

2ej1129



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

**"ESTANDARIZACION E IMPLEMENTACION DEL BIOENSAYO
DE LA TIROTROPINA HUMANA (hTSH) EN RATA"**

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

P r e s e n t a

JOSE GERARDO PERERA MARIN

J U R A D O

Presidente: Biol. Leonor Peralta Zamora

Secretario: Dra. Elvira Estrada Flores

Vocal: MVZ Mario Soriano Bautista



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

INTRODUCCION

MATERIAL

- A) Biológicos
- B) Cristalería
- C) Aparatos y Equipo
- D) Reactivos
- E) Dieta

METODOLOGIA

- A) Preparación de los animales para el bioensayo
- B) Obtención y manejo de las muestras biológicas
- C) Preparación del material radioactivo
- D) Preparación de los estándares de origen animal:
 - NIAMDD-OTSH-9
 - NIAMDD-TSH-B6
- E) Preparación de polvos problemas
- F) Técnica
- G) Conteo y Análisis de los Datos
- H) Análisis Estadístico de los Datos
- I) Determinación de la Actividad Biológica de las Preparaciones
- J) Estandarización de la Técnica:
 - Sensibilidad
 - Especificidad
 - Precisión
 - Exactitud

RESULTADOS

- A) Sensibilidad
- B) Especificidad
- C) Precisión
- D) Exactitud

DISCUSION

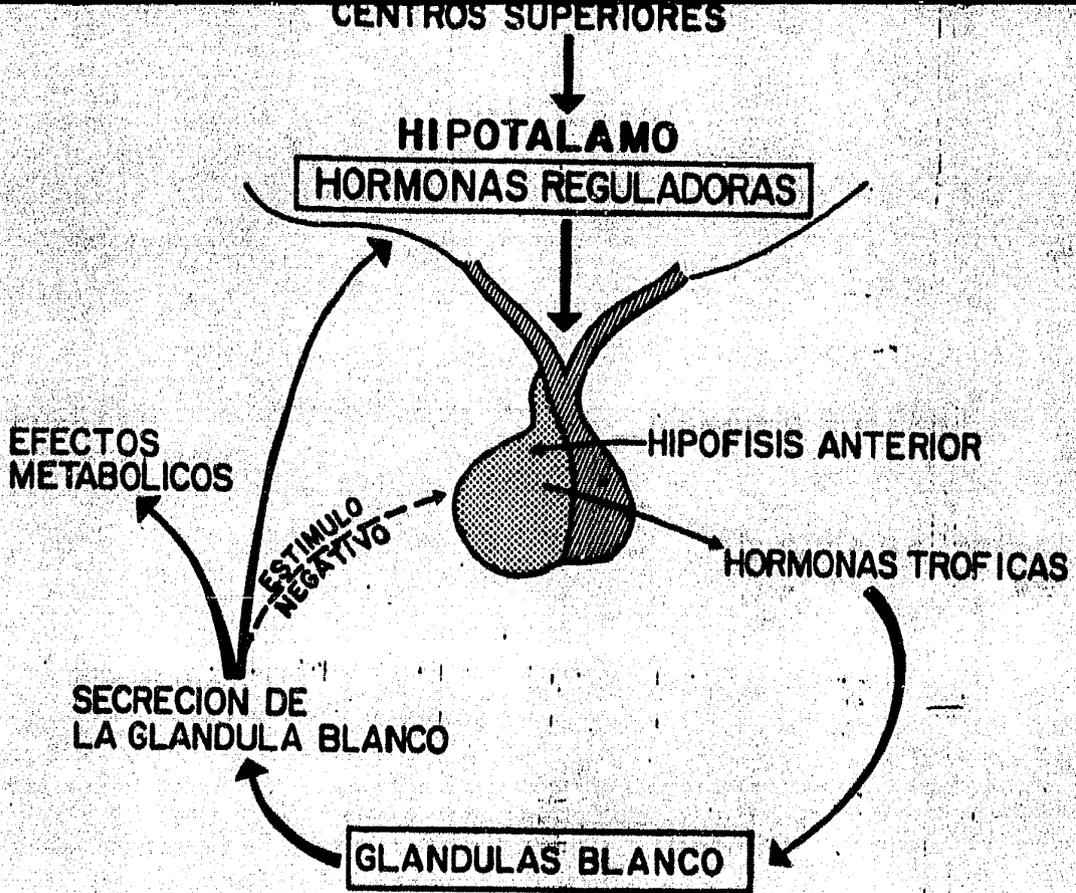
RESUMENES

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION

La hormona estimulante de la tiroides humana (hTSH) es una de las tres glicoproteínas del lóbulo anterior de la hipófisis. Como grupo, estas moléculas protéicas son de difícil extracción, purificación y caracterización química. Derivadas de la fracción cruda de glicoproteínas, que se obtiene por cualquiera de los métodos empleados para la extracción simultánea de las hormonas de la hipófisis, su separación conlleva múltiples problemas que dependen de la similitud de las propiedades físico-químicas de las tres glicoproteínas. En lo que se refiere a la hTSH, es la hormona que en cualquiera de los procedimientos de extracción y purificación conocidos se obtiene al final de los mismos; además, su permanente acompañante es la hormona luteinizante (LH), de la cual es muy laborioso separarla, y raras veces se logra (1). Las TSH más estudiadas hasta 1973 fueron las de origen animal, y la humana a partir de esa fecha ha sido el objeto de mayores estudios para lograr su más alta purificación y con ella conocer las verdaderas características físico-químicas de la hormona (2,3). Aunque todavía no se conozca la estructura completa de hTSH, si se han podido determinar con bastante aproximación algunas de sus características, tales como que se trata de una glicoproteína, cuyo peso molecular es de 28 000 daltones, con radio de Stokes de 27.5 Å (gel-filtración), altamente heterogénea, cuyos puntos isoeléctricos van de pH 5 a 9 (isoelectrofocusing), que está constituida por todos los aminoácidos (220), excepto el triptofano y que contiene un 15% de carbohidratos. Está constituida por las subunidades: α y β ; aparentemente la subunidad α



RELACIONES ENTRE LAS HORMONAS REGULADORAS DEL HIPOTALAMO Y LAS GLANDULAS BLANCO, A TRAVES DE LAS HORMONAS TROFICAS DE LA HIPOFISIS.

FIGURA 1

es común a las otras glicoproteínas (LH y la estimulante del folículo, FSH), mientras que la β es diferente entre ellas y les confiere la especificidad de su acción biológica e inmunológica.

La hormona se sintetiza en las células basófilas (de las clasificaciones iniciales) (4) de la hipófisis ó de células cromóforas en las recientes y cuya característica al microscopio electrónico es la abundancia de microtúbulos (5): dicha síntesis se realiza bajo la acción de la hormona liberadora de TSH, abreviado como TRH (thyrotrophic releasing hormone). Su acción se ejerce sobre las células de la glándula tiroidea, induciendo a través de la acción del AMP cíclico la síntesis de las hormonas tiroideas (tiroxina, T_4 y triyodotironina, T_3) y su liberación a la sangre; interviene en la reabsorción del coloide (tiroglobulina) y como se dijo antes, en la secreción de las hormonas tiroideas. Una de sus más importantes acciones es estimular la bomba del yodo a través de mecanismos dependientes de DNA-RNA y la específica organificación de las yodotironinas. Además, incrementa en la glándula la oxidación de la glucosa, el consumo de oxígeno, la síntesis de fosfolípidos, el transporte de aminoácidos y la síntesis de DNA-RNA y proteínas (6). La acción de las hormonas tiroideas liberadas al torrente circulatorio se ejerce en todo el organismo, interviniendo en los procesos de diferenciación y crecimiento celular. Al ejercer su acción, las hormonas tiroideas se transforman a metabolitos inactivos, lo que conduce a que la concen-

tracción real de T_4 y T_3 en la sangre, disminuyen. Esta disminución del nivel hormonal en la sangre permite la liberación de la TRH en el hipotálamo, el que a su vez estimula de hipófisis para sintetizar TSH, que liberada a la sangre, de nuevo ejerce su acción sobre la tiroides. Todo el proceso es un claro ejemplo de lo que en endocrinología se conoce como mecanismo de retroalimentación con el que se regula el sistema endocrino. Estos mecanismos de regulación hormonal, que comparten las hormonas del lóbulo anterior de la hipófisis se muestran en la figura 1.

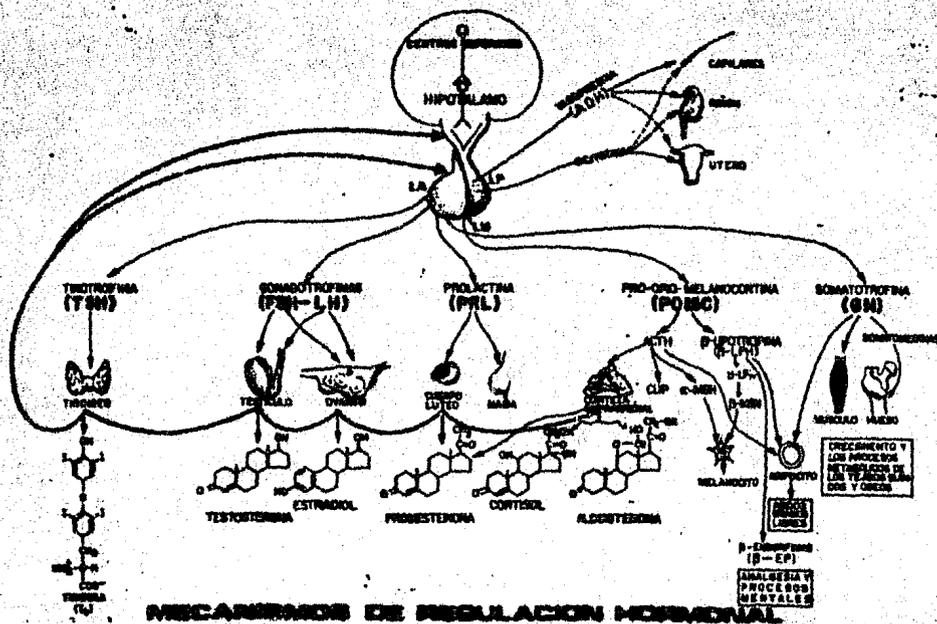


Figura 2

En la figura 2 se detallan los mecanismos para todas las hormonas conocidas de la hipófisis de las cuales, los correspondientes a la TSH sólo se ejemplifican con la producción de la T₄.

Cuando se extrae y purifica una hormona, el procedimiento se acompaña de técnicas de caracterización, que permiten detectar el grado de purificación que se ha alcanzado. En general, estas técnicas sirven para definir características físico-químicas pero las más importantes son aquellas que permiten conocer la actividad inmunológica y la biológica, propias de cada proteína. Mientras que para la primera existen múltiples procedimientos (7) de mayor o menor sensibilidad y que en los últimos años se han sustituido por el radioinmunoanálisis (RIA) (8) (lo que permite manejar numerosos problemas simultáneamente y tener además una extraordinaria sensibilidad a nivel de pg ó ng), para la segunda ó sea su actividad biológica, existen dos ó tres bioensayos en animal completo para cada hormona (9).

Para el caso especial de la TSH se han ideado numerosas técnicas (10), de las cuales la de McKenzie (11) permanece como la más adecuada para cuantificar la actividad biológica de la TSH.

Aunque la técnica original (11) se realizó en ratones, algunos autores (10) han utilizado otros animales para demostrar la capacidad que la tiroides tiene de captar y concentrar yodo radioactivo y liberarlo a la sangre periférica bajo la acción de la TSH.

Aparentemente, la rata ha sido poco favorecida para esta prueba, aunque Lamberg (12) cita que Wolff en (1951) y Botkin & Jensen en (1952) pudieron observar la liberación del ^{131}I a la sangre, 2 a 4 horas después de una inyección intraperitoneal de TSH.

En el Banco de Hormonas Protéicas del IMSS fue necesario desarrollar la técnica de McKenzie en ratas (10) porque era el único animal de laboratorio disponible para desarrollar un bioensayo de la TSH que se extrae y purifica en el propio laboratorio. Cuando se aprendió todo lo relacionado al isótopo, a las condiciones del animal de experimentación, a las condiciones ambientales y los efectos de la TSH en relación al tiempo, dosis y vía de administración (10) era necesario estandarizar la técnica para incorporarla a la rutina de los bioensayos.

El propósito de este trabajo es presentar los resultados de dicha estandarización, la que se realizó con 1380 ratas prepúberes, durante un período que comprendió de mayo de 1982 a marzo de 1983.

M A T E R I A L

A) Biológico:

- Cepas endogámicas, ratas machos Sprague Dawley y/o Long Evans, de 23 a 26 días de edad, con peso corporal de 60-100 g.
- Sangre venosa 0.5 ml, dos veces por animal.
- La tiroides.
- Estándar NIAMDD-oTSH-9 con actividad biológica de 7.54 UI/mg.
- Estándar NIH-TSH-B6 con actividad biológica de 2.54 USP/mg.
- Productos hipofisarios:
 - 45h₁ Extracto glicoprotéico (LH-FSH-TSH)
 - 39h₁ Extracto glicoprotéico (LH-FSH-TSH)
 - 39h₁-CM-2 (LH-TSH)
 - 45h₁-CM-2-DEAE-2 (TSH)
 - IMSS hGH Lote 9
 - 48b₁-CM-2-DEAE-2b (bLH)
 - 48b₁-CM-2-DEAE-2c (bFSH)

Las siglas utilizadas para cada producto corresponden a la nomenclatura utilizada para identificar cada uno de los productos; el número inicial es el correspondiente al lote experimental; h= humano, b= bovino, o=ovino, S₁= primer sobrenadante o extracto crudo que contiene las tres glicoproteínas conocidas (FSH= Follicle Stimulating Hormone-Hormona Estimulante del Fo-

lículo; LH= Luteíning Hormone-Hormona Luteinizante; TSH= Thyroid Stimulating Hormone-Hormona Estimulante del Tiroides. Se utilizan las siglas en inglés que son de uso universal).
CM= Carboximetilcelulosa; DEAE= Dietiletilaminocelulosa; 2= Segundo pico de la cromatografía correspondiente; a,b,c= Fracción de un mismo pico. GH= Growth Hormone-Hormona de Crecimiento; 9= Lote N° 9, de uso clínico.

B) Cristalería:

- Tubos de ensayo de 10 x 75 mm, 16 x 150 mm, 13 x 100 mm.
- Vasos de precipitado de 50, 100, 250 y 1000 ml.
- Frascos ampula color ámbar de 100 ml.
- Pipetas de 1, 5, 10 y 20 ml.

C) Aparatos y Equipos:

- Microscopio estereoscópico Carl Zeiss, modelo 6257.
- Balanza Analítica Mettler, con sensibilidad 1 mg.
- Balanza Analítica Mettler, con sensibilidad 0.1 mg.
- Balanza de 500 g, con escala dietética marca Chantillon.
- Balanza Chyo Júpiter, con capacidad de 1200 mg.
- Contador de Centelleo para radiaciones gamma, automático Nuclear Chicago, modelo 4230.
- Calibrador de dosis, radiaciones gamma, Nuclear Chicago.
- Contador de centelleo, System Automático, modelo 1185.
- Calculadora Hewlett-Packard HP-97.

Equipo:

- Tijeras rectas.
- Pinzas de disección y bisturí.
- Jeringas desechables de 2.5 ml y/o 3 ml con agujas hipo dérmicas de 21 x 32 mm.
- Jaulas de acrílico con rejillas de acero, modelo Jumbo.
- Marcador de roedores.
- Algodón y gasas.

D) Dieta:

- Purina Laboratorios Chow (0.5% de la sal yodada).
- Extracto de tiroides (Armour 0.065 g, equivalente a 0.130 mg de iodo en combinación orgánica).
- Mafz quebrado.
- Caseinato de calcio clave 1930, cuadro básico del IMSS.

Proteínas	88%
Grasas	2%
Salas Minerales	4%
Humedad	5%
Calcio	2%
Fósforo	0.8%
Sodio menor de	0.1%

M E T O D O L O G I A

A) Preparación de los animales para bioensayo:

Los animales se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura (22°C), ciclo de luz (7 am a 7 pm) y alimento especial hasta la realización del bioensayo. El alimento consistió en una dieta pobre en yodo que se preparó de la siguiente manera: Caseinato de calcio en 18.86% y un 81% de maíz quebrado.

El agua que ingirieron "ad libitum" contenía 130 mg de extracto total de tiroides por cada 100 ml de agua destilada.

A las 72 h a partir del inicio de la dieta se aplicaron por vía subcutánea 5 μ Ci de la solución de Na ¹³¹I en 0.5 ml de solución salina fisiológica por animal y 48 h después se realizó el bioensayo propiamente dicho.

PREPARACION DE RATAS PARA BIOENSAYO

<u>Tiempo:</u> 0 a 72h	Suministro de la dieta pobre en yodo y extracto total de tiroides en el agua ingerida
a las 72h	Aplicación subcutánea de 5 μ Ci de la solución de ¹³¹ I por animal
hasta las 120h	Tiempo necesario, para el equilibrio metabólico de yodo marcado

B) Obtención y manejo de las muestras biológicas:

Se forman grupos de 5 animales cada uno; distribuidos por peso promedio semejante. Cada roedor se mantuvo bajo ligera anestesia de éter para extraer por punción intracardiaca 0.5 ml de sangre (con jeringa desechable), la que se colocó en tubos de ensayo de 10 x 75 mm para aforar con solución salina fisiológica a un volumen de 1 ml cada tubo; inmediatamente después se aplicó la dosis de TSH designada a cada animal en cada grupo, por vía subcutánea o intraperitoneal en un volumen de 0.5 ml de solución salina. Tres horas después se obtuvo una segunda muestra de sangre de 0.5 ml por la misma vía la cual se llevó a un volumen de 1 ml cada tubo. Por último, se sacrificaron los animales con hielo seco para extirpar la tiroides, obtenida de la siguiente manera: Se hizo una incisión de la piel longitudinalmente a la altura del cuello, separando así la piel y glándulas salivales quedando al descubierto músculos que rodean a la tráquea y la tiroides; éstos se separan longitudinalmente y se sujetan con un separador de ojos, quedando así tráquea y hueso iodeo al descubierto; por último, se corta el segmento de tráquea que comprende hueso iodeo y 3 ó 4 anillos traqueales a los cuales se encuentra adosada la glándula tiroides; el segmento traqueal se lava en agua corriente para eliminar la contaminación de radioactividad y la tiroides se coloca en tubos de 10 x 75 mm para conteo "in vitro".

C) Preparación del material radioactivo:

El Departamento de Medicina Nuclear del Hospital General del Centro Médico Nacional, proporcionó el Na ¹³¹I en solución concentrada, que es la misma que se utiliza para diagnóstico clínico; dicha solución se diluyó con solución salina fisiológica a una concentración de 10 µCi/ml; se elaboraron alícuotas de 0.5 ml (5 µCi) a las cuales se les midió su actividad en c.p.m. en el contador de dosis Nuclear Chicago, para posterior aplicación a cada animal utilizado en el bioensayo.

D) Preparación de los estándares de origen animal:

NIAMDD-oTSH-9: Dicho estándar tiene una actividad de 7.5 UI/mg (1st-bTSH) 53-/11, el que se preparó de la siguiente manera: Se prepararon 100 µg (750 mUI) de polvo y se disolvieron en 15 ml de solución salina; de esta solución se formó un primer grupo de 25 alícuotas de 0.5 ml (25 mUI), un segundo grupo de 160 µl (8 mUI) y por último un tercer grupo de alícuotas de 50 µl (2.5 mUI).

Nº de fracciones	µl	mUI	ng
25	500	25	3250
12	160	8	1040
10	50	2.5	325

NIH-TSH-B6: Con actividad biológica de 2.54 USP/mg, del cual se pesaron 100 μg (2.54 mU) de polvo y se disolvieron en un volumen de 10 ml de solución salina fisiológica; de esta solución se formaron 50 alícuotas de 200 μl (5.08 mU) cada una.

Todas las alícuotas se congelaron con acetona y hielo seco y se conservaron a -23°C hasta su utilización.

E) Preparación de los polvos problema:

Los polvos utilizados durante el trabajo experimental se prepararon de la manera siguiente: En el caso de tener una solución (que generalmente proviene de una cromatografía de intercambio iónico) se le determinó la densidad óptica en contra del amortiguador con que se eluyó y el resultado se leyó en una curva de albúmina humana (0.15% μg a 1000 μg) leída a 280 nm, obteniendo así la cantidad aproximada de proteína por ml de solución.

En el segundo caso, cuando el producto estaba liofilizado, se pesó 1 mg de polvo, se disolvió en 1 ml de solución salina fisiológica y la solución se leyó contra la solución salina y el resultado se obtuvo en la misma curva humana obteniendo así la cantidad de proteína por mg de polvo.

Ya que la dosis aplicada se hace por concentración de proteína, conviene señalar desde ahora su concentración en los diferentes productos.

El tiempo inicial de bioensayo es la primera toma de sangre periférica en un volumen de 0.5 ml por animal; inmediatamente después se aplica el estándar, en dosis de 13 ng (0.1 mU), 26 ng (0.2 mU), 53 ng (0.4 mU) en un volumen de 0.5 ml de solución salina, por vía subcutánea o intraperitoneal; por último, el problema a dosis de 25 ng (0.2 mU), 50 ng (0.4 mU), 100 ng (0.8 mU).

La segunda toma de muestra se toma a las tres horas después de aplicado el estímulo y se sacrifica al animal para extirpar la tiroides.

Todas las muestras biológicas son llevadas a conteo "in vitro" en el contador de centelleo Nuclear Chicago. El cuadro I resume lo anterior.

G) Conteo y análisis de los datos.

NIAMDD-OTSH-9

Dosis	0.10		0.20		0.40		Control	
Nº del animal	Sp ₁	Sp ₂	Sp ₁	Sp ₂	Sp ₁	Sp ₂		
1	591	824	439	711	190	924	259	399
2	827	700	242	924	430	1653	641	704
3	702	467	254	1021	338	1269	475	364
4	587	1247	442	704	714	734	695	887
5	658	1364	233	873	563	1348	497	719
X	613	920	322	847	447	1186	513	615
Δ ₁	307		525		739		102	
Δ ₂	233		272		734		140	
	-127		682		1223		63	
	-235		767		931		-111	
	660		262		20		192	
	706		640		785		222	
Σ	1237		2623		3693		506	

BIOENSAYO DE TSH

(Mc Kenzie)

LIBERACION A LA SANGRE PERIFERICA DE LAS HORMONAS TIROIDEAS

MARCADAS CON ¹³¹I BAJO EL ESTIMULO DE LA TSH

	Nº de animales por grupo	Dosis de ¹³¹ I (μ Ci/animal)	1ª toma sangre periférica (mI/animal)		15 min después dosis de TSH por animal		A las 3h 2ª toma de sangre (mI/animal)	CONTEO
					ng	mU		
Control	5	5		0.5	0	0	0.5	
Estándar	5	5	48 horas después	0.5	13	0.1	0.5	
	5	5		0.5	26	0.2	0.5	
	5	5		0.5	53	0.4	0.5	
Problema	5	5		0.5	25	0.2	0.5	
	5	5		0.5	50	0.4	0.5	
	5	5		0.5	100	0.8	0.5	

Sp_1 = 1er. sangrado (c.p.m.)

Sp_2 = 2º sangrado (c.p.m.)

\bar{X} = La media obtenida pro grupo en cada sangrado

Δ_1 = La diferencia de las medias por grupo

Δ_2 = La diferencia en c.p.m. decada sangrado/animal

Σ = Suma total en c.p.m.

H) Análisis estadístico del bioensayo:

Todo el análisis estadístico se realizó en un programa manual diseñado en la propia unidad (13) tanto para bioensayo balanceados de 2 + 2, como 3 + 3 y cuyos esquemas (1 y 2) se presentan a continuación:

I) Determinación de la actividad biológica de las preparaciones:

La determinación de la actividad biológica de las hormonas purificadas o de preparaciones crudas (en las que se sabe que existe la TSH pero aún contaminada con otra hormona), se obtiene por medio de un ensayo balanceado de 2+2 ó de 3+3, entendiéndose por esto, dos dosis del estándar y dos del problema para el primer caso y tres dosis para cada uno en el segundo caso. En cualquiera de ambos diseños, hay un grupo control que recibe la solución salina fisiológica únicamente.

La condición esencial del bioensayo es mantener la misma relación de cambio de dosis en el estándar y el problema (ejemplo: 10, 20, 40 ng del estándar y 15, 30, 60 ng del problema; la relación de cambio en ambos casos es de dos. No se debe tener en el estándar

CONTROL	ESTÁNDAR PROBLEMA			
	S ₁	S ₂	U ₁	U ₂
DOSIS				
TOTAL				
C	T	W	X	Y
Efecto en % $\frac{100(T-C)}{C}$				

BIOENSAYO 2+2 BALANCEADO

tipo: fecha: n° sec:

n° de animales/grupo: n = _____ I = $\log(s_2/s_1) =$ _____

actividad del estándar A = $\frac{mU}{\mu g}$ B = $\sqrt{s_1 \cdot s_2 / U_1 \cdot U_2} =$ _____

D = W + X - Y - Z = _____ G = $(\sum T)^2 / 4n =$ _____

E = W + Y - X - Z = _____ H = $\sum T^2 / n =$ _____

F = W + Z - X - Y = _____ K = $\sum X^2 =$ _____

ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente de Variación	grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F	P
Tratamientos	3	N = H - G = _____	N/3 = _____		
Preparaciones	1	D ¹ = D ² /4n = _____	D ¹ = _____		
Regresión	1	E ¹ = E ² /4n = _____	E ¹ = _____		
Paralelismo	1	F ¹ = F ² /4n = _____	F ¹ = _____		
Error	4(n-1) = 16	R = Q - N = _____	S ² = _____		
Total	4n-1 = 19	Q = K - G = _____			F(3, 16) = 3.24

$$t = t_{0.05, 4(n-1)} = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$L = \left(\frac{1}{b(1-g)} \right) \sqrt{\frac{s^2}{n} \left[\left(\frac{D}{E} \right)^2 + (1-g) \right]}$$

$$= \underline{\hspace{2cm}}$$

$$M = DI / E = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$M_1 = M - L = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$M_2 = M + L = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$\text{Pendiente combinada, } (-E)/2nI = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$\text{Varianza de la pendiente: } S^2/nI^2 = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$\text{Criterios de validez: } \begin{cases} S/b = \\ t^2 v(b)/b^2 = \end{cases}$$

$$\text{Potencia relativa del problema: } AB \cdot 10^M = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$\text{Intervalo de confianza: } \begin{cases} AB \times 10^{M_1} = \\ AB \times 10^{M_2} = \end{cases}$$

b =	_____
v(b) =	_____
$\lambda =$	_____
g =	_____
P =	_____ mU/ μ g
P ₁ =	_____ mU/ μ g
P ₂ =	_____ mU/ μ g

una relación de cambio de 2 y en el problema de 3: 10, 20, 40, vs 10, 30, 90).

El número de animales por punto debe ser de cinco, aunque ocasionalmente puede ser de cuatro; cuando un animal se pierde durante el bioensayo, se promedian los resultados de los cuatro restantes y el resultado se introduce como el quinto.

La potencia biológica de las hormonas con el 95% de límites de confianza se obtiene del análisis de varianza de los contrastes para las fuentes de variación: tratamientos, preparaciones, regresión, paralelismo y error experimental, si se trata de un bioensayo 2+2 y si es uno de 3+3 se agregan la curvatura y la curvatura opuesta.

Los criterios de validéz o confiabilidad son: la λ que es un índice de precisión del bioensayo y que se obtiene de dividir la desviación estándar entre la pendiente de la línea de respuesta al logaritmo de las dosis.

El otro criterio de validéz es la (g) que es un índice de significancia de la pendiente.

J) Estandarización de la técnica:

Ya que el propósito de este trabajo es la estandarización de la técnica, los estímulos utilizados para el estudio fueron estándares ovino: NIAMDD-oTSH-9 y el bovino NIH-TSH-B6, proporcionados por los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos.

Sensibilidad: Se determinó con 12 ensayos de 20 ratas cada uno, distribuidos en cuatro grupos cada uno; es decir, un grupo control y tres grupos para las dosis del estándar. El rango de las dosis estudiadas se fraccionó debido a que no era posible manejar simultáneamente el gran número de animales necesarios para las dosis estudiadas.

El primer grupo de tres ensayos recibió dosis de 0.05, 0.1, 0.2 mUI; el segundo grupo de cinco ensayos recibió dosis de 0.1, 0.2, 0.4 mUI y el tercer grupo de 4 ensayos recibió dosis de 0.2, 0.4, 0.8 mUI, del estándar.

Los resultados se expresaron en porcentaje de liberación de ^{131}I a la sangre periférica y se graficaron con el log de las dosis.

Especificidad: Se determinó con cuatro polvos hipofisarios, dos de los cuales eran de origen humano y dos de origen bovino, cuyas características biológicas y de concentración de proteínas se presentan a continuación:

Producto (clave)	Actividad biológica de:	Concentración de Proteínas ($\mu\text{g}/\text{mg}$ ó ml)
45hS ₁ -CM-2-DEAE-2	hTSH	180
48hS ₁ -CM-2-DEAE-2b	bLH	369
48hS ₁ -CM-2-DEAE-2c	bFSH	511
IMSS-hGH-9	hGH	990

Cada producto se utilizó a las dosis de 25, 50 y 100 ng, que corresponden en masa a las de 26, 53 y 106 ng del estándar; el ensayo para cada producto se hizo con 20 ratas, 15 para las dosis del problema y cinco para el control. Los resultados se presentan comparativamente en porcentaje de liberación del ^{131}I a la sangre periférica.

Precisión: La reproducibilidad de la técnica se estudió durante los meses de agosto de 1982 a febrero de 1983, con un total de 22 ensayos. Para cada uno se utilizaron 20 animales distribuidos de la manera ya mencionada. El estándar se aplicó en dosis de 0.1, 0.2 y 0.4 mUI. Y los resultados se presentan en forma gráfica y los correspondientes al análisis estadístico: promedio (\bar{X}), desviación tipo ó estándar (s), error estándar (ES), pendiente (b), e índice de precisión (λ : λ). También los datos se presentan en su transformación semilogarítmica y logarítmica gráfica, así como con datos estadísticos.

Exactitud: El diseño experimental y el concepto de exactitud de un ensayo de naturaleza química, cambian en el bioensayo, debido a la enorme variabilidad del mismo. El concepto de que tan cercano está el valor experimental del "real", se sustituye por los criterios de validez (λ) y (g). El primero es también un índice de precisión y el segundo corresponde a la significancia de la pendiente. Debe señalarse que estos parámetros sólo se obtienen en el bioensayo completo; el análisis de varianza para los contrastes de tratamientos, preparaciones, regresión, paralelismo y curvaturas en su caso, con el del error experimental propor-

cionan la probabilidad estadística de la influencia que cada factor tiene en el ensayo mismo. Si la λ es menor de 0.30 y la "g" menor de 1, se puede obtener la potencia del problema con sus límites de confianza al 95%.

Para la realización de esta prueba se utilizaron cuatro productos, de dos diferentes lotes humanos, cuyo grado de purificación era también diferente. Para el estudio completo se utilizaron 595 ratas, distribuidos en 35 animales por bioensayo; el número de experimentos para cada polvo aparece en la tabla correspondiente de resultados. Para ilustrarlos también se presentan en forma de gráficas. Los resultados se presentan como el promedio del número de ensayos y el análisis estadístico se hizo con los programas manuales ya mostrados.

R E S U L T A D O S

Sensibilidad: La primera sección de la figura 3, muestra que las dosis de 0.05 mUI del estándar ovino (NIAMDD-OTSH-9) no tiene ningún efecto sobre la liberación del ^{131}I de la tiroides, mientras que las de 0.1 y 0.2 mUI son claramente efectivas; la dosis de 0.1 libera del 5 al 12.5% de la radiactividad presente en la glándula y la de 0.2 libera del 20 al 54%. En la segunda sección, se confirma que el efecto de la dosis de 0.1 alcanza el 15%, la de 0.2 es de la misma magnitud obtenida en la primera sección y que la de 0.4 ya no rebasa los niveles de la 0.2 mUI.

En la tercera sección se observa que la dosis de 0.2 no tuvo efecto en uno de los cuatro ensayos; que la dosis de 0.4, aunque siempre positiva y mayor que la de 0.2, es en conjunto de menor magnitud que la observada en la sección dos. Además, el efecto de dosis de 0.8 mUI, aunque siempre positiva, es claramente inferior a la dosis de 0.4 mUI.

Estos datos indican que la dosis mínima del estímulo aplicado es de 0.1 mUI y la máxima útil es de 0.4 mUI.

Por otro lado, debe hacerse notar que la diferencia de la magnitud de la respuesta entre dos dosis, es en general, mayor del 15%, a excepción de dos casos (sección dos) en los que la diferencia es menor del 5% entre las dosis de 0.1 a 0.2 mUI.

El otro dato importante en el estudio de la sensibilidad es que

RESPUESTA A LAS DOSIS DE TSH

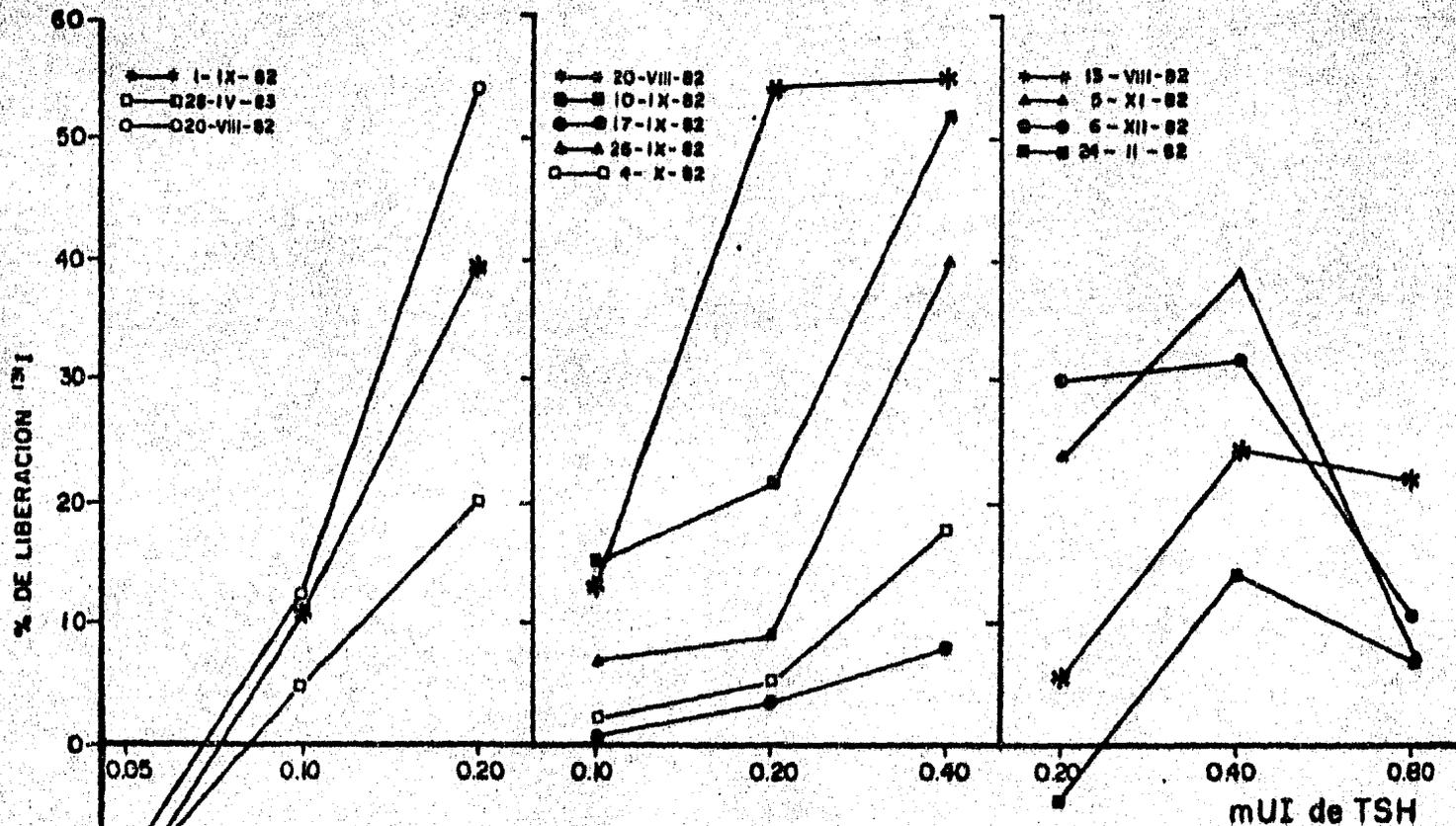


FIGURA 3: ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD CON EL NIAMDD-OTSH-9.

los ensayos se verificaron a lo largo de ocho meses, lo que obligará a hacer consideraciones de la respuesta del animal a un mismo estímulo, en los diferentes periodos del año.

Los resultados obtenidos permiten dejar establecido que la sensibilidad del bioensayo es de 0.1 mUI y que hay linealidad de la respuesta hasta 0.4 mUI del estándar de TSH.

Especificidad: Los resultados de comparar el efecto de una TSH humana con la GH del mismo origen, así como con la LH y la FSH de origen bovino, a dosis iguales, están graficados en la figura 4. Es evidente que la TSH humana tiene una respuesta positiva proporcional al aumento de las dosis; que la GH humana, por el contrario, disminuye la respuesta conforme se acrecienta la cantidad de hormona aplicada, y que la FSH y la LH bovinas no son un estímulo específico para la liberación del ^{131}I de la tiroides a la sangre periférica.

Precisión: La figura 5 muestra las respuestas para cada dosis de los 23 ensayos que se realizaron entre los meses de agosto de 1982 a febrero de 1983. Las respuestas se grafican en porcentaje de liberación del ^{131}I .

Si se analiza la figura en conjunto, sólo puede decirse que hay una tendencia creciente en la magnitud de la respuesta, conforme aumenta la dosis; pero si se analiza cada uno de los ensayos, se encuentra que solo 16 tuvieron una respuesta proporcional a las dosis; el número 9 respondió inversamente proporcional a ellos;

ESPECIFICIDAD

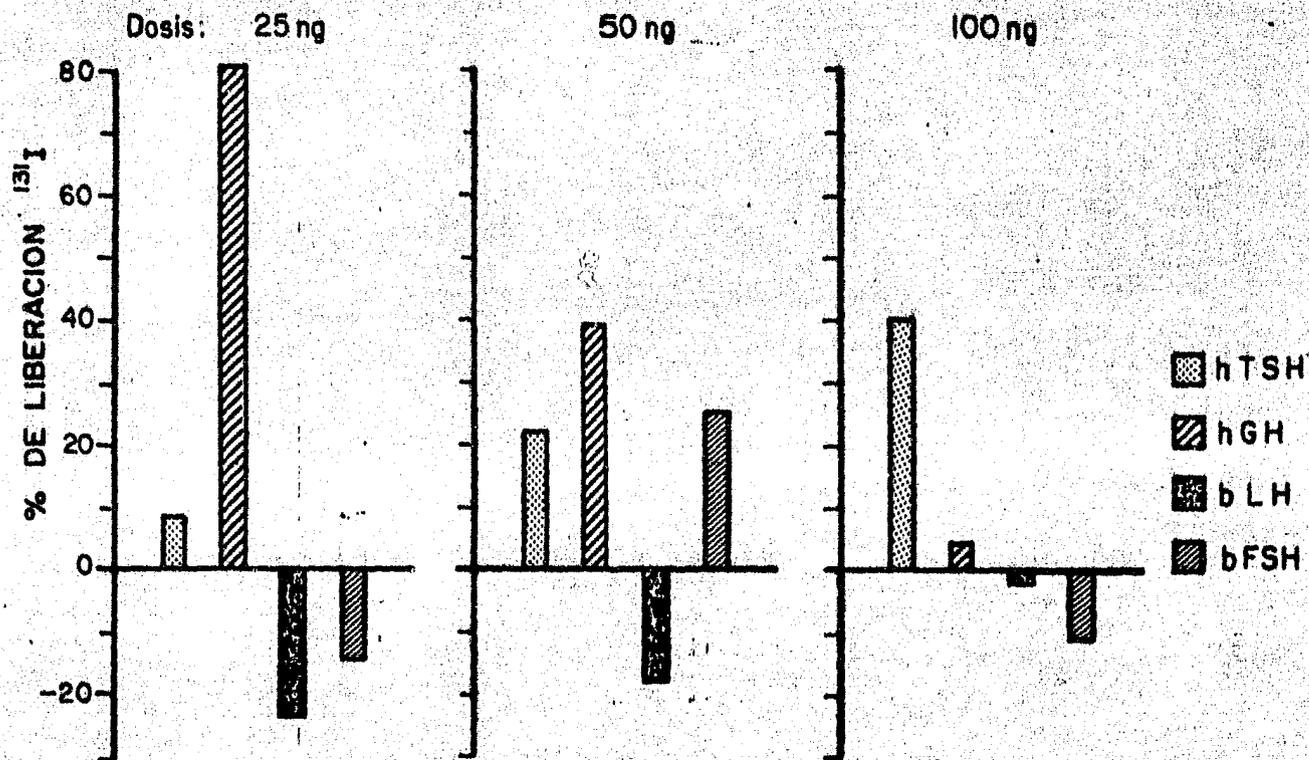


FIGURA 4

PRECISION

St: NIAMDD - oTSH-9

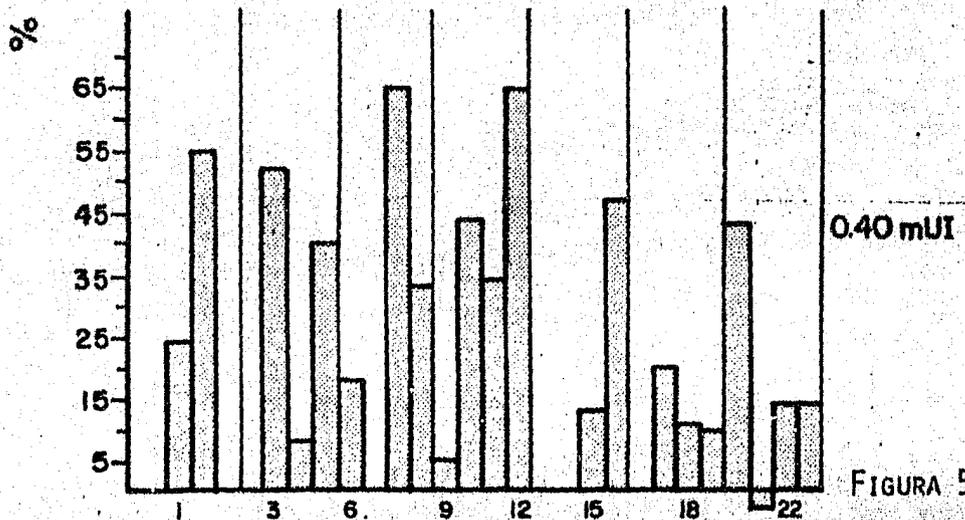
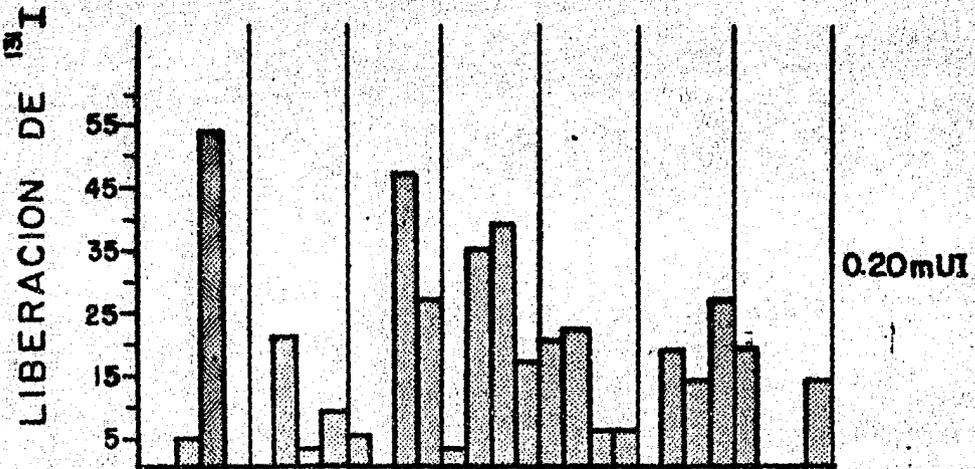
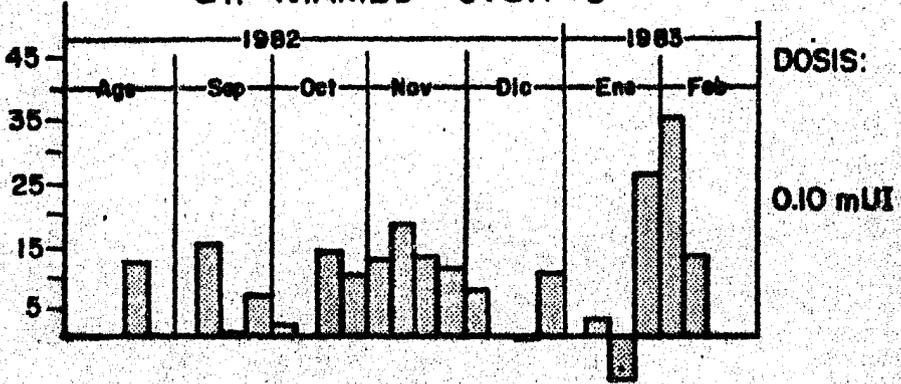


FIGURA 5.

el 16 y el 20 disminuyeron su respuesta en la dosis intermedia; en la tercera dosis, se deprime la respuesta del 19 y aún más, el 18, 21 y 22 muestran respuestas negativas en alguna de las dosis.

Si se eliminan los ensayos con respuestas negativas y se analizan globalmente las respuestas para cada dosis, con los datos originales de las cpm de los resultados, sin transformación porcentual, se encuentra lo siguiente:

<u>Dosis (mUI de TSH):</u>	<u>0.1</u>	<u>0.2</u>	<u>0.4</u>
\bar{X} :	291	725	1050
s :	470	726	1141
ES :	100	151	238
CV :	120.2	100.0	108.6

La media (\bar{X}) aumenta proporcionalmente con las dosis, pero las medidas de dispersión son enormes.

Si se analizan los resultados de los cinco ensayos de 0.1, 0.2 y 0.4 mUI de la sensibilidad, de los cuales se sabía que todas eran respuestas positivas y proporcionales a las dosis señaladas, tampoco disminuyeron las dispersiones:

<u>Dosis (mUI de TSH):</u>	<u>0.1</u>	<u>0.2</u>	<u>0.4</u>
\bar{X} :	425	917	1693
s :	551	1021	1709
ES :	246	417	698
CV :	129.6	111.3	100.9

La dispersión de los resultados obliga a hacer transformaciones, tanto en las dosis como las respuestas.

En la Tabla I que corresponde a los datos transformados de los ensayos que tuvieron respuestas progresivamente crecientes a las dosis, se tiene en el lado izquierdo la transformación semilogarítmica, en la que la transformación log es para las dosis; los datos anotados corresponden a las diferencias de las cpm entre las dos muestras de sangre, para cada dosis ensayada. En el lado derecho, la transformación es log, tanto para las dosis como para las respuestas. Lo que se advierte es que con la transformación log-log, las medidas de dispersión disminuyen en forma muy importante.

Si se analizan los resultados correspondientes únicamente a los ensayos con respuesta errática, en la Tabla II que tiene la misma distribución que la anterior, se observa que lo señalado para la tabla previa se repite en esta; otra vez, debe señalarse que los datos de dispersión son mucho menores que en la primera.

Otro dato, que debe anotarse, y que corresponde a las dos tablas de datos, es que la dispersión es mayor en la respuesta a las dosis más pequeñas y que disminuye proporcionalmente conforme aumentan estas, a excepción de la transformación log-log para los ensayos que tuvieron respuestas erráticas, en las cuales el coeficiente de variación es bastante homogéneo.

RESPUESTA CRECIENTE A LA DOSIS

Semi-Log

Log-Log

Fecha	DOSIS			LOG		
	0.10	0.20	0.40	0.10	0.20	0.40
13-VIII-82	-	30	116	-	1.48	2.06
20-VIII-82	190	197	317	2.28	2.29	2.50
10-IX-82	247	525	739	2.39	2.72	2.87
17-IX-82	1	31	60	0	1.49	1.78
26-IX-82	21	405	731	1.32	2.61	2.86
4-X-82	9	29	61	0.95	1.46	1.78
18-X-82	44	169	264	1.64	2.23	2.42
15-XI-82	78	138	190	1.89	2.14	2.28
29-XI-82	70	75	241	1.84	1.87	2.38
13-I-83	36	203	286	1.56	2.31	2.46
22-XI-82	0	216	266	1.89	2.33	2.42
22-XII-82	-	26	54	-	1.41	1.73
24-II-83	-	138	142	-	2.14	2.15
$\Sigma =$	696	2182	3467	15.76	26.48	29.69
$\bar{X} =$	69.60	167.80	266.70	1.576	2.037	2.2838
$s =$	83.94	151.58	226.70	0.697	0.451	0.3744
E.S. =	26.54	42.04	62.87	0.220	0.1251	0.1038
$V =$	7045.20	22977.97	51386.23	0.486	0.203	0.140
C.V. =	119.45	90.30	85.00	44.23	22.10	16.40

Tabla I.- Análisis estadístico de la precisión de los ensayos con respuesta creciente a la dosis, con transformación semilogarítmico y log-log.

RESPUESTA ERRÁTICA EN ALGUNA DOSIS

Semi-Log

Log-Log

Fecha	DOSIS			LOG		
	0.10	0.20	0.40	0.10	0.20	0.40
X-82	173	491	383	2.23	2.69	2.58
XI-82	448	41	58	2.65	1.62	1.76
-XII-82	94	75	340	1.97	1.87	2.53
-I-83	210	259	102	2.32	2.41	2.00
II-83	277	158	438	2.44	2.20	2.64
=	1202	1024	1321	11.61	10.79	11.51
=	240.4	204.80	264.20	2.32	2.518	2.302
=	133.5	180.77	172.40	0.252	0.424	0.396
S. =	59.86	81.06	77.31	0.1130	0.190	0.178
=	17834.30	32679.20	29723.20	0.063	0.180	0.157
V. =	55.50	88.30	65.20	10.86	16.8	17.20

Tabla II.- Análisis estadístico de la precisión de los ensayos con respuesta errática con transformación semilogarítmica y log-log.

Si ahora se comparan gráficamente (fig. 6) los resultados del primer grupo, I (Con respuesta positiva a las dosis) con el grupo total, II (que incluye las de respuestas erráticas), se observa que en su transformación semi-logarítmica, el primero tiene una completa linealidad, que no tiene el segundo.

En cambio, en la transformación log-log (fig. 7) se demuestra que la linealidad corresponde al grupo total (II).

Por lo tanto, una transformación semi-logarítmica es suficiente si se trata de ensayo con respuestas progresivamente crecientes a las dosis. La pendiente de esta recta fue de 328 y su coeficiente de regresión: 0.47.

Para la transformación log-log, la pendiente fue de 1.54 y su coeficiente de regresión fue de 0.32.

La precisión del bioensayo propiamente dicho se verá en el siguiente tema de exactitud.

Exactitud: Aquí, la exactitud se estudió con el estándar ovino a las dosis ya señaladas y dos productos de origen hipofisario humano, con dosis discretamente superiores a las del estándar y conservando la misma relación del cambio de dosis.

Los productos empleados procedían de dos lotes, de los que se esperaba una actividad diferente en razón de los también diferentes procedimientos de almacenamiento de las hipófisis de donde procedían. Las gráficas de la figura 8 corresponden a los

TRANSFORMACION SEMI-LOG

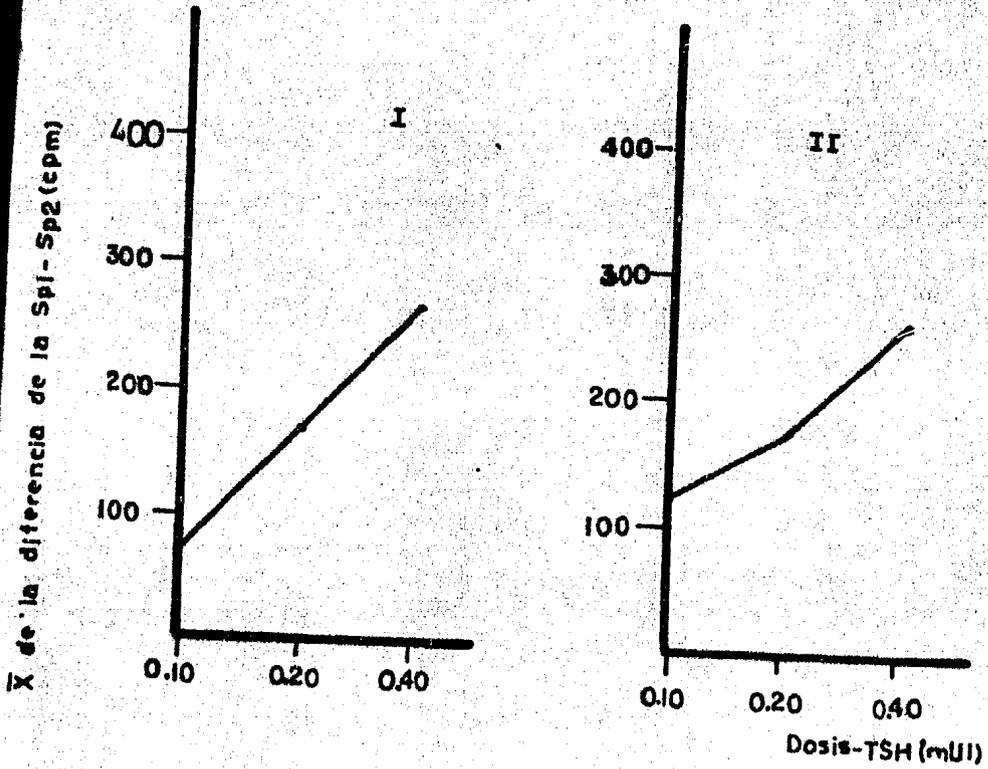


FIGURA 6: TRANSFORMACIÓN SEMILOGARÍTMICA DE I: ENSAYOS CON RESPUESTA PROGRESIVAMENTE CRECIENTE AL AUMENTO DE LAS DOSIS, Y II: EL GRUPO TOTAL (QUE INCLUYE LAS RESPUESTAS ERRÁTICAS).

TRANSFORMACION LOG-LOG

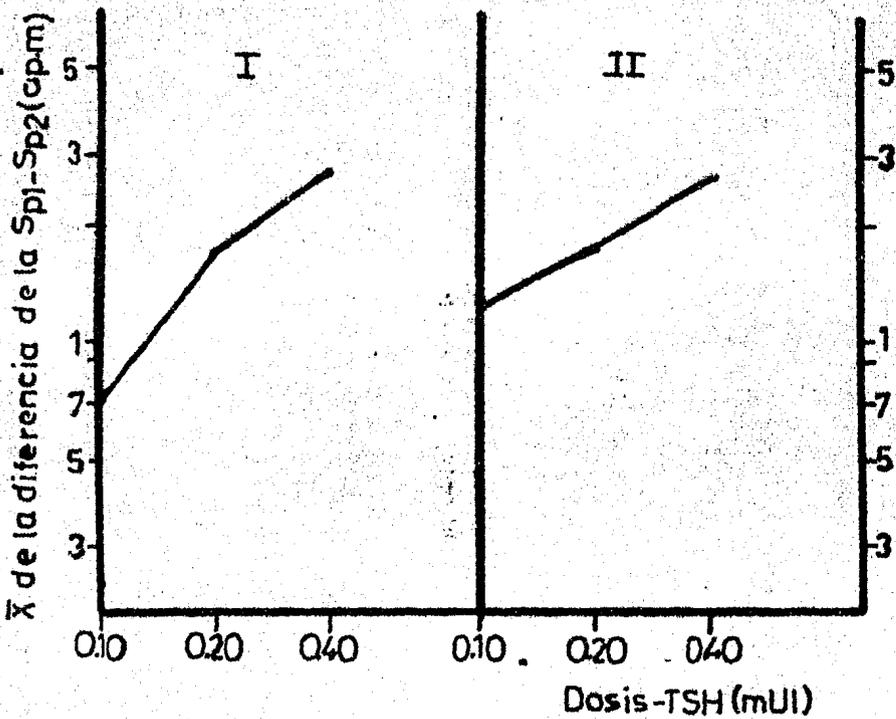


FIGURA 7: TRANSFORMACIÓN LOG-LOG DE:

- I: ENSAYOS CON RESPUESTA PROGRESIVAMENTE CRECIENTE AL AUMENTO DE LAS DOSIS Y
- II: GRUPO TOTAL (QUE INCLUYE EL GRUPO CON RESPUESTAS ERRÁTICAS).

datos agrupados de los resultados de cada dosis, del número de bioensayos practicados para cada producto.

Para tener una mejor idea del fenómeno subyacente (respuesta a la dosis) la respuesta se graficó sin la transformación porcentual, sino como la diferencia de las cpm totales de la sangre periférica, antes y después del estímulo.

En las dos primeras gráficas que corresponden al lote que se esperaba con poca actividad biológica, se advierte que hay un mayor paralelismo (identidad) en el producto más purificado ($39hS_1$ -CM-2) que contiene la TSH aún contaminada con LH, mientras que el producto crudo ($39hS_1$ -Extracto glicoprotéico) que además contiene la contaminación de FSH, la respuesta con paralelismo apenas comienza en la segunda dosis. Además la magnitud de la respuesta es mayor en el producto menos contaminado, que en el extracto crudo.

Lo mismo puede decirse del lote 45, en el que el producto purificado (TSH) no solo tiene una respuesta mayor de magnitud y una linealidad evidente con respecto a un extracto crudo ($45hS_1$ -Extracto glicoprotéico), sino que también mantiene un mejor paralelismo en sus tres dosis, con respecto al estándar.

Cuando se aplica el análisis estadístico a sus resultados numéricos, los cuales se presentan en el Cuadro II, se advierte de inmediato que para los tres primeros productos no hay criterios de validez confiables, por lo que no se pueden determinar sus

EXACTITUD

Nº BIO	P O L V O	POTENCIA mUI	TIPO DE ENSAYO
2	39h ₁ -EXTRACTO GLICOPROTEICO (FSH-LH-TSH)	1.339 $\lambda=0.927$ $g=8.580$	2 + 2
3	39h ₁ + CH - 2 (LH-TSH)	3.559 $\lambda=0.677$ $g=4.550$	2 + 2
4	45h ₁ -EXTRACTO GLICOPROTEICO (FSH-LH-TSH)	4.753 $\lambda=0.577$ $g=3.300$	2 + 2
8	45h ₁ -CH-2-DEAE-2 (TSH)	1.865 $\lambda=0.400$ $g=0.494$	3 + 3
		2.117 $\lambda=0.245$ $g=0.789$	2 + 2
		2.213 $\lambda=0.375$ $g=0.668$	2 + 2

Cuadro II.- Estudio de exactitud con criterios de confiabilidad.

límites de confianza y por lo tanto, la potencia relativa del problema queda invalidada.

En cambio, el producto purificado ($45hS_1$ -CM-2-DEAE-2), que en el diseño experimental de 3 + 3 y en uno de 2 + 2 tiene una lamda discretamente superior al límite permisible, posee una "g" excelente y por lo tanto, la potencia estimada es válida. De las tres estimaciones (que son muy similares entre sí), la segunda llena todos los requisitos de los criterios de validez, por lo tanto, tiene límites de confianza al 95% y la potencia estimada se acepta con confianza.

Además de la estandarización de la técnica, se buscó la relación de las potencias del estándar ovino y del bovino. En un ensayo balanceado de 3 + 3 y teniendo al ovino como estándar (7.5 UI/mg) se encontró que la potencia del bovino era de 6.887 UI/mg con límites de confianza al 95% de 3.963 y 11.969 UI/mg. Si con los mismos datos del bioensayo se califica el ovino contra el bovino (2.54 U-USP/mg), se encuentra que la potencia del ovino es de (2.766 U-USP/mg). El bioensayo se repitió una semana después y los resultados fueron muy parecidos: el bovino con 6.510 UI/mg y el ovino con 2.928 U-USP/mg. Como no se pudo obtener la definición de la unidad USP, sólo puede decirse que la unidad USP tiene mayor actividad que la internacional y que el estándar ovino tiene una actividad discretamente superior al de origen bovino.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA / GRADO DE PURIFICACIÓN

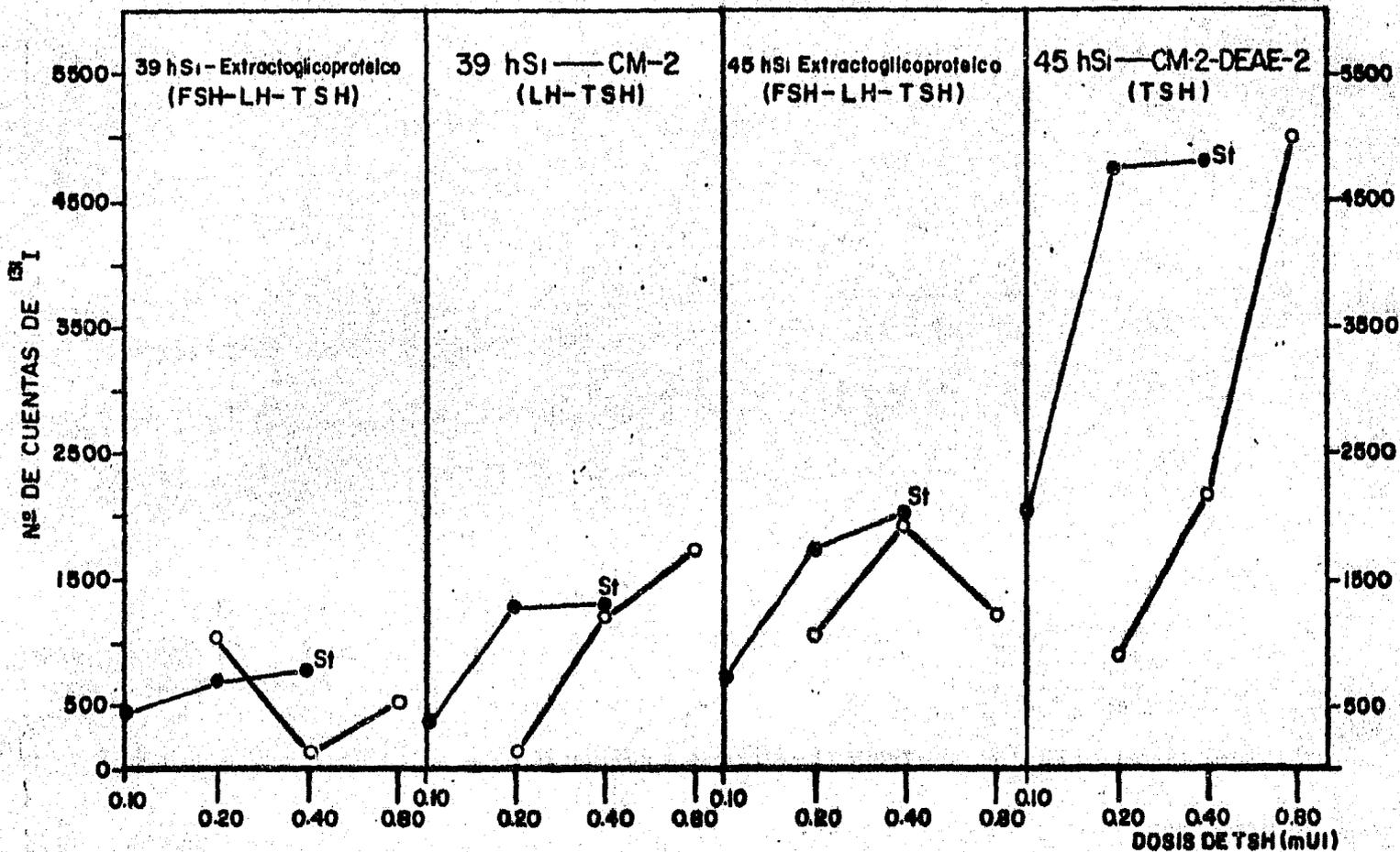


FIGURA 8: ESTUDIO DE LA EXACTITUD CON PRODUCTOS DE DIFERENTE GRADO DE PURIFICACIÓN.

Debe señalarse que la comparación de estos estándares con la TSH humana más purificada en este laboratorio, demostró sistemáticamente que la potencia en orden decreciente, fue: ovino, bovino y humano.

Aunque en la sección de Material y Métodos se describió que también se extraía la tiroides para conocer su depleción de ^{131}I , desde las primeras etapas de este estudio se abandonó dicha práctica, porque pronto se observó una dispersión de datos muy acentuada y no hubo una correspondencia estricta de la depleción del ^{131}I al aumento de las dosis.

DISCUSION

El presente estudio es la demostración de que la rata Sprague-Dawley, macho, de 23 a 26 días de edad es también un animal de laboratorio útil para el bioensayo de TSH, realizado con la técnica de McKenzie (11). La estandarización de la técnica fue posible en base al estudio previamente realizado en el mismo laboratorio (10) del metabolismo del ^{131}I en las cepas de ratas Long-Evans y Sprague-Dawley.

Otra aportación del presente trabajo consistió en sustituir la punción retroorbitaria por la punción intracardiaca, lo que permitió tener un mayor volumen y por lo tanto, un mayor número de cpm; así, pudo obtenerse una diferencia de cpm más significativa entre las dos muestras de sangre que conforman el bioensayo en cada animal. Además, pudo acortarse el tiempo de duración del bioensayo, ya que fue suficiente un periodo de dos días con dieta pobre en yodo y la administración simultánea de extracto total de tiroides antes de aplicar el isótopo; también se acortó el tiempo para alcanzar el equilibrio metabólico, que se fijó a las 48 horas de aplicado el ^{131}I .

Otra modificación a la técnica recomendada (10) fue la vía de administración, que fue más reproducible en los resultados, cuando se administró por vía subcutánea.

Es interesante que la sensibilidad de la técnica en la rata es

igual a la primera informada por McKenzie (14) y a las de otros, anotadas por el mismo autor (11).

Aunque la técnica realizada en ratones, ha mostrado una mayor sensibilidad (11,15-17) que la aquí presentada para la rata, los resultados demuestran que para cuantificar concentraciones de TSH en los productos que se purifican en este laboratorio, la sensibilidad de la técnica es muy adecuada.

Debe hacerse notar que la rata ha sido el animal recipiente de los estudios del metabolismo de la TSH (16) y también de otros tipos de bioensayos (19), pero no se le ha considerado como un animal adecuado para aplicar la técnica de McKenzie.

En cuanto a los resultados de la especificidad es evidente que una TSH altamente purificada tiene una acción liberadora de ^{131}I desde la tiroides a la sangre periférica y que esta liberación es proporcional al aumento de la dosis.

Los notables resultados con la hGH, que tuvieron una pendiente negativa, se explican por el conocimiento previo de que la hormona en cuestión tenía una alta contaminación de TSH, lo que se debía a la presencia del 2-mercapto-etanol en los pasos iniciales de la extracción de las glicoproteínas, como fue informado por Elrick (20) y que fue la técnica utilizada para el lote de donde procedía la TSH. Ya que su pendiente negativa indica la no identidad del producto con respecto al estándar de TSH utilizado en el bioensayo, solo puede decirse que la hGH en cues-

tión tiene contaminación de TSH, aunque no pueda cuantificarse su potencia, debido a la no identidad de los productos. Por otro lado debe recordarse que Ching (21) sugiere que la GH podría potenciar la acción de la TSH. De todos modos, es evidente que aún deben estudiarse en nuestro caso, dosis menores de 25 ng de hGH por animal, con objeto de conocer el verdadero efecto de la TSH contaminante.

Algunos autores (21-23) han informado que la LH de rata estimula la liberación de las hormonas tiroideas en el pollo y en el rena cuajo ó en el ratón pero no ha sido muy claro si la LH utilizada era suficientemente pura, ya que como se sabe, la más frecuente contaminación de la LH es la TSH (24) y la inversa es también cierta. La LH bovina utilizada en este trabajo demuestra claramente que no tiene ninguna acción para liberar el ^{131}I de la tiroides, aunque debe hacerse notar que las dosis utilizadas fueron muy pequeñas comparadas con las reportadas por otros (21-23).

En cuanto a la FSH, Breneman (22) asegura que no tiene acción a la TSH en el pollo y aquí puede verse que la FSH bovina no tuvo acción importante en el bioensayo de McKenzie.

Es conveniente señalar en relación a las gonadotrofinas, que otros (21, 23) han indicado que dichas hormonas comparten con la TSH, similitudes de composición química y estructura, lo que podría explicar que una LH muy purificada (23, 25) tuvo una respues

ta positiva en el bioensayo de McKenzie. Estos hechos sugieren que la especificidad de la técnica para TSH se comparte con la LH. En nuestro caso, queda aún por comprobar la acción que las gonadotrofinas humanas altamente purificadas puedan tener en el bioensayo de McKenzie.

Que la capacidad de respuesta de la rata al estímulo de hTSH, cambia de una semana a otra y también con las estaciones del año, queda bien ejemplificado con la gráfica de reproducibilidad. No sólo la magnitud de la respuesta cambia de una semana a otra, a pesar de que las condiciones experimentales se mantuvieron constantes, sino que a partir de noviembre de 1982, y de una manera más clara, desde diciembre hasta febrero del 83, las respuestas se volvieron erráticas y a veces hasta negativas. Esta variabilidad de la respuesta biológica a los estímulos con las estaciones del año ha sido señalada (26-28) como una característica de los ritmos biológicos. Es interesante que dichos cambios en las respuestas de los animales en el presente caso, se manifestaron a pesar de que ellos se mantuvieron en condiciones ambientales estrictamente constantes y por lo tanto, los cambios en las respuestas no pueden adjudicarse a las variaciones ambientales, que influyen de manera tan importante (10,29).

Esta variabilidad de las respuestas, obliga a recurrir a transformaciones estadísticas de los resultados, para encontrar la linealidad, que permita hacer cuantitativo el ensayo (30). Algunos autores (15,31) han reportado modificaciones tanto a la técnica

como al análisis estadístico, para aumentar la sensibilidad así también como la precisión de la técnica. En los datos aquí presentados para la precisión del ensayo, los coeficientes de variación aún en transformaciones semilog y log-log son todavía muy importantes. Aunque las pendientes y los coeficientes de regresión de las rectas obtenidas con los datos transformados son aceptables, la persistencia de malas medidas de dispersión, explica porqué en los bioensayos se recurre a criterios de validez o de confiabilidad, con los que se sustituyen los criterios de precisión y exactitud de la estadística de los análisis químicos, tal y como se describió en Metodología y Resultados de exactitud. A pesar de estos resultados, la técnica de McKenzie continúa siendo favorecida por los experimentadores, debido a que tiene las menores dispersiones, comparada con las otras técnicas descritas para el bioensayo de TSH (32).

El concepto de exactitud de los bioensayos se demuestra cuando existen los criterios de validez y se pueden determinar los límites de confianza. Esto sólo es cierto cuando la sustancia problema es suficientemente pura, para dar una respuesta lineal proporcional a la dosis (30). Esto quedó demostrado en las figuras 8 y 9: significancia de la pendiente y paralelismo sólo se dan en los productos de mayor purificación.

La comparación de las actividades de la TSH bovina con el estándar de TSH humana, con TSHs parcial y altamente purificadas (17), así como la comparación de métodos de bioensayo de TSH utilizando como

estándar la TSH bovina y la humana (33), demostraron que la humana es de menor potencia que el bovino, observación repetida en nuestros resultados, que se amplían con la demostración de que a su vez, el bovino es de menor potencia que el ovino.

Es probable que el bioensayo aquí reportado pueda mejorarse con algunas modificaciones tales como el agregar tiroxinas para reforzar la inhibición de la TSH endógena (11, 14, 15, 17, 21) y deberán establecerse sus condiciones utilizando un estándar de origen hipofisario humano, como otros han recomendado (17, 33).

RESUMEN

Se hicieron algunas modificaciones a la técnica de bioensayo en rata para la TSH humana, previamente estudiada en este laboratorio.

Se realizó la estandarización de la técnica y se demostró que tiene una sensibilidad de 0.1 a 0.4 mUI/mg; que su especificidad permite demostrar su actividad tanto en la TSH purificada, como en productos parcialmente purificados, así como en hormonas diferentes aún contaminadas con TSH; una vez más se demuestra la gran variabilidad de las respuestas en los bioensayos, cuya precisión puede obtenerse, ya sea por modificaciones a la técnica, así como con transformaciones estadísticas de los resultados; finalmente, se demuestra que la exactitud sólo existe en el bioensayo de una TSH altamente purificada, expresada en los criterios de validez de un análisis estadístico, que permiten determinar los límites de confianza cuando se quiere conocer la potencia relativa de una hormona a su estándar.

Se compararon las potencias de los estándares de TSH ovina y bovina, así como la de la TSH humana obtenida en el propio laboratorio.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo permiten establecer las condiciones en que rutinariamente debe realizarse el bioensayo de TSH de los productos obtenidos en el laboratorio y que son de origen hipofisario:

Ratas de cualquier cepa y sexo, de 23 a 26 días de edad, mantenidas en condiciones ambientales constantes, con una dieta nutritiva y pobre en yodo desde 48 horas antes de aplicar el isótopo por vía subcutánea, a dosis de 5 μ Ci/animal y con la administración oral de extracto total de tiroides, a la dosis de 130 mg por 100 ml del agua potable, que se administra "ad libitum".

Dos días después, aplicación por vía subcutánea (o intraperitoneal) de la TSH estándar ovino a las dosis de 0.1, 0.2 y 0.4 mUI y el problema a las dosis de 25, 50 y 100 ng, en un volumen de 0.5 ml de solución salina isotónica.

Obtención de 0.5 ml de sangre por punción intracardíaca, en el tiempo 0 (inmediatamente antes de la aplicación del estímulo), y a las tres horas de aplicado el estímulo, manteniendo a los animales bajo una anestesia superficial, con éter.

Conteo de los tubos con el 0.5 ml de sangre que se lleva a un volumen final de 1 ml.

Calcular la respuesta en % del aumento del número de cpm en relación al tiempo cero.

Graficar las respuestas de las dosis del estándar y del problema en papel semilogarítmico.

Calcular la potencia relativa del problema, con sus límites de confianza (cuando existen) por medio del programa manual diseñado en la unidad.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Pierce, J.C.: Chemistry of thyroid-stimulating hormone. In: Handbook of physiology. Section 7. Endocrinology, vol. IV. The pituitary gland and its neuroendocrine control. Part 2. Chapter 24, pag. 79, 1974. Ed. Amer. Physiol. Soc. Washington.
- 2- Sairam M.R. and Li Ch.Ch.: Human pituitary thyrotropin. In: Isolation and characterization of the hormone and its subunits. Can. J. Biochem. 55:747-754, 1977.
- 3- Sairam, M.R. and Li, Ch.Ch.: Human pituitary thyrotropin. The primary structure of the α and β subunits. Can. J. Biochem. 55:755-760, 1977.
- 4- Loraine, J.A. Trevol. Bell E. Ed. Hormone Assays and their clinical. Chapter IV, pag. 136, Third Edition. Application E & S Livingstone, Edinburg and London, 1971.
- 5- Kovacs K. Patología de los adenomas hipofisarios asociados a la hipersecreción hormonal. en Nuevos Conceptos sobre Fisiología y Patología hipotálamo-hipofisaria. pag. 79. C. Valverde G. Fanghalen- F. Mena, Editores. Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología, Méx. 1982.
- 6- Gómez V.E. Bolaños F. Valverde R.C. Tiroides. cap. 5, pag. 54. en Fundamentos de Endocrinología Clínica. 3a. ed. J.M. Malacara, M. García V., C. Valverde R. Ed. La Prensa Médica Mexicana, S.A. México, 1982.
- 7- Immunological methods in Endocrinology. Symposium in Ulm, Febr. 25, 1970. K. Federlin, C.N. Hales, J. Kracht, Editors. Georg Thieme, Verlag Stuttgart. Academic Press, New York. London, 1971.
- 8- Yalow R.I., Berson S.A.: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. J. Clin. Invest. 39:1157, 1960.
- 9- Loraine J.A. Trevol B.E.: Hormone assays by biological methods. Chap. 1, pag. 8. in Hormone Assays and there clinical application. Third Edition. E & S Livingstone, Edinburg and London, 1971.
- 10- Ble C.J.L.: Variables principales que afectan el bioensayo de la hormona estimulante del tiroides en ratas utilizando radioisótopos. Tesis Profesional Q.F.B., 1978, UNAM. Facultad de Química.
- 11- McKenzie J.M. The bioassay of thyrotropin in serum. Endocrinology 63:372-382, 1958.

- 12- Lamberg B.A. Radiative of phosphorus as indicator in a chick assay of TSH. Acta Med. Scand. Suppl. 279, 145:9-79, 1953.
- 13- Alatorre F.S.: Programa Manual para Bioensayos. Unidad de Investigación Biomédica, CMN-IMSS. 1976.
- 14- McKenzie J.M.: Bioassay of thyrotropin. Fed. proc. 16:87, 1957.
- 15- Good B.F. Stenhouse N.S.: An improved bioassay for TSH, by modification of the method of McKenzie. Endocrinology 78: 429, 1966.
- 16- Levy R.P., McGuire W.L., Shaw R.K., Bartsch G.E.: Effect of species differences of mice on the bioassay of thyrotropin. Endocrinology 76:890-894, 1965.
- 17- Hershman J.M.: Different slopes of the dose-response curves of human and bovine TSH in the McKenzie bioassays. Endocrinology 86:1004, 1970.
- 18- Halmi N.S., Spirtos B.N.: Analysis of the action of propylthiouracil on the pituitary-thyroid axis of rats. Endocrinology 55:613-620, 1954.
- 19- Redmond O.: Exogenous TSH increases mitotic activity in rats thyroid follicular cells in fifteen minutes. Irish J. Med. Sci. 149:76, 1980.
- 20- Erlick H. Yearwood-Drayton V. Arai Y. Leaver F. Morris H.G. Collection processing and fractionation of human pituitary glands. J. Clin. Endocr. 23:694, 1963.
- 21- Ching Melvin: Regarding the validity of the endpoint response of the mouse (McKenzie) bioassay for thyrotropin (TSH). Acta endocrinologica 96:342-349, 1981.
- 22- Breneman W.R.: Bioassay of thyrotropin in chicks with simultaneous estimation of gonadotropin. Gen. and Comp. Endocr. 20:41-52, 1973.
- 23- Ching Melvin: Are examination of the tadpole in metamorphic stasis as a recipient in a bioassay for thyroid-stimulating hormone. J. endocrinology 61:15-19, 1974.
- 24- Stockell Hartree A. Butt W.R. Kirham K.E.: The separation and purification of human luteinizing and thyrotropic hormone. J. Endocr. 29:61-69, 1964.
- 25- Hagen C. McNeill A.S.: Identification of human luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, luteinizing-hormone β subunit and gonadotrophin α subunits in foetal and adult pituitary glands. J. Endocr. 67:49-57, 1975.

- 26- Halberg F.: Chronobiology. *Ann. Rev. Physiol.* 31:675-725, 1969.
- 27- Ottenweller J.E. and Hedge G.A.: Diurnal variation of plasma thyrotropin, thyroxine, and triiodothyronine in female rats are phase shifted after inversion of the photoperiod. *Endocrinology* 111:590, 1982.
- 28- Wong Ch.Ch., Döhler K.D., Atkinson M.J., Geerlings R.D. von zur Mühlen A.: Influence of age, strain and season on diurnal periodicity of thyroid stimulating hormone, thyroxine, triiodothyronine and parathyroid hormone in the serum of male laboratory rats. *Acta endocrinológica* 102:377-385, 1983.
- 29- Clough G.: Environmental effects on animals used in biomedical research. *Biol. Rev.* 57:487-523, 1983.
- 30- Finney D.J.: *Statistical method in biological assay*. Second ed. Charles Griffin & Co. Ltd, 1971.
- 31- Sakiz E. Guillermin R.: On a method for calculation and analysis of results in the McKenzie assay for thyrotropin (TSH). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 115:856-860, 1964.
- 32- Florsheim, W.H., Williams, A.D. and Schönbaum E.: On the mechanism of the McKenzie bioassay. *Endocrinology* 87:881, 1970.
- 33- Bakke J.L.: Assay of human thyroid-stimulating hormone by 18 different assay laboratories using 12 different methods. *J. Clin. Endocr.* 25:545, 1965.