



11262
1 ej 4
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA
División de Estudios de Posgrado

**EXTRACCION DE TIROTROPINA PLASMÁTICA PARA SU
CUANTIFICACION POR RADIOINMUNOANÁLISIS**

T E S I S
para obtener el grado de
Maestría en Ciencias Médicas

DR. MIGUEL ANGEL LOPEZ MORA

Unidad de Investigación Clínica en Enfermedades Endocrinas

Hospital General, Centro Médico Nacional
Instituto Mexicano del Seguro Social

Tutor: Dr Salvador Villalpando Hernández



México, D. F.

FALLA DE CRÉDITO

1986



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 esta 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.

Antecedentes científicos

El radioinmunoanálisis (RIA), ha aportado avances importantes en el estudio de la fisiología y la patología de la función tiroidea, simplificando el manejo clínico de las alteraciones que afectan a esta glándula. Sin embargo, para valorar la función tiroidea se necesita medir varios índices tales como: 1) la concentración en suero de las hormonas tiroideas y de la hormona estimulante del tiroides (TSH), los niveles circulantes de la tiroglobulina, de la globulina transportadora de tiroxina (TBG), los anticuerpos antitiroideos y la captación de triyodotironina por una resina (captación de T3), 2) captación de yodo radiactivo por la glándula tiroidea y el centelleograma (1-3). Incluso, en algunas condiciones patológicas se necesitan estudios adicionales o pruebas provocativas como son la prueba de supresión de TSH con T3, la estimulación con TSH y la estimulación con la hormona liberadora de tirotrópina (TRH). Algunos de estos recursos no siempre están disponibles, además de que elevan el costo de la atención médica y pueden condicionar retrasos en la instalación de la terapéutica (4). Las hormonas tiroideas circulantes en suero están unidas a proteínas. Solamente el 0.05 % de la concentración total plasmática se encuentra circulando en forma libre y esta fracción es la que desarrolla las funciones metabólicas y la autorregulación (5-7). Por ello, la forma idónea de precisar la función tiroidea sería mediante la cuantificación de las fracciones libres de T3 y tiroxina (t4), para lo cual se utiliza una diálisis en equilibrio. Esperamos, el procedimiento es complejo y no se encuentra disponible para su uso rutinario (8). Una forma indirecta de valorar la función tiroidea es cuantificar la TSH plasmática, ya que pequeños cambios en los niveles circulantes de T3 y T4 del orden de 15 % a 20 % modifican proporcionalmente la secreción de TSH. Este efecto de las hormonas tiroideas se alcanza en virtud de que controlan el número de los receptores de membrana para la TRH en el tirotrópo hipo -

fisario. Así, concentraciones altas los disminuyen y niveles bajos los aumentan. A su vez, la TSH controla la secreción de T3 y T4 estableciéndose el fenómeno de retroinhibición(9-11). El problema que se presenta con la cuantificación de TSH es que la sensibilidad del RIA disponible comercialmente es de 0.6 uUI/ml, mismo que constituye el nivel inferior en los individuos sanos. Los valores de TSH en el estado normal y la hiperfunción tiroidea son semejantes y por lo tanto muestran una sobreposición(3). De la misma forma, tampoco ayuda a distinguir casos que cursan con hipotiroidismo secundario a una deficiencia de TSH. Consecuentemente, la utilidad clínica de la medición hormonal de TSH se limita a los casos de hipotiroidismo primario en cuyo caso los niveles de la hormona son muy elevados(12). En otros estados funcionales es de poca utilidad diagnóstica. La TSH es una hormona proteica con un peso molecular de 28 000 daltones que se sintetiza en las células tirotrópicas de la adenohipófisis. Contiene en su estructura 15 % de carbohidratos por lo que se le considera al igual que a las gonadotropinas, como una hormona glucoproteica(13). Recientemente, se han descrito métodos para extraer glucoproteínas circulantes, los cuales emplean adsorbentes grupo-específicos del tipo de las lectinas(Concanavalina-A acoplada a sefarosa 4B) que concentran las glucoproteínas y consecuentemente aumentan la sensibilidad de los sistemas de medición(14). La Concanavalina-A (Con-A) es una proteína cristalizable del grupo de las lectinas que tiene la propiedad de fijar azúcares (15,16); está compuesta de una subunidad alfa y dos subunidades beta. También se considera como una metaloproteína por el alto contenido en calcio, magnesio y manganeso. Asimismo, el zinc es importante porque le confiere estabilidad en sus formas ionizadas. La lectina interactúa con cualquier cadena de carbohidratos y su propiedad fijadora es cuantitativa y es proporcional a la concentración en que se utiliza. La presencia en las glucoproteínas de residuos alfa-manosil con grupos hidroxilo libres en los carbonos número 3, 4 y 6 es un requisito para su unión a la Con-A

(17-21). El fenómeno de fijación de las glucoproteínas en la superficie de la Con-A es revertido con alfa-metil-D-manósido(manósido), monosa - cárido por el cual la lectina tiene una afinidad mayor(22).

Considerando que la TSH es una hormona glucoprotéica, se diseñó un método para extraerla del plasma utilizando concanavalina-A acoplada a sefarosa 4B y cuantificarla posteriormente por radioinmunoanálisis.

Objetivo

Valorar la capacidad de un método de extracción de TSH plasmática utilizando concanavalina-A, como índice diagnóstico único para precisar la función tiroidea.

Materiales y métodos

Reactivos .- La concanavalina-A acoplada a sefarosa 4B se obtuvo de Pharmacia Fine Chemicals Co. y el manósido de Sigma Chemical Co. La TSH marcada con yodo radiactivo y los reactivos del RIA se obtuvieron de Sorin Biomedica-International-CIS. La cromatografía de afinidad se hizo en columnas desechables Kontes-Chromaflex de 20 cm. El amortiguador salino-fosfato(PBS PO4 0.01 M, NaCl 0.15 M, pH 7.8) se obtuvo de Sigma Lab. de México.

Caracterización del procedimiento de extracción de TSH-I¹²⁵

Cromatografía de afinidad .- En un extremo de la columna desechable se colocaron 0.5 ml de Con-A preparada mediante agitación continua del sedimento con una proporción peso/volumen iguales de lectina y PBS. Posteriormente se añadió TSH-I¹²⁵ (1.0 ml, 200 000 cuentas/minuto) y se procedió a eluir la columna con PBS. Finalmente se añadió 1.0 ml de manósido 0.5 M con el objeto de desplazar la hormona radiactiva de la lectina. Las fracciones de 1.0 ml se recogieron en tubos y fueron contadas en un espectrómetro de radiaciones gama.

Efecto de las dosis de Con-A y manósido sobre la fijación y desplazamiento de TSH-I¹²⁵ .- Con el objeto de estudiar los efectos de concentraciones variables de Con-A y manósido para fijar y desplazar TSH-I¹²⁵

respectivamente, se efectuó un experimento con un diseño de cuadrado latino. La Con-A se utilizó a las concentraciones de 10, 50, 100 y 500 ul y el manósidio a la concentración de 0.2, 0.6, 0.8 y 1.0 molar. En tubos de ensayo de 12 x 75 mm se colocaron la Con-A y la TSH radiactiva (100 ul, 35 000 cuentas/minuto), se agitó en vértex dejándose reposar 30 minutos. Los tubos se centrifugaron a 3 000 rpm durante 20 minutos y se decantó el sobrenadante. El precipitado y el sobrenadante fueron contados por espectrometría. Una vez contados, al precipitado se le agregó la solución de manósidio en un volumen de 500 ul a la molaridad correspondiente. Después se centrifugó y se hizo decantación de la misma manera. Fueron contados tanto el precipitado como el sobrenadante.

Efecto del plasma y del pH sobre la fijación y desplazamiento de TSH-I¹²⁵

Para valorar el efecto del suero sobre la fijación y desplazamiento de TSH y del pH sobre la capacidad de la lectina para fijar la hormona, se utilizó el suero de un enfermo hipofisectomizado y tratado con una mezcla de hormonas tiroideas. En este individuo la TSH fue indetectable por RIA. En tubos de ensayo se colocaron 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 ml de suero. Cuando fue necesario se aforaron con PBS hasta un volumen de 2.5 ml. Se agregaron 500 ul de Con-A y 100 ul de TSH-I¹²⁵ (35 000 cuentas/minuto). En otros tubos se colocaron 2.5 ml de solución salina normal con pH de 6.0, 7.0 y 8.0 y se agregaron la Con-A y la hormona radiactiva en las cantidades descritas. Enseguida, los tubos fueron agitados en vértex y centrifugados como fue descrito. El sobrenadante fue descartado. Después de agregar 500 ul de manósidio 0.8 M al precipitado, los tubos se agitaron y centrifugaron de nuevo. El precipitado y el sobrenadante fueron contados por separado.

Caracterización del procedimiento de extracción de TSH (hormona "fría")

Con el objeto de conocer la recuperación de dosis conocidas de TSH mediante el procedimiento de extracción, las dosis de la curva estándar del RIA se aforaron hasta un volumen de 2.5 ml con PBS y sometidas al procedimiento de extracción utilizando para ello 500 ul de la Con-A y 500 ul

de manósidio 0.8 M. La TSH extraída se midió en el RIA y se comparó con la dosis sin extraer.

Caracterización del procedimiento de extracción de TSH en el suero humano.

La concentración de TSH fue medida en el suero de pacientes con hipertiroidismo (n=12), hipotiroidismo primario (n=6), hipotiroidismo secundario (n=4) y en individuos sanos (n=7), mediante un sistema de RIA. En tubos separados se colocaron 2.5 ml de la muestra problema y se agregaron 500 ul de Con-A. Los tubos se agitaron durante una hora a intervalos de 15 minutos, con incubación a temperatura ambiente, centrifugándose después a 3 000 rpm durante 20 minutos. Los sobrenadantes se decantaron y eliminaron, después se agregó el manósidio (500 ul, 0.8 M) al precipitado de Con-A-TSH. Se procedió de nuevo a agitación y centrifugación como fue descrito y los sobrenadantes se midieron en el RIA de TSH. Todas las muestras fueron procesadas en un solo ensayo.

Los resultados de los experimentos con TSH-I¹²⁵ se expresaron en porcentajes de fijación, desplazamiento y recuperación. Las concentraciones de la TSH plasmática se calcularon en una curva linealizada (logit-log) y se expresaron en UUI/ml. La validación del RIA se estableció en la forma habitual (23) y el análisis estadístico de los grupos de individuos estudiados se hizo con un anova de comparación múltiple no-planeada (método GT-2) previa transformación logarítmica (24).

Resultados

Caracterización del procedimiento de extracción de TSH-I¹²⁵

Cromatografía de afinidad .- Al efectuarse la cromatografía de afinidad (fig 1) de TSH-I¹²⁵, se detectó un primer pico de radiactividad equivalente al 25 % de las cuentas por minuto totales. Después de agregar el manósidio a la columna, se observó un segundo pico que correspondió al 60% aproximadamente de la radiactividad total, permaneciendo el 10 % adherido a la columna.

Efecto de las dosis de Con-A y de manósido sobre la fijación y desplazamiento de TSH-¹²⁵

.- La influencia de las variaciones en la concentración de lectina y manósido sobre la fijación y desplazamiento de TSH radiactiva se describen en la fig 2 y 3 . La capacidad máxima de la Con-A para fijar la hormona se alcanzó con 100 ul del adsorbente. Las dosis de 100 y 500 ul mostraron diferencias mínimas con respecto a los porcentajes correspondientes de fijación. Por otra parte, puede observarse (fig 3) , que a medida que aumentaron las concentraciones de manósido en presencia de cantidades progresivamente mayores de Con-A, la cantidad de TSH desplazada fue mayor. La radiactividad residual de los precipitados fueron similares en todos los tubos después de añadirse el manósido (tabla 1).

Efecto del plasma y del pH sobre la fijación y desplazamiento de TSH-¹²⁵

La fig 4 ilustra el efecto del suero sobre la capacidad de la Con-A para fijar hormona radiactiva. La fijación de la glucocorticoide es inversamente proporcional a la concentración del suero. A los valores analizados, el pH no mostró relación con la capacidad de la lectina para fijar TSH radiactiva.

Caracterización del procedimiento de extracción de TSH [hormona "frfa"]

La tabla 2 muestra los valores de TSH obtenidos después de haber sometido las dosis de la curva estándar del RIA al procedimiento de extracción utilizando Con-A. La diferencia entre los valores de las dosis estándar cuantificadas con y sin extracción son claras ya que varían entre 50 % y 70 %. La variación es menor cuando la cantidad de glucocorticoide está por abajo de 5 uUI/ml. Las concentraciones de TSH de la curva estándar del RIA tuvieron una correlación significativa ($p < 0.001$) con los valores de la hormona después de extracción (fig 5). Los coeficientes de variación inter-intraensayo del RIA fueron menores de 5 % .

Caracterización del procedimiento de extracción de TSH en el suero humano

Los valores de TSH observados en individuos sanos con el método de extracción tuvieron como límites 4.9 uUI/ml - 9.4 uUI/ml mientras que sin extracción los tuvieron entre 1.5 uUI/ml - 2.9 uUI/ml .

Los valores individuales obtenidos con ambos métodos se muestran en la tabla. En la mayoría de los casos, el valor obtenido de TSH con el procedimiento de extracción fue 2 a 3 veces mayor respecto del método sin extracción. Sin embargo, en los casos con hipertiroidismo, el nivel de la hormona se encontró 8 a 16 veces mayor con el procedimiento de extracción. En la fig 6 se describen la media y la desviación estándar de la TSH de los grupos estudiados. Los valores de TSH medidos con un mismo método no demostraron diferencias significativas al comparar los grupos. Por el contrario, al comparar los valores obtenidos con uno y otro método, las diferencias intragrupalas fueron significativas ($p < 0.05$). En un caso de hipertiroidismo, la TSH plasmática se pudo detectar solamente con el procedimiento de extracción.

Discusión

Los resultados de este trabajo permitieron demostrar la propiedad de la Con-A para fijar TSH, como sucede con otras glucoproteínas(14). El análisis cromatográfico permitió establecer que la recuperación que ofrece el procedimiento es de 50 % de la TSH radiactiva. La precipitación guarda una relación directa con las cantidades de lectina utilizadas. Del mismo modo se pudo verificar la mayor afinidad de la Con-A por el manósido, puesto que este fue capaz de separar la hormona contenida en el sedimento de agarosa, aunque solo parcialmente (tabla 1). El porcentaje óptimo de recuperación de TSH se obtuvo utilizando 580 ul de lectina y 500 ul de manósido 0.8 M (fig 3). Estas dosis fueron utilizadas en todos los experimentos restantes. La concentración de suero afectó adversamente la extracción de TSH. Sin embargo, aún utilizando suero sin diluir, la recuperación mínima fue de 50 %. Esta recuperación fue similar a la que se obtuvo en la cromatografía de afinidad. La recuperación limitada de la TSH del suero puede deberse a la competencia de otras glucoproteínas plasmáticas por la Con-A o la interferencia de otros sacáridos presentes

en la muestra. Con los datos disponibles no es posible determinar cuantitativamente el efecto de cada uno de los compuestos del suero que potencialmente afectan la fijación de TSH. Los cambios en el pH no alteraron dicha fijación. El material precipitado por la Con-A fue identificado por el anticuerpo del RIA y a su vez fue capaz de competir con la hormona radiactiva por el mismo anticuerpo. Las dosis de TSH utilizadas como estándar en el RIA fueron medibles después de haberlas diluido hasta 2.5 veces y extraído ulteriormente con Con-A, obteniéndose una correlación positiva significativa ($p < 0.001$) entre las mediciones hechas con y sin extracción (fig 5). También a este respecto, es importante señalar que la saturación del sistema de fijación con Con-A y la capacidad limitada del manóido para romper esta unión, produce una pérdida variable de la glucocorticoide como se muestra en la tabla 2. Obsérvese que la recuperación porcentual es mayor (50 %) cuando la concentración de la hormona se halla por abajo de 5 uUI/ml. Los individuos sanos y los hipertiroideos tienen concentraciones plasmáticas cercanas a 5 uUI/ml y puede esperarse que a estos niveles circulantes, el procedimiento de extracción sea útil. La recuperación de TSH (aproximadamente 50 %) es menor que la recuperación informada para otras glucocorticoideas como la hCG (90 %) utilizando procedimientos de extracción similares (22). La diferencia puede deberse a que la cantidad de carbohidratos de la hCG es de 30 % mientras que la de TSH es 15 % (25).

Los valores de TSH plasmática en los individuos sanos obtenidos después de la fijación con Con-A se separaron claramente de los que se obtuvieron sin extracción (fig 6). No obstante, fue imposible precisar el estado de la función tiroidea mediante este procedimiento. En la mayoría de los grupos estudiados, el valor de la TSH plasmática fue 2 a 3 veces mayor después de la extracción. Sin embargo, en los hipertiroideos la proporción fue mayor, posiblemente porque al medir la muestra sin extracción, sus concentraciones correspondían al extremo poco sensible de la curva del RIA.

Inclusiva, debe hacerse notar que en la mayoría de este grupo los valores fueron menores de 1.0 uUI/ml (tabla 3). Las limitaciones técnicas de ambos métodos no explican totalmente la incapacidad para precisar el estado de la función tiroidea. También es posible que durante la hiperfunción glandular, la supresión que ejercen las yodotironinas sobre el tirotrópico y por lo tanto también lo sean las concentraciones de TSH; solamente en unos pocos casos los valores son indetectables (27). La falta de correlación entre la tiroxina libre y la TSH circulantes en el grupo de pacientes hipertiroideos apoya esta posibilidad (datos no graficados). Los resultados obtenidos no permiten establecer si en condiciones patológicas se producen formas moleculares de TSH prevalentes que tengan afinidad diferente por la lectina (28).

Wehman y colaboradores utilizando un método similar pudieron precisar el estado de la función tiroidea (29). Estos investigadores incorporaron el manóido a los reactivos del RIA y a los tubos que contenían la muestra de suero y la lectina. Esta variante merece aclarar dos aspectos importantes: primero, las inmunoglobulinas que constituyen los anticuerpos del RIA son verdaderas glucoproteínas (30), de tal manera que podrían fijarse a la lectina y a la TSH simultáneamente. Esta interacción interfiere con la medición de la hormona en el RIA. Segundo, posiblemente persistan contaminantes radiactivos y fragmentos no inmunorreactivos de TSH-¹²⁵I en la matriz de agarosa-Con-A, lo que acentuaría el error en la cuantificación de TSH plasmática. El método diseñado por nosotros es muy simple y utiliza un solo paso de extracción de TSH de las muestras problema. Además no se modifican las condiciones del RIA comercial. Evans y colaboradores (31) utilizaron un procedimiento con dos pasos sucesivos de purificación, en columna de Sephadex y en Con-A; además, utilizaron 5 días de incubación para las reacciones del RIA. El método permitió precisar el estado de la función tiroidea en 95 % de los casos. El procedimiento

to diseñado por estos autores tiene la desventaja de ser complicado para uso rutinario y requiere de mucho tiempo para su realización. Estos mismos investigadores seleccionaron los casos de hipertiroidismo sobre la base de TSH indetectable en el RIA comercial, lo que implica un sesgo en los resultados obtenidos.

La conclusión mas importante derivada de nuestro estudio es que la cuantificación de la TSH plasmática por sí sola, no es un índice sensible para distinguir los estados de funcionamiento tiroideo, independientemente del método utilizado para medirla. Una excepción es el hipotiroidismo primario. Sin embargo, el procedimiento de extracción de TSH con concanavalina-A puede ser útil como un recurso para analizar la hormona con otros propósitos.

REFERENCIAS

- 1.- Tepperman J. The Thyroid. In Tepperman J (ed): Metabolic and endocrine physiology. The Yearbook Medical Publishers. Chicago Ill. U.S.A. pp-145,1980
- 2.- Caldwell G, Kellett HA, Gow SM, Beckett GJ, Seeting WM, Seth J, Toft Ad. A new strategy for thyroid function testing. Lancet 1:1117, 1985
- 3.- Reasner II CH, Isley WL. Thyroid scanning in patients with suspected thyroid diseases. Ann Int Med 102:209,1985
- 4.- Alsever EN, Gotlin EW. The thyroid. In Alsever EN & Gotlin EW (ed): Handbook of endocrine tests in adults and children. Yearbook Medical Publishers. Chicago Ill. USA. pp-43,1978
- 5.- Robbins J, Chen SY, Gersherngorn MC, Glinser D, Cahman HJ, Edelhock H. Thyroxine transport proteins of plasma, molecular properties and biosynthesis. Recent Prog Horm Res 34:477,1978
- 6.- Ketcotoff S, Fang V, Marshall SS. Studies on human TBG. Some physical and biological properties of radiolodinated TBG and partially desialyted TBG. J Clin Invest 56:177, 1975
- 7.- Spaulding SW, Utiger ED. The thyroid. In Scelig P, Baxter JD, Broadus AE, Frohman LA (eds): Endocrinology and metabolism. McGraw-Hill Book Co. pp-281, 1981
- 8.- Sterling K, Brenner MA. Free thyroxine in human precipitation. J Clin Invest 45:153, 1966
- 9.- Sheron RG, Kaplan MM, Larson PR. Physiological and pharmacological influences on T4 to T3 conversion and nuclear T3 binding in rat anterior pituitary. J. Clin Invest 64:1402, 1979

- 10.- Bleich HL, Moore MJ. Thyroid-pituitary interaction.
N Eng J Med 306:23, 1982
- 11.- Wilburg JF, Seibel MJ. Thyrotropin-releasing hormone interactions with an anterior membrane pituitary receptor.
Endocrinology 92:888, 1973
- 12.- Woolf ED. Hyperthyroidism, hypothyroidism and thyroiditis. Goiters and thyroid nodules. In Streck WF & Lockwood DII (eds): Endocrine diagnosis. Little Brown Co. Boston Ma. USA. pp-53,1983
- 13.- Pierce JG, Parsons T. Glycoproteins hormones structure and function. Ann Rev Biochem 50:465,1981
- 14.- Ayala AR. Empleo de lectinas en el radioinmunoanálisis de hormonas glucoproteicas. Rev Inv Clin (Méx) 46:729,1981
- 15.- Goldstein LJ. I. The interaction of polysaccharides with concanavalina-A. Biochem Biophys Acta 97:68,1965
- 16.- Goldstein LJ, Holliman CE, Smith EE. Protein-carbohydrate interaction. II. Inhibition studies on the interaction of concanavalina-A with polysaccharides. Biochemistry 4:476,1965
- 17.- Abe Y, Iwabuchi M, Ishii S. Multiple forms in the subunit structure of concanavalina-A. Biochem Biophys Res Commun 45:1271,1971
- 18.- Olson MO, Licner IE. Some physical and chemical properties of concanavalina-A. The phytohemagglutinin of jack-bean. Biochemistry 6:105,1967

- 19.- Karl D, Hardman MK, Schiffer M, Edmunson AB, Aisworth GP.
Structure of concanavalina-A at 4.25 Angstrom resolution.
Proc Natl Acad Sci, USA. 68:1393, 1971
- 20.- McCubbin WD, Kay CH. Molecular weight studies on concanavalina-A.
Biochem Biophys Res Commun 44:101,1971
- 21.- Sumner JB, Howell SF. The role of divalent cations metals in
the reversible inactivation of jack-bean hemagglutinin.
J Biol Chem 115:583,1936
- 22.- Nisula BC, Ayala AR, Stolck MD, Taliadouras GS, Stolck JM.
Solid-phase group-specific adsorbants in assays for glucoproteins.
In Radioimmunoassay and related procedures in Medicine. Vol I.
Intern Atomic Energy Agency pp-113,1978.
- 23.- Bedolla-Tovar N, Ulloa-Aguirre A, Landeros-Valdepeña J,
Pérez-Palacios G. Análisis de datos y control de calidad en el
radioinmunoanálisis. I. Guía para la evaluación de resultados.
Rev Invest Clin (Méx) 36:179,1984
- 24.- Sokal RR, Rohlf R. Single classification analysis of variance.
In Sokal RR & Rohlf R (eds): Biometry. Freeman Co. USA.
pp-179,1980
- 25.- Ayala AR, Nisula BC, Chen HC, Hosgen WD, Ross GT. Highly sensitive
radioimmunoassay for chorionic gonadotropin in human urine.
J Clin Endocrinol Metab 47:767,1978
- 26.- Hidalgo JU, Maxwell CE, Bloch T, Spokrer LR, Wooten M. Precision
of radioimmunoassay with emphasis on curve-fitting procedures.
In Freeman IM, Blaufox HD (eds): Radioimmunoassay. Grune &
Stratton, New York. USA. pp-29,1978

- 27.- Surks MI. Hyperthyroidism. Thyroid Diseases. In Krieger DT & Bardin CW (eds): Current therapy in endocrinology 1983-1984. CV Mosby Co. St Louis Mo. USA. pp-60, 1984
- 28.- Diamond RC, Rosen SW. Chromatographic differences between circulating and pituitary thyrotropin. J. Clin Endocrinol Metab 39:316,1974
- 29.- Wehman RE, Gregerson NI, Burns WH, Saral R, Santos GW. Suppression of thyrotropin in the low-thyroxine state of severe nonthyroidal illness. N Eng J Med 312:546,1985
- 30.- Porter RR. Structural studies of immunoglobulins. Science 180:713,1973
- 31.- Evans M, Croxson MS, Wilson TM, Ibbertson HK. The screening of patients with suspected thyrotoxicosis using a sensitive TSH radioimmunoassay. Clin Endocrinol 22:445,1985

Tabla 1 .- Cuentas por minuto (promedio de dos experimentos) de la radiactividad registrada en agarosa-concanavalina después de desplazamiento con - alfa-metil-D-manósido.

Con-A-Safarosa [ul]	0.2	0.6	0.8	1.0
	[M] manósido			
10	7480	9825	8511	9505
50	9788	10916	10176	8946
100	8352	10416	10035	9929
500	7549	9090	8367	9149

Tabla 2 .- Valores de TSH (uUI/ml) de la curva estándar del radioinmunoanálisis con y sin extracción con Con-A

Extracción					
sin	2.5	5	10	25	50
con	2.0	2.4	3.1	7.2	15

Tabla 3 .- Valores de TSH plasmática (uUI/ml) en varias condiciones clínicas

Función tiroidea	Procedimiento	
	sin extracción	con extracción
Normal	2.1	6.8
	2.4	9.4
	1.5	6.0
	2.9	5.7
	2.5	4.9
	2.8	6.3
	2.8	5.9
Hipertiroidismo	2.0	9.4
	0.0	5.3
	0.6	5.6
	0.6	6.0
	0.9	6.4
	0.9	6.4
	0.9	6.4
	2.2	11.4
	1.1	2.9
	4.5	3.7
	1.1	3.8
1.6	2.9	
Hipotiroidismo secundario	2.1	9.0
	2.7	8.7
	1.7	3.3
	1.6	3.8
Hipotiroidismo primario	6.8	19.2
	21.3	58.6
	1.9 E	7.1
	3.8 E	7.5
	16.9	31.7
	154.0	231.0

E recibiendo tratamiento con hormonas tiroideas.

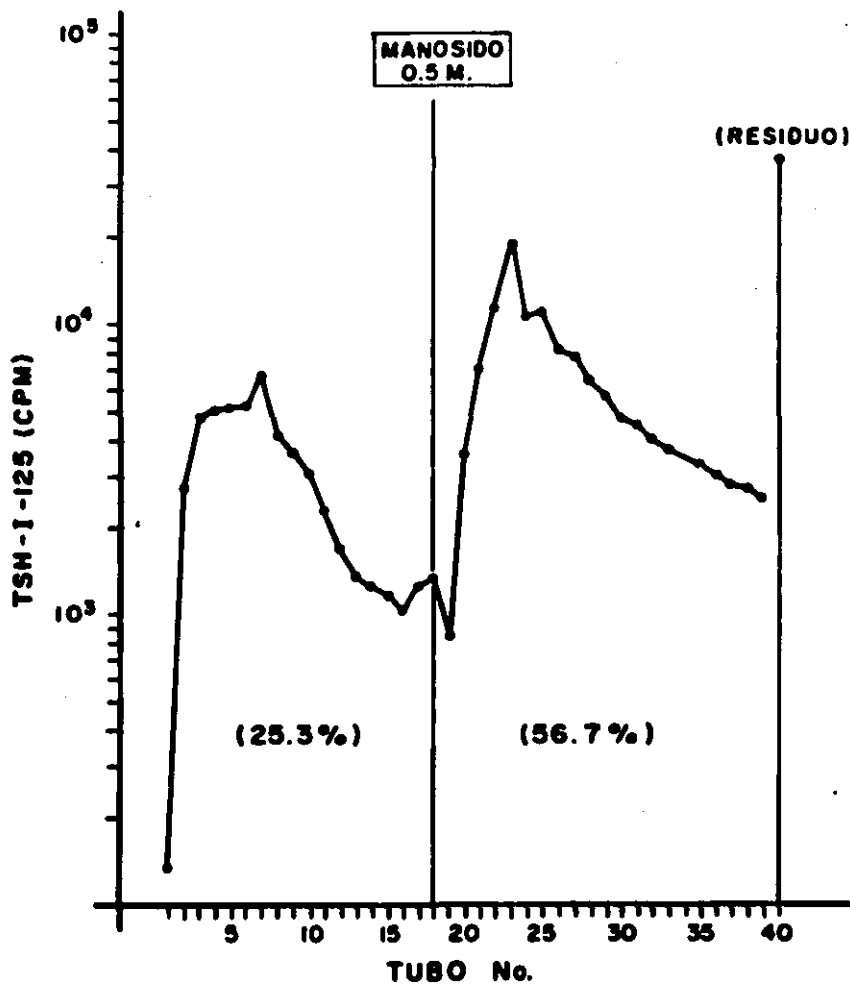


Figura 1

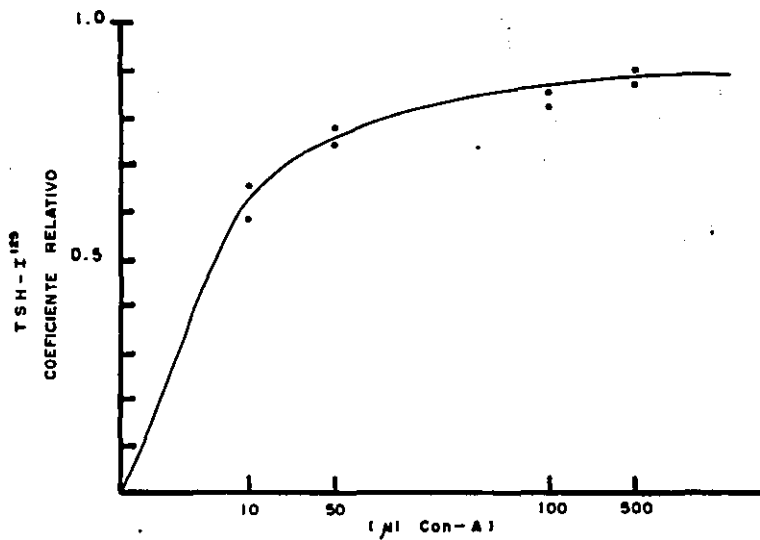
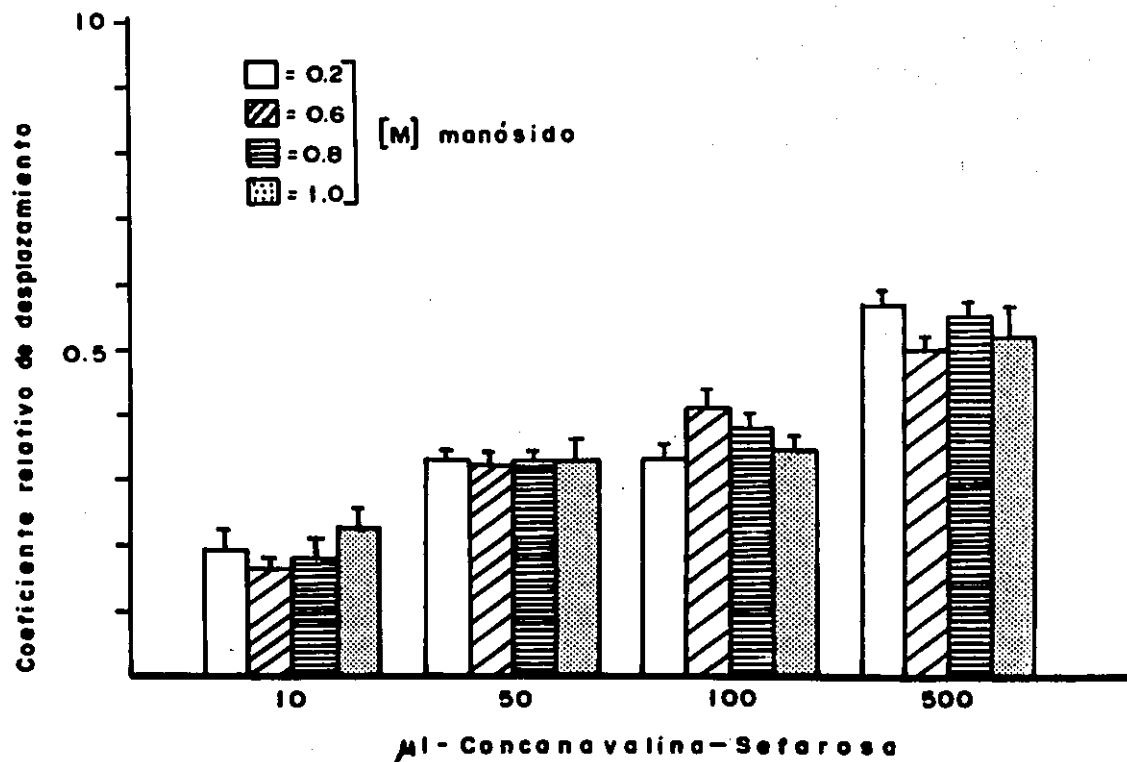


Figura 2



Figuro 3

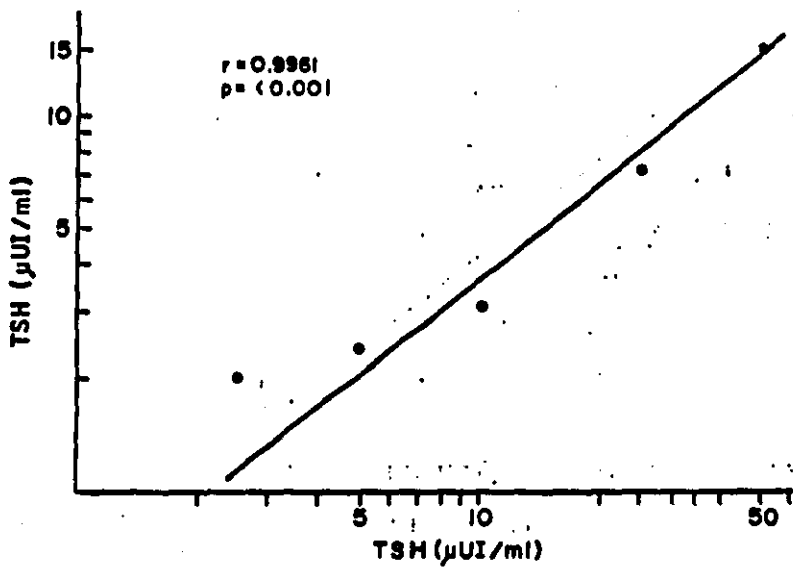


Figura 4

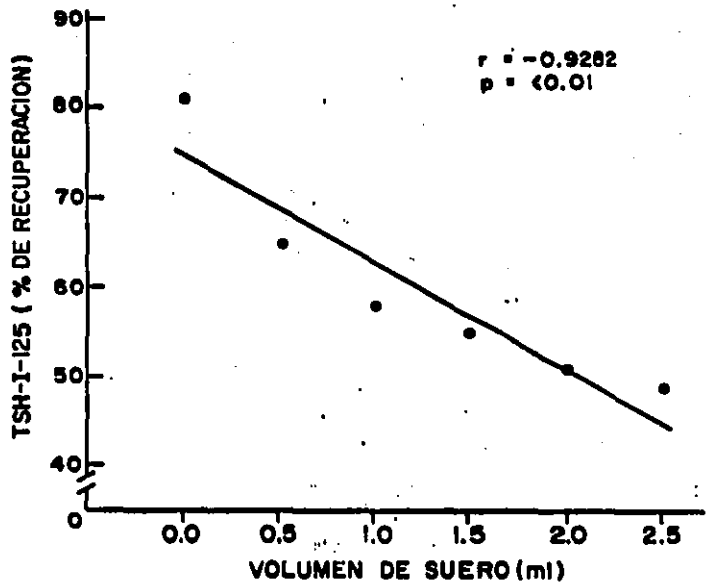


Figura 5

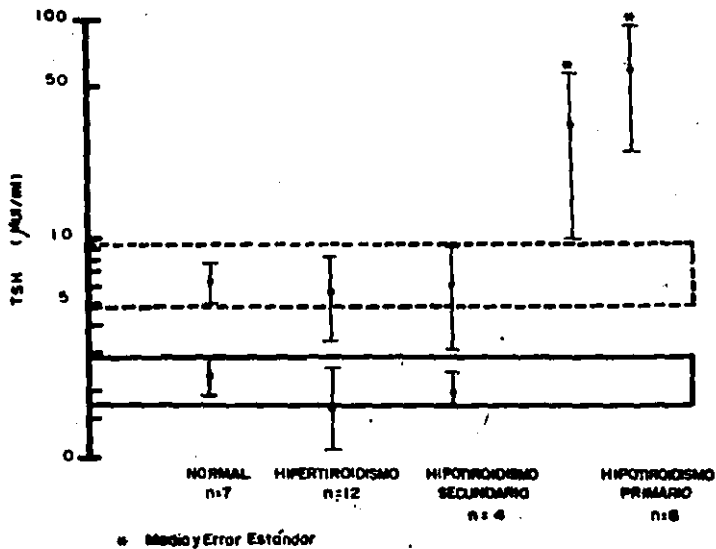


Figura 6

Pie de figuras *

Fig 1 .- Perfil de elución de la TSH-I¹²⁵ en la cromatografía de afinidad. El valor señalado con el 56.7 % corresponde a la cantidad de hormona que fue fijada por la Con-A y desplazada por el manósido. El punto residual es radiactividad (18 %) que permaneció adherida a la columna. Los valores indicados son el promedio de dos experimentos.

Fig 2 .- Coeficiente relativo (porcentaje) de fijación de la TSH-I¹²⁵ con diferentes concentraciones de Con-A. Nótese que con el volumen de 10 ul se pudo fijar mas de 50 % de glucocorticoide radiactivo. Los puntos representan dos experimentos.

Fig 3 .- Coeficiente relativo de desplazamiento de TSH-I¹²⁵ al utilizarse molaridades diferentes de manósido ante concentraciones crecientes de lectina. Con una concentración determinada de Con-A, la molaridad del manósido no afectó significativamente la recuperación de TSH radiactivo. Las barras señalan el promedio y las líneas el rango de dos experimentos.

Fig 4 .- Análisis de regresión de las dosis de la curva estándar del RIA después de extracción con Con-A. Las dosis de la curva estándar sin extracción están en las abscisas. La correlación fue significativa [p 0.001] , indicando que la TSH extraída con la lectina conserva su inmunoreactividad.

Fig 5 .- Efecto de la concentración del suero sobre la recuperación (extracción) de TSH-I¹²⁵ . La línea es la recta de regresión , indicando el efecto adverso de la concentración del suero sobre la extracción. La recuperación mínima de la hormona [50 %] se obtuvo con el suero sin diluir.

Fig 6 .- Valores de la TSH plasmática (media y desviación estándar) obtenida con (eee) y sin (ooo) extracción con Con-A en los grupos estudiados. Los cuadros señalan la dispersión de los valores observados en individuos sanos con [- - -] y sin [—] extracción. Destaca la incapacidad de ambos métodos para precisar la función tiroidea. Los valores de TSH observados con un método y otro difirieron significativamente (p 0.05).