

418
207



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores
"Cuautitlán"

"DISEÑO DE UN ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO
(ELISA) PARA LA DETECCIÓN DE TIROGLOBULINA
Y ANTICUERPOS ANTI - TIROGLOBULINA EN
SUERO HUMANO"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
ISAIAS SANCHEZ GONZALEZ

Director de Tesis: M. en C. Luis Angel de J. Terán Ortiz

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1987



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

	PÁGINA
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	9
DESARROLLO EXPERIMENTAL	10
RESULTADOS	39
CONCLUSIONES	71
APÉNDICE	74
BIBLIOGRAFÍA	77

INTRODUCCION:

La tiroides es una glándula endócrina impar y simétrica, situada en la parte anterior del conducto laríngeo traqueal, está formada por dos lóbulos laterales unidos por un puente transversal y estrecho que es el istmo. El peso promedio de esta glándula, en el adulto, es de 25 a 30 gramos. Histológicamente, está constituida por sacos de forma esférica denominados folículos tiroideos cuyas paredes están formadas por tejido cuboidal. En el interior de cada folículo se encuentra el coloide tiroideo que equivale a un depósito para almacenar las hormonas tiroideas y la tiroglobulina, constituyendo esta última el 75% del coloide tiroideo (1,2,3).

Las células tiroideas son típicas células glandulares secretoras de proteínas. El retículo endoplásmico y el aparato de Golgi sintetizan y secretan hacia los folículos una proteína con un peso molecular de 660,000 daltons llamada tiroglobulina en la que existen 140 residuos de tirosina, siendo éste el sustrato que se combina con yodo para formar las hormonas tiroideas que se originan en la molécula de tiroglobulina. Además de secretar la tiroglobulina, las células glandulares proveen el yodo, las enzimas y otras sustancias necesarias para la síntesis de hormonas tiroideas (3).

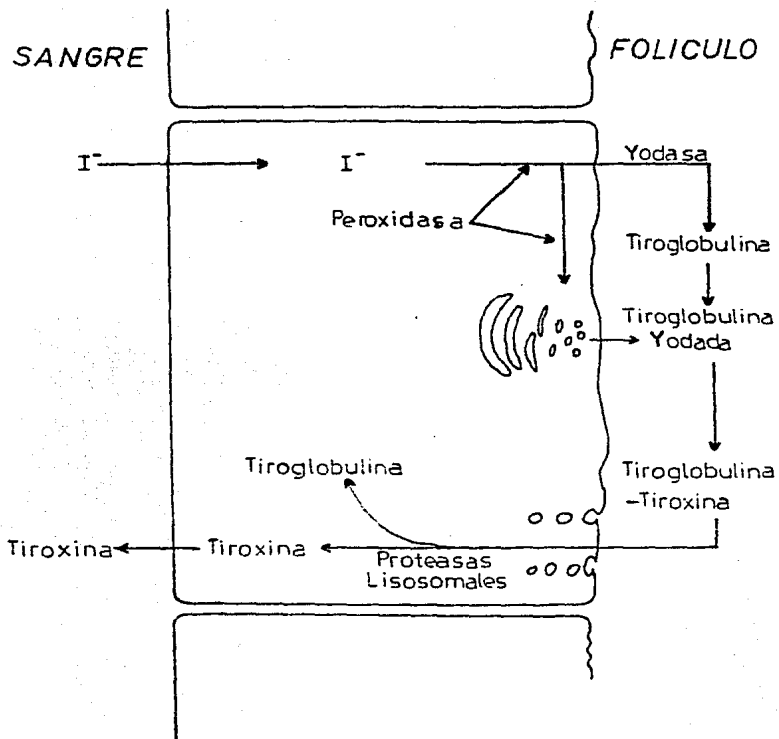


FIGURA No. 1

LIBERACION DE HORMONAS DE
LOS FOLICULOS TIROIDEOS (3)

La molécula de tiroglobulina no es liberada como tal a la circulación sanguínea, sino que primero se separan la tiroxina y la triyodotironina y luego estas hormonas libres pasan a circulación. Este proceso ocurre como sigue: la superficie apical de las células tiroideas normalmente emite pseudópodos, que encierran pequeñas porciones del coloide para formar vesículas picnóticas. Los lisosomas inmediatamente se fusionan, formando vesículas digestivas que contienen las enzimas de los lisosomas -- mezcladas con el coloide. Las proteasas digieren las moléculas de tiroglobulina liberando tiroxina y triyodotironina, las cuales difunden a través de la base de las células tiroideas y a través de la membrana basal, vertiéndose finalmente a los capilares circundantes. Así, las hormonas tiroideas son liberadas a la sangre (Fig.1)

La mitad o más de la tirosina yodada en la tiroglobulina nunca llega a ser hormona tiroidea, sino que permanece como monoyodo o diyodotirosina. Durante la digestión de la molécula de tiroglobulina, para liberar la tiroxina y la triyodotironina, estas tirosinas yodadas son liberadas de las células tiroideas; sin embargo, no son secretadas a la sangre y en lugar de ello su yodo es liberado por una enzima yodasa, quedando disponible para -

volverse a utilizar en la formación de nuevas hormonas tiroideas. En los casos de ausencia congénita de la enzima yodasa, las personas frecuentemente llegan a ser deficientes en yodo debido a las fallas en este proceso de reciclaje (3).

La hiposecreción de la hormona tiroidea durante los años del crecimiento produce una condición llamada cretinismo; los dos síntomas clínicos más sobresalientes de un cretino son el enanismo y el retardo mental. El primero es ocasionado por fallas del esqueleto en su crecimiento y maduración; el segundo es ocasionado por fallas en el desarrollo completo del cerebro; presentando además un desarrollo sexual retardado y color amarillento en la piel. Si esta enfermedad se diagnostica a tiempo, los síntomas son reversibles mediante la administración de hormonas tiroideas (2).

La hipersecreción de la hormona tiroidea da origen a una condición llamada bocio exoftálmico. Esta enfermedad es más frecuente en mujeres, afectando a 8 por cada hombre. Uno de los síntomas principales es el agrandamiento de la tiroides, llamado bocio, que puede alcanzar 2 ó 3 veces el tamaño normal. Los otros dos síntomas característicos son la hipertrofia del tejido graso retroocular que ocasiona la protusión del ojo hacia ade

lante (exoftalmos) y un metabolismo anormalmente acelerado, excesiva estatura, pulso acelerado, temperatura corporal alta, piel caliente húmeda y sonrosada y pérdida de peso. El método usual para tratar el hipertiroidismo es la administración de drogas que suprimen la síntesis de tiroxina o la intervención quirúrgica para remover parte de la glándula (2,3).

El bocio simple es más frecuentemente ocasionado por una baja cantidad de yodo en la dieta. Sin embargo, puede producirse también si la ingestión de yodo no se aumenta en ciertas circunstancias, lo que demandaría mayor cantidad de tiroxina en el organismo. Estas circunstancias se refieren a una exposición frecuente al frío y dietas altas en grasas y proteínas (2,3).

Las enfermedades autoinmunes de la glándula tiroidea se presentan en varias especies animales, además del humano (4). La enfermedad se manifiesta por varios síndromes clínicos bien definidos, como son: tiroiditis linfocítica, tiroiditis de Hashimoto, mixedema y enfermedad de Graves. En su patogénesis están involucradas reacciones humorales y reacciones mediadas por células y en las formas más severas de tiroiditis autoinmune la invasión linfoide destructiva involucra a todo el tejido tiroideo, conduciendo finalmente al mixedema. En la

enfermedad de Hashimoto la glándula parece compensar el efecto destructivo por la formación de nuevos cuerpos acinares, lo que aparentemente conduce a un incremento del estímulo inmunológico y a la proliferación de células linfoides, lo que se evidencia por la formación de centros germinales a lo largo de la tiroides y por una marcada hiperplasia reactiva en los ganglios linfáticos regionales que rodean la glándula. La sobreproducción de linfocitos y la regeneración del tejido tiroideo conducen al crecimiento de la glándula, usualmente acompañado de altos niveles de anticuerpos circulantes.

En la apariencia histológica de las lesiones básicas y en la respuesta de anticuerpos, el mixedema primario del adulto está estrechamente relacionado con la tiroiditis de Hashimoto. Sin embargo, en este caso, la glándula es incapaz de regenerarse y el resultado final es la fibrosis, con persistencia de focos linfoides pequeños y bajos títulos de anticuerpos circulantes. La regeneración celular en tiroiditis no es dependiente de TSH (Hormona Estimulante de la Tiroides), puesto que se encuentran altos niveles de esta hormona en el mixedema primario y su producción es normal en la enfermedad de Hashimoto, a menos que exista hipotiroidismo (4).

Las observaciones y el estudio del fenómeno autoinmune en la enfermedad de Graves sugiere que está estrechamente relacionada con el mixedema primario y con la tiroiditis de Hashimoto. En muchos casos, la enfermedad de Graves se caracteriza por exacerbaciones y remisiones espontáneas. Alrededor del 30% de los casos permanecen eutiroides después de 1 a 3 años de tratamiento medicamentoso; más del 50% de los casos sufren recaídas después de este tratamiento; y en el restante 20% la enfermedad es continua, refractaria a drogas y a tratamiento quirúrgico. Los casos severos se asocian algunas veces con oftalmopatía endócrina y con altos niveles de anticuerpos circulantes, requiriéndose varias dosis de yodo radiactivo para volverlos eutiroides. Casi todos los casos de enfermedad de Graves están asociados con bocio nodular tóxico, que pueden ser tumores benignos de la tiroides no asociados a anticuerpos (4).

Se han identificado cuatro diferentes sistemas antígeno-anticuerpo específicos en tiroiditis humana. Los constituyentes de la tiroides que actúan como autoantígenos se encuentran en la glándula normal y no hay métodos suficientemente sensitivos para detectar anomalías químicas, en caso de que éstas existan. Roitt (5) y Wittebsky (6) identificaron a la tiroglobulina como moléculu

la antigénica; después Belyavin (7), Anderson (8) y Rott (9) hicieron lo mismo con el antígeno microsomal y Balfour (10) con el segundo antígeno del coloide acinar, en tanto que Fagreous (11) y Jonston (12), a su vez detectaron un antígeno de superficie. Anticuerpos contra estos antígenos se encuentran en todas las variedades de tiroiditis linfoide y existen títulos elevados en la enfermedad de Hashimoto.

Los procedimientos actualmente utilizados para la detección de tiroglobulina y anticuerpos contra tiroglobulina son: precipitinas (13), fijación de complemento (14), hemaglutinación, aglutinación en látex, inmunofluorescencia y radicinmunoanálisis (15,16). Este último es el más sensible, sin embargo su realización está restringida a los laboratorios que cuentan con las condiciones adecuadas para el manejo de radioisótopos. Por otra parte, dado que el ensayo inmunoenzimático es casi tan sensible como el radioinmunoanálisis y es de manejo más fácil, ya que puede realizarse en un laboratorio convencional que cuente con un espectrofotómetro, es una alternativa para reemplazar a éste.

Por lo anterior, el principal objetivo de este trabajo es la estandarización de un método inmunoenzimático para la detección de tiroglobulina y anticuerpos contra tiroglobulina en suero humano.

OBJETIVOS:

- Estandarización de un método de purificación de tiroglobulina humana, a partir de tiroides de cadáver fresco;
- Obtención y purificación de anticuerpos de conejo contra tiroglobulina humana; y
- Estandarización de un método inmunoenzimático (ELISA), para la detección de tiroglobulina y de anticuerpos contra tiroglobulina en suero humano.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

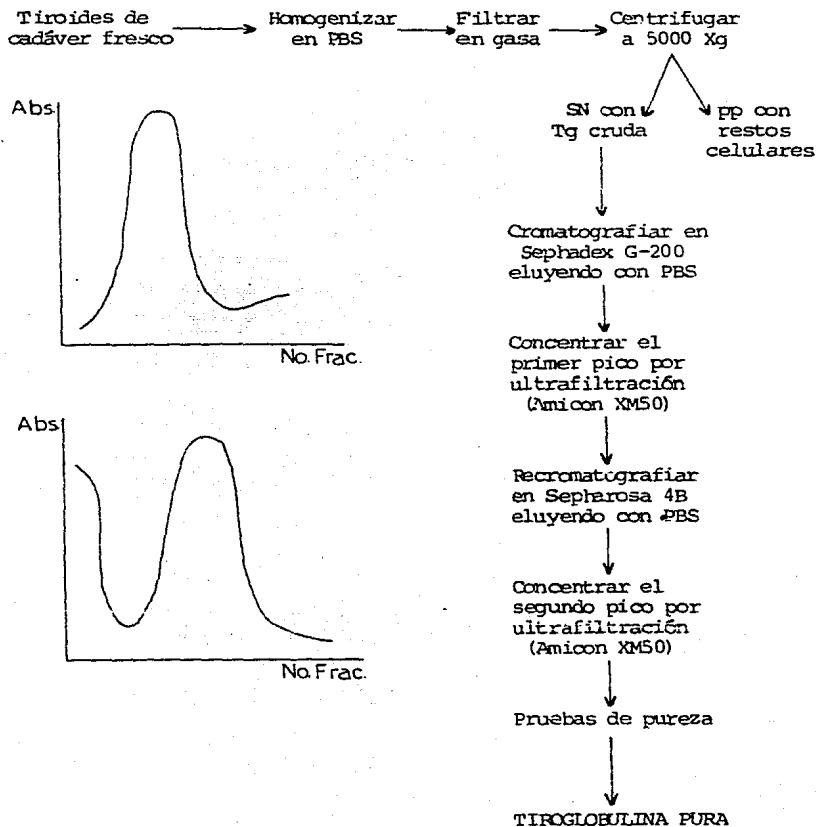


FIGURA No. 2
ESQUEMA DE PURIFICACION DE TIROGLOBULINA

A. PURIFICACION DE TIROGLOBULINA

I.- PROCESAMIENTO DE TIROIDES (16,17,18)

Para poder extraer la molécula de tiroglobulina localizada en el interior del tejido tiroideo, es necesario homogenizar la glándula para retirar los fragmentos de tejido y centrifugar el sobrenadante, para separar los componentes solubles de los restos celulares.

Material y reactivos:

- Tiroides humanas de cadáver fresco
- Homogenizador
- Centrífuga refrigerada
- Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2

Procedimiento:

Se disecciona la glándula tiroidea de un cadáver fresco (menos de 72 horas), eliminando toda la grasa y membranas que la protegen. Se procede a seccionar el tejido y se homogeniza utilizando para ello PBS pH 7.2, obteniendo una suspensión que se filtra a través de una gasa para separar fragmentos de tejido; y el filtrado se centrifuga durante 10 minutos a 5000 Xg, con el objeto de eli-

minar restos celulares. El sobrenadante que contiene la tiroglobulina continúa en el proceso, para su purificación (Fig. 2).

NOTA: Las tiroides utilizadas en la purificación de tiroglobulina, fueron obtenidas en el anfiteatro de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M. Estas -- glándulas provenían de personas cuyos cadáveres -- no fueron reclamados, por lo que el Estado los otorga a la Universidad para ser utilizados en enseñanza e investigación.

II.- CROMATOGRAFIA POR EXCLUSION DE PESO MOLECULAR (16,18,19,20,21).

El uso de geles porosos (como dextrán, agarosa o mezclas de agarosa y acrilamida) permite la separación de proteínas en base a su dimensión molecular. Estos geles funcionan como tamices moleculares de partículas esféricas con diferente trama. Cuando una solución proteica acuosa atraviesa el gel filtrante, las moléculas de diámetro inferior al de la trama penetran las partículas del gel mientras que las que se encuentran sobre el límite de exclusión no lo hacen, por lo que éstas -- son las primeras que se obtienen al eluir.

El sephadex es un polímero de dextrán, que se prepara por el entrecruzamiento de dextrán alcalino con epíclorhidrina, hidratándose para su uso con PBS o agua. Es el material más ampliamente empleado para filtración en gel.

La sepharosa consiste en pequeñas esferas de agarosa, un polisacárido lineal de D-galactosa y 3,6-anhidro L-galactosa. A diferencia del sephadex y debido al tamaño de su poro, ésta puede usarse para separar moléculas muy grandes.

Material y reactivos:

- Columnas de vidrio de 60 x 2 cm y de 100 x 2 cm
- Colector de fracciones
- Bomba de vacío
- Sephadex G-200 (Pharmacia Fine Chemicals, Suecia)
- Sepharosa 4B (Pharmacia Fine Chemicals, Suecia)
- PBS pH 7.2
- Espectrofotómetro

Procedimiento:

Se pesan 3 g de Sephadex G-200 y se hidratan con agua destilada o PBS, incubándose toda la noche a 37°C. -- Luego se procede a desgasificar tanto el sephadex hidratado como el PBS, utilizando para ello una bomba de vacío. Se adiciona después el sephadex a la columna cuidando que no se formen burbujas, para lo cual se le deja caer cuidadosamente por las paredes. En seguida se equilibra con PBS desgasificado.

Posteriormente, se colocan aproximadamente 4 ml del extracto de tiroides en la columna y se eluye con PBS, -- colectando fracciones de 4 ml. A estas fracciones se les determina proteínas leyendo a 280 nm y se traza una curva de absorbancia contra número de fracción.

Las fracciones que contengan tiroglobulina se concentran por ultrafiltración (empleando membranas de Amicon XM50), hasta una cuarta parte de su volumen.

En un último paso, se prepara una columna de Sepharosa 4B en la misma forma que la anterior y se recromatografía el concentrado, eluyendo con PBS. Finalmente se concentra la fracción que contenga la tiroglobulina empleando una membrana de Amicon XM50 (pag. 16).

III.- ULTRAFILTRACION (22)

Para separar mezclas de proteínas existen varios métodos, que se fundamentan en los tamaños de las partículas. Entre éstos, podemos citar: la cromatografía de exclusión de peso molecular (23,24), la electroforesis en gel de poliacrilamida (25,26), la ultracentrifugación, la ultrafiltración, etc.

La ultrafiltración emplea membranas de poro definido, las que retienen moléculas mayores al tamaño de poro y dejan pasar solo moléculas más pequeñas, para lo que se aplica una presión positiva utilizando nitrógeno gaseoso.

Material y reactivos:

- Portamembranas (Amicon Corporation, Massachusetts USA)
- Membranas XM50 (Amicon Corporation, Massachusetts USA)
- Nitrógeno gaseoso

Procedimiento:

Se ensambla el portamembranas de acuerdo a las especificaciones del sistema (Amicon Corporation), colocando la membrana previamente lavada con agua destilada. - Sobre la membrana se coloca la muestra (fracciones eluí

das de la columna, que contienen tiroglobulina) y se aplica una presión de aproximadamente 3,7 atm., con nitrógeno gaseoso. La muestra se concentra hasta una cuarta parte de su volumen. Por último, se descarta el filtrado y al concentrado se le realizan pruebas de caracterización para tiroglobulina.

IV. - INMUNOELECTROFORESIS (27/28)

Es un método cualitativo, que combina los principios de la electroforesis de zona con reacciones antígeno anticuerpo en gel. El proceso se lleva a cabo en dos etapas: la primera consiste en que la mezcla de proteínas es separada por electroforesis; siguiendo a ésta, en una segunda etapa, a la inmunodifusión de las proteínas contra un antisuero, permitiendo la formación de arcos de precipitación.

Material y reactivos:

- 1) Portaobjetos
- 1) Equipo de electroforesis
- 1) Perforador para electroforesis
- 1) Solución amortiguadora de barbituratos pH 8.6
- 1) Agar noble (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA)
- 1) Suero humano normal
- 1) Suero de conejo anti proteínas totales humanas
- 1) Suero humano que contiene anticuerpos contra tiroglobulina (C.H. 20 de Noviembre, ISSSTE)
- 1) Azul de Brómofenol (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo., USA)

Procedimiento:

Preparar placas de 2 mm de espesor, con agar al 1% en solución amortiguadora de barbituratos pH 8.6. Colocar 50 μ l de muestra en los pozos y correr la electroforesis a 100 volts, hasta que el colorante mezclador con la muestra migre 2.5 cm aproximadamente. Adicionar el antisuero en el canal e incubar en cámara húmeda durante 24 horas, permitiendo así la difusión; la lectura se realiza observando las bandas de precipitación.

Tiroglobulina
pura



3 inoculaciones
semanales de
10 mg de Tg c/u
Vía IM

↓
Obt. Antisuero

↓
Cromatografía de afinidad
(Inmunoadsorbente con Tg)

↓
Acs. anti-tiroglobulina

FIGURA No. 3
ESQUEMA DE OBTENCION Y PURIFICACION
DE ANTICUERPOS ANTI-TIROGLOBULINA

B. PURIFICACION DE ANTICUERPOS ANTI TIROGLOBULINA.

I.- INMUNIZACION (29,30)

Se conoce como inmunización al proceso que resulta - cuando se induce una respuesta inmunológica en un individuo mediante el contacto con un antígeno específico, en forma natural o artificial. La respuesta obtenida puede ser: celular, humoral, o ambas, dependiendo de diversos factores tales como: dosis, vía de administración, tipo de antígeno, etc.

Para la obtención de anticuerpos específicos contra una proteína determinada, es importante conocer la naturaleza de dicha proteína; lo cual permitirá escoger la especie animal que se habrá de utilizar (debido a que -- existen algunas especies en las que un antígeno puede -- mostrar menor inmunogenicidad que en otras), así como la vía de inoculación que se empleará, ya que los antígenos particulados son más inmunogénicos por vía intramuscular o intraperitoneal que por vía intravenosa, mientras que con los antígenos solubles se obtienen mejores resultados por vía intravenosa.

Los adyuvantes son sustancias que inoculadas junto - con el antígeno, permiten aumentar el nivel de anticuerpos circulantes y pueden inducir respuesta celular. Su -

empleo es importante para obtener una respuesta experimental adecuada.

Aunque existen algunos lineamientos generales, los parámetros anteriores nos conducirán a la elaboración de un esquema de inmunización particular y adecuado para el antígeno a estudiar.

La tiroglobulina es un antígeno soluble, que debido a su alto peso molecular es un buen inmunógeno; por estas razones se diseñó el siguiente esquema de inmunización:

Inoculación	Día	Dosis	Adyuvante	Vía
1a.	0	10 mg Tg	FCA	IM
2a.	7	10 mg Tg	FIA	IM
3a.	14	10 mg Tg	FIA	IM
	21	P r i m e r a s a n g r í a		
	28	S e g u n d a s a n g r í a		

FCA - Adyuvante completo de Freund

FIA - Adyuvante incompleto de Freund

IM - Vía intramuscular

Especie utilizada: Conejos New Zealand; adultos
jóvenes.

II.- INMUNOPRECIPITACION EN CAPILAR (38)

La presencia de antígeno o anticuerpo en una muestra puede manifestarse si se ponen en contacto ambos componentes en fase líquida, ya que se observará una reacción de precipitación al llevarse a cabo la unión antígeno-anticuerpo.

Material y reactivos:

- Tubos capilares
- Tiroglobulina purificada

Procedimiento:

En un tubo capilar se coloca antígeno en solución hasta un tercio de su volumen y los dos tercios restantes se completan con el suero del conejo inmunizado. Se mezclan por inversión y se deja en reposo, a temperatura ambiente, en posición vertical; la lectura se realiza al aparecer el precipitado.

III.- CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD (31)

La cromatografía de afinidad es un procedimiento que se utiliza para la purificación de anticuerpos. Consiste en tener inmovilizado al antígeno en una fase fija y a través de ésta hacer pasar el anticuerpo en solución (fase móvil), permitiendo que se lleve a cabo una reacción específica antígeno-anticuerpo. Por lo anterior, la fase fija es llamada inmunoadsorbente y puede estar constituida por partículas de sepharosa a las cuales está unido el antígeno, o por un gel formado por moléculas del antígeno polimerizadas con glutaraldehído.

Material y reactivos:

- Tiroglobulina purificada
- Albúmina sérica bovina (ASB)
- Solución amortiguadora de acetatos 0.2 M pH 5.0
- Glutaraldehído al 2.5%
- Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.4
- Solución de glicina-HCl 0.2 M pH 2.8
- Fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) 1.0 M
- Lisina 0.1 M pH 7.4
- PBS

Procedimiento:

Mezclar 100 mg de tiroglobulina con 400 mg de ASB, - en 10 ml de acetatos 0.2 M pH 5.0. Añadir 2 ml de solu - ción de glutaraldehído al 2.5%, e incubar toda la noche a temperatura ambiente. El gel formado se homogeniza pa - sándolo a través de una aguja número 18 y se dispersa en 50 ml de fosfatos 0.1 M pH 7.4. Centrifugar 10 min. a -- 3000 rpm, desechando el sobrenadante. Lavar varias veces con 50 ml de solución de fosfatos 0.1 M, como en el paso anterior, hasta que el sobrenadante tenga una absorban - cia menor de 0.05 a una longitud de onda de 280 nm. Reho - mogenizar el gel y dispersarlo en 50 ml de glicina-HCl, agitando a temperatura ambiente durante 15 min. Centrifu - gar a 3000 rpm durante 10 min.; desechar el sobrenadante y neutralizar el gel con 10 ml de K_2HPO_4 1.0 M y 40 ml - de agua destilada. Centrifugar 10 min. a 3000 rpm. y dis - persar el gel en 10 ml de lisina 0.1 M pH 7.4 incubando toda la noche a 4°C. Lavar con PBS y conservar a 4°C.

Preparar una columna con el gel anterior y agregar - la proteína a purificar (suero de conejo contra tiroglo - bulina) eluyendo con PBS, hasta que la absorbancia del - eluido sea menor de 0.05, a 280 nm.

Para remover los anticuerpos unidos al inmunoadsor -

bente, se eluye la columna con solución de glicina-HCl - 0.2 M, colectando fracciones de 5 ml en tubos que contienen 0.5 ml de K_2HPO_4 1.0 M.

Leer las fracciones a 280 nm y concentrar aquellas que contengan la mayor cantidad de proteína.

IV.- PRECIPITACION EN GEL (21,29)

Una de las manifestaciones de la reacción antígeno-anticuerpo es la precipitación. La formación del inmuno precipitado depende de la relación antígeno-anticuerpo, en el medio donde los reactantes se combinan. Estos medios pueden ser líquidos o semisólidos. El agente gelificante usado más frecuentemente es el agar.

En la doble inmuno difusión, se permite al antígeno y al anticuerpo migrar uno hacia el otro en un gel, donde se formará una línea de precipitación cuando los reactantes se encuentren en equivalencia; su posición relativa estará determinada por la concentración del antígeno y del anticuerpo en el agar. Aparecerán varias líneas de precipitación si el antígeno y el anticuerpo contienen varias especies moleculares.

Esta técnica tiene la ventaja de que pueden compararse varios antígenos o antiseros alrededor de un pozo de antígeno o de anticuerpo.

Material y reactivos:

- Agar noble (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. USA)
- Solución salina fisiológica (SSF)
- Suero humano que contiene anticuerpos contra tiro

globulina (C.H. 20 de Noviembre, ISSSTE)

- Suero de conejo anti proteínas humanas totales
- Suero humano normal
- Suero de conejo anti tiroglobulina

Procedimiento:

Preparar placas de 2 mm de espesor con agar al 2% - en SSF. Perforar de acuerdo al siguiente esquema y depositar en cada pozo 50 µl de la muestra correspondiente.

① ②

⑥ O_{Tg} ③

⑤ ④

Tg- Tiroglobulina

1 a 6 - Diluciones del antisuero

Colocar la placa en cámara húmeda durante 24 horas, para permitir la difusión de las muestras. La lectura de la prueba se realiza observando las bandas de precipitación que aparezcan.

C. ENSAYO INMUNOENZIMATICO (32,33,34,35)

Existen diversos métodos en los que se hace uso de la reacción antígeno-anticuerpo para poner de manifiesto a uno u otro de estos componentes. En varios ensayos se utilizan anticuerpos o antígenos marcados: como en inmunofluorescencia, en donde el anticuerpo se conjuga con un colorante fluorescente; en el radioinmunoensayo, en que se unen isótopos radiactivos a anticuerpos o antígenos. Los ensayos inmunoenzimáticos han sido diseñados como alternativa del radioinmunoensayo; en éstos se emplean anticuerpos o antígenos conjugados con enzimas, de tal manera que tanto la actividad inmunológica como la enzimática se conservan, a la vez que se observa que la sensibilidad y velocidad del ensayo son debidas a la amplificación de la reacción ocasionada por la enzima. El producto de reacción es un compuesto colorido que puede ser reportado en forma numérica utilizando un espectrofotómetro.

En el ensayo inmunoenzimático, el antígeno es inmovilizado en una fase sólida y se incuba con el suero problema. Posteriormente, se agrega una inmunoglobulina acoplada a una enzima. La cantidad de enzima que permanezca unida después del lavado es directamente proporcional a

la concentración de anticuerpos específicos en el suero. Este procedimiento también puede ser utilizado para la - detección de antígenos.

Para evaluar la prueba, es necesario tener sueros de referencia positivos así como sueros normales.

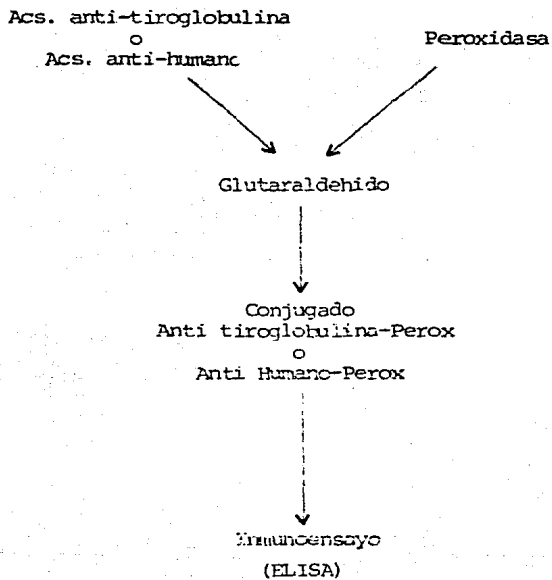
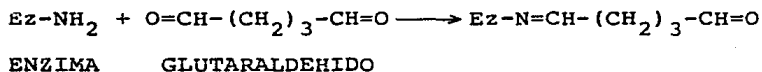


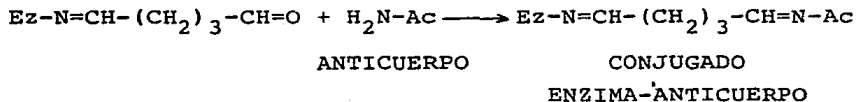
FIGURA No. 4
ESQUEMA DE CONJUGACION DE ANTICUERPOS A PEROXIDASA

I.- CONJUGACION DE ANTICUERPOS A PEROXIDASA (36,37).

La detección de antígenos puede llevarse a cabo en forma específica utilizando anticuerpos conjugados con enzimas, para lo cual se emplea el glutaraldehido como puente entre ambas moléculas. Las enzimas más utilizadas para este fin son la fosfatasa alcalina y la peroxidasa de rábano. En este procedimiento, se hace reaccionar el grupo amino terminal de la enzima con uno de los grupos carbonilo del glutaraldehido:



En el segundo paso, el grupo carbonilo libre del compuesto formado en la reacción anterior reacciona con el grupo amino terminal del anticuerpo, formando el conjugado anticuerpo-enzima:



Material y reactivos:

- Peroxidasa de rábano fuerte RZ=3, Tipo VI (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. USA)
- Glutaraldehido (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. USA)

- Glicerol (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. USA)
- Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemicals, Suecia)
- Solución de fosfatos 0.1 M pH 6.8
- Cloruro de sodio 0.15 M (NaCl)
- Lisina 0.1 M pH 9.5
- Solución amortiguadora de carbonatos 1.0 M pH 9.5
- PBS

Procedimiento:

Se disuelven 10 mg de peroxidasa de rábano en 0.2 ml de glutaraldehído al 1% en fosfatos 0.1 M pH 6.8, incubándose a temperatura ambiente durante 18 horas. Se pasa esta solución a través de una columna de sephadex G-25 (0.9 x 30 cm), equilibrada con NaCl 0.15 M; se colecta la fracción café que contiene la peroxidasa, eliminando la cabeza y cola del eluido. Si se requiere, el filtrado se concentra a 1 ml y se le agregan 5 mg de anticuerpo, contenidos en un volumen de 1 ml (el anticuerpo debe ser de reciente preparación y estar dializado contra NaCl). Se agregan 0.2 ml de solución amortiguadora de carbonatos 1.0 M pH 9.5 y se incuba durante 24 horas a 4°C. Se adicionan 0.2 ml de solución de lisina 0.1 M pH 7.0, incubándose a temperatura ambiente durante 2 horas. Se -

dializa contra PBS durante 24 horas a 4°C. A la muestra dializada se le agrega un volumen igual de glicerol (como conservador) y se almacena a 4°C, en alícuotas pequeñas.

El título del conjugado se determina por el método de ELISA.

II.- METODO DE ELISA (38).

La propiedad de los antígenos protéicos de adsorberse a una fase sólida se emplea para la determinación de la concentración de anticuerpos específicos contra estos antígenos presentes en el suero analizado. El método requiere de la participación de un segundo anticuerpo conjugado a una enzima. Este procedimiento también puede ser utilizado para la detección de antígenos.

Material y reactivos:

- Placas de poliestireno de 96 pozos (Nunclon, Dinamarca)
- Lector de placas de ELISA (Minireader. Dynatech, - Virginia, USA)
- Solución amortiguadora salina de fosfatos (PBSS) - pH 7.4
- Albúmina sérica bovina al 2% en PBSS (BSA)
- Tween 20 al 0.05% en PBSS (PBSS-Tween)
- Gelatina al 0.5% en PBSS-Tween (PBSS-Tween-Gel)
- Orto fenilén diamina (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. USA)
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 1.2%
- Acido sulfúrico (H_2SO_4) 4N
- Solución amortiguadora de citratos 0.32 M

Procedimiento:

Forrar la placa con antígeno disuelto en PBSS a una concentración de 50 µg/ml, colocando 50 µl por pozo e incubar toda la noche a 4°C.

Retirar el sobrenadante de los pozos y adicionar 200 µl de BSA, incubando una hora a 37°C con el propósito de saturar la superficie libre de los pozos. Aspirar y lavar 3 veces las placas con PBSS-Tween.

Agregar diferentes diluciones de suero humano normal (control negativo), suero problema, PBSS (blanco de la reacción) y control positivo conocido; cada uno en un volumen de 50 µl por pozo (de acuerdo al diseño experimental), incubando 2 horas a 37°C. Lavar 3 veces con PBSS-Tween.

Agregar 50 µl de anticuerpo conjugado con peroxidasa y diluido en PBSS-Tween-Gel. Incubar 2 horas a 37°C y lavar 3 veces con PBSS-Tween.

Adicionar 50 µl del sustrato preparado de la siguiente manera:

2.50 mg de o-fenilendiamina

5.00 ml de H₂O bidestilada

0.06 ml de citratos 0.32 M

0.05 ml de H₂O₂ al 1.2%

Incubar 10 minutos a 37°C en la oscuridad.

Detener la reacción, agregando 100 µl de H₂SO₄ 4N -
en cada pozo.

RESULTADOS:

A. PURIFICACION DE TIROGLOBULINA.

I.- PROCESAMIENTO DE TIROIDES.

Se disecó la glándula tiroides de 3 cadáveres frescos, homogenizando con PBS y obteniendo aproximadamente 30 ml de sobrenadante, el que contiene la tiroglobulina cruda.

II.- CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-200.

El sobrenadante que contiene la tiroglobulina cruda se agregó a una columna de sephadex G-200 de 2 x 90 cm y se colectaron fracciones de 4 ml, a las que se les de terminó proteínas leyendo a 280 nm, obteniendo los resultados que se presentan en la tabla 1. Estos datos -- fueron graficados (Figura 5) y las fracciones 4 a 12 se reunieron y se concentraron por ultrafiltración en membrana de Amicon XM50, hasta una cuarta parte de su volumen.

III.- CROMATOGRAFIA EN SEPHAROSA 4B.

El concentrado de la cromatografía en sephadex G-200 se recromatografió en una columna de 2 x 50 cm de sepha-

rosa 4B, colectando fracciones de 4 ml que se leyeron a 280 nm (Tabla 2) y cuyas lecturas fueren graficadas - - (Figura 6).

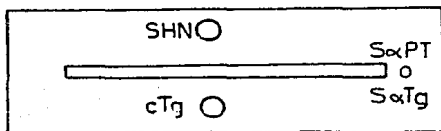
Las fracciones 9 a la 18 se concentraron por ultrafiltración, empleando una membrana de Amicon XM50 hasta una cuarta parte de su volumen.

IV.- PRUEBAS DE PUREZA.

El concentrado de la cromatografía en sepharosa 4B contiene la tiroglobulina pura; para comprobarlo se realizaron las siguientes determinaciones:

i- INMUNOELECTROFORESIS.

Se colocaron las muestras de acuerdo al siguiente esquema:



SHN- Suero humano normal

SαPT- Suero de conejo anti proteínas totales humanas.

SαTg- Suero humano, que contiene anticuerpos contra tiroglobulina humana.

cTg- Concentrado de tiroglobulina humana.

Los resultados obtenidos se observan en las figuras 7 y 8, y en ellos se pueda apreciar que el concentrado de tiroglobulina está exento de proteínas séricas (Fig. 7) y que reacciona de manera específica contra un suero anti tiroglobulina (Fig. 8).

TABLA No. 1
CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-200
DE UFI EXTRACTO DE TIROGLOBULINA CRUDA

No. Fracción	Absorbancia (280 nm)
1	0.070
2	0.215
3	0.610
4	1.110
5	1.900
6	2.700
7	3.650
8	3.780
9	3.800
10	3.650
11	2.990
12	1.490
13	0.720
14	0.450
15	0.310
16	0.250
17	0.210
18	0.190
19	0.170
20	0.160
21	0.160
22	0.150
23	0.160
24	0.170
25	0.180
26	0.210
27	0.230
28	0.270
29	0.310
30	0.330

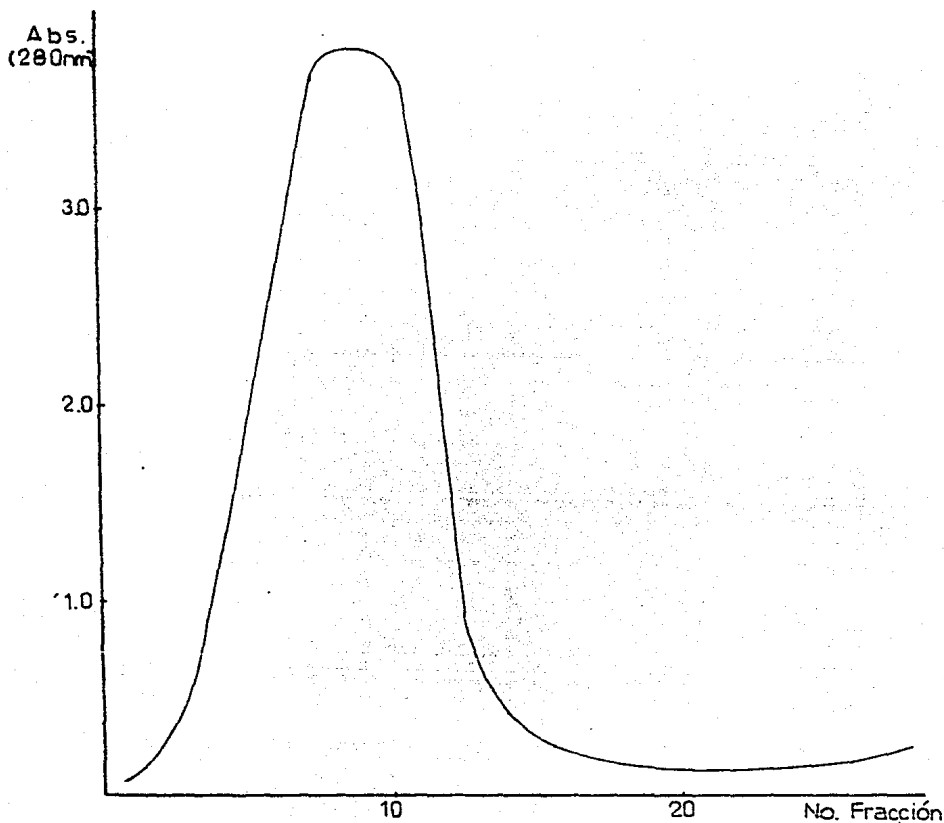


FIGURA No. 5
CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-200
DE UN EXTRACTO DE TIROGLOBULINA CRUDA

TABLA No. 2
 CROMATOGRAFIA EN SEPHAROSA 4B DEL CONCENTRADO
 DE LAS FRACCIONES 4 A 12 ELUIDAS DE SEPHADEX G-200

No. Fracción	Absorbancia (280 nm)
1	4.200
2	3.250
3	2.170
4	1.500
5	1.235
6	1.030
7	0.950
8	1.190
9	2.060
10	3.200
11	3.450
12	3.600
13	3.680
14	3.590
15	3.400
16	3.200
17	2.630
18	1.890
19	1.290
20	0.880
21	0.630
22	0.440
23	0.280
24	0.175
25	0.125
26	0.115
27	0.105
28	0.090
29	0.070

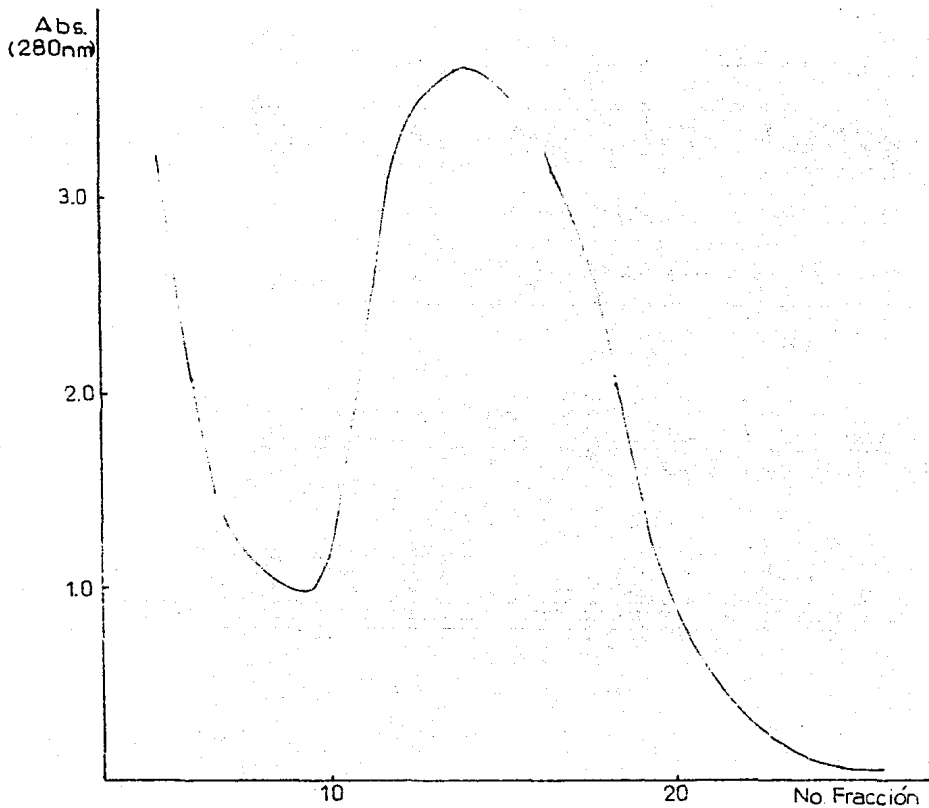


FIGURA No. 6
CROMATOGRAFIA EN SEPHAROSA 4B DEL CONCENTRADO
DE LAS FRACCIONES 4 A 12 ELUIDAS DE SEPHADEX G-200

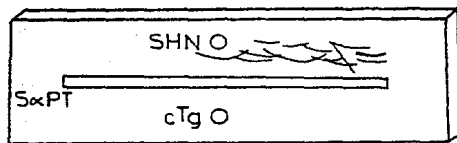


FIGURA No. 7
 INMUNOELECTROFORESIS CONTRA
 SUERO ANTI-PROTEINAS TOTALES

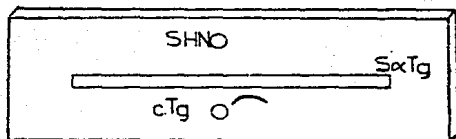


FIGURA No. 8
 INMUNOELECTROFORESIS CONTRA
 SUERO ANTI-TIROGLOBULINA

B. OBTENCION DE ANTICUERPOS CONTRA TIROGLOBULINA.

Se obtuvo el suero hiperinmune de 3 conejos New Zealand, inmunizados con tiroglobulina de acuerdo al esquema de la página 21.

Fue necesario verificar la especificidad del anti-suero obtenido, para lo cual se realizaron ensayos de inmunoprecipitación en capilar y precipitación en gel.

i- INMUNOPRECIPITACION EN CAPILAR.

Esta es una determinación inicial, para detectar la presencia de anticuerpos específicos en el suero, en donde se observó la aparición de precipitado abundante en forma casi inmediata, al mezclar 15 μ l de una solución de 6.6 mg/ml de tiroglobulina con 60 μ l de suero del conejo inmunizado.

ii- CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD.

El suero hiperinmune se cromatografió a través de un inmunoadsorbente con tiroglobulina. Se colectaron fracciones de 5 ml y se leyeron a 280 nm (Tabla 3). Estos datos se graficaron (Fig. 9) y las fracciones 2 a 10, que contienen los anticuerpos contra tiroglobulina, se concentraron empleando para ello polietilenglicol (PEG) 20000.

La especificidad de estos anticuerpos, así como su título, se determinó mediante reacciones de precipitación en gel (doble inmuno difusión).

iii- PRECIPITACION EN GEL.

El suero obtenido, así como los anticuerpos purificados, se pusieron en contacto con la tiroglobulina para determinar su especificidad (Fig.10).

El título del antisuero obtenido se determinó también por este método y fue de 1:64 (Fig.11).

TABLA No. 3
CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD DEL SUERO
DE CONEJO CONTRA TIROGLOBULINA

No. Fracción	Absorbancia (280 nm)
1	0.018
2	0.299
3	1.520
4	1.375
5	0.690
6	0.403
7	0.265
8	0.188
9	0.140
10	0.108
11	0.085
12	0.070
13	0.050
14	0.050
15	0.040

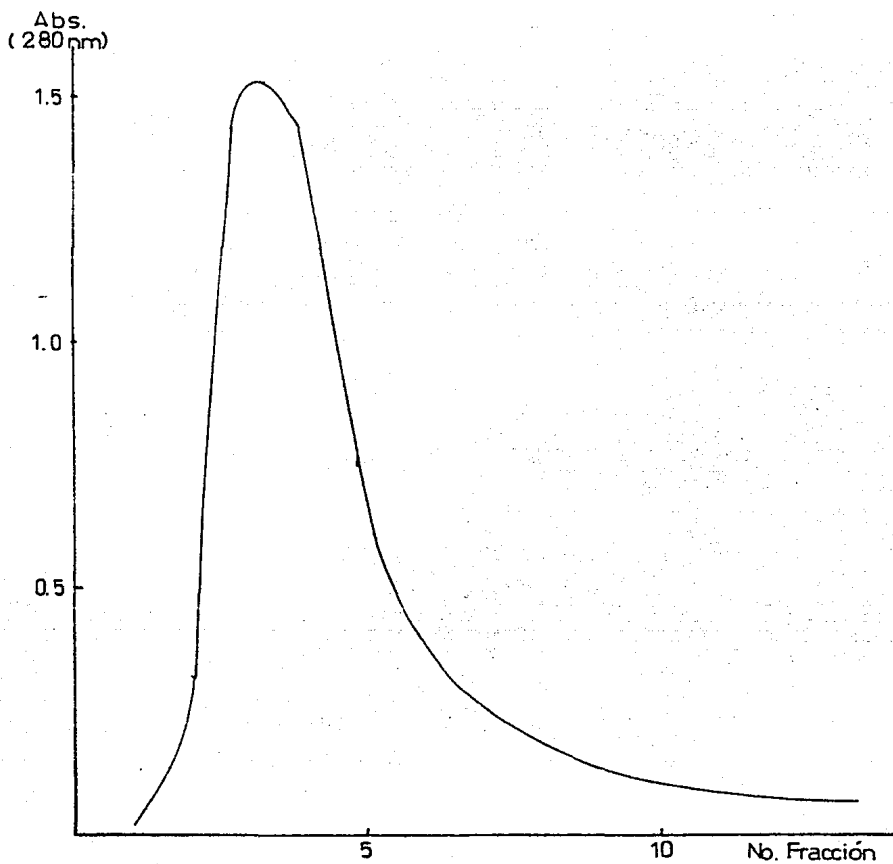


FIGURA No. 9
CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD
DEL SUERO DE CONEJO CONTRA TIROGLOBULINA

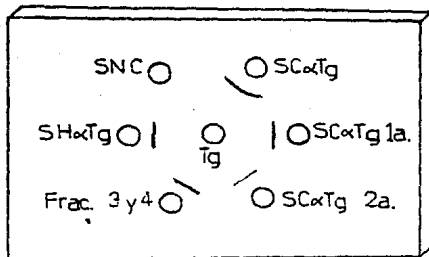


FIGURA No. 10
PRECIPITACION EN GEL

- SC α Tg - Suero de conejo anti-tiroglobulina (inicial).
- SC α Tg 1a. - Filtrado una vez por inmunoadsorbente.
- SC α Tg 2a. - Filtrado dos veces por inmunoadsorbente.
- Frac. 3 y 4 - Fracciones 3 y 4 eluidas con glicina-HCl.
- SH α Tg - Suero humano que contiene anticuerpos contra tiroglobulina humana (control positivo).
- SNC - Suero normal de conejo (control negativo).

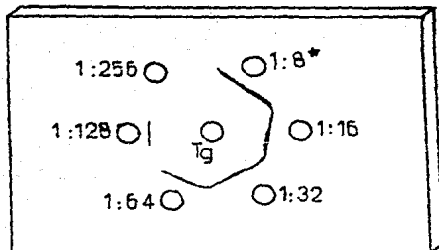


FIGURA No. 11

TITULACION DEL ANTISUERO DE
CONEJO CONTRA TIROGLOBULINA

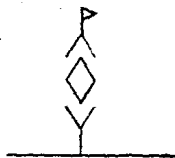
*Diluciones del antisuero de
conejo contra tiroglobulina.

Tg-Tiroglobulina purificada.

C. ENSAYO INMUNOENZIMATICO.

Ia. TITULACION DEL CONJUGADO ANTI TIROGLOBULINA-PEROXIDASA.

Sistema:



Tg-Perox

Tg (5 ng/ml)

Tg (50 µg/ml)

Se obtuvieron 2 ml del conjugado, que fue titulado por el método de ELISA utilizando una concentración de 50 µg/ml de anticuerpos de conejo contra tiroglobulina humana, para sensibilizar la placa, y una concentración constante de tiroglobulina de 5 ng/ml. Se emplearon las siguientes diluciones del conjugado: 1:50, 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000 y 1:8000.

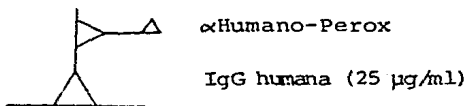
El blanco de la reacción está formado por el sustrato de la enzima y ácido sulfúrico; este último se utiliza para detener la reacción.

El basal o negativo de la reacción es aquel en el que no se adiciona el primer anticuerpo, de tal manera que la coloración obtenida es debida a unión inespecífica.

Se consideró como dilución óptima del conjugado a -
aquella dilución donde se obtiene la mayor diferencia -
entre positivos y negativos; en este caso, la dilución
es de 1:2000 (Tabla 4).

Ib. TITULACION DEL CONJUGADO ANTI HUMANO-PEROXIDASA.

Sistema:



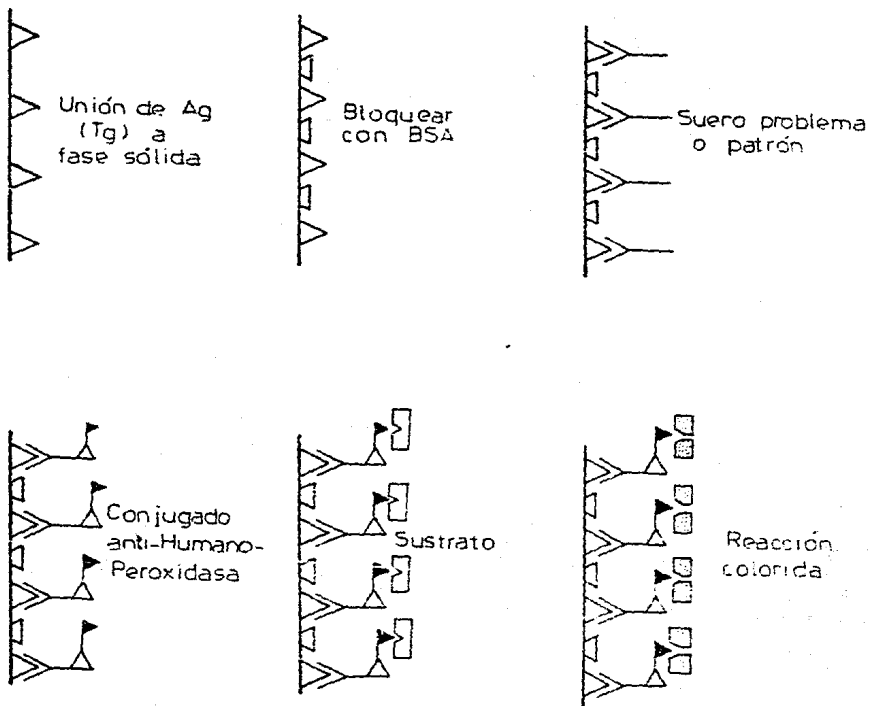
Para sensibilizar la placa, se utilizó IgG humana -
en una concentración de 25 μ g/ml. Las diluciones usadas
del conjugado fueron: 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000, - -
1:4000 y 1:6000, y de acuerdo a los resultados obteni -
dos la dilución óptima del conjugado es 1:1000 (Tabla
5); ésta es la dilución que se utilizó en los ensayos -
siguientes.

TABLA No. 4
 TITULACION DEL CONJUGADO
 ANTI TIROGLOBULINA-PEROXIDASA
 POR EL METODO DE ELISA

Dilución del Conjugado	Absorbancia a 492 nm		Diferencia (Pos - Neg)
	Muestra Negativa	Muestra Positiva	
1:250	1.576	2.000	0.424
1:500	1.063	1.491	0.428
1:1000	0.525	0.971	0.446
1:2000	0.136	0.614	0.478
1:4000	0.000	0.275	0.275
1:8000	0.000	0.041	0.041

TABLA No. 5
 TITULACION DEL CONJUGADO ANTI HUMANO-PEROXIDASA
 POR EL METODO DE ELISA

Dilución del Conjugado	Absorbancia Muestra Negativa	a 492 nm Muestra Positiva	Diferencia (Pos - Neg)
1:250	1.804	1.976	0.172
1:500	1.303	1.662	0.359
1:1000	0.738	1.621	0.883
1:2000	0.683	1.116	0.433
1:4000	0.580	0.624	0.044
1:6000	0.510	0.592	0.082



Ag - Antígeno
Tg - Tiroglobulina

BSA- Albúmina sérica bovina

FIGURA No. 12
ESQUEMA DEL ENSAYO DE ELISA PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA TIROGLOBULINA

IIa. ESTANDARIZACION DEL METODO DE ELISA PARA DETERMINAR ANTICUER-
POS CONTRA TIROGLOBULINA HUMANA EN SUERO.

La placa se recubrió con 50 µl de una solución de -
50 µg/ml de tiroglobulina (Fig.12). En esta determina -
ción se empleó una dilución de 1:320 tanto para mues --
tras normales como para muestras problema, debido a que
en esta dilución es donde se aprecia mejor la diferen -
cia entre las lecturas de positivos y negativos.

Se procesaron 15 sueros normales y 50 sueros problema
; para comparar estas poblaciones, se utilizó el Indi
ce de ELISA (18) que resulta de dividir la absorbancia
de la muestra problema entre la absorbancia del suero -
normal o de referencia; a cada uno de estos datos se le
resta la absorbancia basal, que es la absorbancia del -
pozo que contiene todos los reactivos, excepto el anti-
geno.

$$IF = \frac{(Abs Problema) - (Abs basal)}{(Abs referencia)* - (Abs basal)}$$

*Como muestra de referencia se utiliza una mezcla -
de por lo menos 10 sueros normales.

El uso de este índice nos permite la comparación de
datos entre ensayos.

Para poder distinguir muestras positivas de negativas, se estableció un límite considerando el promedio más 2 desviaciones estándar ($\bar{X} + 2S$) del IE de las muestras normales procesadas (Tabla 6), por lo que todo suro por arriba de este punto será considerado positivo y por debajo de él negativo. El valor límite obtenido es 1.1.

Los resultados obtenidos para las muestras problema se muestran en la tabla 7.

Las muestras normales y las muestras problema se graficaron (Figura 13) para permitirnos hacer una comparación entre ellas. Se obtuvieron 29 valores por arriba del límite, por lo que estas muestras se consideran positivas; el resto de las muestras se localizaron dentro de los valores normales.

La mayoría de las muestras que por este método fueron positivas habían resultado también positivas por inmunofluorescencia.

TABLA No. 6
 DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA TIROGLOBULINA
 EN MUESTRAS NORMALES

Muestras Normales

No.	I.E.
1	0.7
2	0.7
3	0.9
4	0.7
5	0.8
6	0.5
7	0.9
8	0.4
9	0.1
10	0.6
11	0.6
12	0.8
13	0.6
14	0.6
15	0.9

$$\bar{X} = 0.653$$

$$S = 0.206$$

$$\bar{X} + 2S = 1.100$$

- I.E. - Índice de ELISA
 \bar{X} - Media aritmética
 S - Desviación estándar

TABLA No. 7

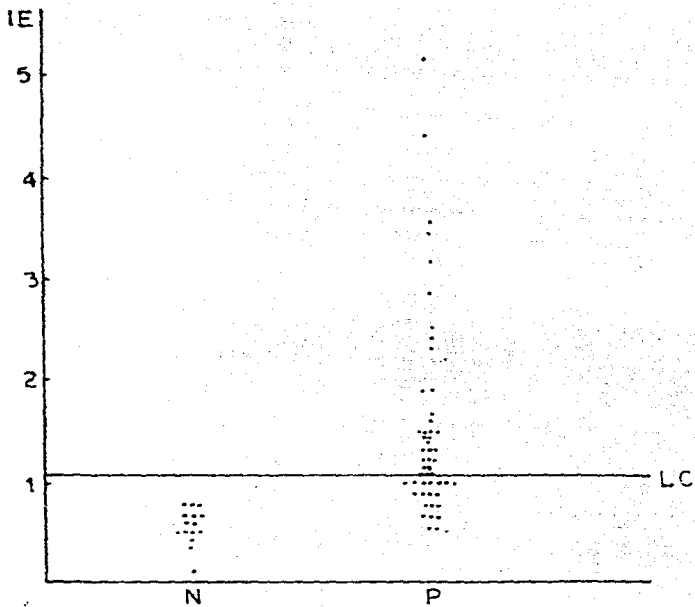
DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA TIROGLOBULINA
EN MUESTRAS PROBLEMA

Muestra No.	I.E.	Resultado
1	0.9	-
2	1.5	+
3	0.7	-
4	1.0	-
5	0.7	-
6	3.4	+
7	0.7	-
8	0.9	-
9	4.4	+
10	2.4	+
11	1.0	-
12	1.5	+
13	1.1	-
14	1.2	+
15	0.9	-
16	5.2	+
17	0.5	-
18	1.1	-
19	1.0	-
20	1.6	+
21	1.2	+
22	1.0	-
23	1.3	+
24	1.0	-
25	0.9	-

TABLA No. 7 (CONT.)

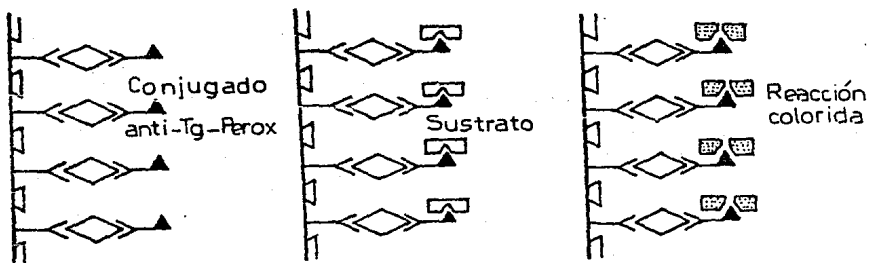
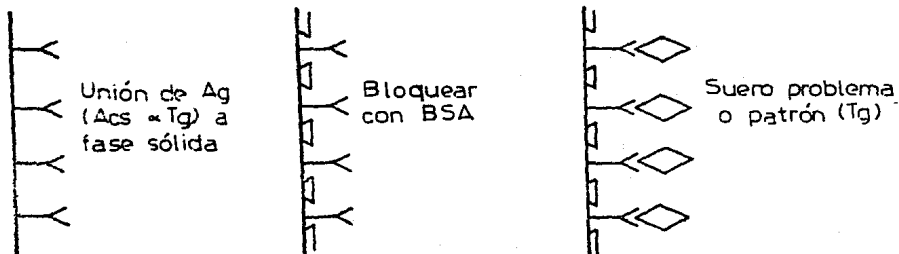
Muestra No.	I.E.	Resultado
26	0.5	-
27	1.0	-
28	1.8	+
29	1.5	+
30	1.2	+
31	2.9	+
32	3.1	+
33	0.6	-
34	0.6	-
35	1.4	+
36	0.7	-
37	0.6	-
38	3.5	+
39	1.1	-
40	1.2	+
41	2.3	+
42	1.7	+
43	1.0	-
44	1.4	+
45	0.7	-
46	0.8	-
47	2.5	+
48	1.2	+
49	1.8	+
50	1.5	+

I.E. - Indice de ELISA



I.E. -Indice de ELISA
 L.C. -Límite de confiabilidad
 N -Muestras normales
 P -Muestras problema

FIGURA No. 13
 DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA TIROGLOBULINA
 POR EL METODO DE ELISA



Ag - Antígeno
 Acs α Tg - Anticuerpos
 contra Tg

Tg - Tiroglobulina
 BSA- Albúmina sérica
 bovina

FIGURA No. 14
 ESQUEMA DEL ENSAYO DE ELISA PARA LA DETERMINACION
 DE TIROGLOBULINA

IIb. ESTANDARIZACION DEL METODO DE ELISA PARA DETECCION DE TIROGLOBULINA EN SUERO.

La placa se recubrió con 50 μ l de una solución de anticuerpos contra tiroglobulina en una concentración de 50 μ g/ml (Fig.14).

Se trazó una curva patrón, utilizando concentraciones conocidas de tiroglobulina (Tabla 8, Figura 15).

Se procesaron 9 sueros de personas sin alteración tiroidea aparente (que se consideraron normales) y 33 sueros problema. Ambas poblaciones se trabajaron en dilución 1:4, para que las lecturas obtenidas pudieran ser interpoladas en la curva patrón.

Las concentraciones de tiroglobulina obtenidas, tanto para muestras normales como para las muestras problema se observan en las tablas 9 y 10. Como se mencionó anteriormente, la concentración de tiroglobulina en sujetos normales es hasta de 120 ng/ml; considerando este valor como límite superior, las muestras fueron graficadas observándose que 23 de las 33 muestras problema exceden este límite (Figura 16).

TABLA No. 8
 CURVA PATRON PARA LA DETECCION DE TIROGLOBULINA
 POR EL METODO DE ELISA

Tiroglobulina (ng/ml)	Log []	Absorbancia (492 nm)
1.0	0.00	0.030
1.5	0.17	0.060
3.5	0.54	0.045
7.5	0.87	0.060
15.5	1.19	0.065
31.0	1.49	0.060
62.5	1.79	0.085
125.0	2.09	0.105
250.0	2.39	0.135
500.0	2.69	0.185
1000.0	3.00	0.260
2000.0	3.30	0.380

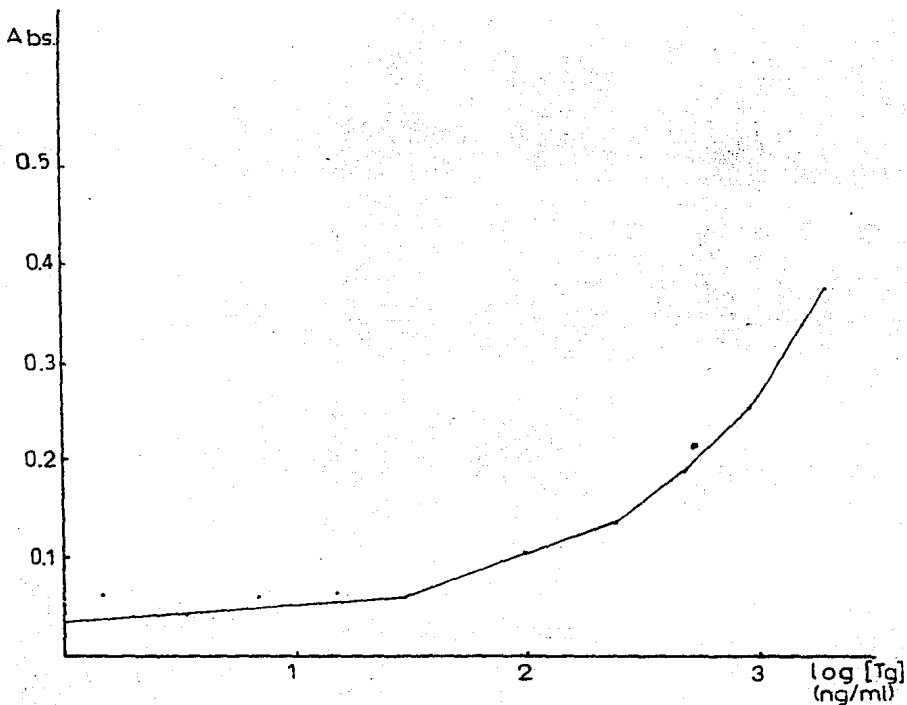


FIGURA No. 15
CURVA PATRON PARA LA DETECCION DE TIROGLOBULINA
POR EL METODO DE ELISA

TABLA No. 9
DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE TIROGLOBULINA
EN MUESTRAS NORMALES POR EL METODO DE ELISA

No.	Absorbancia (492 nm)	Tiroglobulina (ng/ml)
1	0.040	7.6
2	0.045	13.6
3	0.050	25.2
4	0.015	4.0
5	0.070	156.0
6	0.035	4.6
7	0.050	25.2
8	0.070	156.0
9	0.045	13.6

TABLA No. 10
 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE TIROGLOBULINA
 EN MUESTRAS PROBLEMA POR EL METODO DE ELISA

No.	Absorbancia (492 nm)	Tiroglobulina (ng/ml)
1	0.05	25
2	0.08	231
3	0.06	100
4	0.06	100
5	0.08	231
6	0.11	539
7	0.07	156
8	0.09	303
9	0.05	25
10	0.07	156
11	0.07	156
12	0.07	156
13	0.04	7
14	0.06	100
15	0.05	25
16	0.08	231
17	0.06	100
18	0.07	156
19	0.07	156
20	0.06	100
21	0.09	303
22	0.12	692
23	0.14	1076
24	0.09	303
25	0.20	2300
26	0.09	303
27	0.13	872
28	0.11	539
29	0.15	1236
30	0.12	692
31	0.08	231
32	0.07	156
33	0.06	100

CONCLUSIONES:

Siendo la patología de la glándula tiroides una de las más frecuentes en la endocrinología (18), las pruebas de laboratorio para determinar T3, T4, tiroglobulina, TSH y anticuerpos anti-tiroideos son de las más solicitadas; lo que resulta en un gasto considerable, sobre todo por tratarse de equipos importados.

En este trabajo se proponen procedimientos para:

- a) Obtención de tiroglobulina
- b) Preparación de anticuerpos anti-tiroglobulina
- c) Preparación de un método inmunoenzimático para determinar:

i.- Tiroglobulina sérica

ii.- Anticuerpos anti-tiroglobulina.

El procedimiento estandarizado en este trabajo para la purificación de tiroglobulina es un método sencillo, además de práctico y reproducible, que se puede realizar en cualquier laboratorio por ser económico y producir excelentes resultados, ya que el rendimiento que se obtiene es adecuado tanto para producir anticuerpos contra esta molécula como para ser utilizada en ensayos --posteriores.

Los métodos para obtener y purificar anticuerpos --

contra tiroglobulina en conejo son muy eficientes, ya que nos permitieron obtener anticuerpos de alta afinidad, pureza y buena especificidad.

La difusión de los métodos inmunoenzimáticos está permitiendo la detección de más moléculas de interés clínico, ya que son comparables a métodos muy sensibles (radioinmunoensayo e inmunofluorescencia) y son de manejo accesible a una gran cantidad de laboratorios de diagnóstico.

El ensayo de ELISA para detectar anticuerpos contra tiroglobulina estandarizado en este trabajo, es un método sensible que diferencia adecuadamente muestras normales y muestras positivas, y también es específico ya que el reactivo utilizado (tiroglobulina) está exento de contaminantes, lo cual fue comprobado por inmunoelectroforesis e inmunodifusión.

El índice de ELISA es un parámetro que nos permite comparar los resultados obtenidos en ensayos diferentes, lo cual es importante para el seguimiento de pacientes en períodos prolongados.

En el ensayo de ELISA para la detección de tiroglobulina, es importante trazar una curva patrón con concentraciones conocidas de tiroglobulina cada vez que se realice una determinación, lo cual nos permitirá obte -

ner las concentraciones reales de cada muestra. Este en sayo es específico ya que el reactivo utilizado (anti - cuerpos contra tiroglobulina) es específico para su antígeno (tiroglobulina) lo cual se confirmó por inmunodi fusión e inmunolectroforesis. Su sensibilidad es alta ya que nos detecta en forma adecuada hasta 7.5 ng/ml, - lo cual es muy útil debido a que la concentración nor - mal de tiroglobulina en sangre está en el rango de 20 a 120 ng/ml.

La detección de tiroglobulina y anticuerpos contra tiroglobulina, por los métodos estandarizados en este - trabajo convertirán estas determinaciones es pruebas me nos restringidas; su utilización por lo tanto, podrá -- ser una herramienta más accesible para el diagnóstico - clínico de enfermedades tiroideas.

El papel del Q.F.B. no debe circunscribirse a utili - zar reactivos comerciales o equipos automatizados para realizar las determinaciones de laboratorio, sino ade - más debe incursionar también en otros campos, por el mo mento poco explotados. En esta perspectiva, la labor -- del Q.F.B. será igualmente valiosa tanto al servicio de la investigación como persiguiendo la autosuficiencia - tecnológica, sobre todo en estos momentos de crisis eco nómica en la que hay el peligro de carecer de presupes to para seguir en la práctica de una medicina moderna.

APENDICE:

1.- ADYUVANTE INCOMPLETO DE FREUND (FIA)

Arlacel 1 vol.

Drakeol 9 vol.

Agitar vigorosamente hasta homogenizar

2.- ADYUVANTE COMPLETO DE FREUND (FCA)

Micobacterium sp. desecado 2 mg

FIA 10 ml

Agitar vigorosamente para homogenizar

3.- SOLUCION AMOTRIGUADORA DE ACETATOS 0.2 M pH 2.8

Sol. A Acetato de sodio 8.2 g/l

Sol. B Acido acético 6.0 g/l

Mezclar 1/3 de solución A con 2/3 de solución B.

Ajustar el pH a 2.8 y diluir 1:5 para su uso.

4.- SOLUCION AMORTIGUADORA DE BARBITURATOS pH 8.6

Ac. dietilbarbitúrico 2.76 g

Dietilbarbiturato de sodio 15.40 g

Ajustar el pH y aforar a 1 litro

5.- SOLUCION AMORTIGUADORA DE CARBONATOS 1.0 M pH 9.5

Sol. A Na_2CO_3 1.05 g/10 ml

Sol. B NaHCO_3 4.20 g/50 ml

Mezclar 3 ml de la solución A con 7 ml de la solución B.

6.- SOLUCION AMORTIGUADORA DE CITRATOS 0.32 M

Ac. cítrico 0.1 M 24.3 ml

Na_2HPO_4 0.2 M 25.7 ml

Aforar a 100 ml con agua bidestilada.

7.- SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS) pH 7.2

NaCl 7.650 g

Na_2HPO_4 1.268 g

NaH_2PO_4 0.100 g

KH_2PO_4 0.211 g

Aforar a 1 litro.

8.- SOLUCION AMORTIGUADORA SALINA DE FOSFATOS (PBSS)

pH 7.2

NaCl 8.0 g

KH_2PO_4 0.2 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g

KCl 0.2 g

Aforar a 1 litro con agua bidestilada.

9.- SOLUCION SALINA FISIOLÓGICA (SSF)

NaCl 9.0 g

Aforar a 1 litro.

10.- SOLUCION DE GLICINA-HCl 0.2 M pH 2.8

Glicina 15.01 g

Disolver en 500 ml de agua destilada y ajustar el pH con HCl 0.2 M.

Aforar a 1 litro.

BIBLIOGRAFIA:

- 1) Quiroz, G.F. Anatomía Humana. 18a. Edición. Ed. Porrúa. México 1978.
- 2) Tortora, G.J. y Anagnostakos, N.P. Principios de Anatomía y Fisiología. Ed. Harla. México 1977.
- 3) Guyton, A.C. Medical Physiology. 6a. Edición. Ed. W. B. Saunders Co. London 1981.
- 4) Shulman, S. Thyroid antigens and autoimmunity. Adv. in Immunol. 14:85 (1971).
- 5) Roitt, I.M., Doniach D., Campbell, P.N. and Vaughan Hudson, R. Autoantibodies in Hashimoto's disease (lymphadenoid goitre). Lancet ii, - 820 (1956).
- 6) Witebsky, E., Rose, N.R., Terplan, K., Paine, J.R. - and Egan, R.W. Chronic Thyroiditis and autoimmunization. J. Amer. Med. Assoc. 164:1439 (1957).
- 7) Belyavin, G. and Trotter, W.R. Investigations of Thyroid antigens reacting with Hashimoto sera. Lancet i: 648 (1959).
- 8) Anderson, J.R., Goudie, R.B. and Gray, K.G. The 'thyrotoxic' complement fixation reaction. Scot. Med. J. 4:64 (1959).
- 9) Roitt, I.M. and Doniach, D. Human autoimmune thyroiditis: serological studies. Lancet ii:1027 - (1958).

- 10) Balfour, B.M., Doniach, D., Roitt, I.M. and Couch - man, K.G. Fluorescent antibody studies in - human thyroiditis: autoantibodies to an antigen of the thyroid colloid distinct from thyroglobulin. Brit. J. Exp. Path. 42:307 - (1961).
- 11) Fagraeus, A. and Jonsson, J. Distribution of organ antigens over the surface of thyroid cells as examined by the immunofluorescence test. Immunology 18:413 (1970).
- 12) Jonsson, J. and Fagraeus, A. On the mechanism of - the ring zone effect obtained with the mi - xed haemadsorption technique. Studies with human anti thyroid sera, reacting with thyroid monolayer cultures. Immunology 17:387 (1969).
- 13) Goudie, R.B., Anderson, J.R. and Gray, K.G. Non-pre cipitating antithyroglobulin studied by the Ouchterlony technique. Immunology 4:309 - - (1959).
- 14) Calder, E.A., McLeman, D. and Irrine, W.J. Lymphocite cytotoxicity induced by pre-incubation - with serum from patients with Hashimoto thyroiditis. Clin. Exp. Immunol. 15:467 (1973)
- 15) Mori, T. and Kriss, J.P. Measurements by competitive binding radioassay of serum anti-microsomal and anti-thyroglobulin antibodies in -- Graves' disease and other thyroid disorders J. Clin. Endocr. 33:688 (1971).

- 16) Van Herle, A.J., Matthews, N.L. and Broun, J. Radioimmunoassay for measurement of thyroglobulin in human human serum. J. Clin. Invest. 52:1320 (1973).
- 17) Roman, S.H., Korn, F. and Davies, T.F. Enzyme-linked immunosorbent microassay and hemagglutination compared for detection of thyroglobulin and thyroid microsomal autoantibodies. Clin. Chem. 30: 246 (1984).
- 18) Doniach, D. and Roitt, I.M. Autoimmune thyroid disease. In Textbook of Immunopathology. 2nd. - Ed. Ed. Miescher, P.A. and Muller-Eberhardt H. Grune and Stratton, New York. (1980).
- 19) Sephadex gel filtration in theory and practice. -- Pharmacia Fine Chemicals. Uppsala-Sweden -- 1970 (Manual).
- 20) Margni, R.A. Inmunología e Inmunología. Fundamentos. Ed. Panamericana, Argentina 1977.
- 21) Hudson, L. and Hay, F.C. Practical Immunology. Ed. Blackwell. 2nd. Ed. London 1980.
- 22) Operating Instructions for Diaflo Ultrafilters. Publication I-101M. Amicon Corporation. Massachusetts, U.S.A.
- 23) Whitaker, J.R. Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on Sephadex. Anal. Chem. 35: 1950 (1963).
- 24) Andrews, P. Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel filtration. Biochem. 91: 222 (1964).

- 25) Jonhs, P.P. Selected Methods in Cellular Immunology
Ed. W.H. Freeman and Company. 1980.
- 26) Quesada, F. Practicas de Inmunofisica. E.N.C.B. -
I.P.N. México 1985.
- 27) Weir, D.M. Handbook of Experimental Immunology. --
Blackwell Scientific Publications. 2nd. Ed. -
Oxford 1973.
- 28) Vanoss, C.J. Methods in Immunodiagnosis. A Wiley Me
dical Publication. 2nd. Ed. 1980.
- 29) Campbell, D.H., Garvey, J.S., Cremer, N.F. and Suss
dorf, D.H. Methods in Immunology. 2nd. Ed. --
W.A. Benjamin, Inc. N.Y. 1970.
- 30) Kabat, E.A. and Mayer, M.M. Experimental Immunoche-
mistry. 2nd. Ed. Charles C. Thomas. Illinois,
U.S.A. 1961.
- 31) Jaton, J.C., Brandt, D.C. and Vasalli, P. The isola
tion and characterization of immunoglobulins,
antibodies and their constituent polypeptide
chains. Immunological Methods. L. Lefkovits -
and B. Pernis. Eds. Academic Press. New York
1979.
- 32) The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Bull.
World Health Organ. 54: 3498 (1976).
- 33) Voller, A., Bidwell, D.E. and Bartlott, A. Enzyme -
immunoassays in diagnostic medicine. Bull --
World Health Organ 53: 55 (1976).
- 34) Bidwell, D.E. et.al. The enzyme-linked immunosor --
bent assay (ELISA). Bull World Health Organ -
54: 129 (1976).

- 35) Engvall, E. and Perlmann, P. Enzyme-linked immuno - sorbent assay (ELISA). Immunochemistry 8: 871 (1971).
- 36) Avrameas, S. and Ternynck, T. Peroxidase labeled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. Immunochemistry 8:87 -- (1971).
- 37) Nakane, P.K. and Kawaoi, J.A. Peroxidase labelled - antibody. A new method of conjugation. J. Histochem Citochem 22: 1084 (1974).
- 38) Voller, A. et.al. The enzyme-linked immunosorbent - assay. In Manual of Clinical Immunology. Eds. N. Rose and I. Friedman. Publ. Amer. Soc. Microbiol. (1976).

Esta Tesis fué elaborada en su
totalidad en los Talleres de -
Impresos Moya, Rep. de Cuba -
No. 99, Despacho 23.

México 1, D.F. Tel. 657-24-74
Presupuestos 9 P.M. a 11 P.M.
Sr. Salvador Moya Franco.