

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA 2y

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE BIOLOGIA



ESTUDIO COMPARATIVO DEL MANEJO DE DATOS
DE RADIOINMUNOANALISIS (RIA)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A.

RUTH VENEGAS SANCHEZ



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.

INDICE

RESUMEN

I. INTRODUCCION

II. PRINCIPIOS DEL RIA

A. Componentes básicos del RIA

1. Anticuerpo
2. Antígeno
3. Antígeno marcado radiactivo

B. Unión inespecífica

III. LAS HORMONAS T₄ Y TSH

IV. GENERALIDADES SOBRE LAS RADIACIONES NUCLEARES

A. Características y propiedades

B. Detección y medida de la radiación

1. Efecto fotoeléctrico
2. Efecto Compton
3. Creación de pares

C. Seguridad radiológica en laboratorios de RIA

....

V. MANEJO DE DATOS DE RADIOINMUNOANÁLISIS

- A. Relación matemática desconocida
- B. Relación empírica
- C. Relación teórica

VI. MATERIAL Y METODOS

- A. Procedimientos de radioinmunoanálisis
 - 1. Determinación de T₄ total
 - 2. Determinación de TSH (humana)
- B. Medición de la radiactividad
- C. Manejo de los datos experimentales
 - 1. Modelo logístico de cuatro parámetros
 - 2. El que recomienda el proveedor (Clinical Assays)
 - 3. Concentración contra T/B

VII. RESULTADOS

- A. Tiroxina
- B. Hormona estimulante tiroidea
- C. Discusión

VIII. CONCLUSIONES

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

RESUMEN

En la actualidad la técnica de radioinmunoensayo, también conocida como radioinmunoanálisis (RIA), se ha convertido en un apero tanto clínico como de investigación, que ha contribuido al desarrollo del análisis cuantitativo de hormonas, drogas, proteínas y otras sustancias de importancia en diversas áreas como son la farmacología, microbiología, medicina, biología, etc.

Las ventajas de la técnica radican en la especificidad de la reacción inmunológica que se logra con el anticuerpo, la alta sensibilidad mediante el uso de material radiactivo y en la posibilidad de hacer numerosas determinaciones en forma simultánea.

El RIA se utiliza ampliamente en análisis clínicos para determinar la concentración de una gran variedad de sustancias de interés médico en muestras de pacientes. Un ejemplo muy representativo son las hormonas tirotropina ("TSH") y tiroxina ("T₄"), que es motivo del presente estudio, con relación al procesamiento de los datos experimentales que se obtienen en RIA. Los métodos para procesar los datos que se estudiaron son tres: a) los sugeridos por los proveedores de los juegos de reactivos ("kits"), b) el recomendado por el Organismo Internacional de Energía Atómica, c) el propuesto por el Dr. Grafton Chase. De los mé-

todos indicados y de acuerdo a los resultados hallados, el que ofreció mayores ventajas y mejor exactitud fue este último.

I. INTRODUCCION

El rápido progreso que se ha obtenido en las ciencias biológicas durante las últimas tres décadas, está vinculado principalmente al desarrollo de nuevas técnicas experimentales y de instrumentos científicos. De modo importante destaca el uso de sustancias radiactivas como trazadoras de fenómenos biológicos.

Una de estas nuevas técnicas, que se ha difundido mucho, es el radioinmunoensayo o radioinmunoanálisis (RIA), que ha permitido obtener avances significativos acerca de la naturaleza química y los mecanismos fisiológicos de sustancias contenidas en fluidos biológicos.

El RIA fue introducido a la medicina por los investigadores Rosalyn S. Yalow y Solomon A. Berson, cuyo primer reporte se publicó en 1959 (29), el cual tuvo aplicaciones inmediatas en la medición de insulina humana en 1960. En previos trabajos, los autores examinaron la degradación de insulina radiactiva en enfermos diabéticos dependientes de insulina y la conclusión alcanzada fue que los pacientes sintetizan anticuerpos específicos a la insulina exógena, y que la unión del anticuerpo específico (o anticuerpos) a la insulina marcada radiactivamente (trazador), está en función cuantitativa de la insulina no marcada (analito). Originalmente, un trabajo previo de estos investigadores

1.2.

no fue aceptado para su publicación, pero Yalow obtuvo el Premio Nobel de Medicina en 1977, ya que, para entonces, su compañero de trabajo ha bía fallecido.

En las últimas dos décadas el uso del RIA se ha expandido rápidamente y ha contribuido al progreso de la medicina, especialmente de la endocrinología, pues ha permitido estudiar detalladamente los diferentes mecanismos de regulación hormonal, así como también las diversas endocrinopatías asociadas con hiper o hiposecreción de las hormonas.

El radioinmunoanálisis es un procedimiento de análisis por saturación o de análisis por unión, que permite la determinación cuantitativa del orden de nanogramos y picogramos de unas 200 sustancias de estructuras complejas en fluidos biológicos, muchas de las cuales no son cuantificables mediante métodos comunes. En la mayoría de los casos el a n a l i t o es un medicamento, una hormona, una vitamina u otra sustancia de estructura y peso molecular conocidos. Su utilidad proviene pr i n c i p a l m e n t e de su característica de alta especificidad para una sustancia dada así como, también, de su sensibilidad extremadamente alta.

Por las características de este tipo de técnica, es necesario efectuar un procesamiento de los datos experimentales para relacionarlos a una concentración de la sustancia a determinar.

I.3.

Se parte inicialmente de una serie de patrones con diferentes concentraciones de la substancia pura, para obtener una gráfica, llamada "curva estándar" o "curva patrón", que relaciona la concentración de cada patrón con la radiactividad y, posteriormente, hallar en esa curva el valor de las muestras desconocidas. Para ello existen varios métodos y es recomendable seleccionar el más adecuado para el manejo de los datos experimentales. Por lo tanto, el propósito del presente estudio es el de comparar y evaluar las ventajas y desventajas de tres de los métodos más conocidos, para el mejor aprovechamiento de los datos y la mayor confiabilidad en los resultados.

Con este motivo se estudiaron resultados de análisis de muestras de las hormonas T_4 y TSH, que corresponden, quizá, a los ensayos más sol citados.

II. PRINCIPIOS DEL RIA

A. Componentes básicos del RIA

Los análisis cuantitativos como el RIA, son procedimientos que requieren de un compuesto químico unidor, con capacidad de ligarse a una sustancia (analito) en forma selectiva.

El RIA es un procedimiento en el cual el unidor es un anticuerpo y el analito es su antígeno correspondiente, que debe encontrarse en exceso con respecto al anticuerpo. Al término de la reacción inmunológica se obtiene una fracción del antígeno unida al anticuerpo, en tanto que la otra fracción permanece libre. La forma de conocer la proporción de las fracciones libres y unidas resultantes, es utilizar una marca en el antígeno, que consiste en la incorporación de un radionúclido (trazador radiactivo, cap. IV), que permita la cuantificación. Por consiguiente, para que una sustancia pueda ser determinada mediante la técnica de radioinmunoanálisis, se tiene que contar con tres componentes básicos: anticuerpo (Ab), antígeno (Ag) y antígeno marcado (Ag*). El principio general del RIA se muestra a continuación en la figura 1:

II.2.

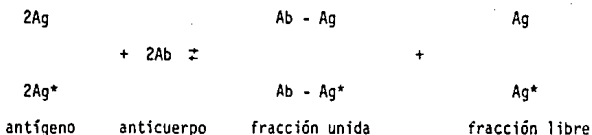


Figura 1. Principio general del RIA

A medida que aumenta la concentración de Ag, disminuye la fracción Ab - Ag* y aumenta la fracción Ab - Ag. Para una concentración fija de Ab, Ag y Ag*, cuando la relación de la rapidez de asociación y de disociación se vuelve una constante, se obtiene el equilibrio químico de los reactivos. Este equilibrio se ajusta a lo que establece la ley de acción de masas: "La velocidad de una reacción química es proporcional al producto de las concentraciones de los reactivos" (3).

Después de dejar reaccionar durante cierto tiempo, se procede a separar las fracciones libres (Ag y Ag*), de las fracciones unidas y, así iniciar la cuantificación de la fracción unida marcada con material radiactivo (Ab - Ag*), mediante un instrumento sensible a la radiación.

A continuación se describen las características principales de los componentes del RIA.

I. Anticuerpo

Las moléculas de anticuerpos, o inmunoglobulinas, aparecen en el suero sanguíneo y en ciertas células de vertebrados, en respuesta a la introducción de una proteína u otra macromolécula extraña denominada antígeno o inmunógeno.

La formación de anticuerpos en los vertebrados es un reflejo de un tipo especializado de diferenciación celular, en el cual cada tipo de célula linfática es capaz de producir un tipo único de anticuerpo. Estas células poseen, además, centros de unión que son específicos para las características estructurales del antígeno que indujo su formación. La alta especificidad en radioinmunoanálisis se logra con un anticuerpo producido específicamente para la substancia que se va a analizar.

Para obtener el anticuerpo, se tiene que inmunizar a un animal con el antígeno que interesa valorar. Los animales que más se utilizan para estos casos son: conejos, borregos, chivos, monos, ratas, ratones, etc. Un anticuerpo específico que se formó como respuesta al antígeno extraño, puede persistir en la sangre durante mucho tiempo. Si el antígeno tuviera acceso a la linfa en cualquier ocasión futura, los anticuerpos formados pueden neutralizar el antígeno al combinarse con él.

11.4.

Entre las principales propiedades de los anticuerpos destacan que son proteínas frágiles, se desnaturalizan al calor y su especificidad debe ser única y casi absoluta para reconocer el antígeno, aún cuando éste se encuentre mezclado con otras substancias similares. Si sucede todo lo contrario, o sea, que se una a otros compuestos semejantes, se dice que reacciona en forma cruzada, fenómeno mejor conocido como "reactividad cruzada" (23). Los anticuerpos con alta reactividad cruzada no son convenientes para radioinmunoanálisis, como se explicará más adelante.

2. Antígeno

El antígeno es una sustancia que, introducida en un organismo vivo, tiene la capacidad de estimular la formación de anticuerpos y, subsecuentemente, la de reaccionar específicamente con él.

La habilidad del antígeno para provocar una respuesta inmune se conoce como "antigenicidad" y depende del peso molecular del antígeno y del grado de diferenciación que existe entre la sustancia natural correspondiente al animal inmunizado. Generalmente, las moléculas con un peso molecular de 10,000 o más, son buenos antígenos y se considera que las moléculas de un pe

11.5.

so molecular menor son antígenos pobres (2). Los haptenos son moléculas de pequeño tamaño ($PM < 1000$), que generalmente no poseen propiedades inmunológicas, a menos que se encuentren unidas en forma covalente a proteínas portadoras o acarreadoras, considerándolas, así, inmunogénicas; por lo tanto, el anticuerpo es específico para la pareja (hapteno - proteína). Las proteínas unidas a grupos hapténicos también se denominan "proteínas conjugadas" y la conjugación de haptenos es viable in vivo o in vitro (1). Entre las sustancias que se consideran como haptenos están los esteroides, pequeños péptidos, T., etc.

En RIA se establece una curva estándar, en base a diferentes concentraciones conocidas de antígenos o haptenos, que son utilizados como patrones, controles o estándares y que reúnan como requisito básico que la sustancia a cuantificar (muestra desconocida), sea idéntica a la sustancia con la cual se compara (estándar). El estándar y la muestra desconocida deben tener idéntica "inmunorreactividad", o sea, igual capacidad para desplazar al trazador en su unión con el anticuerpo, la misma estructura química y comportamiento fisiológico.

Los estándares son sustancias diluidas a concentraciones establecidas dentro de límites convenientes, y deben de poseer un

...

II.6.

alto grado de pureza. Para la preparación de los estándares se requiere de un diluyente, que en el caso ideal sería el mismo suero del paciente pero, generalmente, se utiliza una mezcla de sueros humanos, o bien, albúmina bovina, albúmina humana, suero de caballo, gammaglobulina bovina, algún buffer u otras substancias.

Los estándares deben ser homogéneos, es decir, que las series de patrones deben tener las mismas concentraciones en diferentes lotes o juegos de reactivos; para ello suele usarse preparados distribuidos por la O.M.S. (Organización Mundial de la Salud), el N.I.H. (National Institute of Health, Bethesda), N. I.M.R. (National Institute for Medical Research, Londres), etc. y algunas substancias puras disponibles comercialmente.

La muestra del paciente se obtiene, principalmente, de plasma, suero, orina o de otros líquidos biológicos. La muestra no sólo contiene el analito sino también, una mezcla de diferentes substancias, tales como proteínas, aminoácidos, grasas, etc. El contenido o matriz de las muestras de cada paciente y de los estándares es diferente, por lo tanto.

Las muestras para RIA de hormonas tiroideas se obtienen por

punción de vía venosa, pero según el procedimiento puede utilizarse sangre, plasma o suero, aunque se prefiere este último porque evita el uso de anticoagulante y está libre de ciertas sustancias que pueden hacer difícil el uso de micropipetas o que pueden interferir en el análisis.

3. Antígeno marcado radiactivo

El antígeno marcado radiactivo, es además conocido como trazador, antígeno radiomarcado, material caliente, etc.; en RIA se designa con el símbolo Ag^* .

El antígeno marcado ideal se debe comportar como el mismo antígeno aislado y purificado que se utilizó en el proceso de inmunización para producir anticuerpos específicos e idéntico al antígeno de los pacientes; por lo tanto, debe tener la misma afinidad o tendencia a unirse al anticuerpo específico, que el antígeno sin marcar.

El trazador es necesario para permitir la identificación y distribución del analito en las fracciones libre y unida.

La marcación de las moléculas se realiza introduciendo en las mismas átomos radiactivos, obteniéndose moléculas marcadas o

II.8.

trazadoras de la substancia a determinar. Entre los radionúclidos que son comúnmente usados se encuentran el yodo-131, yodo-125, hidrógeno-3 (tritio) y carbono-14, aunque el yodo-125 es el que se utiliza con mayor frecuencia (20). Para las hormonas relacionadas con este trabajo se utilizó como trazador yodo-125 y se designan TSHh(I-125) y T₄(I-125).

B. Unión inespecífica

Se define la unión inespecífica (NSB), como el antígeno que se encuentra en la fracción unida, el cual no se debe a la reacción anticuerpo-antígeno que es la que produce la unión específica, sino a la unión del antígeno con otros agentes ligantes presentes en la matriz.

Una equivocación que se comete frecuentemente se debe a la creencia de que puede realizarse una corrección de la NSB en una serie de tubos de ensaye, mediante la resta de un valor constante, al que se le llama el "blanco", sin tomar en cuenta que la NSB varía de un tubo a otro.

Para los procedimientos de RIA que se basan en la separación de una fase sólida (la fracción unida) y una fase líquida (la fracción libre), puede clasificarse la NSB como sigue:

1. Unión mecánica inespecífica

Es el resultado de un compromiso entre una buena técnica analítica y el empleo eficiente del tiempo. Este tipo de NSB depende de:

- a) Trazador radiactivo que se adhiere al tubo.
- b) Trazador radiactivo del sobrenadante que queda mezclado con el precipitado.

2. Unión química inespecífica

Depende de sustancias unidoras diferentes al anticuerpo, que se encuentren presentes en la reacción. Este tipo de NSB se debe a:

- a) Trazador radiactivo unido químicamente a las proteínas séricas.
- b) Trazador radiactivo adsorbido en el precipitado o en el tubo.

III. LAS HORMONAS T_4 Y TSH

La técnica de radioinmunoanálisis es de gran utilidad en el estudio del eje hipotálamo - hipófisis - tiroides, ya que la cuantificación de las hormonas TSH, T_4 y T_3 , es indispensable para el estudio de funciones y disfunciones del eje mencionado. En el presente estudio se tratarán en particular las hormonas TSH y T_4 .

La función de la glándula tiroides es la síntesis de hormonas tiroideas y la secreción de éstas al torrente sanguíneo. Entre las hormonas principales tenemos la T_4 y T_3 , que desempeñan actividades importantes en el organismo. En el feto su función principal es el crecimiento, la maduración del sistema nervioso y la diferenciación, mientras en el individuo maduro las hormonas regulan el balance energético.

Las pequeñas cantidades que secreta la glándula tiroides, se regulan por un mecanismo que se inicia (figura 2) en el sistema nervioso central (SNC) el cual, a su vez, regula al hipotálamo, cuyo estímulo se amplía aún más por la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), que estimula la glándula hipófisis para la producción y liberación de la hormona estimulante tiroidea (TSH). Esta actúa sobre la glándula tiroides para iniciar la síntesis y liberación de la tiroxina (T_4) y triyodotironina (T_3) y a su vez, la T_4 y T_3 regulan la secreción de TSH por

III.2.

un proceso de reflexión o "retroalimentación" represiva en la hipófisis y, posiblemente, en el hipotálamo (19).

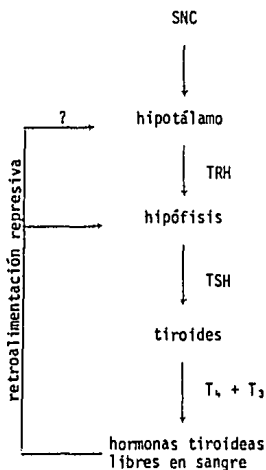


Figura 2. Eje hipotálamo - hipófisis - tiroides

La L-tiroxina (3,5,3',5'-L-tetrayodotironina, T_4), es un aminoácido con fórmula $C_{15}H_{11}I_4NO_4$ y peso molecular 776.93 (28) que, al ser secretada al torrente sanguíneo, es transportada por proteínas, que ordenadas de modo decreciente por su afinidad a la tiroxina, son:

...

III.3.

globulina unidora de la hormona tiroidea (TBG), prealbúmina unidora de la hormona tiroidea (TBPA) y albúmina, las cuales ávidamente enlazan la T_4 , de manera que sólo una pequeña fracción menor del 0.05% (12) de la cantidad de T_4 total circulando, está libre y fisiológicamente activa, ya que la hormona ejerce su acción en todo el organismo, específicamente en los procesos metabólicos de lípidos, carbohidratos, proteínas y vitaminas, así como, también el crecimiento y desarrollo del individuo, logrando así el estado óptimo del funcionamiento del organismo humano (eutiroidismo). La cuantificación de T_4 total en suero humano se emplea para corroborar, junto con el diagnóstico clínico, los diferentes estados tiroideos: el estado hipotiroideo (abajo de la concentración normal) es una enfermedad que en menores de edad se conoce como cretinismo o mixedema si ocurre en el adulto.

La hiperfunción tiroidea (excesiva síntesis de hormonas tiroideas) se presenta en enfermedades tales como: Graves - Basedow y de Plummer, entre otras (26).

La hormona estimulante tiroidea (tirotropina humana TSHh) es una glicoproteína secretada por el lóbulo anterior de la glándula hipófisis, con un peso molecular aproximado de 28,000 (14), que está formada de dos subunidades diferentes, alfa y beta. La subunidad alfa tiene una secuencia similar a la subunidad de otras hormonas glicoproteicas.

...

III.4.

Por mencionar algunas de éstas, tenemos la hormona luteinizante (LH), hormona folículo estimulante (FSH) y otras (26). La subunidad beta, confiere la propiedad específica, biológica e inmunológica, de la hormona. Por consiguiente, la determinación de tirotropina es muy útil para el diagnóstico diferencial del hipotiroidismo primario de uno secundario. El hipotiroidismo primario se caracteriza por niveles altos de TSH y se presenta en pacientes con disfunción de la glándula tiroidea. Al hipotiroidismo secundario se le conoce como disfunción de la glándula hipófisis, con niveles bajos de TSH. Por lo tanto, la medición de tirotropina representa una ayuda considerable en la investigación de desórdenes que se presentan en el eje hipotálamo - hipófisis - tiroides.

La tabla 1, contiene de modo condensado los diferentes estados tiroideos en relación con la concentración de tiroxina y tirotropina en el suero sanguíneo humano (12,13, y 14).

TABLA 1. CONCENTRACION DE LAS HORMONAS T₄ Y TSH EN SUERO HUMANO

HORMONAS	EUTIROIDEOS	HIPOTIROIDISMO	HIPERTIROIDISMO
Tiroxina (T ₄)	4.5 - 11.5 µg/dl	< 4.5 µg/dl	> 11.5 µg/dl
Tirotropina (TSH)	< 6.5 µIU/ml	> 6.5 µIU/ml	

IV. GENERALIDADES SOBRE LAS RADIACIONES NUCLEARES

Es importante tomar en cuenta que el pilar de apoyo del radioinmunoanálisis se logra con la utilización de un trazador radiactivo, el cual es el elemento esencial que da a la técnica la propiedad de gran sensibilidad. Por lo tanto, es necesario explicar el fenómeno de la radiactividad y describir los instrumentos utilizados para medir la radiación, así como las normas que se deben seguir para el manejo seguro del material radiactivo.

A. Características y propiedades de la radiación

La radiación es energía que viaja a través del espacio, ya sea en forma de ondas electromagnéticas o de partículas veloces. Un ejemplo claro de esto es la radiación que siempre nos ha llegado del Sol y del espacio exterior en forma de luz, calor y de radiación nuclear.

Se requiere tener presente la estructura de la materia para explicar el origen de las radiaciones nucleares. La materia está formada por los elementos químicos que existen en la naturaleza. La cantidad mínima en que se puede presentar un elemento se llama átomo. Los átomos de diferentes especies se combinan para formar otras sustancias, llamadas compuestos. La cantidad mínima en que se puede presentar un compuesto se llama molécula. Aunque la palabra átomo significa sin corte

IV.2.

o sin división, se ha establecido que los átomos están constituidos por electrones y un núcleo.

Los electrones son partículas con masa muy pequeña (9.1×10^{-27} g) y con una carga eléctrica negativa. El núcleo tiene carga eléctrica positiva, la cual neutraliza la carga de los electrones y, por lo tanto, los átomos son eléctricamente neutros en condiciones normales. La masa del núcleo es relativamente grande, comparada con la del electrón, y es muy próxima a la masa del átomo.

Se ha determinado que el núcleo atómico está compuesto por protones y neutrones. También se ha establecido que el protón es el componente único del núcleo del hidrógeno ordinario y que su masa es mucho mayor que la masa del electrón (1840 veces). La masa del protón (1.007276 uma) es aproximadamente igual a una unidad de masa atómica (1 uma = 1.6605×10^{-24} g) y tiene una carga eléctrica positiva. El neutrón es una partícula eléctricamente neutra, con una masa ligeramente mayor que la del protón (1.008665 uma).

Los átomos de cada elemento se representan con el número de protones o carga nuclear (Z) y con el número de masa (A), que es la suma de los protones y los neutrones, ambos como subíndices a la izquierda del elemento químico $\begin{matrix} A \\ Z \end{matrix}$. Ejemplos: ${}^1_1\text{H}$, ${}^{12}_6\text{C}$.

...

IV.3.

El número de neutrones (N), en muchos casos se omite porque es fácil obtenerlo con la fórmula $N = A - Z$. Por ejemplo, el yodo se representa: ${}^{127}_{53}\text{I}_{74}$.

Los elementos han sido ordenados en forma creciente de su número atómico Z, en la clasificación periódica. En ella se hace evidente el aumento progresivo de la masa atómica A.

La forma de presentar las propiedades de los núcleos es mediante la "tabla nuclear o tabla de los núclidos". Se entiende por "núclido", cada especie nuclear caracterizada por sus valores de Z y N. La tabla nuclear consiste en un arreglo de coordenadas cartesianas, en cuyo eje de las abscisas se anota el número de neutrones N, y el número de protones Z, en el eje de las ordenadas.

En la tabla nuclear se pueden observar familias de núclidos llamados "isótopos", que son núcleos que tienen Z constante, para N diferente. Por consiguiente, son núcleos de un mismo elemento químico, pero con masas diferentes. Esto implica que tienen las mismas propiedades químicas pero diferentes propiedades físicas, o sea, unos pueden ser energéticamente estables y otros inestables (radiactivos). La mayoría de los núclidos conocidos son inestables (llamados también "radionúclidos"), en tanto que sólo algunas combinaciones de Z y N corresponden a

IV.4.

núclidos estables, (figura 3, detalle de la tabla nuclear, con ejemplos del yodo) (27).

I 125	I 126	I 127	I 128
59.7d	13.0d	estable	25.0m
γ 0.0355	γ 0.389,...		γ 0.4429,...
	β^- 0.86, ...		β^- 2.125,...
	β^+ 1.13,...		

Figura 3. Isótopos del yodo

Los radionúclidos disipan su energía emitiendo radiaciones. A este proceso se le conoce como "radiactividad o decaimiento radiactivo" (17) y es un proceso mediante el cual los átomos inestables tienden a alcanzar la estabilidad. En algunos casos, el radionúclido se convierte directamente en un átomo estable, en tanto que, en otros, se transforma en un átomo inestable diferente, el cual, a su vez, tenderá a buscar la estabilidad.

Las radiaciones más comúnmente emitidas por los radionúclidos se denominan alfa, beta y gamma:

- Radiación alfa (α)

Está constituida por partículas idénticas a los núcleos de helio (compuestos por 2 protones y 2 neutrones), con carga positiva +2 y masa 4. No es de importancia para el presente trabajo y, por lo tanto, no será discutida.

- Radiación beta (β)

Son electrones (β^-) o positrones (β^+) de alta energía. Las partículas beta tienen masas despreciables y una unidad de carga positiva o negativa. La radiación beta no es de interés para el presente estudio.

- Radiación gamma (γ)

Es radiación electromagnética de muy corta longitud de onda, como los rayos X, y es semejante a otros tipos de radiación electromagnética de longitud de onda más larga y, por lo tanto, menor energía, como la luz ultravioleta, la luz visible, los rayos infrarrojos y las ondas de radio y televisión. Los rayos gamma, de interés en este trabajo, carecen de carga y de masa en reposo. Se hablará más ampliamente de los rayos gamma en el transcurso de este capítulo.

Se conoce como "actividad" de una muestra radiactiva a la rapidez con la cual se desintegra por unidad de tiempo. La unidad más comúnmente

IV.6.

usada para medir la actividad es el "curie" (Ci), el cual se define como la actividad de una muestra, en la que ocurren 3.7×10^{10} desintegraciones por segundo. En el Sistema Internacional, la unidad fundamental es el becquerel (Bq), que equivale a una desintegración por segundo. También son muy usados algunos submúltiplos:

$$1 \text{ Ci} = 1 \text{ curie} = 3.7 \times 10^{10} \text{ des/seg} = 3.7 \times 10^{10} \text{ Bq}$$

$$1 \text{ mCi} = 1 \text{ milicurie} = 3.7 \times 10^7 \text{ des/seg} = 3.7 \times 10^7 \text{ Bq}$$

$$1 \text{ } \mu\text{Ci} = 1 \text{ microcurie} = 3.7 \times 10^4 \text{ des/seg} = 3.7 \times 10^4 \text{ Bq}$$

En radioinmunoanálisis, generalmente se utilizan actividades muy pequeñas y las unidades están expresadas, con frecuencia, por unidad de volumen; por ejemplo, se utilizan fracciones de μCi , por mililitro de solución.

La actividad (A) de la muestra es proporcional al número de átomos radiactivos (N) contenidos en la misma:

$$A = \lambda N \quad \dots(1)$$

La constante de proporcionalidad (λ), se llama constante de decaimiento y corresponde a la fracción de átomos que se desintegran por unidad de tiempo.

...

IV.7.

La desintegración radiactiva es un proceso aleatorio es decir, que si tenemos un número de átomos radiactivos, a través del tiempo la radiactividad va desapareciendo, sin que le afecte el medio ambiente para acelerar o disminuir el decaimiento. La "ley del decaimiento radiactivo", establece que no se puede predecir qué átomo de ellos se desintegrará a un tiempo específico, pero si se podrá establecer cuántos átomos en promedio se desintegrarán durante cierto período de tiempo, mediante la ecuación 2:

$$N = N_0 e^{-\lambda t} \quad \dots(2)$$

En esta ecuación (N) representa el número de átomos radiactivos restantes al cabo del tiempo (t), (N_0) es el número inicial de los átomos y $e = 2.718281\dots$ es la base de los logaritmos naturales.

Al substituir el valor de (N) de la ecuación 2, en la ecuación 1 se obtiene:

$$A = \lambda N_0 e^{-\lambda t} \quad \dots(3)$$

y, por lo tanto,

$$A_0 = \lambda N_0 \quad \dots(4)$$

...

IV.8.

representa la actividad inicial (A_0) de la muestra en el tiempo cero.

Al substituir λN_0 en la ecuación 3 se transforma ésta en:

$$A = A_0 e^{-\lambda t} \quad \dots(5)$$

Con esta fórmula se puede calcular la actividad restante al cabo de cualquier tiempo.

Otra forma de calcular la actividad de un radionúclido en un tiempo de terminado, es haciendo uso de la tabla de los núclidos, que aporta el dato de "vida media o período de semidesintegración" ($T^{1/2}$) para cada radionúclido, que se define como el tiempo necesario para que la mitad de los átomos radiactivos decaigan. Con el conocimiento de la actividad inicial, se puede trazar una gráfica en papel semilogarítmico (figura 4), con respecto al tiempo transcurrido.

Se considera como "actividad específica" de una muestra radiactiva, a la actividad del radionúclido por unidad de masa del elemento químico o de la substancia de la cual forma parte. Las unidades correspondientes son:

$$\text{des/seg} \cdot \text{g} \quad \text{o} \quad \text{Ci/g}$$

...

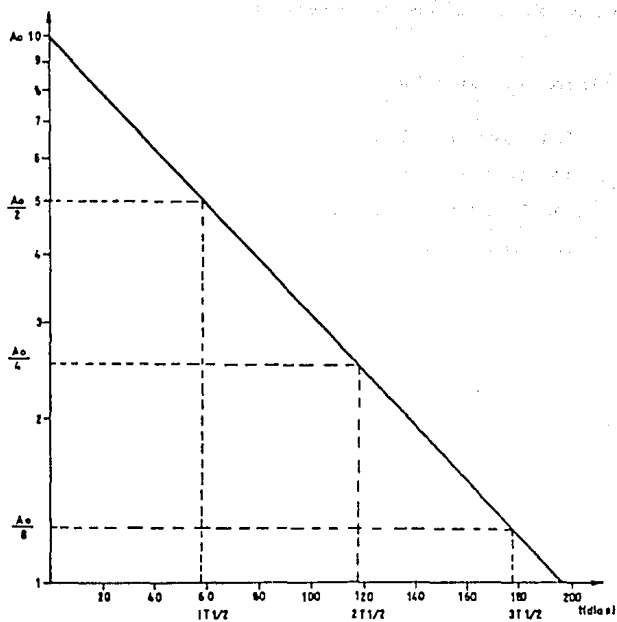


Figura 4. Período de semidesintegración del I-125

IV.10.

B. Detección y medida de la radiación

La base para la detección de la radiación electromagnética son los efectos que provocan los rayos gamma al interactuar con la materia. La energía de la radiación y el tipo del material sobre el que incide determinan que se produzcan los siguientes efectos:

1. Efecto fotoeléctrico

Es el resultado de la incidencia de un rayo gamma en un electrón que está fuertemente ligado en las capas internas del átomo. El rayo transfiere toda su energía al electrón, provocando la expulsión del mismo (figura 5).

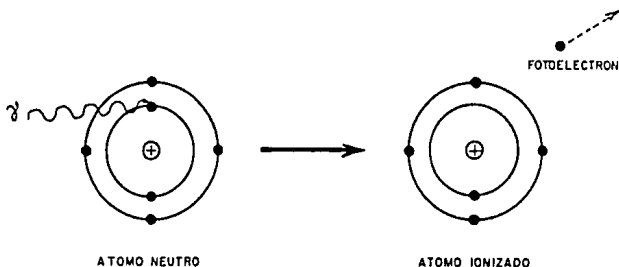


Figura 5. Efecto fotoeléctrico

...

2. Efecto Compton

Resulta de la interacción de un rayo gamma con un electrón que se encuentra en las capas externas del átomo, prácticamente poco ligado. El electrón no absorbe toda la energía del rayo incidente, sino sólo una parte y provoca una desviación del rayo gamma, el cual se lleva una parte de su energía original (figura 6).

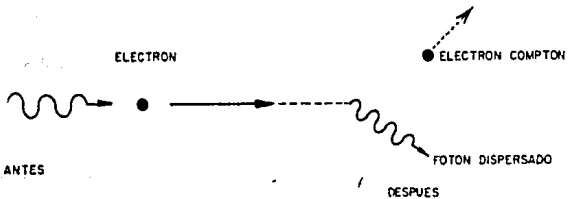


Figura 6. Efecto Compton

3. Creaciones de pares

Para que este fenómeno se realice, es necesario que la energía

IV.12.

del rayo gamma sea mayor de 1.022 MeV*. Al incidir el fotón en un núcleo atómico, se transforma en un electrón y un positrón. Es un caso de transformación de energía en materia (figura 7).

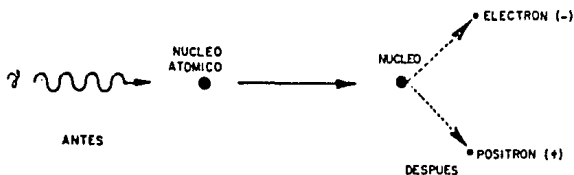


Figura 7. Creación de pares

Para la energía de la radiación del yodo-125, la cual es de 0.035 MeV, sólo los dos primeros efectos son importantes.

Los tres tipos de efectos producen iones (también los producen las radiaciones α y β), por lo cual a las radiaciones nucleares se les deno-

* Un electrón volt (1 eV) es la energía que corresponde al cambio de energía cinética de un electrón, al ser acelerada de un punto a otro, entre los que existe una diferencia potencial de un volt. Los múltiplos utilizados con frecuencia son: keV por mil o kiloelectrón volts y MeV por millón o megaelectrón volts.

mina "radiaciones ionizantes".

La detección y la medición de la radiación gamma in vitro, se basa en los destellos luminosos que son provocados por la interacción de la radiación con un material centellador. La interacción produce inicialmente excitación y ionización dentro del material. El detector de cristal de yoduro de sodio activado con talio (NaI(Tl)) es el más utilizado en RIA para la detección de I-125. Este cristal es más eficiente si tiene una cavidad cilíndrica, para permitir que la muestra radiactiva sea colocada muy cerca del detector y al centro del mismo; por esta cavidad se le conoce como detector de pozo. El detector es tan sensible, que se encuentra protegido por un blindaje de plomo, para evitar interferencias por fuentes radiactivas presentes en el laboratorio, o de las radiaciones nucleares provenientes del medio ambiente (rayos cósmicos y materiales radiactivos naturales).

Los destellos luminosos son captados por un tubo fotomultiplicador y transformados en pulsos eléctricos. Estos pulsos son enviados a un amplificador para incrementar su tamaño y formar el pulso; después pasan a un analizador que discrimina pulsos de energía que no son de interés en la medición y, posteriormente, son recibidos por un "escalador", que los cuenta, y proporciona el número de pulsos recibidos, en un período de tiempo.

IV.14.

En forma breve, el equipo necesario para la detección y medición de la radiación gamma in vitro, se ilustra en la figura 8.

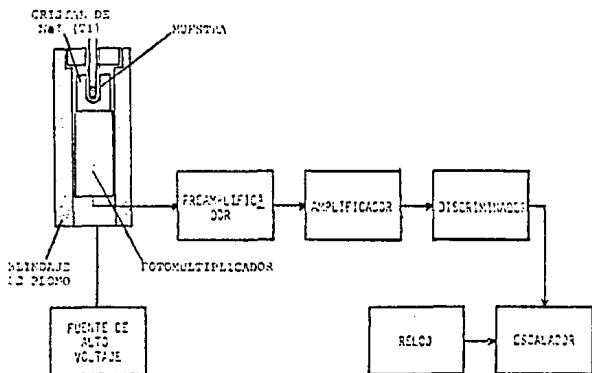


Figura 8. Esquema del sistema de detección y medición

Para verificar el buen funcionamiento del sistema de medición es necesario que cada laboratorio elabore un programa de control de calidad, y así, evaluar la estabilidad y reproducibilidad de los equipos (25).

C. Seguridad radiológica en laboratorios de RIA

Cualquier actividad humana, ya sea laboral, hogareña, deportiva, etc., lleva consigo relativos riesgos; así mismo, el trabajar en el laboratorio con gérmenes patógenos, sustancias tóxicas o material radiactivo, presenta, igualmente, cierta peligrosidad. Sin embargo, todas las actividades mencionadas pueden llevarse a cabo con gran seguridad si se toman las precauciones adecuadas.

En México, como en otros países, existe una reglamentación para utilizar material radiactivo, mediante la que se dicta una serie de normas, con el objetivo de reducir al mínimo posible los riesgos que pueda correr el personal que lo maneje. El organismo oficial encargado de expedir, modificar, suspender y revocar los permisos y licencias que se requieren en el país para la posesión, el transporte, el uso y la eliminación de material radiactivo, es la Comisión Nacional de Seguridad Nuclear y Salvaguardias (CNSNS).

En laboratorios de radioinmunoanálisis se labora con cantidades muy pequeñas de trazadores radiactivos en solución, del orden de microcuries. Esto disminuye al mínimo las precauciones que se deben tomar para su manejo (16). Así, por ejemplo, el laboratorio no requiere instalaciones especiales, no es necesario utilizar dosímetros personales y sólo

IV.16.

se usa ropa común de protección, tal como batas normales de laboratorio (22). Por lo tanto, los requisitos para obtener la licencia no son tan estrictos como en los casos de aplicaciones de fuentes radiactivas de mayor intensidad.

Sólo se recomienda tomar las siguientes precauciones para evitar una posible contaminación externa o interna (10 y 18).

Para prevenir contaminación externa se deben utilizar charolas envueltas con bolsas de polietileno y cubrir con papel absorbente las superficies de éstas, donde se trabajará. De este modo, se evita la dispersión del material radiactivo. Todos los utensilios de laboratorio deben marcarse adecuadamente para señalar que están contaminados, para tomar las debidas precauciones, a fin de volver a utilizarlos, con los cuidados necesarios, o desecharlos.

La contaminación interna se produce cuando se introduce material radiactivo al interior del cuerpo humano por ingestión, a través de la piel, o por alguna herida en ésta. Por lo tanto, no se deben utilizar pipetas ni otros instrumentos que se accionen con la boca. Está prohibido introducir al laboratorio alimentos, bebidas, utensilios para comer y beber, artículos para fumar, cosméticos y artículos de uso personal que no sean indispensables para el trabajo. Deben utilizarse guan

IV.17.

tes de plástico o de hule en todas las ocasiones en que se requiera. El acceso al laboratorio debe estar permitido sólo al personal necesario y cualquier otro individuo que necesite entrar deberá estar acompañado por alguien autorizado para hacerlo.

El trazador radiactivo utilizado y los tubos de ensaye, las puntas desechables de pipetas, etc., que participaron en la realización del radioinmunoanálisis, se consideran desechos radiactivos líquidos o sólidos, respectivamente. En el caso del yodo-125 (11), se permite eliminar los desechos líquidos por dilución en el drenaje común del edificio, de modo que se obtenga como máximo una concentración promedio mensual de 2×10^{-5} $\mu\text{Ci/ml}$. El cálculo puede ser efectuado con la actividad total de los desechos líquidos y el consumo mensual de agua del edificio. La cantidad máxima de yodo-125 que se permite eliminar al año es de 1 curie. Esta actividad equivale a unos 20 millones de pruebas de RIA.

Los desechos radiactivos sólidos, en la mayoría de los casos y con autorización previa de la CNSNS, pueden ser eliminados directamente, sin ningún tratamiento, con la basura común, ya que su radiactividad es despreciable.

... ..

... ..

... ..

V. MANEJO DE DATOS DE RADIOINMUNOANÁLISIS

Desde los inicios del radioinmunoanálisis, ha existido gran diversidad de opiniones sobre el procesamiento de los datos recolectados en el análisis; por tanto, no habiendo una unificación de ideas y acuerdos por las diferentes corrientes interesadas en la materia, ha sido necesario escoger y llevar a cabo el método que mejor se crea conveniente.

Conocer las características de cada método de manejo de datos permite criticar libremente, pero con bases, cuál de ellos ofrece mayor precisión y disminución del sesgo, para lograr la exactitud y cumplir con el objetivo del RIA, que es medir la concentración de una substancia en especial.

En este capítulo se analizan tres métodos que se encuentran entre los más utilizados en nuestros días y, por consiguiente, se enumeran las características de cada uno de ellos como, también, sus ventajas y desventajas. El fin es que el analista reconozca qué método le conviene, por la facilidad del procesamiento y para que aprecie a tiempo los posibles errores involucrados, así como las equivocaciones, cuando éstas se presenten.

Primero se definirán algunos tecnicismos que se utilizan y que están

V.2.

de acuerdo con los propuestos por Horwitz (2).

Entre los términos más utilizados en esta técnica y que han ocasionado mayores confusiones, están los de "error" y "exactitud"; por tanto, se debe tener presente que:

Exactitud, se obtiene sólo evitando los errores, pero no hay que confundir errores con "equivocaciones".

Equivocación, se comete al realizar mal una acción, un cálculo, un juicio, una percepción, una estimación o al registrar los datos; por ende, al actuar descuidadamente. Además de los errores experimentales normales, estas equivocaciones introducen errores adicionales.

Error, sólo se debe a la imprecisión y al sesgo que está presente al realizar el análisis. Por ejemplo, hay errores propios de la técnica de medición, debidos a "imprecisión" (fluctuaciones) y sesgo, o una combinación de ambos. La imprecisión es el resultado del error al azar, por ejemplo el decaimiento radiactivo o en operaciones de laboratorio, tales como pipeteo. El "sesgo" acontece cuando se comete, durante el desarrollo del análisis, un error sistemático; por ejemplo, mediante el uso de pipetas mal ca-

libradas, o cambios en la integridad de los reactivos, que pueden provocar resultados altos o bajos. Entre los problemas más grandes del radioinmunoanálisis está el reducir el sesgo producido por la unión inespecífica.

En el radioinmunoanálisis se parte de que la concentración está en función de la radiactividad. O sea,

$$p = f(A) \quad \dots(6)$$

donde, p es la concentración de la substancia que se desea medir (analito), pero sin marcar, que es utilizada como "patrón" o "estándar" a diversas concentraciones conocidas y A es la radiactividad o una relación de ésta, tal como $\% B/B_0$, cuentas por minuto (cpm), B/F , T/B , etc., donde, B = fracción unida radiactiva, B_0 = fracción unida radiactiva a concentración cero del ligando no radiactivo, F = fracción libre radiactiva, T = cuentas totales del trazador. Los valores de p y A se representan gráficamente para trazar con ellos una curva patrón o curva estándar.

La sensibilidad del análisis representa la cantidad de respuesta (en este caso, p , la concentración del analito) medida por unidad del estímulo (A , la radiactividad o una relación de ella). La sensibilidad se

V.4.

suele medir por la pendiente de la curva. Es obvia la ventaja de disponer de una sensibilidad constante en todo el intervalo de concentraciones, pero esto sólo se logra con gráficas de curvas patrón que son líneas rectas. La sensibilidad del RIA no sólo depende de la pendiente de la curva patrón sino, también, de otro factor tal como la actividad específica del ligando radiactivo.

Se conocen tres relaciones básicas mediante cada una de las cuales se trata de representar gráficamente la función de la ecuación 6 y, así, establecer la relación de la concentración contra la radiactividad, (2):

- A. Relación matemática desconocida.
- B. Relación empírica.
- C. Relación teórica.

A continuación se discute cada una de ellas.

A. Relación matemática desconocida

No se conoce la relación matemática de la $f(A)$ y sólo se manejan los datos arbitrariamente, utilizando las coordenadas para graficar la concentración contra la radiactividad mediante una curva suave que una to

dos los puntos. Como no se conoce la función $p = f(A)$, la relación entre la concentración y la actividad sólo se establece gráficamente. Entonces, las desventajas son:

1. No puede relacionarse matemáticamente la concentración del antígeno con la radiactividad.
2. No es posible obtener el mejor ajuste de los datos mediante análisis de regresión.
3. Ya que no puede aplicarse un análisis de regresión, no es posible determinar si hay error en algún punto de la gráfica y puede trazarse una curva suave tanto por los puntos buenos como por los malos. No es suficiente la inspección visual de la curva para revelar el error.
4. La gráfica proporciona poca información, o ninguna, acerca de la integridad o el deterioro de los reactivos, ni la presencia de unidores inespecíficos.
5. La sensibilidad no es constante, ya que la curva patrón generalmente no es lineal y la gráfica no señala la concentración del analito, por encima de la cual la unión química inespecífica es excesiva.

V.6.

Quizás la mayor desventaja de usar coordenadas arbitrarias para graficar datos de RIA sea la falta de exactitud. La exactitud de una región particular de la curva depende a su vez de cada punto individual y, habitualmente, cuando se conectan los puntos mediante una curva suave, no se identifican los errores correspondientes a cada punto individual.

Para ilustrar este tipo de relación, en los siguientes párrafos se discuten las gráficas de interés para el presente estudio, basadas en una función matemática desconocida.

a. Gráfica de cuentas por minuto contra el logaritmo de la concentración.

El origen de este tipo de gráfica quizás está relacionado con el hecho de que una respuesta biológica frecuentemente se aproxima a una función del logaritmo de la dosis. Es un intento para linealizar la curva; sin embargo, el resultado también es una curva, con un punto de inflexión cerca de la parte media (figura 9). Se suele suponer que la porción central de la curva es lineal y esta suposición introduce error, el cual, en realidad, es una equivocación.

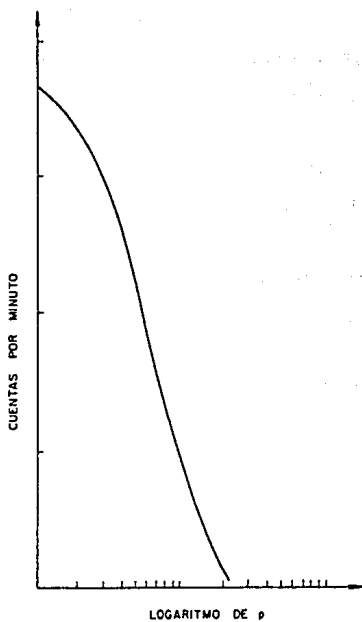


Figura 9. cpm contra log de p

V.8.

Las desventajas que tiene son:

- El decaimiento radiactivo varía constantemente en función del tiempo.
- La sensibilidad no es constante a lo largo de la curva patrón, porque la pendiente es variable.
- Se pierde información al no poderse graficar el punto cero, ya que el logaritmo de cero es menos infinito. Por lo tanto, no pueden interpolarse en la curva datos que correspondan a concentraciones comprendidas entre cero y el patrón del valor inmediato superior.

b. Gráfica de $\% B/B_0$ contra el logaritmo de la concentración.

Este tipo de gráfica representa un gran esfuerzo para compensar la falta de linealidad de la curva y los cambios del sistema, mediante la utilización de una combinación de normalización y de función logarítmica (figura 10).

V.9.

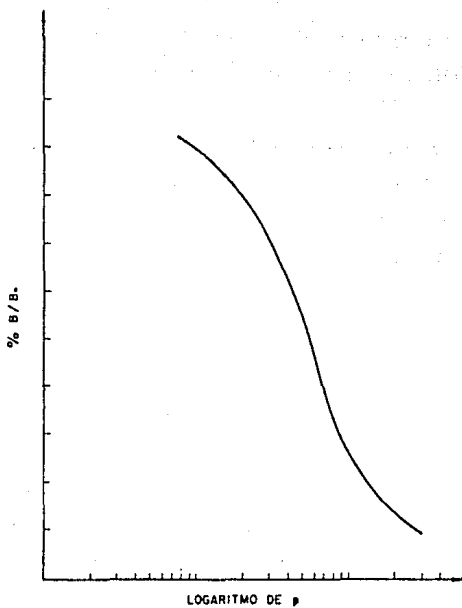


Figura 10. % B/B₀ contra log de p

V.10.

Las desventajas son:

- La sensibilidad no es constante.
- Se pierde información al ser imposible graficar el punto de concentración cero del ligando radiactivo.
- La normalización, basada en la relación de la radiactividad unida (B) con respecto a la unión correspondiente al patrón de concentración cero (B_0), independiza la curva de la vida media del radionúclido, pero hace difícil detectar el deterioro de los reactivos.

B. Relación empírica

Se establece una relación empírica cuando se busca una función matemática sin apoyo teórico por lo que es difícil confirmar su validez. Sólo se trata de obtener el mejor ajuste de los datos experimentales. De manera que los errores experimentales deben ser al azar, ya que los errores sistemáticos pueden orientar hacia la conclusión de que los datos no siguen la relación empírica propuesta.

Existen programas de cómputo que ayudan a buscar una relación empírica.

Se calcula el mejor ajuste lineal de cuadrados mínimos, con un grupo de funciones establecidas arbitrariamente (por ejemplo, funciones exponenciales, de potencia, hiperbólicas, etc.). En ciertos casos, una de estas funciones permite ajustar algunas curvas, pero ninguna de las expresiones matemáticas puede ser utilizada sistemáticamente en todos los casos. Se ha comprobado que no puede aplicarse la misma función para todos los sistemas de RIA (4, 15 y 21).

Otro procedimiento empleado para el manejo de los datos de RIA es el denominado "logit - log", que se basa en una función estadística, la cual, adaptada para radioinmunoanálisis, se expresa como:

$$\text{logit } B/B_0 = \ln \frac{B/B_0}{1 - B/B_0} \quad \dots(7)$$

En el eje de las ordenadas se representa la ecuación 7 y en el de las abscisas el logaritmo de la concentración del analito. La relación logit - log se utiliza para linealizar datos de RIA, aunque la gráfica resultante presenta una curvatura cuando se aplica al radioinmunoanálisis, como ilustra la figura 11. Las gráficas logit- log se usan en estadística para linealizar distribuciones simétricas; por ejemplo, como es el caso de una distribución gaussiana. Por ende, si la distribución no es simétrica, la gráfica logit - log no será lineal.

V.12.

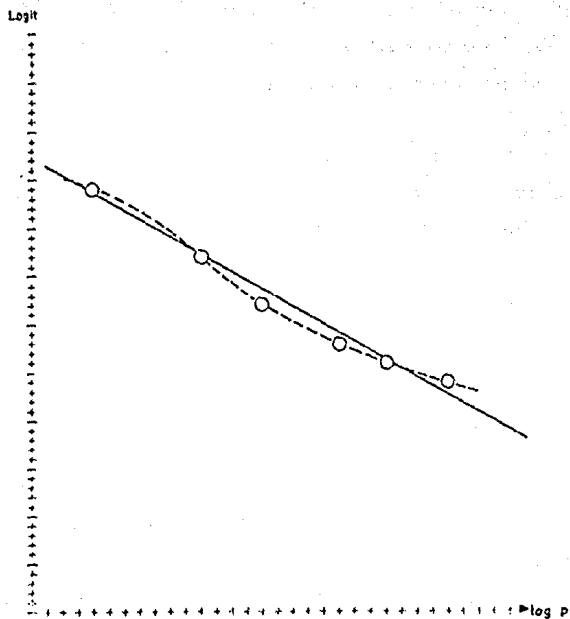


Figura 11. Logit contra log p

...

Cuando se usa papel logit - log para graficar curvas patrón de RIA, generalmente se traza la mejor recta que pueda pasar por los puntos suponiendo, falsamente, que la gráfica es lineal. Este procedimiento introduce error, el cual se agrega al error experimental.

Al reconocerse que la gráfica logit - log no es lineal, se elaboró el sistema "logístico de cuatro parámetros" (24), que es uno de los sistemas empleados en el presente estudio. Representa un ajuste de cuadrados mínimos para una expresión matemática arbitraria que contiene cuatro parámetros, los cuales supuestamente son:

- a. B (o)
- b. La pendiente de la gráfica logit - log
- c. La concentración del ligando correspondiente al 50% de unión
- d. La unión inespecífica (NSB)

Para que los cuatro parámetros fueran constantes también NSB tendría que ser constante y la curva debería ser lineal, requisitos que no se cumplen.

Entre las principales desventajas de este sistema se pueden señalar que:

V.14.

1. Se pierde información al no ser posible graficar B (o).
2. Se considera que NSB es constante, lo cual es falso.
3. Se supone que la curva es una línea recta pero, en realidad, es una curva.
4. Carece de sensibilidad para señalar cambios en la calidad de los reactivos.

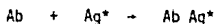
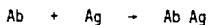
C. Relación teórica

El manejo de datos basado en una relación teórica se caracteriza, en particular, porque utiliza una función matemática, que se deriva de una relación teórica de todos los elementos del sistema. Así mismo, la validez de esta relación puede ser comprobada si los datos experimentales se ajustan a la ecuación propuesta.

Uno de los mecanismos teóricos que más se acercan al comportamiento del radioinmunoanálisis, es el que propone el Dr. Grafton Chase (5), en el que se definen hipotéticamente los siguientes parámetros para un radioinmunoanálisis "ideal":

1. El antígeno radiactivo y el no radiactivo, Ag^* y Ag , son químicamente e inmunológicamente indistinguibles.

2. El anticuerpo reacciona totalmente con el antígeno.



3. El anticuerpo es específico sólo para el antígeno y no ocurren otros tipos de reacciones.
4. Hay un exceso de $\text{Ag} + \text{Ag}^*$, con respecto al anticuerpo.
5. El ligando y los sitios de unión del anticuerpo reaccionan en una relación de uno a uno.

El objetivo del RIA es relacionar la concentración, "y", en función a la radiactividad, "x". Matemáticamente se expresa como:

$$y = f(x) \quad \dots(8)$$

Para la construcción de la curva estándar ideal, se trata de relacionar la ecuación anteriormente mencionada 8, con datos obtenidos de un radio inmunoensayo ideal; por ejemplo en la figura 12, tenemos tres tubos que corresponderán a tres puntos de la curva. En la figura se ilustran los reactivos que se añaden a cada tubo, respectivamente: seis unidades

V.16.

de antígeno radiactivo (\bullet); cero, tres y doce unidades de antígeno no radiactivo (\circ), y tres unidades de anticuerpo (Δ). Se mezcla bien el contenido de los tubos y se incuban para que se complete la reacción. Al concluir ésta, se procede a separar la fracción libre de la unida, por medio de centrifugación y decantación. Finalmente, se efectúa la medición de la fracción unida, en cada tubo.

Con los datos obtenidos de los tubos a, b y c, se procede a calcular la relación T/B y los resultados se resumen en la tabla 2, en la cual:

$$\frac{\text{concentración del ligando total}}{\text{concentración del ligando unido}} = \frac{Ag + Ag^*}{Cb} = \frac{T}{B} \quad \dots(9)$$

donde:

C_b = concentración del analito radiactivo unido o concentración de los sitios de unión.

T = es el antígeno marcado total.

B = es el antígeno marcado unido.

$Ag + Ag^*$ = la concentración de antígeno no radiactivo y antígeno radiactivo, respectivamente.

...

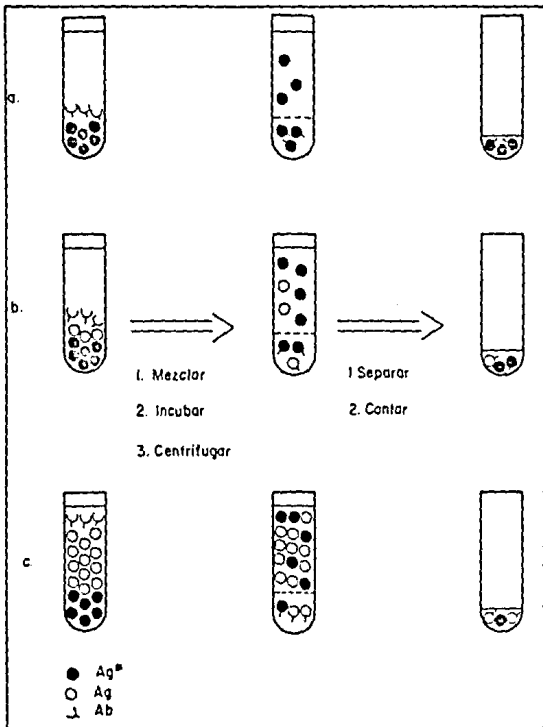


Figura 12. Procedimiento de un RIA ideal

V.18.

TABLA 2. DATOS PARA CONSTRUIR UNA CURVA ESTANDAR IDEAL

Tubo	Ag*	Ag	Ag* + Ag	Cb	Unidades libres	T/B
a	6	0	6	3	3	2
b	6	3	9	3	6	3
c	6	12	18	3	15	6

Al graficar la concentración de Ag no marcado en función de la radiactividad (T/B), se obtiene la gráfica siguiente (figura 13), en la que se aprecia que la curva patrón es una línea recta, construida con datos ideales.

Despejando Ag, de la ecuación 9, se obtiene:

$$Ag = - Ag^* + Cb (T/B) \quad \dots(10)$$

Al relacionar esta ecuación con una función matemática lineal, se hace evidente su analogía con la expresión:

$$y = b + mx \quad \dots(11)$$

Al substituir los valores obtenidos en la figura 13, en la ecuación 11, tenemos que:

$$y = -6 + 3 (T/B)$$

...

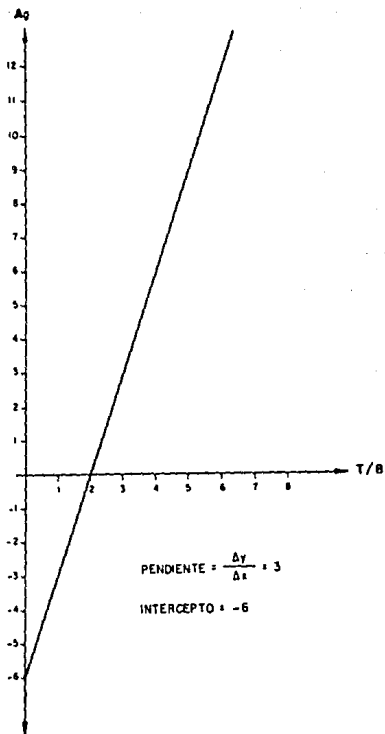


Figura 13. Concentración contra T/B, "ideal"

V.20.

En esta ecuación la pendiente corresponde a la concentración de los si tios de unión que están presentes en la reacción y la ordenada en el o rigen ("intercepto"), a la concentración de Ag^* .

Las ventajas de una relación teórica como ésta son:

1. Las constantes de la ecuación matemática definen propiedades específicas del sistema; por ejemplo:
 - a. La ordenada en el origen, que informa sobre la estabilidad del antígeno marcado.
 - b. La pendiente, que señala los cambios de concentración del anticuerpo (por ejemplo: deterioro).
2. Esta ecuación es válida para interpolar con exactitud los resultados de los tubos problema y extrapolar de manera adecuada.
3. Una relación teórica, como en este caso, nos mantiene al tanto del sistema ante datos sospechosos por posibles errores experi mentales, como son los sistemáticos, al azar y las equivocaciones.
4. También informa sobre uniones inespecíficas que se presenten en el análisis.
5. No se omite la información B (o).

...

6. Es posible obtener un ajuste lineal de mínimos cuadrados.
7. Si no se dispone de una calculadora para efectuar el ajuste lineal de mínimos cuadrados, se realiza el método gráfico, con sólo una hoja de papel milimétrico y una regla.

Al utilizar esta expresión matemática con datos experimentales reales y, probar la validez de la relación matemática propuesta, se observa, en algunos casos, que el sistema ideal se ajusta al real con gran exactitud, como se ilustra en la figura 14, correspondiente a un RIA de digoxina (6).

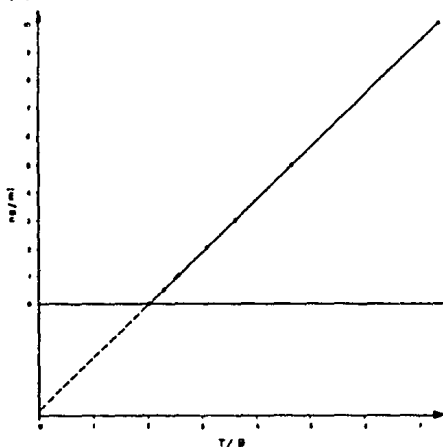
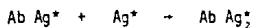
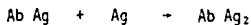
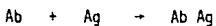


Figura 14. Gráfica de un RIA ideal de digoxina

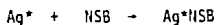
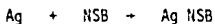
No todos los sistemas de RIA se ajustan en su totalidad a la ecuación 11, debido a una serie de factores que intervienen en mayor o menor grado en cada análisis. Estos factores dependen de las reacciones que se llevan a cabo en el RIA, las cuales son mucho más complejas que las consideradas en el RIA ideal, ya que por ejemplo:

1. Pueden efectuarse reacciones cruzadas del anticuerpo con varios antígenos que se encuentren presentes en la misma muestra.
2. El antisuero está compuesto por muchas poblaciones de anticuerpos y cada una de las cuales muestra diferente afinidad hacia el analito.
3. Se sabe que los anticuerpos no son monovalentes, sino que tienen dos sitios de unión independientes, que compiten entre sí para reaccionar con el antígeno, por lo que el Ab y el Ag no se unen en una relación de uno a uno.
4. La muestra del paciente y del diluyente de los patrones contienen sustancias diferentes, tales como proteínas séricas, que reaccionan de modo inespecífico con el analito.
5. El Ag y el Ag* no siempre tienen exactamente la misma estructura química ni el mismo comportamiento inmunológico.

En consecuencia, además de las reacciones que producen unión específica:



también se lleva a cabo simultáneamente una diversidad de reacciones entre el analito y el trazador con muchos otros unidores de menor afinidad, los cuales constituyen la unión inespecífica, que puede representarse de manera global como:



Por lo tanto, se puede representar de un modo más real la concentración total del analito unido, mediante la igualdad siguiente:

$$\left[\begin{array}{l} \text{analito} \\ \text{unido} \\ \text{total} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{l} \text{analito unido al} \\ \text{primer sitio del} \\ \text{anticuerpo espe-} \\ \text{cífico} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{l} \text{analito unido al} \\ \text{segundo sitio} \\ \text{del anticuerpo} \\ \text{específico} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{l} \text{analito asociado} \\ \text{a unidores de ba} \\ \text{ja afinidad} \end{array} \right]$$

...(12)

Para elevar al máximo la exactitud en el RIA deberían tomarse en cuenta los factores descritos en los párrafos anteriores.

Existen dos métodos para manejar los datos, basados en la relación de la concentración contra T/B. El primero, que es el más complejo de los dos, proporciona mayor información acerca de la calidad de los reactivos y hace una estimación del grado de unión inespecífica, así como de otros parámetros del sistema, pero requiere de equipo de cómputo. El segundo método es esencialmente gráfico y está destinado a laboratorios que no disponen de computadoras. Este segundo método se utilizó en el presente trabajo.

VI. MATERIAL Y METODOS

Las pruebas de radioinmunoanálisis para determinar T_4 y TSH fueron llevadas a cabo en el Servicio de Medicina Nuclear del Centro Hospitalario 20 de Noviembre del I.S.S.S.T.E., por personal del propio Centro Hospitalario.

Para el presente estudio se dispuso de 30 series compuestas por patrones para cuantificar T_4 y 27 series para TSH. Este último grupo no se completó a 30 series por motivo de un cambio en el proveedor de los radiactivos.

Después de concluirse los procedimientos rutinarios de análisis, se utilizaron las series de patrones para medir de nuevo la radiactividad de cada tubo de ensaye y manejar los resultados experimentales. Esto último se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.

A. Procedimientos de radioinmunoanálisis

1. Determinación de T_4 total

Se efectuó la preparación de la curva patrón con juegos de reactivos ("kits") Gamma Coat de Clinical Assays (12), No. de catálogo

...

VI.2.

go CA - 535, 555. Estos juegos de reactivos contienen tubos de ensayo de plástico de 12 mm ϕ x 75 mm, recubiertos en su interior con antisuero de conejo anti-T₄ y los demás reactivos necesarios: T₄ marcada con I-125 (trazador), suero humano "blanco" libre de T₄ y patrones de T₄ (1,4,8,12 y 20 μ g/dl) disueltos en suero humano. Se hicieron determinaciones por duplicado de los patrones.

Siguiendo el orden de los tubos, como se presenta en la tabla 3, se procedió a añadir 10 microlitros (pipeta, Brand) de suero "blanco" (B₀) a cada uno de los dos primeros tubos 1, 2 y 10 microlitros de suero estándar con las concentraciones correspondientes de T₄ a los tubos 3 al 12. Posteriormente se añadió 1.0 ml (pipeta, Brand) del trazador, a cada tubo (T₁, T₂, 1, 2,, 12), se colocaron los tubos en una gradilla, excepto T₁ y T₂. La gradilla junto con los tubos se agitaron suavemente en un mezclador "vortex" (Lab-line Instruments, Inc.) y se dejaron incubar a 20° - 25°C por 45 minutos. Después de la incubación, se procedió a la separación de la fracción unida en cada tubo (que contiene antisuero adherido a la superficie interior) de la fracción libre (sobrenadante), por medio de decantación (excepto T₁ y T₂), durante 3 a 5 minutos y se procedió a medir la actividad de cada tubo.

TABLA 3. SECUENCIA DE LOS TUBOS PATRONES CON LAS CONCENTRACIONES CORRESPONDIENTES PARA CUANTIFICACION DE T₄ TOTAL EN SUERO HUMANO

Tubo No.	Contenido de los tubos	Concentración de T ₄ total (µg/dl)
T ₁ , T ₂	Cuentas totales del trazador	
1, 2	Suero blanco (Bo)	0
3, 4	Suero patrón	1
5, 6	Suero patrón	4
7, 8	Suero patrón	8
9, 10	Suero patrón	12
11, 12	Suero patrón	20

2. Determinación de TSH humana

Se hizo el análisis con juegos de reactivos para la cuantificación de TSHh con Gamma Dab de Clinical Assays (14), No. de catálogo CA - 591. Los kits contienen: TSHh marcada con I-125 en solución de gelatina (trazador), antisuero de conejo anti - TSH en solución de gelatina, antisuero de cabra anti - conejo (segundo antisuero, utilizado como precipitante), suero de co-

VI.4.

nejo unidor no específico de TSHh en solución de gelatina, suero blanco libre de TSHh simulado con albúmina bovina y patrones de TSH (2,5,10,20 y 50 microunidades internacionales por ml) en solución de albúmina bovina. Las pruebas se hicieron en tubos (polipropileno, 12 mm ϕ x 75 mm) por duplicado para los totales, NSB y patrones. En la tabla 4, se resumen las concentraciones de los patrones y la secuencia llevada para

TABLA 4. SERIE DE TUBOS PARA LA CUANTIFICACION DE TSHh

Tubo No.	Contenido de los tubos	Concentración de TSHh (μ IU/ml)
T ₁ , T ₂	Cuentas totales del trazador	
1, 2	Suero blanco de NSB	0
3, 4	Suero blanco (Bo)	0
5, 6	Suero patrón	2
7, 8	Suero patrón	5
9, 10	Suero patrón	10
11, 12	Suero patrón	20
13, 14	Suero patrón	50

VI.5.

realizar el análisis; por ejemplo, se agregaron 200 microlitros (pipeta, Brand) de suero blanco (Bo) a cada tubo de NSB y tubos de Bo, 200 microlitros de suero patrón de $2 \mu\text{IU/ml}$ a los tubos 5 y 6 y, así, sucesivamente, hasta finalizar la serie de tubos patrones.

Posteriormente, se añadieron 100 microlitros (pipeta, Brand) de suero unidor no específico de TSHh a los tubos de NSB. Se agregaron a todos los tubos (excepto totales y NSB) 100 microlitros de suero de conejo anti - TSHh. Los tubos se incubaron en baño de temperatura constante a $37^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ (Equipar) durante una hora. Se agregaron 100 microlitros de trazador a cada tubo y se mezcló manualmente y con cuidado cada uno de ellos. Los tubos se incubaron a $37^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ durante 2 horas. Al concluir la incubación, se añadió 1.0 mililitro de antisuero precipitante a todos los tubos (excepto los totales) y se mezcló en el agitador vortex. Nuevamente se procedió a incubar en las mismas condiciones anteriores pero sólo 5 minutos. Se centrifugaron (Sol - Bat) todos los tubos (excepto totales) durante 15 minutos. Se decantó cada tubo (se omitieron los totales), cuidando que el precipitado (fracción unida) no se afecte. Finalmente, se midió la radiactividad de la fracción unida de cada tubo.

VI.6.

B. Medición de la radiactividad

La cuantificación de la radiactividad se llevó a cabo en un sistema de medición por centelleo, diseñado por el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) para analizar muestras in - vitro, en particular las de radioinmunoanálisis (8).

El sistema de medición está constituido por 5 elementos: 1) un proyector Kodak tipo "carrusel" S - AV 2000, adaptado para trabajar como cambiador de muestras, con capacidad para 80 tubos de 12 mm ϕ x 75 mm; 2) una calculadora Hewlett - Packard HP - 41 CV programable, que funciona como control del sistema y procesador de datos; 3) una impresora Hewlett - Packard 82143 A Peripheral, que imprime los datos procesados; 4) un lector de tarjetas magnéticas que se adapta a la calculadora HP-41 CV, indispensable para leer y grabar programas e información general sobre cada procedimiento de análisis; 5) un contador gamma Sample Changer & Desk Calculator Interface, John Caunt Nucleonics LTD., Gynsham, England, compuesto por un detector de pozo de NaI(Tl) .

Se comprobó el buen funcionamiento del equipo, realizando las siguientes pruebas como control de calidad: 1) voltaje de operación o voltaje óptimo para la energía del I-125; 2) la prueba de χ^2 , para determinar la reproducibilidad y precisión de conteo en la medición de radia-

VI.7.

ción gamma. En esta prueba se utilizó cesio-137 (Cs-137) como fuente de referencia, que tiene una vida media de aproximadamente 30 años y, por lo tanto, no se requiere hacer corrección, debido al decaimiento radiactivo, durante la prueba.

Para medir la radiactividad de cada tubo, se colocaron los tubos en el portamuestras con el mismo orden en que se efectuó el análisis (tubos: $T_1, T_2, 1, 2, 3, 4, \dots, X_n$); al terminar la medición, se tomó un tubo patrón de cada concentración y se procedió a medir nuevamente la radiactividad. Estos datos se utilizaron posteriormente como tubos problemas o experimentales.

C. Manejo de los datos experimentales.

Los datos proporcionados por el contador gamma, correspondientes a cada serie de tubos, se procesaron mediante tres métodos:

1. Modelo logístico de cuatro parámetros (OIEA)
2. El que recomienda el proveedor
3. Concentración contra T/B

Cada uno de ellos se explica a continuación:

VI.8.

1. Modelo logístico de cuatro parámetros

El programa "logístico de cuatro parámetros con ajuste ponderado de mínimos cuadrados" fue desarrollado por el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA). Se diseñó para estimar "in - vitro" la concentración del analito y evaluar la precisión de los datos experimentales en radioinmunoanálisis (9).

El programa está grabado en tarjetas magnéticas para la calculadora Hewlett - Packard 41 CV y fue diseñado para procesar las cuentas de la fracción unida o cuentas de la fracción libre, pero no ambas a la vez. La versión del programa que se utilizó en el presente estudio maneja en línea ("on line"), o sea, directamente del contador de radiación gamma, los datos de cada serie de patrones y muestras para análisis. El programa consta de las siguientes partes (figura 15).

- a) Inicio de los patrones ("Standards Initialization" o "SI").
- b) Análisis de los patrones ("Standards Analysis" o "SA").
- c) Perfil de imprecisión ("Imprecision Profile" o "IP").
- d) Curva estándar ("Standard Curve" o "SC").
- e) Inicio de los problemas ("Unknown Initialization" o "UI").
- f) Análisis de los problemas ("Unknown Analysis" o "UA").

VI.9.

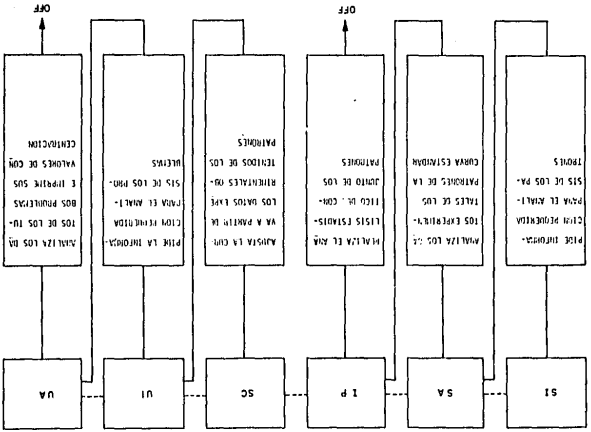


Figura 15. Programa logístico de cuatro parámetros

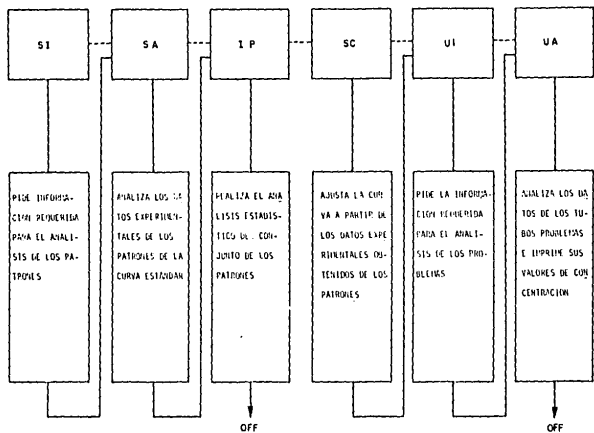


Figura 15. Programa logístico de cuatro parámetros

A = es un valor constante de "RRE, relación respuesta error", donde "A" es el intercepto de la recta: $R = A + BP$ y "R" representa los errores no atribuibles a la estadística de la medición de radiactividad. Aunque el valor de A puede ser establecido en el laboratorio mediante cálculos basados en resultados obtenidos con muchos lotes de análisis de la misma sustancia, el OIEA sugiere que se utilice 3.000.

B = es el valor constante de la pendiente en la ecuación $R = A + BP$. El OIEA sugiere $B = 0.000$.

J = información acerca de la posición de los tubos en el cambiador de muestras. Se usa $J = 1$ si los tubos están en posiciones adyacentes.

T (time) = tiempo de conteo para cada tubo, en minutos.

M (multiplicity) = "multiplicidad", o sea, número de tubos por cada patrón ($M = 2.000$ significa duplicados).

N (number) = número de patrones.

X2, ..., X8 = concentración de cada patrón ($X3 = 1000000.000$ corresponde a una concentración infinitamente grande o "dosis infinita", considerada como equivalente a la NSB).

...

VI.12.

Q = tiempo óptimo de conteo con el objetivo de reducir el error en la medición de la radiactividad.

b) SA

La figura 17, presenta el análisis de los patrones (SA).

-1 = las cuentas por minuto (cpm) del tubo de "fondo natural".

Se utilizan dos tubos de fondo: uno al principio y otro al final de SA, para revelar si existe una contaminación radiactiva y verificar la estabilidad de funcionamiento del contador.

0 = tubo de referencia, de radiactividad conocida (cpm). También se usan dos tubos número 0, uno al principio y otro al final.

1 = cpm promedio de los dos tubos de cuentas totales.

2 = resultado promedio de los tubos de B (o), expresado como relación:

$$P = \frac{\text{cpm del patrón}}{\text{cpm totales}} \times 100$$

En el presente trabajo, en todos los casos se utilizaron las cpm de la fracción unida (B) y las cpm totales (T):

$$P = \frac{B}{T} \times 100$$

SASASASASASASASASASASASAS

VI.13.

-1 C106.000 E25.7

0 C6297.000 E21.1

23667.00

20998.70

e0.4 FI 00 H0

1 C26513.500 E20.4

33.00

27.78

e0.1 FI 00 H-1

2 P37.391 E22.3

C93.00

C84.00

3

33.40

34.78

e0.9 FI 01 H7

4 P34.093 E22.3

20.23

25.14

e0.8 FI 01 H5

5 P22.695 E22.4

14.01

12.67

e1.8 FI 03 H34

6 P13.442 E22.4

18.80

19.74

e1.1 FI 01 H11

7 P10.610 E22.4

7.41

6.78

e1.2 FI 03 H37

8 P7.191 E22.4

-1 C105.000 E24.2

0 C5879.000 E21.1

Figura 17. SA

VI.14.

El programa no subtrae las cpm del fondo y, por lo tanto, no utiliza cuentas netas.

3 = valor promedio de P, de los tubos duplicados de NSB.

4, ..., 8 = valor promedio de P, de los patrones correspondientes.

Los análisis estadísticos que realiza el programa en las partes SA, IP, SC y UA, son:

$$E\% = \frac{1}{\sqrt{\text{cpm}}} \times 100$$

$$e = \frac{\text{dispersión observada}}{\text{dispersión esperada}} = \sqrt{\frac{U}{F}}, \text{ en cada pareja de tubos.}$$

F = multiplicidad -1 = grados de libertad.

U = F x e² donde U tiene las mismas propiedades de χ^2 , tablas respectivas.

H = FR² donde, H es el valor compensado de R²; se utilizó en análisis en que los patrones se incluyeron por duplicado y los problemas en tubos simples, o sea, no fue uniforme la multiplicidad.

Los tubos replicados (patrones y problemas) en que no es razonable su dispersión están señalados:

VI.15.

* = en la prueba de χ^2 se somete "e" a un intervalo de probabilidad de 5% - 0.3%. Los resultados así señalados son inconsistentes.

** = en la prueba de χ^2 se somete "e" a $p < 0.3\%$. Los resultados se consideran "outliers" y son muy inconsistentes.

† = en la prueba de χ^2 se somete "e" a $p > 95\%$. El resultado de los datos son irrazonablemente consistente.

W (warning) = aparece cuando sólo se dispone de tubos individuales o también cuando el coeficiente de variación excede el 9%.

‡ = se utiliza en UA para identificar las extrapolaciones que se hicieron en puntos altos o bajos de la curva patrón.

c) IP

El perfil de imprecisión es análogo a la curva RRE, sólo que IP es una descripción del error no asociado a la estadística de conteo y del error aleatorio. El IP muestra dichos errores en términos no de P, sino del logaritmo natural de la concentración de analito ($\ln X$).

El análisis estadístico que se lleva a cabo en esta parte del

VI.16.

programa se aplica al conjunto de patrones e incluye (figura 18):

$$R = \sqrt{H/F}$$

F = No. de patrones -1

Figura 18. IP.

d) SC

En la figura 19 se puede observar:

a = el valor máximo de P, o sea, B (o).

b = la pendiente de la curva logit - log.

c = la concentración del ligando correspondiente al 50% de unión, es decir, $P = (a + d)/2$.

d = el valor mínimo de P, correspondiente a NSB

El programa permite graficar la curva estándar, logit contra Y (es el % de error en la concentración del patrón). La curva

...

VI.18.

Los puntos que no se ajustan, aparecen a la izquierda (-) o a la derecha (+) de la línea vertical. Se unen los puntos manualmente para corregir "a ojo" el error en cada intervalo de concentración de los patrones.

F = los grados de libertad de la curva = al número de patrones -4 (de los 4 parámetros a, b, c y d).

V = una medida de la falta de ajuste entre los puntos de los patrones y la vertical $Y = 0$.

e) UI

El inicio para los tubos problemas se ilustra en la figura 20.

0101010101010101010101010101

$Z_L = 7.000$

$Y = 2.000$

$Z_L = 6.000$

$Y = -3.000$

$Z_L = 5.000$

$Y = -2.000$

$Z_L = 4.000$

$Y = 3.000$

$\mu = 3.000$

$\sigma = 0.000$

$J = 1.000$

$T = 1.000$

$H = 1.000$

$W = 5.000$

$S = 222222333.0$

Figura 20. UI

$\%L$ = son los puntos de la gráfica anterior.

Y = es el porcentaje de error de los patrones, que se lee del ajuste de la curva que se realizó manualmente. Este cálculo se efectuó a partir de $Y = 0$, estimando el alejamiento de la línea vertical ($Y = 0$).

N = número de problemas a cuantificar.

$9Q$ = tiempo óptimo de conteo.

f) UA

En la figura 21 se tiene:

-1 = cuentas por minuto del tubo de fondo.

0 = cuentas por minuto del tubo de referencia.

1 = tubo problema número 1.

2 = tubo problema número 2 y así, sucesivamente, hasta finalizar la cuantificación de analito en cada tubo problema.

-1 = cuentas por minuto del tubo de fondo.

0 = cuentas por minuto del tubo de referencia.

La concentración de analito en el suero del paciente se representa con la letra X .

VI.20.

URUURURURURURURURURURURURURURURURUR

```
-1 C94.000 E210.3
    02706.00 XEQ H
    02702.00 XEQ H
    02720.00 XEQ H
0 C0203.000 E21.1
    03124.00 XEQ H
    03104.00 XEQ H
    0.81
K1 X0.610 E432.3
    02091.00 XEQ H
    02074.00 XEQ H
    3.75
M2 X3.757 E45.4
    01100.00 XEQ H
    01099.00 XEQ H
    0.02
M3 X01.017 E40.3
    00902.00 XEQ H
    00906.00 XEQ H
    00911.00 XEQ H
    11.75
M4 X11.776 E45.1
    00602.00 XEQ H
    00651.00 XEQ H
    00621.00 XEQ H
    00690.00 XEQ H
    12.34
M5 X19.345 E45.2
    00630.00 XEQ H
    00645.00 XEQ H
    00627.00 XEQ H
-1, C103.000 E43.9
    02724.00 XEQ H
    02694.00 XEQ H
    02710.00 XEQ H
0 C0194.000 E41.1
```

Figura 21. UA

...

2. El que recomienda el proveedor (Clinical Assays)

- a) Para los análisis de T_4 total se procedió según el protocolo proporcionado por el proveedor. Los datos que arrojó el contador son valores de P ; por lo tanto, se despejó B obteniéndose así, cuentas unidas brutas que se graficaron en papel semilogarítmico, donde el eje vertical "Y" (escala lineal) representa la actividad de la fracción unida de los tubos patrones de T_4 total, contra la concentración ($\mu\text{g/dl}$) de los patrones en el eje horizontal "X" (escala logarítmica del papel). Se procedió a trazar una curva por los puntos, tratando de hacer el mejor ajuste (figura 22). Los tubos de cuentas totales y B_0 no se requieren para este método pero son necesarios para otros.

Para encontrar la concentración de T_4 total en los problemas, se localizaron en el eje Y, las cuentas unidas para cada tubo, se trazó una línea horizontal que intercepte la curva patrón y en el punto de la intersección se trazó una línea perpendicular hasta el cruce con el eje X y se procedió a leer la concentración de T_4 total. Este procedimiento se repitió tantas veces como muestras de problemas existan. Los datos proporcionados en la tabla 5, son de la serie No. 17, compañera de 30 análisis de T_4 que se efectuaron para este estudio comparativo.

VI.22

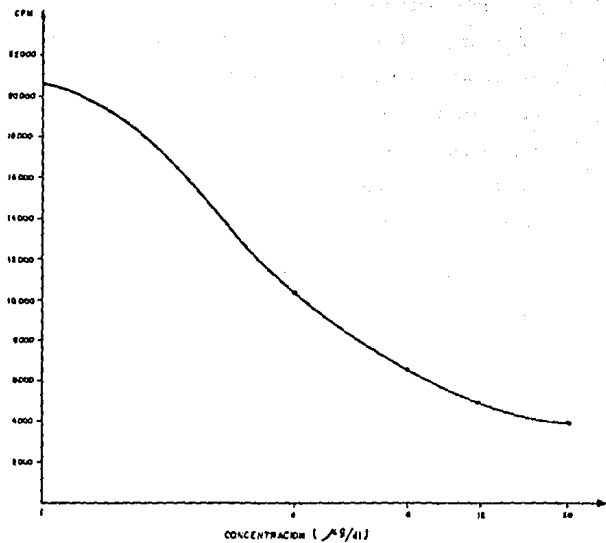


Figura 22. cpm contra log x, para tiroxina

TABLA 5. DATOS TOMADOS DEL ANALISIS No. 17 DE T.

Contenido de los tubos	Tubo 1	Tubo 2	Concentración de T. total ($\mu\text{g/dl}$)
Cuentas totales	56085	57102	
Suero blanco (Bo)	26316	27607	0
Suero estándar	20561	20555	1
Suero estándar	10351	11206	4
Suero estándar	6825	6356	8
Suero estándar	4963	5263	12
Suero estándar	3645	3984	20
Tubo problema (patrón 1)	20515		1.05
Tubo problema (patrón 4)	11484		3.65
Tubo problema (patrón 8)	6348		8.5
Tubo problema (patrón 12)	5310		10.6
Tubo problema (patrón 20)	3935		19.2

...

VI.24.

b) Para la cuantificación de TSH humana

Según el proveedor de los kits, se utilizan coordenadas arbitrarias para representar, en papel semilogarítmico, % B/B₀ en el eje Y (escala lineal) y la concentración en el eje X (escala logarítmica). El % B/B₀ de los patrones y problemas se calcula de la siguiente manera:

$$\% B/B_0 = \frac{cpm_X - cpm_{NSB}}{cpm_{B_0} - cpm_{NSB}} \times 100$$

donde:

cpm_X = son las cpm de cada patrón y muestras problemas.

cpm_{NSB} = Es el promedio de los tubos de NSB (1 y 2).

cpm_{B_0} = El promedio de los tubos 3 y 4, (B₀).

Por ejemplo, tenemos la serie No. 7, de las 27 series que comprende el estudio comparativo realizado con la tirotrópica. Ver la tabla 6.

Para conocer la concentración de TSHh en los problemas sólo es necesario conocer el porcentaje unido del analito, se localiza éste en el eje Y, y se realiza el mismo procedimiento de interpolación del ejemplo anterior (figura 23). Los tubos de cuentas totales no son necesarios en este método.

TABLA 6. DATOS DE LA SERIE No. 7 DE TSHh

Contenido de los tubos	Tubo 1	Tubo 2	%B/Bo	Contenido de TSHh (μ U/ml)
Cuentas totales	48630	48714		
Suero blanco NSB	1562	1782		
Suero blanco (Bo)	23650	23582	100	0
Suero patrón	21080	20885	88	2
Suero patrón	16733	16748	69	5
Suero patrón	12124	12007	47	10
Suero patrón	7001	7017	24	20
Suero patrón	3349	3339	8	50
Tubo problema (patrón 2)	20760		87	2.1
Tubo problema (patrón 5)	17013		70	4.8
Tubo problema (patrón 10)	12276		48	9.6
Tubo problema (patrón 20)	7218		25	19.5
Tubo problema (patrón 50)	3327		8	50

VI.26.

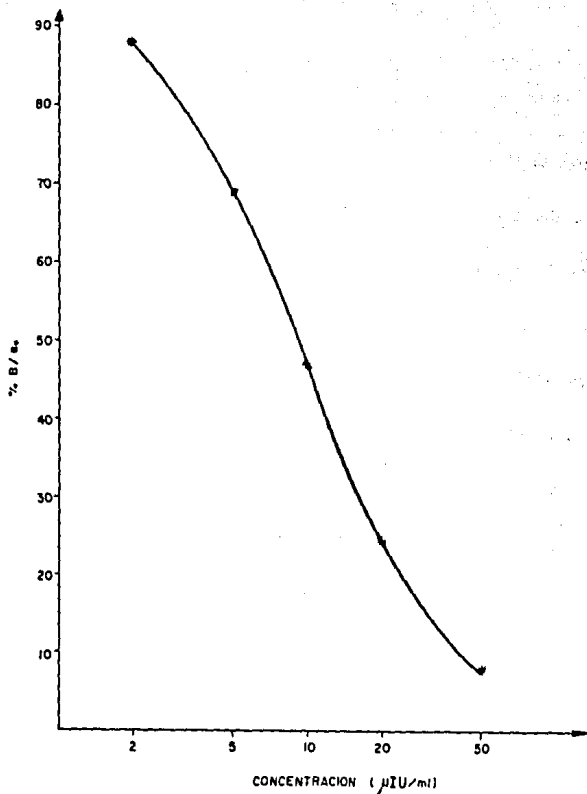


Figura 23. % B/B₀ contra log x, para TSH

...

3. Concentración contra T/B

El manejo de los datos experimentales de todas las series de tubos se llevó a cabo según el método gráfico (2), que comprende los siguientes pasos:

- a) Se midió el fondo durante 10 minutos y se calculó el promedio en cpm.
- b) A partir de $P = \frac{B}{Y} \times 100$, se obtuvo el valor de cuentas unidas brutas por minuto (B) de cada uno de los tubos de los patrones.
- c) Para obtener cuentas netas de T y de B, se restó el fondo de (cpm) a las lecturas de los tubos respectivos.
- d) Se calcularon las relaciones de T/B con cuentas netas.
- e) Se graficó la curva estándar en papel milimétrico, representando en el eje Y las concentraciones de los patrones y los valores correspondientes de T/B en el eje X (figura 24 y 25).
- f) Se trazó con una curva francesa la mejor curva para todos los puntos.
- g) Con la ayuda de una regla se procedió a trazar una recta, a través de los puntos correspondientes a las concentraciones pequeñas (1, 4 y 8 $\mu\text{g}/\text{dl}$ en el caso de T, y 2, 5 y 10 $\mu\text{IU}/\text{ml}$

VI.28.

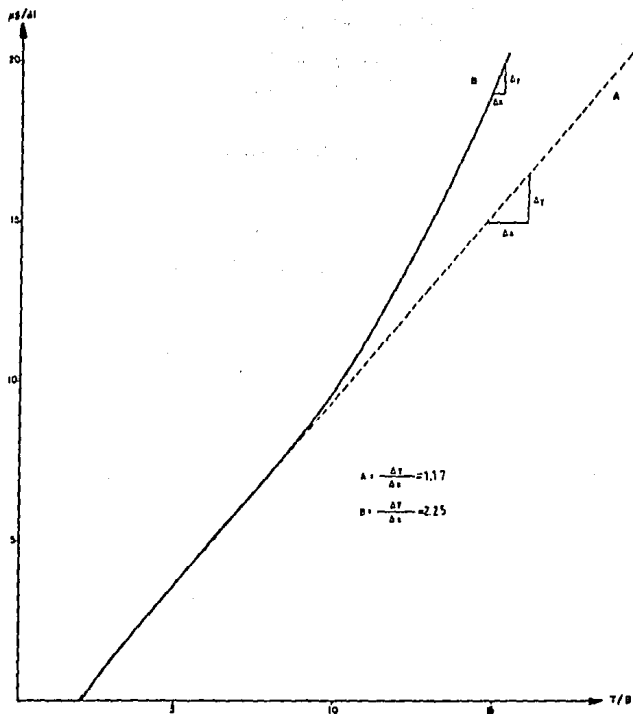


Figura 24. Concentración contra T/B para T_w .

...

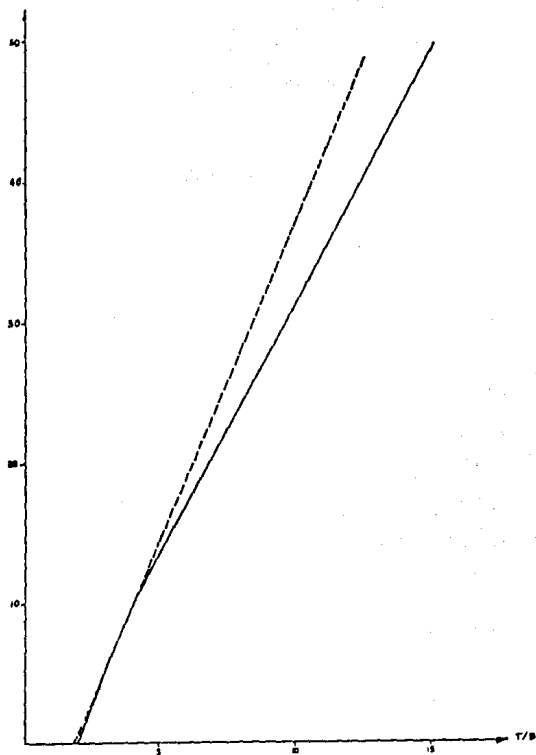


Figura 25. Concentración contra T/B, para TSH

VI.30.

para el caso de TSH).

- h) La curva estándar se utilizó para interpolar los datos experimentales de los tubos problema, expresados como la relación de T/B en cuentas netas.

La parte recta de la gráfica corresponde al RIA ideal. La ligera curvatura que presenta en concentraciones pequeñas de analito se debe a baja afinidad del anticuerpo por el antígeno. La parte superior de la curva, desplazada hacia arriba de la recta, indica la presencia de unidores no específicos (figura 24) y el desplazamiento hacia abajo (figura 25), se debe a deterioro de los reactivos (2). La zona que es una recta es válida para interpolar datos de los problemas, y la zona de la curva puede no ser válida si el porcentaje de unión inespecífica presente en esta región es mayor que la tolerancia establecida o de las exigencias de exactitud del análisis con cual se trabaja.

Para simplificar los cálculos de resta de fondo y de T/B, se utilizó un sencillo programa, denominado ASSAY, aplicado a la calculadora HP - 41 CV.

VII. RESULTADOS

A. Tiroxina

Las concentraciones de interés clínico, para determinar los diferentes estados tiroideos, están comprendidas entre 4, 8 y 12 $\mu\text{g/dl}$; por consiguiente, se consideraron de importancia estas concentraciones para evaluar la precisión, el sesgo y la exactitud en los tres métodos de manejo de datos.

En la tabla 7 se presentan los resultados promedio de los patrones de 4, 8 y 12 $\mu\text{g/dl}$, considerados como problemas, obtenidos en 30 series de T₄ total mediante cada uno de los tres métodos. La tabla también contiene el índice de correlación calculado con los resultados obtenidos y con los valores correspondientes de los patrones.

TABLA 7. CONCENTRACION PROMEDIO DE T₄

Patrones $\mu\text{g/dl}$	Protocolo		O.I.E.A.		T/B	
	\bar{X}	d.e.	\bar{X}	d.e.	\bar{X}	d.e.
4	4.028	0.254	4.010	0.279	4.040	0.255
8	8.190	0.800	8.389	0.890	8.112	0.502
12	12.110	1.080	12.156	1.319	11.980	1.067
Indice de correlación	0.9998506		0.9990606		0.9998899	

VII.2.

Un método es más preciso cuando es menor su desviación. Las menores desviaciones estándar para 8 y para 12 $\mu\text{g/dl}$ correspondieron al método de concentración contra T/B. La desviación para 4 $\mu\text{g/dl}$ fue aproximadamente igual según este mismo método (0.255) que la del protocolo (0.254). El índice de correlación más alto correspondió a T/B.

En la tabla 8 y las figuras 26a, b y c, se muestra el coeficiente de variación* encontrado para cada método.

TABLA 8. PRECISION PROMEDIO DE T.

$\mu\text{g/dl}$	Protocolo	O.I.E.A.	T/B
4	6.31	6.96	6.31
8	9.77	10.61	6.19
12	8.92	10.85	8.91

$$* \text{ C.V.} = (\text{d.e.}/\bar{X}) \cdot 100$$

La relación de concentración contra T/B, presentó la menor dispersión para las tres concentraciones.

VII.3.

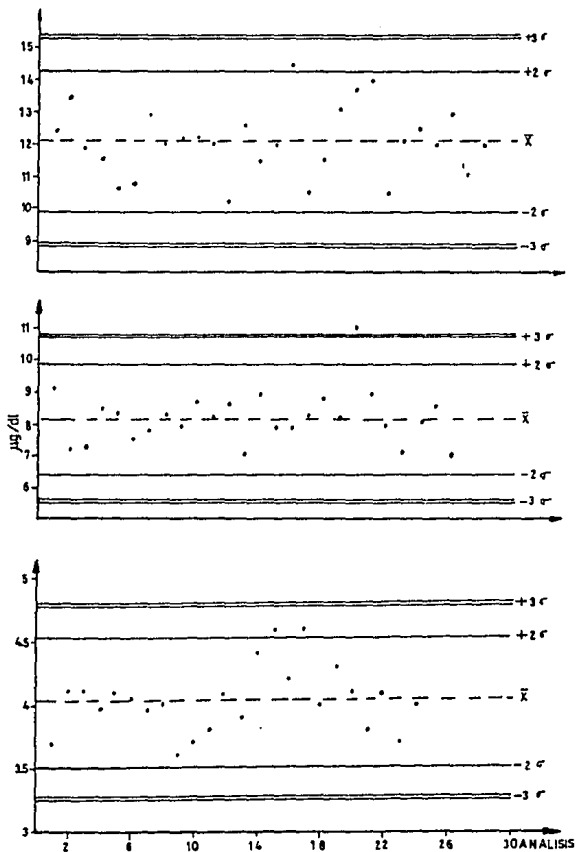


Figura 26a. Precisión de T, (Protocolo)

VII.4.

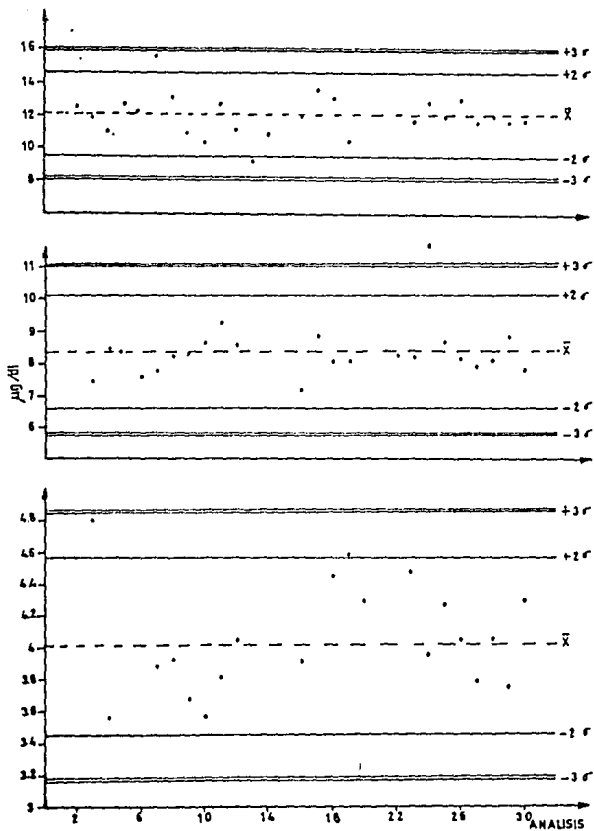
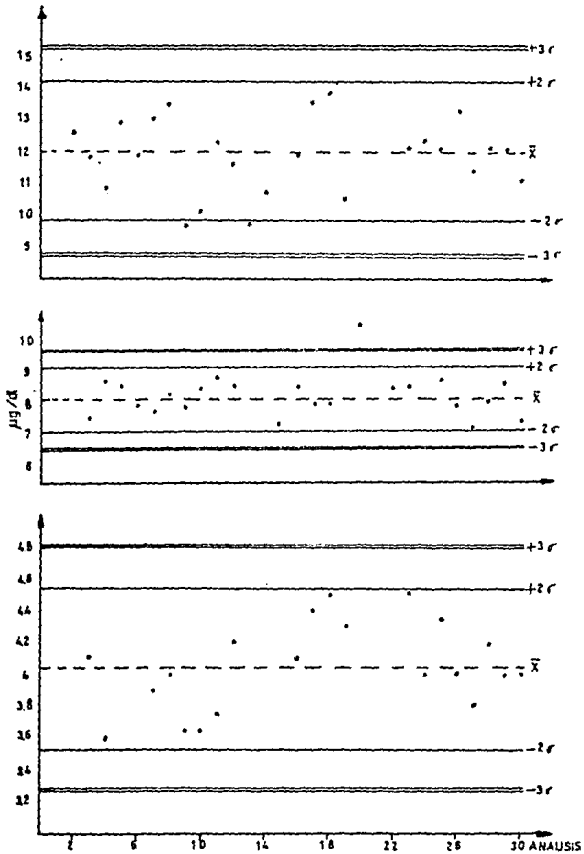


Figura 26b. Precisión de T, (O.I.E.A.)

Figura 26c. Precisión de T_4 (T/B)

VII.6.

Se cuantificó el sesgo** de cada uno de los métodos, y la tabla 9 y la figura 27 presentan los valores encontrados.

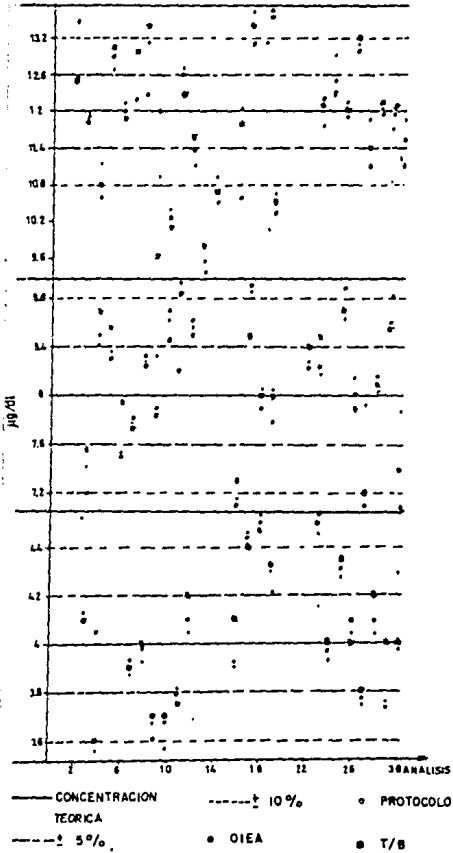
TABLA 9. SESGO PROMEDIO DE T.

µg/dl	Protocolo	O.I.E.A.	T/B
4	- 0.700	- 0.250	- 1.050
8	- 2.375	- 4.863	- 1.400
12	- 0.917	- 1.300	0.167

$$** \text{ sesgo} = \frac{\text{valor del patrón} - \text{promedio del método}}{\text{valor del patrón}} \cdot 100$$

Al relacionar la concentración del analito contra T/B, fue mucho menor el sesgo promedio para 8 y 12 µg/dl, en tanto que fue mayor para la concentración de 4 µg/dl.

La exactitud*** de los métodos fue valorada por la suma de los errores de precisión y sesgo. El método más exacto es aquel en el cual la precisión es mayor (menor su desviación estándar) y menor su sesgo. En la tabla 10 se resumen los valores de la exactitud de cada uno de los métodos.

Figura 27. Sesgo de T₁

VII.8.

TABLA 10. EXACTITUD PROMEDIO DE T,

ug/dl	Protocolo	O.I.E.A.	T/B
4	6.3487	6.9645	6.3968
8	10.0545	11.6714	6.3463
12	8.9670	10.9276	8.9116

$$*** \text{ exactitud (error total) } = \sqrt{(C.V.)^2 + (\text{sesgo})^2}$$

El método de concentración contra T/B fue el que resultó con mayor exactitud, ya que presentó mayor precisión y menor sesgo, a excepción de la concentración de 4 ug/dl, que fue ligeramente mayor que la encontrada siguiendo el protocolo.

Al graficar concentración contra T/B, se encontró en las 30 series de T_n, que sólo en las series números 2, 8, 12 y 23, se obtuvo una linealidad para todos los puntos de la gráfica, con un índice de correlación de 1, 0.999, 1 y 0.999, respectivamente (un RIA "ideal"). En 20 series se observó una tendencia de aumentar la pendiente, aproximadamente, a partir de la concentración de 12 ug/dl con respecto a la recta. Esto corresponde, posiblemente a la presencia de unidores no específicos. Y, por último, en seis series se presentó disminución

VII.9.

de la pendiente con respecto a la recta, probablemente debida al deterioro de los reactivos.

En las series que presentaron aumento de la pendiente debido a la presencia de NSB, fue factible calcular la concentración de unidores no específicos en cada análisis. Por ejemplo, en la figura 24, se calculó la concentración de NSB y unidores específicos, en el punto B de la curva, donde el valor de la pendiente es:

$B = A_b + NSB = 2.25 \mu\text{g/dl}$. Se estimó la concentración de NSB, mediante la diferencia de la pendiente $A = A_b = 1.17 \mu\text{g/dl}$, que se debe al unidor de alta afinidad, donde: $B - A = 2.25 - 1.17 = 1.08 \mu\text{g/dl}$ de NSB. El porcentaje de la unión no específica es = $(1.08/2.25) \cdot 100 = 48\%$. Fue claro que la zona donde se presenta NSB corresponde a puntos que no fueron necesarios para definir algún estado tiroideo. El intervalo comprendido entre 4, 8 y 12 $\mu\text{g/dl}$ es en el cual se produce unión específica, y se representa por la parte más lineal de la gráfica.

B. Hormona estimulante tiroidea

Se tomaron las concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{IU/ml}$, como límites para diferenciar entre pacientes eutiroideos e hipotiroideos.

Los resultados de la tabla 11 presentan el promedio y la desvia-

VII.10.

ción estándar de 27 series que se analizaron a partir de tubos patrónes empleados como problemas.

TABLA 11. CONCENTRACION PROMEDIO DE TSH (humana)

$\mu\text{IU/ml}$	Protocolo		O.I.E.A.		T/B	
	\bar{X}	d.e.	\bar{X}	d.e.	\bar{X}	d.e.
5	5.07	0.72	5.33	0.96	4.91	0.41
10	9.64	0.62	9.64	0.78	9.68	0.72

La menor desviación que se observó a 5 $\mu\text{IU/ml}$ es para el método de concentración contra T/B (0.41). En la concentración de 10 $\mu\text{IU/ml}$ fue menor para el protocolo (0.62).

La precisión, el sesgo y la exactitud, fueron calculadas de la misma forma que se hizo para la tiroxina.

TABLA 12. PRECISION PROMEDIO DE TSH (humana)

$\mu\text{IU/ml}$	Protocolo.	O.I.E.A.	T/B
5	14.20	18.011	8.350
10	6.43	8.091	7.438

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

VII.11.

En la tabla 12 y en las figuras 28a, b y c se muestra que la precisión de los datos experimentales fue mejor en el método de concentración contra T/B (8.35), mientras que a la concentración de 5 μ IU/ml lo fue con el protocolo (6.43).

El sesgo promedio que se calculó para la TSH se presenta en la tabla 13 y figura 29.

TABLA 13. SESGO PROMEDIO DE TSH (humana)

μ IU/ml	Protocolo	O.I.E.A.	T/B
5	- 1.4	- 6.6	1.8
10	3.6	3.6	3.2

El sesgo fue menor con el método del protocolo (- 1.4) en la concentración de 5 μ IU/ml, en tanto que a la concentración de 10 μ IU/ml es un poco menor en el caso de T/B (3.2).

TABLA 14. EXACTITUD PROMEDIO DE TSH (humana)

μ IU/ml	Protocolo	O.I.E.A.	T/B
5	14.27	19.18	8.54
10	7.37	8.86	8.1

RECIBO DE
RECEPCION DE
LABORATORIO
CIENTIFICO
11-30
11-30

VII.12.

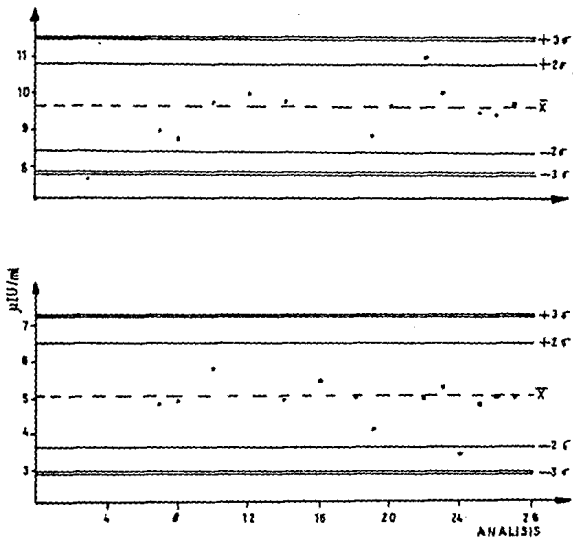


Figura 28a. Precisión de TSH (Protocolo)

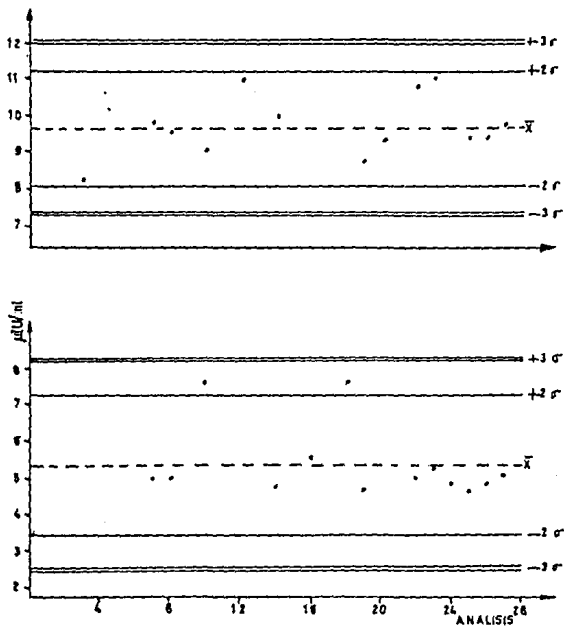


Figura 28b. Precisión de TSH (O.I.E.A.)

VII.14.

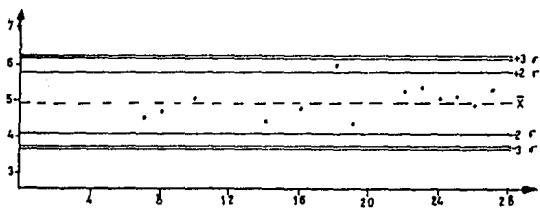
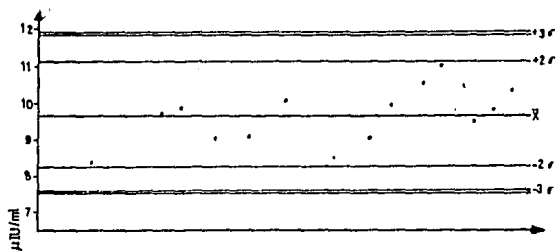


Figura 28c. Precisión de TSH (T/B)

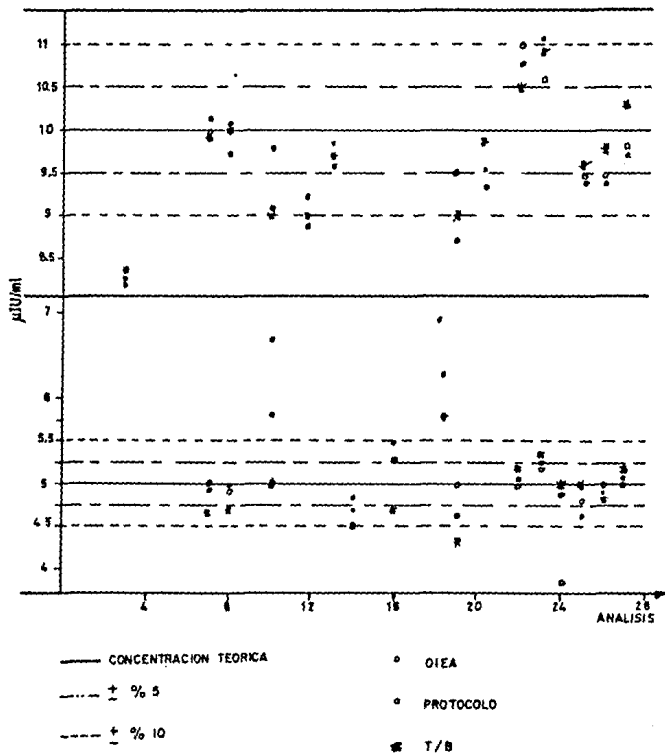


Figura 29. Sesgo de TSH

VII.16.

La exactitud (tabla 14) calculada en cada método es mejor en la relación de concentración contra T/B para 5 μ IU/ml (8.54), y la relación que indica el protocolo resultó mejor para la concentración de 10 μ IU/ml (7.37). Al comparar los errores para las dos concentraciones en cada uno de los métodos, se encontró que es mejor para la relación de concentración contra T/B (8.54 y 8.1).

De las 27 series de TSH, sólo cuatro series presentaron mayor pendiente con respecto a la recta, y en el resto de las series fue menor la pendiente al valor de la pendiente de la recta. El punto de 5 μ IU/ml queda comprendido en el intervalo de no desviación con respecto a la recta y en el punto de 10 μ IU/ml. Como ya se mencionó, prevalece la tendencia de disminuir la pendiente, debido al deterioro de los reactivos.

C. Discusión

1. El método de mayor exactitud para cuantificar tiroxina fue para la relación de concentración contra T/B, a excepción de la concentración de 4 μ g/dl. El segundo método fue el del protocolo, que sugiere el proveedor de los kits, y por último la relación que recomienda el OIEA.

2. La exactitud obtenida en las series de tirotropina es aproximadamente mejor para ambos patrones con la relación de concentración contra T/B, ya que no es mucha la diferencia del error que se presenta en 5 y en 10 $\mu\text{IU/ml}$; igualmente, para ambas concentraciones es doble el error (14.27) que se presenta en 5 $\mu\text{IU/ml}$ con respecto a 10 $\mu\text{IU/ml}$ (7.37). En último término quedó el método del OIEA, con un error mucho mayor (19.18) para la concentración de 5 $\mu\text{IU/ml}$ en comparación al error que se presentó para 10 $\mu\text{IU/ml}$ (8.86).

3. De modo adicional, se puede valorar la integridad de los reactivos con la relación de concentración contra T/B; por ejemplo, en tiroxina, se cuantificó la concentración de NSB. En el caso de las gráficas de tirotropina, se observó un sesgo debido a la descomposición de los reactivos, en particular del trazador. Este hecho quizás pueda atribuirse a la baja concentración e inestabilidad de la hormona. Las moléculas de TSH pueden también descomponerse durante el proceso químico de su marcación, al incorporarles átomos de yodo, el cual no es uno de sus elementos constitutivos.

VIII. CONCLUSIONES

Del estudio comparativo realizado con tres métodos para manejar los datos experimentales, se encontraron las siguientes ventajas y desventajas:

A. Concentración contra T/B

Las ventajas que presentó este método fueron:

1. Fue una manera simple de calcular, graficar e interpolar datos en forma rápida y sencilla.
2. No oscurece información, ni oculta errores.
3. No fue necesario disponer de sistemas de cálculo complejos, y está al alcance de cualquier laboratorio.
4. Contribuyó a la estimación de la presencia de unidores no específicos y a señalar cuándo éstos son excesivos.
5. Es un método que permitió reconocer la estabilidad de los reactivos.

VIII.2.

6. Fue casi constante la sensibilidad en la zona de interés clínico, tanto para la hormona tiroxina, como para la tirotropina.
7. Presentó menor sesgo e imprecisión; por consecuencia, mayor exactitud.

Desventajas halladas:

1. Sólo algunos análisis se ajustaron al RIA ideal en todos los puntos y el resto sólo parcialmente.

B. Protocolo

Se observaron las siguientes ventajas:

1. Facilidad para calcular, graficar e interpolar los datos.
2. No fue necesario utilizar sistemas de cálculo complejos.
3. La sensibilidad fue regularmente constante en el intervalo comprendido de 2, 4 y 8 $\mu\text{g/dl}$ para cuantificar tiroxina.

Las principales desventajas encontradas fueron:

...

VIII.3.

1. No fue constante la sensibilidad en la zona de interés clínico, en el caso de la hormona tirotrópica.
2. Sólo es válida la curva, para cada punto individual correcto, pero fue difícil reconocer cuando sucede esto.
3. No se pudo determinar, ni cuantificar la integridad de los reactivos.

C. Programa logístico de cuatro parámetros (O.I.E.A.)

De acuerdo a los resultados hallados no se pueden enumerar ventajas importantes, al compararlo con los métodos anteriores.

Las desventajas de este método fueron:

1. Presentó errores adicionales al experimental; por lo tanto, disminuyó su exactitud.
2. El manejo de los datos requirió de mayor tiempo.
3. Es necesario contar con sistemas de cálculo más complejos.

VIII.4.

4. Este método no está al alcance de todos los laboratorios.

D. El método que ofreció mayores ventajas y mejor exactitud, fue el que relaciona la concentración contra T/B; sin embargo, los tres métodos utilizados cumplieron con el objetivo del RIA, respecto a cuantificar la concentración del analito dentro de los límites de interés clínico. Dependiendo de la exactitud que se requiere y del equipo disponible, cada analista debe elegir el método más conveniente.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Apuntes del Curso para Formación de Capacitadores en Radioinmunoanálisis, patrocinado por el Organismo Internacional de Energía Atómica y la Organización Mundial de la Salud, México, 1984.
2. Ashkar F. S. (editor): Radiobioassays. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1983.
3. Billinghamurst, M. W., Fritzberg, A. R.: Chemistry for Nuclear Medicine. Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago, 1981.
4. Chase, G. D.: Some concepts of RIA theory, data reduction, and quality control. I. Basic approaches to data reduction. The Ligand Quarterly, 3:25 - 28, 1979.
5. Chase, G. D.: Some concepts of RIA theory, data reduction, and quality control. II. The "ideal" RIA. The Ligand Quarterly, 3:29 - 32, 1979.
6. Chase, G. D.: Taller sobre Manejo Avanzado de Datos de Radioinmunoanálisis. ININ, México, 1984.

IX.2.

7. Dharan, M.: Total Quality Control in the Clinical Laboratory. The C. V. Mosby Company, Saint Louis, 1977.
8. Dudley, A. R., Figdor, H. C., Keroe, E. A., Morris, A. C., Mutz, O. J.: Well scintillation counter with automatic sample changing and data processing. IAEA - SM - 220/121. Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine (Proc. Symp. Berlin, 1977). IAEA, Vienna, 1978.
9. Dudley, A. R.: Radioimmunoassay (RIA) data processing on programmable calculators: An IAEA project. IAEA - SM 259/88. Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine (Proc. Symp. Vienna, 1982). IAEA, Vienna, 1982.
10. Faires, R. A. y Parks, B. H.: Radioisótopos. Técnicas de laboratorio. Editorial Universitaria de Buenos Aires, 1983.
11. Federal Register, Part II. 10 CFR Parts 19 et al. Standards for Protection Against Radiation. U. S. Nuclear Regulatory Commission. Washington, D. C., 1986.
12. Gamma Coat, I - 125 T₄. Clinical Assays. Division of Travenol Laboratories, Inc. Cat. No. CA - 535, 555. Cambridge, Massachu

- setts, 1983.
13. Gamma Dab H. S., I-125 hTSH. Clinical Assays. Division of Travenol Laboratories, Inc. Cat. No. CA - 1573. Cambridge, Massachusetts, 1983.
 14. Gamma Dab, I-125 hTSH. Clinical Assays. Division of Travenol Laboratories, Inc. Cat. No. CA - 591. Cambridge, Massachusetts, 1984.
 15. Haven, M. C., Orsulak, P. J., Cronin M., Kelly K.: Selection of data reduction methods for the NML, TSH, IRMA. Journal of Clinical Immunoassay, 9:31, 1986.
 16. Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.: Curso de Seguridad Radiológica en Medicina Nuclear. ININ, México, 1985.
 17. Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.: Curso de Seguridad Radiológica en Investigación. ININ, México, 1986.
 18. International Commission on Radiological Protection.: Report of Committee Four on Evaluation of Radiation Doses to Body Tissues from Internal Contamination due to Occupational Exposure.

IX.4.

ICRP Publication 10 (1968) and Publication 10A (1971).

19. Lehman, P. F.: Las hormonas tiroideas. Ciencia (Méx.), 33: 145 - 153, 1982.
20. Libertum, C.: Radioinmunoanálisis, fundamentos y aplicaciones. Editores S. R. L, Buenos Aires, 1980.
21. Maciel, R. J.: Standard Curve Fitting in Immunodiagnosics: A Primer. Journal of Clinical Immunoassay, 8:98 - 106, 1985.
22. Organismo Internacional de Energía Atómica.: Manipulación sin riesgos de los radionúclidos. Colección Seguridad No. 1, OIEA, Viena, 1973.
23. Praither, J. A.: Basic Principles of Radioimmunoassay Testing: A Simple Approach. Journal of Nuclear Medicine Technology, 13:34 - 43, 1985.
24. Programs for data processing in radioimmunoassay using the HP-41C programmable calculator. On - line analysis of counting data from standards and unknowns. International Atomic Energy Agency, TECDOC - 252 and Supplement, Vienna, 1981.

IX.5.

25. Quality Control of Nuclear Medicine Instruments. International Atomic Energy Agency, TECDOC - 317, Vienna, 1984.
26. Travis, J. C.: Clinical Radioimmunoassay. State of the Art. Scientific Newsletters, Inc., Anaheim, California, 1980.
27. Walker, F. W., Miller, D. G., Feiner, F.: Chart of the Nuclides. General Electric Company, San Jose, California, thirteen edition, 1983.
28. Win, C. M.: The Merck Index. Merck & Co. Inc. Rahway, N. J., tenth edition, 1983.
29. Yalow, R. S., Berson, S. A.: Assay of plasma insulin in human subjects by immunologic methods. Nature (London). 184: 1648, 1959.