



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

## AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE TIROGLOBULINA HUMANA

T E S I S

Que para obtener el título de:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a :  
RAFAEL MORA BERMUDEZ



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Tesis 1977

DO ~~XXXXXXXXXX~~

ECHA \_\_\_\_\_

RBC \_\_\_\_\_

S \_\_\_\_\_

283



QUIMICA

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE	Q.F.B. MAGDALENA ACOSTA SEGURA
VOCAL	DR. SALVADOR MARTIN SOSA
SECRETARIO	DRA. BEATRIZ MEDINA DE THIELE
1er SUPLENTE	DRA. VICTORIA VALLES SANCHEZ DE BOURGES
2ndo. SUPLENTE	Q.F.B. Ma. DOLORES LASTRA A.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

CLINICA DE TIROIDES

INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION

SUSTENTANTE: RAFAEL MORA BERMUDEZ.

ASESOR DEL TEMA: DRA. BEATRIZ MEDINA DE THIELE

ASESOR TECNICO: DR. CARLOS VALVERDE-RODRIGUEZ

**A MIS PADRES : RODOLFO Y MARIA DE LA CRUZ .**

**..... GRACIAS .**

**A IRMA : COMPAÑERA, AMIGA , ESPOSA Y FUTURA MADRE .**

**.....A NUESTRO HIJO.....**

**A MIS HERMANOS Y HERMANAS.**

**A MIS AMIGOS DE SIEMPRE .**

**..... GRACIAS.**

AL DOCTOR CARLOS M. VALVERDE RODRIGUEZ , SUPERVISOR DE ESTA  
TESIS , POR SU EMPENO , POR SU TRABAJO , POR SUS EXPERIENCIAS,  
POR SU TOLERANCIA , PERO SOBRE TODO, POR SU INVALUABLE AMISTAD,  
..... GRACIAS.

MI MAS SINCERO AGRADECIMIENTO A LA DOCTORA BEATRIZ MEDINA DE  
THIELE , DIRECTORA DE ESTE TRABAJO , POR SU PACIENCIA Y ENSEÑAN  
ZAS .

AL MAESTRO GUILLERMO BARRAZA ORTEGA , QUIEN ME MOSTRO EL  
HERMOSO MUNDO DE LA QUIMICA , Y DE QUIEN GUARDO SUS CONSEJOS  
EN MI ADOLESCENCIA , PROCURANDO PRACTICARLOS EN EL PRESENTE.

AGRADEZCO AL DOCTOR JORGE A. MAISTERRENA ,  
TODA LA AYUDA, COMPRENSION Y TOLERANCIA  
QUE ME HA BRINDADO , PARA LA REALIZACION  
DE MI VIDA PROFESIONAL.

GRACIAS AL INSTITUTO NACIONAL DE NUTRICION ,  
A TODAS SUS GENTES , GRACIAS .

## INTRODUCCION

Se puede decir, en forma general, que los resultados de cualquier trabajo de investigación, así como de las técnicas rutinarias en Bioquímica y las - Ciencias Biomédicas, dependen fundamentalmente de un profundo conocimiento de las propiedades y pureza de los reactivos químicos y biológicos que se utilizan.

Generalmente, las casas comerciales ofrecen para facilitar este tipo de trabajos, productos químicos y biológicos, de características y pureza determinadas y señaladas en dichos productos, que son respaldadas por la firma comercial de tales empresas. Sin embargo, el trabajo de investigación y de las determinaciones clínicas en Bioquímica y ciencias relacionadas, resultan en nuestro país de un costo bastante elevado, puesto que los reactivos y aparatos utilizados generalmente son objeto de importación. Es importante señalar, que en nuestro país existe una gran cantidad de materias primas, tanto para la manufacturación de productos químicos como para la obtención de productos biológicos. También es importante señalar que en muchos casos no contamos con la tecnología necesaria para obtenerlos, y en otros, aunque se posee la materia prima y la tecnología necesaria, estos trabajos no se realizan por la falta de iniciativa, que en algunos casos, caracteriza a nuestro medio.

3

El ensayo radioinmune cae dentro del segundo grupo señalado previamente. Este método de medición de substancias ha probado ser de gran utilidad en endocrinología clínica y básica, así como en Bioquímica y otras ciencias relacionadas, pues ofrece características excepcionales de especificidad y sensibilidad. Sin embargo, la realización de esta técnica es generalmente de costo elevado.

En el Laboratorio de la Clínica de Tiroides del Instituto Nacional de la Nutrición, se ha realizado - desde 1972 la determinación rutinaria por radioinmunoanálisis de las hormonas tiroideas  $T_3$  y  $T_4$ , por una metodología desarrollada y estandarizada por el personal del propio laboratorio, quien obtuvo el reactivo principal de dicha técnica, el suero inmune contra estas hormonas, inoculando homogeneizados de tiroides humanas en conejos. De esta manera, se ha logrado durante éste período, disminuir los costos grandemente, lo que permite realizar el análisis en grandes poblaciones, sin que signifique un costo excesivo al Instituto.

Esta tesis forma parte de un proyecto de producción de dichos anticuerpos, tratando de estudiar los fenómenos biológicos, bioquímicos, e inmunológicos que intervienen en su obtención.

Como primer paso, y en base a las investigaciones recientes sobre este tema, se decidió obtener tiroglobulina humana pura, para utilizarla como soporte para haptenos, como reactivo en técnicas de hemaglutinación pasiva y para el desarrollo de otros métodos, principalmente inmunológicos, de diagnóstico clínico en patología tiroidea de etiología autoinmune.

Por lo tanto, este trabajo se encaminó a la obtención de tiroglobulina humana que se pudiera considerar inmunológicamente pura. La preparación de los haptenos fué desarrollada por mi compañero Albert Zlotnik, con excelentes resultados, que fueron el objeto de su tesis profesional, y quien actualmente está encaminado en la obtención de los sueros inmunes a las hormonas tiroideas.

## INDICE.

1.	Tiroglobulina	
1.1.	Definición y localización.	1
1.2.	Características y propiedades fisicoquímicas	3
1.3.	Composición química	5
1.4.	Estabilidad y estructura	6
1.5.	Metabolismo	9
1.6.	Propiedades inmunológicas	13
1.7.	Procedimientos generales de aislamiento y purificación	18
2.	Materiales y Métodos.	21
2.1.	Material Biológico	21
2.2.	Reactivos	21
2.3.	Establecimiento de las condiciones de trabajo	21
2.4.	Aislamiento	22
2.5.	Precipitación salina fraccionada	23
2.6.	Cromatografía por exclusión molecular	25
2.7.	Identificación, pureza y rendimiento	30
3.	Resultados y Discusión	33
3.1.	Aislamiento	33
3.2.	Precipitación salina fraccionada	33
3.3.	Identificación y pureza de la tiroglobulina	35
3.4.	Cromatografía por exclusión molecular	37
3.5.	Almacenamiento y conservación de la tiroglobulina	40
3.6.	Resumen	42
4.	Conclusión	45
5.	Apéndice	46
6.	Bibliografía	56

## 1. TIROGLOBULINA

### 1.1. Definición y Localización.

La tiroglobulina (Tgb), es una glucoproteína yodada característica del tejido glandular tiroideo o de su equivalente, en prácticamente todas las especies de vertebrados estudiados a la fecha. La glándula tiroidea es, en los vertebrados superiores, uno de los órganos endócrinos más grandes con un peso aproximado de 20g. En su forma normal está constituida por dos lóbulos con dimensiones de: 2 a 2.5 cm. de espesor y altura, y 4 cm. de longitud. Ambos lóbulos se encuentran conectados por una banda de tejido tiroideo llamada istmo. La glándula está fuertemente unida a las porciones anterior y lateral de la tráquea por medio de tejido conectivo, quedando el istmo situado exactamente por abajo del cartílago cricoides (41). La tiroidea está revestida por una cápsula o capa fibrosa y delgada, que la penetra formando pseudolóbulos irregulares. Al observar cortes de tejido tiroideo en el microscopio óptico se aprecia que los pseudolóbulos están compuestos de células compactamente unidas formando acinis o folículos. Estos folículos tienen un diámetro promedio de 200 micras, y su interior está lleno con un coloide de naturaleza proteínica, que normalmente es el mayor componente de la masa tiroidea total.

Inicialmente se pensó que el coloide tiroideo estaba constituido por una proteína homogénea a la cual se denominó tiroglobulina. (6, 24) Posteriormente, los estudios realizados por Derrien y cols, (6, 7), sobre las propiedades de

solubilidad y contenido porcentual de yodo de tiroglobulinas de diferentes especies de mamíferos (buey, caballo, perro y cerdo), demostraron la existencia en el coloide tiroideo, de proteínas con diferente solubilidad que la Tgb, siendo esta última la de mayor proporción (80%). Así mismo, demostraron la variación del contenido de yodo en tiroglobulinas de animales de la misma especie y aún en tiroglobulinas del mismo individuo. Posteriormente, el mismo grupo (7), determinó el peso molecular de 653 000 daltons para la Tgb, así como un coeficiente de sedimentación de 19 - Svedbergs (19 S).

La constitución del coloide tiroideo fué estudiada por Shulman y Witebsky (30), ultracentrifugando extractos de tiroides de cerdo. Por este método detectaron cinco componentes; uno, la Tgb de 19 S definida por Derrien, en proporción de 80%, otro de 27 S en proporción de 7%, que por sus propiedades parece corresponder a un dímero de la Tgb y ha recibido el nombre de yodoproteína tiroidea de 27 S (24, 30, 42), y finalmente, tres componentes más lentos de 11.3 S (1%), 6.5 S (2%), y 4.2S (11%) respectivamente.

Estudios realizados in vivo e in vitro, de la incorporación de  $^{131}\text{I}$  a la tiroglobulina, utilizando cultivos histológicos de la glándula (22, 24), demostraron que además de la Tgb, existen en el coloide tiroideo dos clases más de yodoproteínas. Una de ellas, insoluble en disolventes acuosos y asociada con partículas subcelulares. La otra, más soluble en soluciones de sales neutras que la Tgb, se denominó tiralbúmina. (24, 42).

Sobre estas bases, el término tiroglobulina se aplica actualmente, a un grupo heterogéneo de glucoproteínas yodadas, solubles en disolventes acuosos, localizadas extracelularmente y en el coloide de los folículos tiroideos, de peso molecular de 660 000 Daltons, coeficiente de sedimentación de 19 S y diferente grado de yodación (6, 8, 24, 30, 42).

### 1.2. Características y Propiedades Físicoquímicas.

La tiroglobulina, presenta en forma general las siguientes propiedades físicoquímicas:

1. Coeficiente de sedimentación de 19 Svedbergs.
2. Peso molecular de aproximadamente 660 000 Daltons.
3. Intervalo definido de insolubilidad tanto en soluciones de sulfato de amonio al 38-42% de saturación, como en mezcla equimolecular de fosfatos mono y dipotásicos del 43 al 48% de saturación.
4. Movilidad electroforética (en amortiguador de veronal a pH 8.6) de  $-5 \times 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/Volt/seg.
5. Punto isoeléctrico (pI) de 4.58.

Estas características son prácticamente independientes del grado de yodación del esqueleto polipeptídico de la Tgb (6, 7, 8).

El coeficiente de sedimentación de la Tgb fué inicialmente deteru

minado por Derrien (7), y posteriormente por Edelhoeh (8). La Tgb humana (37), - así como las de diferentes especies de mamíferos presentan un valor promedio de 19S, excepto la de oveja que tiene un valor de 20.15, la de cerdo con un valor de 18.65, y la de ballena que presenta un valor de 18.25 S. (42).

La determinación del peso molecular fué reportada por Derrien y cols. en 1949, quienes por medio de estudios de ultracentrifugación, y datos hidrodinámicos, obtuvieron por medio de la ecuación de Svedberg, un peso molecular de 653 000 Daltons. (7). Posteriormente Edelhoeh (8), obtuvo un valor de 660 000 D.

La solubilidad de la Tgb en soluciones de sales neutras como sulfato de amonio y mezcla equimolecular de fosfatos mono y dipotásicos, fué estudiada por Derrien en 1948 (6). Sin embargo, en los intervalos de saturación señalados, precipitan también la yodoproteína tiroidea de 27S, y otra proteína relacionada con la Tgb y de coeficiente de sedimentación de 12 S (30).

Es importante observar que por sus características fisicoquímicas e inmunológicas, la proteína tiroidea de 27 S parece corresponder a un dímero de la tiroglobulina (24, 30, 42), y que el componente de 12 S, como se demostró por investigaciones posteriores corresponde a una subunidad de la Tgb. (37, 38).

Por lo anterior se puede considerar que esta propiedad de precipitación en estos medios, es una característica distintiva de la Tgb de 19 S o sea, de la tiroglobulina nativa.

La movilidad electroforética y el punto isoeléctrico de la tiroglobulina, fueron medidas por Heidelberg y Pedersen ( 15 ), en las condiciones anteriormente mencionadas, obteniendo por extrapolación de los datos de movilidad electroforética en varios pH, el punto isoeléctrico de la Tgb.

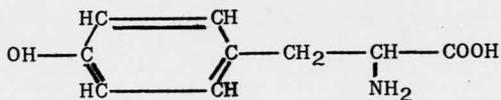
### 1.3 Composición Química.

La tiroglobulina es una glucoproteína, con la particularidad de contener en su estructura aminoácidos yodados, la yodotirosina y la yodotironina cuya estructura se muestra en la Fig. (1): En la tabla 1 se muestra la composición de aminoácidos de la Tgb humana, así como de la Tgb de cerdo, oveja y ternera, según el análisis realizado por Spiro. ( 42 ).

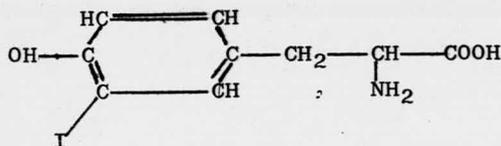
La molécula de la proteína de un promedio de 6 200 aminoácidos, contiene aproximadamente 110 residuos de tirosina, de los cuales 25 ó 6 menos se encuentran normalmente yodados. De éstos, 10 se encuentran en la forma de monoyodotirosina (MIT), 10 ó 12 en la forma de diyodotirosina (DIT), de 0 a 1 como triyodotironina (T3) y, finalmente de 4 a 5 en la forma de tiroxina (T4), (24, 42).

La proteína contiene también cerca de 200 residuos de cisteína, la mayoría formando puentes disulfuro entre las cadenas polipeptídicas, encontrándose grupos - SH libres en moléculas de Tgb con bajo contenido de yodo. (12).

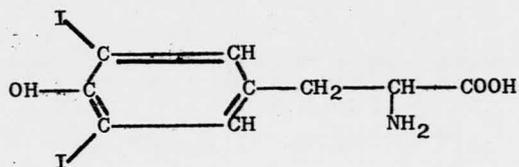
Las investigaciones realizadas sobre la estructura primaria de la Tgb se han visto obstaculizadas por el gran tamaño de la molécula. Sin embargo, -



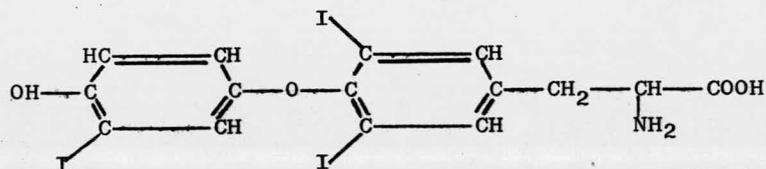
Tirosina



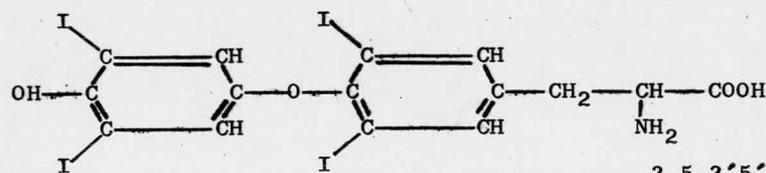
3-Monoyodotirosina  
(MIT)



3,5-Diyodotirosina  
(DIT)



3,5,3'-Triyodotirosina  
 $T_3$



3,5,3',5'-Tetrayodotirosina  
(Tiroxina;  $T_4$ )

Fig.1. Estructura de la tirosina y sus aminoácidos derivados yodados presentes en la Tiroglobulina.

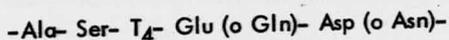
Moles de aminoácidos por mol de tiroglobulina.

<u>Residuo</u>	<u>Humana</u>	<u>Porcina</u>	<u>Ovina</u>	<u>Bovina</u>
Lisina	195	155	164	177
Histidina	80	77	66	76
Arginina	275	371	326	345
Acido aspártico	400	368	385	401
Treonina	283	289	270	266
Serina	484	482	494	502
Acido glutámico	697	673	660	697
Prolina	347	412	365	392
Glicina	394	425	417	422
Alanina	383	498	456	474
Medio-cisteína	244	233	284	248
Valina	310	327	329	338
Metionina	62	54	72	56
Isoleucina	155	131	136	155
Leucina	476	541	489	506
Tirosina	110	101	118	115
Fenilalanina	259	251	257	269
Triptofano	117	101	112	109

Tabla 1.- Composición de aminoácidos de las tiroglobulinas de cuatro especies de mamíferos. (Datos originales de Ui Nobuo, en Handbook of Physiology ref. 42)

estos estudios han dado como resultado la identificación de una secuencia de aminoácidos que parece ser necesaria para la formación de la tiroxina. ( 42 ).

Tal secuencia corresponde a la siguiente:



La Tgb humana contiene además cinco clases de carbohidratos, (24, 33, 42) galactosa, manosa, N-acetilglucosamina, ácido siálico y fucosa, en proporciones de 50, 130, 127, 23 y 21 residuos respectivamente por molécula de Tgb, y que constituyen el 10% de la molécula total. Estos residuos se encuentran agrupados en dos tipos de polisacáridos. Uno de constitución simple, (9 residuos de manosa y 2 de glucosamina), unido a la protefna en la forma de glucopéptido, y el otro, de constitución más compleja conteniendo los cinco carbohidratos, y que parece estar unido por lo menos en dos sitios diferentes en la molécula de Tgb. Unicamente se ha informado variabilidad en la composición de la Tgb, en el contenido de ácido siálico, que está en proporción directa a la yodación de la protefna (11, 33, 42).

#### 1.4. Estabilidad y Estructura.

La heterogeneidad de la tiroglobulina fué propuesta inicialmente con base a los hallazgos de variabilidad en el contenido de yodo de la protefna, el cual oscila entre el 0.07% y el 0.80% (6, 8, 24, 42).

Esta variabilidad en el contenido de yodo, no afecta las propiedades electroforéticas, de sedimentación y de solubilidad de la Tgb, ( 37 ).

La existencia de Tgb de diferente grado de yodación en extractos de una misma glándula se confirmó utilizando la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa (25, 42). Este procedimiento, que ha sido empleado por varios investigadores, ha revelado diferentes números de fracciones según el método de elución utilizado. Sin embargo, existe el concepto general de que las fracciones eluidas en fuerzas iónicas más altas contienen mayor contenido de yodo por molécula, como también una mayor proporción de diyodotirosina, tiroxina y ácido siálico (25).

La tiroglobulina es estable en soluciones de sales que oscilen dentro del intervalo de pH de 5 a 12. En medios de pH entre 4 y 5, la proteína sufre desnaturalización irreversible, y a pH de 12 se disocia en dos subunidades cada una de peso molecular de 330 000 D y coeficiente de sedimentación de 12 S (8). A un pH mayor de 12, se disocia en subunidades de coeficiente de sedimentación de 3 y 8 S. Esta disociación en las subunidades de 12 S ocurre también en medios de baja fuerza iónica, (42) así como también en medios conteniendo dodecilsulfato de sodio a concentración de 1 mM., y en urea 2 M. (9). Este desdoblamiento tiene lugar también a temperaturas mayores de 40°C. (42).

Valeta, Roques y Torresani realizaron en 1968 (37), un estudio sobre la dependencia de las propiedades fisicoquímicas de la Tgb del grado de yodación de la misma. Estos autores utilizaron tiroglobulinas con diferentes grados de yodación: tiroglobulina altamente yodada (contenido porcentual de yodo mayor de -

0.6), obtenida por cromatografía en DEAE-celulosa, tiroglobulina normalmente yodada, (% de I de 0.2 a 0.5), y tiroglobulina de bajo contenido de yodo, (% de I aproximado a 0.006), las dos primeras procedentes de glándulas tiroideas normales, y la última de carcinomas tiroideos y bocios.

Estos mismos investigadores determinaron la dependencia de la disociación, es decir la estabilidad de la Tgb con respecto al grado de yodación de la misma, por reducción de la fuerza iónica de soluciones de Tgb, alcalinización de estas soluciones, y utilizando dodecilsulfato de sodio (SDS) como agente disociante. Además analizaron la composición de aminoácidos, la antigenicidad y las propiedades de sedimentación de las proteínas. Sus resultados indicaron que las tiroglobulinas altamente yodadas son más resistentes a la acción de los agentes disociantes, que las tiroglobulinas con un contenido de yodo menor, y que la composición de aminoácidos, así como la antigenicidad y el coeficiente de sedimentación de unas y de otras son independientes del grado de yodación.

La dependencia de la estabilidad con respecto al grado de yodación de la Tgb, se ha explicado de la siguiente manera por Robbins y Edelhoch (10, 11, - 25). Ambos proponen que la estabilidad de la Tgb depende de la ionización del grupo fenólico de los residuos tirosilo de la molécula. La tirosina tiene un pK de 10, la monoyodotirosina de 8.2, y la diyodotirosina de 6.5; ésto ocasiona que en el intervalo de pH comprendido entre los límites de 6.0 a 10.5, las cantidades relativas de tirosina, monoyodotirosina y diyodotirosina, que como se vió dependen del grado de

yodación de la molécula, determinen la carga neta de la proteína, proporcionando así variaciones en la forma molecular y estabilidad de la misma.

### 1.5. Metabolismo.

En el metabolismo de la tiroglobulina se han identificado cuatro fases distintas, tres que integran la biosíntesis de la proteína, y una fase degradativa - que conduce a la formación de la hormona fisiológicamente activa, (tiroxinogénesis). Las fases biosintéticas son: 1) Síntesis y ensamble de las cadenas polipeptídicas, 2) Glicosilación, y 3) Yodación y maduración de la molécula (41, 42).

Síntesis de las cadenas polipeptídicas.

La Tgb se sintetiza por medio de polipéptidos precursores, o subunidades estructurales, existiendo controversia sobre el número y tamaño de estos precursores. (8, 19, 37, 38).

Mediante estudios de incorporación de aminoácidos marcados radiactivamente, se ha identificado la aparición temprana de subunidades de coeficientes - de sedimentación de 3 a 8 S y de 12 S, inmunológicamente relacionadas a la tiroglobulina. De estos estudios se propuso que la Tgb de 19 S es el producto de la unión de dos subunidades con coeficiente de sedimentación de 12 S, las cuales a su vez están integradas por un número desconocido de protómeros de coeficiente de sedimentación de 3 a 8 S, (8, 29, 42).

Por otra parte, los estudios hechos por Vassart y col. ( 38 ), sobre la traducción de un ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de 335 aislado de la glándula tiroides, y que contiene toda la información requerida para la síntesis de la Tgb de 19 S, sugieren que la proteína está constituida por dos subunidades de 12 S cada una, con un peso molecular de 330 000 daltons. También propone Vassart (38), que estas subunidades se sintetizan individualmente y no por la unión de protómeros más pequeños, y que además, su estructura primaria puede ser diferente.

El producto de esta síntesis, que se efectúa en los polisomas unidos a la membrana de las células foliculares; es una proteína no yodada, que viaja a través del retículo endoplásmico y el aparato de Golgy, en donde es glicosilada. En esta forma pasa por las vesículas apicales de las células foliculares, donde aparentemente ocurre la yodación, y finalmente, pasa a formar parte del coloide tiroideo. - (24, 42).

### Glicosilación.

La incorporación de los carbohidratos (glicosilación) a la proteína ocurre posterior e independientemente de la síntesis del esqueleto polipeptídico, como se ha demostrado inhibiendo la síntesis de proteínas con puromicina ( 34 ).

Este proceso se realiza por la incorporación de los carbohidratos a las unidades crecientes de los mismos en el esqueleto polipeptídico. Se ha demostrado que la glicosilación ocurre antes de la yodación de la proteína, ya que este último -

proceso, al inhibirse con propiltiouracilo, no afecta la incorporación de los azúcares. (14).

Como se mencionó anteriormente, la glicosilación de la molécula de Tgb se inicia en el retículo endoplásmico, continuando al migrar la proteína hacia el aparato de Golgi en donde finaliza el proceso. Para ello, el esqueleto proteínico - de la Tgb, es el aceptor macromolecular de los azúcares activados por sus nucleótidos derivativos, en un proceso de transferencia enzimática.

Entre las enzimas que intervienen en este proceso, se han logrado - identificar una sialiltransferasa, una galactosiltransferasa y una N-acetilhexosaminiltransferasa. (33, 34, 35).

#### Yodación y maduración.

La yodación de la Tgb, como se ha mencionado anteriormente, ocurre posteriormente a la síntesis proteica y a la glicosilación de la Tgb. El producto de la yodación, es una variedad de moléculas de Tgb que difieren en el contenido de yodo, y este proceso depende del estado fisiológico de la glándula, y del estado nutricional del organismo.

Como mecanismo bioquímico para la yodación de los residuos tirosilo de la Tgb, se postula la oxidación de yodo, (en forma de ión yoduro asimilado por la glándula, a un ión positivo ( $I^+$ ), capaz de yodar a la tirosina. (43).

La reacción requiere de la participación de un agente oxidante, el

peróxido de hidrógeno formado metabólicamente en la glándula, y como agente catalítico la enzima peroxidasa. (24, 42, 43).

El sitio de la yodación parece ser la periferia del lumen del folículo, en donde por métodos autorradiográficos se han identificado microvellosidades - (vesículas apicales) de la célula folicular. (42).

El proceso de la yodación continúa hasta un punto aún no determinado en el que la proteína adquiere un grado de yodación óptimo desde el punto de vista fisiológico, tal vez limitado por la estructura misma de la Tgb. Este proceso es conocido como maduración de la tiroglobulina.

#### Tiroxinogénesis.

La última fase del metabolismo de la tiroglobulina, es la formación de las hormonas fisiológicamente activas. El mecanismo por el cual estas hormonas - llegan a la circulación sanguínea, en donde son transportadas a los órganos blanco, parece ser el siguiente: 1. La tiroglobulina almacenada en el coloide, es recapturada por las células tiroideas mediante un proceso de endocitosis.

2. Posteriormente ocurre una migración de lisosomas conteniendo enzimas proteolíticas, del área basal de las células, hacia la Tgb recapturada.

3. Después, los lisosomas se unen a las inclusiones de Tgb, continuando la migración hacia la membrana celular basal.

4. Durante esta migración ocurre la degradación de la Tgb, y el producto (tiroyodotironina, tiroxina, aminoácidos y péptidos), se libera en los vasos linfáticos que rodean al folículo. (41, 42, 43).

#### Importancia fisiológica de la tiroglobulina.

La tiroglobulina tiene una gran importancia fisiológica en el metabolismo de los mamíferos, ya que sirve de almacén de las hormonas tiroideas, y además es sustrato en la síntesis de las mismas. La estructura de la tiroglobulina es necesaria para la formación de las hormonas, ya que como se vio anteriormente, es necesaria una estructura primaria definida para que ocurra la síntesis.

En estudios realizados sobre la susceptibilidad de yodación de los residuos tiroxilo de la Tgb, comparándolos con la susceptibilidad de yodación de los aminoácidos libres, se demostró que es más fácil yodar los aminoácidos integrados a la estructura de la proteína, que en su forma libre. (24, 39, 43).

#### 1.6 Propiedades Inmunológicas.

Inmunológicamente la tiroglobulina es un autoantígeno órgano-específico. Es decir, es una molécula antigénica localizada en un solo órgano, capaz de inducir el desarrollo de una reacción inmune contra ella por el mismo organismo del cual es constituyente. ( 32 ).

Los estudios inmunológicos sobre la Tgb se inician en 1911, cuando

Papazolu ( 20 ) informa del hallazgo de anticuerpos fijadores del complemento, que reaccionan con extractos de tiroides humanas, en el suero de algunos pacientes hiper tiroideos.

Hektoen y cols. informan en una serie de artículos de 1923 a 1927, de los estudios realizados por ellos sobre la producción de heteroanticuerpos contra las tiroglobulinas de varias especies de mamíferos (humana, porcina, ovina y bovina) ( 16 ).

Los anticuerpos contra estas proteínas fueron inducidos en conejo y, aunque demostraron ser órgano-específicos, no poseían una especificidad de especie absoluta, es decir, que los anticuerpos inducidos contra la Tgb de una de las especies estudiadas, reaccionaba en forma cruzada con las tiroglobulinas de las otras especies. Posteriormente, Adant y Spehl ( 2 ), demostraron diferencias cuantitativas en la reactividad cruzada entre los anticuerpos de los conejos, y las tiroglobulinas de las cuatro especies, confirmando así, que las tiroglobulinas de estos mamíferos no son idénticas inmunológicamente.

Rose y Witebsky ( 27 ), demostraron la órgano-especificidad y la autoantigenicidad de la tiroglobulina, al producir anticuerpos homólogos y autoanticuerpos a esta proteína en conejos. Estos autores observaron, que al inocular tiroglobulina heteróloga en conejos, utilizando el adyuvante de Freund completo, ocurrían cambios histológicos en las tiroides de los animales inoculados. Señalaron además, la similitud de estos cambios histológicos (infiltración linfocitaria extensa de la glándu-

la, atrofia y destrucción folicular), con las lesiones observadas en la tiroides de pacientes con tiroiditis crónica (Enfermedad de Hashimoto).

En base a esta observación, Witebsky examinó el suero de pacientes con tiroiditis crónica, demostrando la existencia de anticuerpos contra extractos tiroides humanos, por medio de una técnica de hemaglutinación pasiva.

A partir de la observación anterior, se han realizado numerosos estudios sobre la autoinmunidad tiroidea. La mayoría de estos estudios han sido efectuados en relación con los anticuerpos contra tiroides. Así, se demostró que estos anticuerpos pertenecen a las inmunoglobulinas IgG e IgM principalmente (42). Por otra parte, aunque se ha observado una frecuencia alta de reacciones cutáneas del tipo de hipersensibilidad tardía en conejos y cuyos con tiroiditis autoinmune experimental, casi no se han realizado estudios sobre este tipo de reacción inmune.

Aparte de la tiroglobulina, encontramos en la glándula tiroides otros tres antígenos, estos son: un antígeno coloidal diferente de la tiroglobulina, un antígeno localizado en los microsomas de la glándula, y un antígeno nuclear.

Como resultado del estudio de las propiedades inmunológicas de la tiroglobulina, así como de observaciones clínicas, se ha postulado la intervención de procesos autoinmunes en varias condiciones patológicas de la glándula.

Los fenómenos inmunológicos que participan en la autoinmunidad tiroidea se han estudiado ampliamente. (24, 27, 28, 40). En algunas especies se ha

detectado una mayor participación de la inmunidad de tipo humoral, como en el conejo. En algunas otras especies, (por ejemplo cuyos) la respuesta inmunológica es principalmente de tipo celular, y en algunas especies, ambos tipos de respuesta participan. ( 40 ).

Contrariamente a lo que se suponía, en la mayoría de las especies estudiadas, se observó que la tiroglobulina no se encuentra totalmente aislada del sistema sanguíneo (4, 21, 26), postulándose la existencia de un estado de tolerancia inmunológica a esta proteína, a concentraciones séricas bajas. ( 40 ).

Por métodos experimentales se ha demostrado que la tolerancia a la tiroglobulina se encuentra principalmente a nivel de linfocitos timodependientes (linfocitos T), en conejos, ratones y cuyos, y que para que se produzca una respuesta inmune de tipo humoral a tiroglobulinas homólogas o heterólogas, se requiere de la colaboración entre los linfocitos T y los linfocitos B. Después de tal colaboración, los linfocitos B se diferencian y producen los anticuerpos antitiroglobulina. (3, 40).

En lo que respecta a las lesiones tisulares sufridas por la tiroides en el transcurso del proceso de autoinmunidad, no se ha encontrado una correlación entre la intensidad de éstas, y el nivel de anticuerpos circulantes. (25), aunque se ha informado de la participación de un depósito de complejos antígeno-anticuerpo en el daño a la glándula. ( 40 ).

Además de la enfermedad de Hashimoto (tiroiditis crónica), se han -

encontrado anticuerpos antitiroglobulina circulantes en otras enfermedades tiroideas, así como también en sujetos normales. ( 26 ).

La determinación clínica de los anticuerpos antitiroglobulina se ha realizado por las técnicas de la precipitina, hemaglutinación pasiva, fijación de complemento, y radioinmunoanálisis (1, 21, 24, 26). Por estas técnicas se han demostrado títulos altos en el suero de enfermos de tiroiditis crónica o enfermedad de Hashimoto, así como en bocio tóxico difuso o enfermedad de Graves. Se obtienen pruebas positivas, aunque a títulos menores, en sueros de pacientes hipotiroideos (como en mixedema primario), y otras enfermedades tiroideas. (1, 21).

En la siguiente tabla se muestra el porcentaje de pruebas positivas - obtenidas, al realizar las pruebas inmunológicas en el suero de pacientes con enfermedades tiroideas variadas. (21, 24, 26).

Enfermedad	Precipitina	H.P.*	F.C.**	RIA***
Tiroiditis crónica (Hashimoto)	67%	90%	95%	100%
Hipertiroidismo (en enf. de Graves)	1%	55%	38%	85%
Hipotiroidismo. (en mixedema primario)	20%	65%	60%	94%
Carcinoma tiroideo	-	30%	9%	-
Bocio Adenomatoso con hipertiroidismo	-	24%	19%	-
Bocio Adenomatoso sin hipertiroidismo	-	35%	19%	-

H.P.\* Hemaglutinación pasiva, F.C.\*\* Fijación de complemento, RIA\*\*\* Radioinmunoanálisis.

Como se mencionó anteriormente, los títulos más altos se observan en la enfermedad de Hashimoto, cuyo diagnóstico se ve apoyado por esta determinación. Generalmente, es el examen de los síntomas y los signos presentados por el paciente, así como la observación histológica de biopsias de la glándula tiroidea del paciente y los resultados de las pruebas de función tiroidea, lo que conduce a un diagnóstico más acertado.

Sin embargo, la determinación de anticuerpos antitiroglobulina es de gran utilidad en ese diagnóstico, así como en el transcurso del tratamiento del paciente (1, 21).

#### 1.7. Procedimientos Generales de Aislamiento y Purificación de la Tgb.

La tiroglobulina ha sido purificada por varios métodos fisicoquímicos, como son la precipitación selectiva, las técnicas cromatográficas, las electroforéticas y las de ultracentrifugación.

La precipitación selectiva de la tiroglobulina se ha realizado utilizando como agentes precipitantes la concentración de iones hidronio del medio o pH, - (6, 24) o precipitación isoeléctrica. Sin embargo, este procedimiento desnaturaliza a la tiroglobulina. También se utiliza como agente precipitante la concentración de sales neutras, (precipitación salina fraccionada), que proporciona tiroglobulina nativa aunque de pureza mediana. (6, 30).

Las técnicas cromatográficas empleadas en la purificación de la Tgb,

han sido la de exclusión molecular en geles de dextrana y agarosa (21, 31), y la cromatografía de intercambio iónico, utilizando DEAE-celulosa ( 25 ).

Así mismo, también se ha purificado la tiroglobulina por métodos - electroforéticos, ( 46 ) y por medio de ultracentrifugación (30, 31).

En esta tesis se emplearon los métodos de precipitación salina fraccionada, que aprovecha las propiedades de la tiroglobulina de precipitar en soluciones de sulfato de amonio al 38-42% de saturación. Debido al alto peso molecular de la Tgb (660 000 D.), la cromatografía de exclusión molecular es bastante útil para la purificación de la Tgb, pues su forma y peso molecular difieren bastante de las otras moléculas presentes en la glándula tiroidea, así como en la sangre (24, 42).

Estos métodos fueron escogidos por su fácil acceso a la Clínica de Tiroides, y también porque se adaptaban a las necesidades de cantidad y pureza de la tiroglobulina que por ellos es posible obtener.

La tiroglobulina obtenida mediante estos métodos, se utilizará posteriormente en otros trabajos, principalmente relacionados con Inmunología, por ejemplo como soporte para haptenos (44, 45) y como reactivo en técnicas de inmunoprecipitación y hemaglutinación pasiva, para identificar anticuerpos antitiroglobulina en sueros de pacientes con varias enfermedades tiroideas.

Se estimó que la cantidad de tiroglobulina necesaria para el desarrollo de estos métodos era aproximadamente 1 g. Esta proteína debería mostrar reactivi-

dad inmunológica "in vitro" con sueros antitiroglobulina, y no con sueros inmunes - contra proteínas séricas, puesto que la mayoría de tales técnicas se aplicarían en muestras de suero. Así mismo, la proteína purificada en esta tesis, debería mostrar el patrón electroforético de otras tiroglobulinas estándares, obtenidas por medio de fuentes comerciales. Se utilizaron como estándares tiroglobulinas porcina y bovina, pues la semejanza de las propiedades fisicoquímicas de estas proteínas, con la tiroglobulina humana así lo permite. (6, 8, 37).

En el siguiente capítulo se describen los métodos utilizados en esta tesis, ya que en el apéndice se desglosan con detalle los mismos.

## 2. MATERIAL Y METODOS.

### 2.1. Material Biológico.

Se procesaron glándulas tiroides humanas, normales, obtenidas por autopsia y mantenidas en congelación a  $-4^{\circ}\text{C}$ . En cada caso, se registró el peso húmedo y las características macroscópicas de la glándula, para observar si había correlación entre estas características y la cantidad y calidad de la Tgb obtenida en cada caso. Las glándulas fueron proporcionadas por el Depto. de Patología del Instituto Nacional de la Nutrición.

### 2.2. Reactivos.

Los reactivos químicos utilizados se obtuvieron de fuentes comerciales. En su preparación, así como durante todos los procedimientos se utilizó agua bi-destilada. En el Apéndice de esta tesis, se indica la preparación de los reactivos empleados en cada método, así como la marca comercial de los mismos, y los aparatos utilizados.

### 2.3. Establecimiento de las Condiciones de Trabajo.

Las condiciones de trabajo, durante el desarrollo experimental de esta tesis, se seleccionaron con el propósito de lograr la mayor cantidad y pureza de tiroglobulina, al realizar cada método. Inicialmente, el aislamiento de las proteínas hidrosolubles de la glándula se realiza a  $4^{\circ}\text{C}$ , con el objeto de impedir la acción de las enzi-

mas proteolíticas, y el crecimiento bacteriano. Posteriormente, la precipitación salina fraccionada y la cromatografía por exclusión molecular se realiza a 22°C, debido a que se ha encontrado que a 4°C ocurre una considerable disociación de la tiroglobulina (46). Es importante señalar, que durante estos pasos de purificación, la proteólisis enzimática se ve disminuida por la alta concentración de sulfato de amonio en el primero, y posteriormente al realizar la cromatografía, la concentración de estas enzimas es muy baja. (6, 24).

El pH de las soluciones utilizadas en todos los procedimientos se mantuvo cercano a 7.2 puesto que como se vió anteriormente la Tgb es estable en el intervalo de pH de 5 a 12.

El tiempo utilizado en la realización de los métodos de aislamiento y purificación fué de 6 días aproximadamente, al cabo de los cuales el material obtenido se liofilizó.

#### 2.4. Aislamiento

Las glándulas congeladas se rebanaron con el bisturí, procurando que las rebanadas fueran lo más delgadas posibles, se cortaron con tijeras en fragmentos pequeños, y se colocaron en vasos de precipitados, a los que se adicionaron 3 ml de la solución extractora (NaCl 0.15 M en amortiguador de fosfatos a pH 7.2) por gramo de tejido húmedo.

La suspensión resultante se sometió a agitación vigorosa con agitador

magnético, por 24 horas a 4°C. Posteriormente, la suspensión se filtró a través de fibra de vidrio, para eliminar los trozos de tejido, y el filtrado se centrifugó a 7 000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante (extracto crudo de tiroides) de esta centrifugación conteniendo las proteínas hidrosolubles de la tiroides, se sometió a determinación de proteínas por el método de Lowry, ( 17 ) y posteriormente, a la purificación de la Tgb por precipitación salina fraccionada.

### 2.5. Precipitación Salina Fraccionada.

En este método se utilizó sulfato de amonio como agente precipitante, aunque también son útiles otras sales neutras como el sulfato de sodio y los fosfatos mono y dipotásicos.

La técnica consiste en adicionar sulfato de amonio en cristales a una solución de la proteína (6, 24), variando la saturación de la solución (en %). La tiroglobulina mantiene su solubilidad en solución de sulfato de amonio de concentración menor al 38% de saturación, precipitando en esta saturación proteínas de menor solubilidad. Las proteínas de mayor solubilidad que la Tgb se eliminan precipitándola, ajustando la concentración de la sal al 42% y eliminando el sobrenadante que contiene estas proteínas.

A continuación se ilustra el diagrama de flujo (Fig. 2) seguido para la purificación de la tiroglobulina, que en términos generales, es el descrito por varios autores (6, 24). Todo el proceso se realizó a 22°C, ajustando la concentración

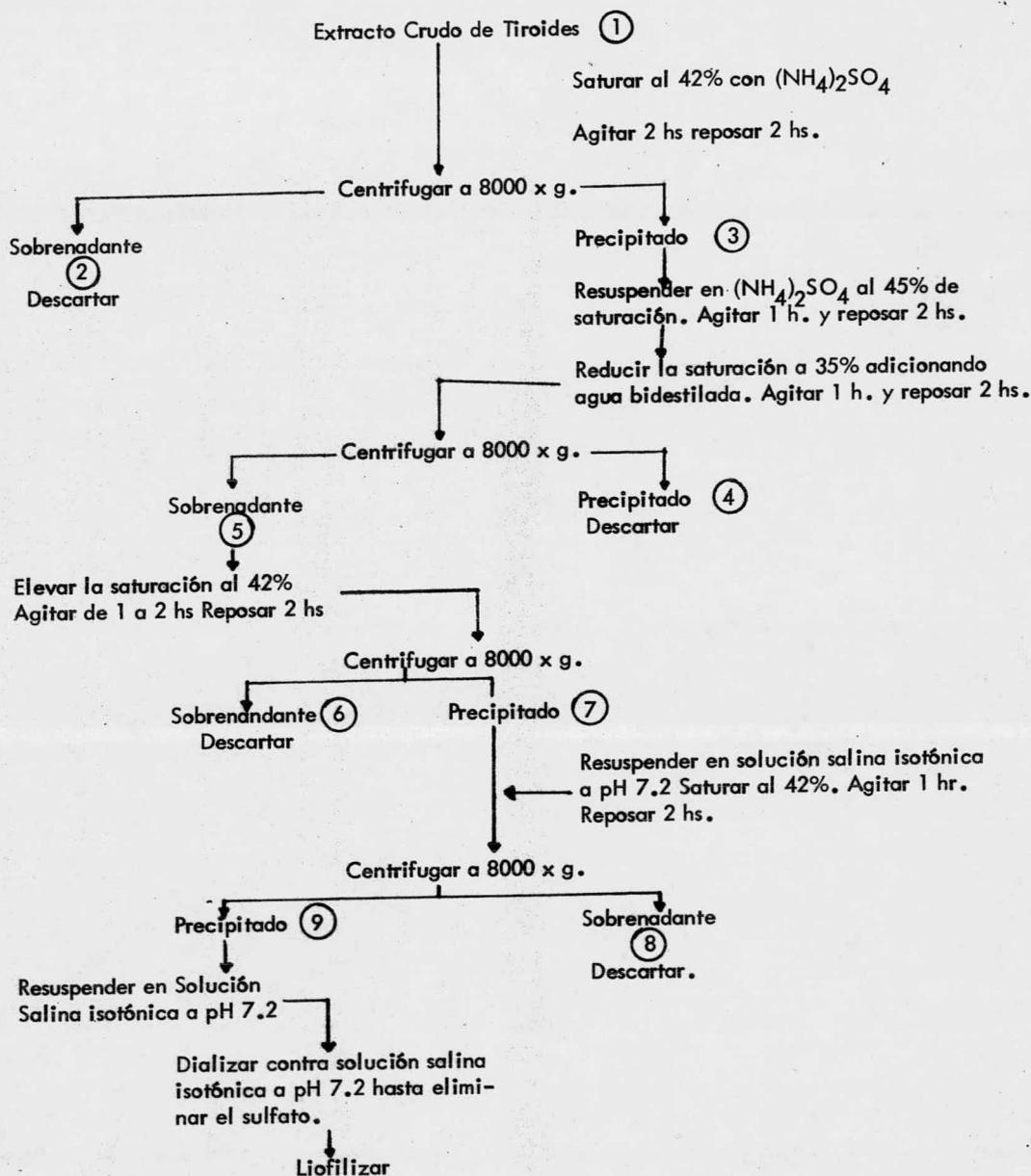


Fig. 2. Diagrama de flujo para la purificación de tiroglobulina por precipitación salina con sulfato de amonio. Los números arábigos dentro del círculo indican toma de muestra para determinación de pureza y rendimiento del método.

saturante de sulfato de amonio por adición de la sal en cristales para aumentarla y por adición de agua bidestilada para disminuirla. La cantidad necesaria de agua o de sal requerida, se determinó consultando el nomograma anexo en el apéndice.

Para un mejor control del método, se realizaron inicialmente las siguientes determinaciones.

a) Concentración saturante de sulfato de amonio en solución acuosa a la temperatura de trabajo (22°C).

b) Curva de solubilidad ("salting-out") de la tiroglobulina.

La concentración saturante de sulfato de amonio resultó ser 4 M, lo que está de acuerdo con lo previamente informado. (Ver apéndice A-1).

La solubilidad de la Tgb en soluciones de diferentes concentraciones de sulfato de amonio se determinó de la siguiente manera:

A una serie de tubos conteniendo 1 ml de una solución de tiroglobulina bovina de concentración de 1 mg/ml, se adicionaron cantidades variables de una solución de sulfato de amonio 4 M, de manera tal que al aforar a un volumen final de 10 ml, la concentración de sulfato de amonio variase entre el 35 y 45 % de saturación (1.4 a 2.3 M). (Ver tabla 2).

Después se agitaron los tubos y se dejaron en reposo por toda la noche.

Posteriormente los tubos se centrifugaron, y los sobrenadante se diali-

Concentración Molar	% de Saturación	ml $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4M	ml $\text{H}_2\text{O}$	Tgb (Bovina) (100 ug/ml.)
0	0	0	9	1 ml
1.3	30.50	3.25	5.75	"
1.5	37.00	3.75	5.25	"
1.7	41.50	4.25	4.75	"
1.9	43.00	4.75	4.25	"
2.1	45.00	5.25	3.75	"

Tabla 2. Esquema utilizado para determinar la curva de solubilidad de la Tgb en soluciones de diferente concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . (Calculado mediante el Nomograma mostrado en el apéndice).

zaron contra solución salina isotónica a pH 7.2 hasta eliminar el sulfato de amonio. (Esto se observó por la ausencia de precipitado  $BaSO_4$ , al adicionar  $BaCl_2$  al agua de diálisis).

En los sobrenadantes dializados se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry para determinar la solubilidad de la proteína en diferentes concentraciones de la sal.

Una vez realizadas las anteriores determinaciones, el extracto crudo de tiroides obtenido en el paso 2.4, se sometió al procedimiento descrito en la figura 2, para la purificación por precipitación salina.

Como se observa en este diagrama, a lo largo de los diferentes pasos del proceso se tomaron muestras para observar la purificación y el rendimiento obtenido.

El material obtenido finalmente, liofilizado, se sometió a cromatografía por exclusión molecular.

## 2.6. Cromatografía por Exclusión Molecular.

La tiroglobulina obtenida por precipitación salina fraccionada de los extractos crudos de tiroides, se sometió a cromatografía por exclusión molecular en gel de dextrana para una mayor purificación.

Estos geles son polímeros entrecruzados derivados de dextrana, insolu

bles en agua y fuertemente hidrofílicos. En la forma comercial se presenta como gránulos pequeños y secos. Al hidratarse, forman el gel constituyendo un tamiz molecular, en el que el tamaño del poro depende del grado de entrecruzamiento de las cadenas del polímero.

La cromatografía por exclusión molecular pertenece a los métodos cromatográficos de partición. En este caso, el coeficiente de partición de un soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria, está determinado únicamente por efectos estéricos, entre los que se encuentran el tamaño del poro del tamiz, (ó límite de exclusión del gel) y el tamaño de las moléculas del soluto.

El sistema cromatográfico está integrado por el gel de dextrana hidratado con un líquido de elución, empacado en una columna generalmente de vidrio en la que se establece un flujo unidireccional del eluyente. (Fig. 3).

La fase estacionaria está constituida por el gel hidratado, y la fase móvil es el líquido eluyente. (13).

El lecho cromatográfico está caracterizado por los siguientes parámetros: El volumen total ( $V_t$ ) del lecho cromatográfico, el volumen del gel en el lecho ( $V_g$ ), o fase estacionaria y el volumen vacío ( $V_o$ ), que es el volumen de eluyente en el espacio intersticial entre los gránulos del lecho. La relación entre estos parámetros es la siguiente:

$$V_t = V_o + V_g \dots \dots \dots 1$$

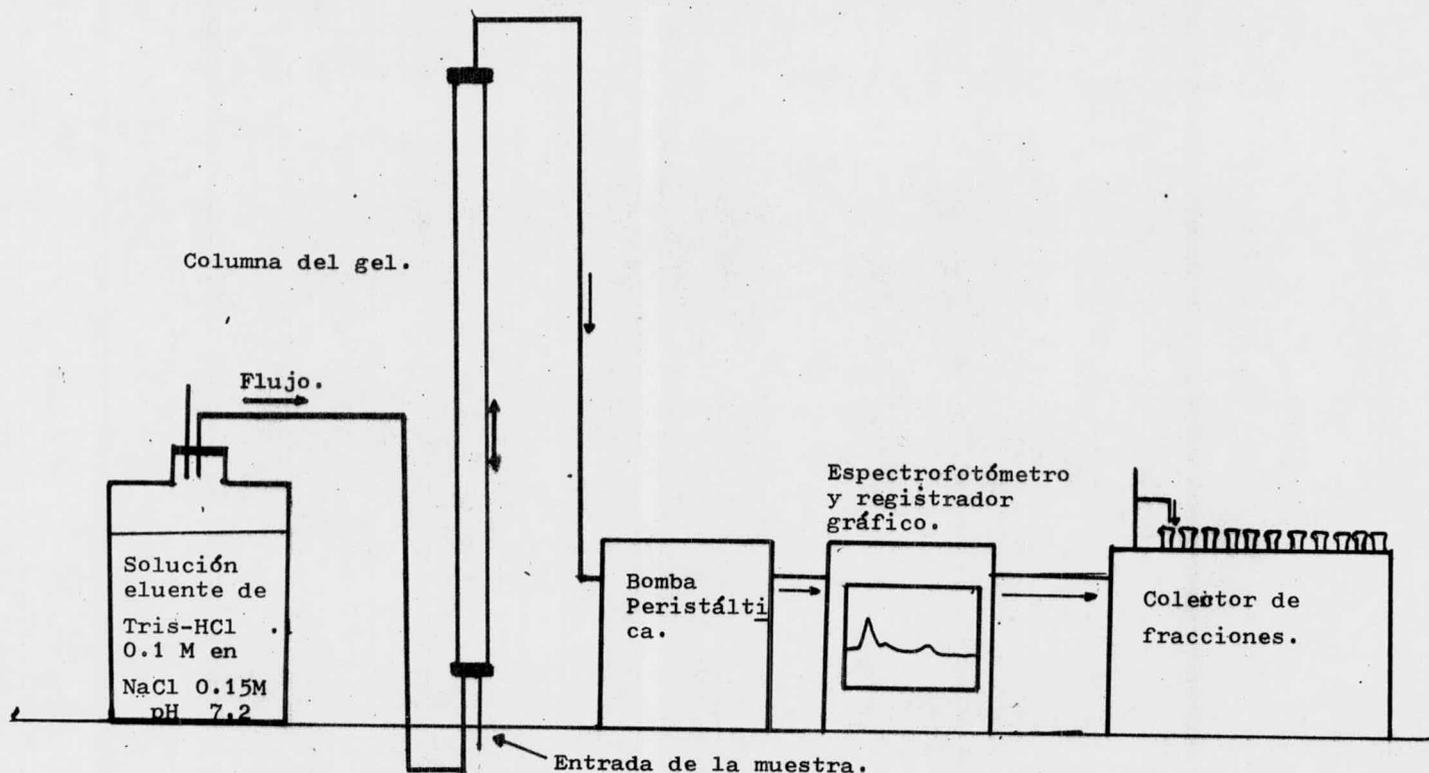


Fig. 3. Diagrama de los dispositivos empleados en la cromatografía por exclusión molecular.

Para caracterizar el comportamiento de un soluto en este sistema, se utiliza el volumen de elución de este soluto, ( $V_e$ ). Este es el volumen de eluyente - que se requiere para transportar las moléculas del soluto a lo largo del lecho del gel.

La relación entre el volumen de elución de un soluto y su coeficiente de partición entre la fase estacionaria y la fase móvil es:

$$V_e = V_o + K V_g \dots\dots\dots 2$$

En donde K es el coeficiente de participación, determinado por la siguiente relación:

$$K = \frac{V_e - V_o}{V_g} \dots\dots\dots 3$$

Como anteriormente se mencionó, este coeficiente de partición depende del límite de exclusión del gel, y del tamaño de las moléculas del soluto.

El límite de exclusión del gel, es determinado por los fabricantes de este material, e indica el peso molecular máximo de los solutos que pueden penetrar - el poro del tamiz del gel. Este límite de exclusión se mantiene de manera uniforme en el transcurso de la cromatografía.

De lo anterior, y observando la ecuación 3, se deduce que si el volumen de elución de un soluto es igual al volumen vacío de la columna; el coeficiente de participación de este soluto es cero:

$$V_e = V_o \quad K = 0$$

Esto indica que las moléculas de soluto con este volumen de elución son tan grandes que no penetran los poros del gel. Debido a esto, no hay partición del soluto entre las fases, y las moléculas de éste únicamente se mueven por el volumen  $V_0$ , eluyéndose de la columna en este volumen.

Por otra parte, si el volumen de elución es mayor al volumen vacío, es indicativo de que las moléculas de este soluto han penetrado en el tamiz del gel, distribuyéndose entre la fase móvil y la fase estacionaria. Esto retarda su elución de la columna, puesto que estas moléculas deben viajar por el volumen  $V_0$  y un volumen adicional  $V_i$ , que es el líquido embebido en la matriz del gel.

El volumen de elución de los componentes de una mezcla de solutos depende, por lo tanto, del tamaño molecular de cada uno de ellos, eluyendo de la columna en forma independiente.

El sistema de cromatografía en gel, utilizado en esta tesis, consistió en una columna de vidrio de 2.5 X 100 cm, empacada con Sephadex G-200, grado superfino. (Pharmacia Fine Chem.). Este tipo de gel, es el de más alta porosidad de esta casa comercial, y tiene un límite de exclusión de 200 000 daltons, y un intervalo de fraccionamiento de 10 000 a 200 000 daltons. Esto quiere decir que las moléculas con peso molecular mayor al límite de exclusión se eluyen de la columna en el volumen igual a  $V_0$ , y que este gel es útil para separar mezclas de solutos con peso molecular entre 10 000 y 200 000 daltons.

En este sistema, la tiroglobulina, cuyo peso molecular de 660 000 - daltons excede el límite de exclusión, se eluye en un volumen de elución igual al volumen vacío de la columna.

Este tipo de gel, se utilizó para separar a la tiroglobulina de proteínas cuyo peso molecular fuera menor a 200 000 daltons, y que no se hubieran eliminado - en la precipitación con sulfato de amonio.

Los procedimientos seguidos para el manejo del Sephadex G-200, así como para el empaque de la columna y la técnica de cromatografía empleada, fué el descrito por los fabricantes, ( 47 ) y en otras referencias ( 13 ).

En el apéndice se indican los reactivos, y los aparatos empleados. En la figura 3 se muestra el diagrama de los dispositivos empleados en la cromatografía. El flujo se estableció de manera inversa, es decir ascendente, para evitar que el gel se compactara en la parte inferior de la columna.

El líquido eluyente fué una solución de tris-(hidroximetil)-aminometano 0.1 M, en NaCl 0.15 M a pH 7.2, a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min, mantenido mediante una bomba peristáltica.

La concentración de proteínas en el eluato de la columna, se registró mediante la absorción a 280 nm. en un espectrofotómetro y monitor gráfico Uvicord. (LKB-Produkter A B ). El eluato se colectó en fracciones de 5 ml mediante un colec-

tor de fracciones automático.

La muestra aplicada fué de 100 mg del material liofilizado obtenido al final de la precipitación salina fraccionada, reconstituido en 1 ml de eluente.

## 2.7. Identificación, Pureza y Rendimiento.

Con el propósito de identificar a la tiroglobulina, así como tener criterios de rendimiento y pureza obtenidos en los métodos descritos, se realizaron las siguientes pruebas. (Los reactivos empleados, y las técnicas se encuentran en el apéndice.)

### 2.7.1. Electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida.

Este tipo de electroforesis se utilizó para caracterizar la proteína obtenida en los pasos de purificación. El sistema electroforético empleado fué el de Ornstein y Davis, ( 5 ) para proteínas plasmáticas, utilizando una solución amortiguadora de tris-(hidroximetil)aminometano-glicina a pH 8.3 en las cámaras de los electrodos. Los geles de poliacrilamida utilizados fueron de concentración total de acrilamida de 5% (T = 5%). La intensidad de corriente aplicada fué de 2 mA por tubo por un tiempo de 2 hs.

Las muestras problema se dializaron, antes de someterlas a la electroforesis, contra la solución amortiguadora de las cámaras de los electrodos para evitar

diferentes concentraciones iónicas. La concentración de proteínas en las muestras se ajustó a 200  $\mu\text{g}/100 \text{ ul}$ .

La identificación de la tiroglobulina, así como su pureza en las muestras problemas, se realizó comparando los patrones electroforéticos obtenidos, con los de tiroglobulina estándar, (bovina) en la misma corrida.

### 2.7.2. Inmunoelectroforesis.

Esta prueba se realizó también como criterio de identificación y pureza de los productos obtenidos, y al mismo tiempo para comprobar sus propiedades inmunológicas.

Se utilizó un gel de agarosa al 2% y un amortiguador de Veronal-acetato a pH 8.2 y fuerza iónica de 0.04. Las muestras (2 ul), se sometieron a electroforesis por 2 hs a un potencial de 90 V. Posteriormente se adicionaron en los canales del gel suero inmune antitiroideos humana (ovino), o suero inmune antisuero humano polivalente, (conejo) dejándose los geles en la cámara de electroforesis desconectada por 48 hrs. para que se efectuara la difusión de los reactantes.

### 2.7.3. Rendimiento.

El rendimiento de los métodos empleados para purificar la tiroglobulina, se determinó analizando la concentración de proteínas totales por el método de Lowry y cols. (17).

Esta determinación se realizó en las muestras indicadas con números arábigos encerrados en un círculo en la figura 2, y en varias fracciones eluidas de la columna cromatográfica.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1. Aislamiento.

En la tabla 3 se muestra el registro del aspecto macroscópico de cuatro glándulas tiroideas que se sometieron a los métodos experimentales de esta tesis. En ella se señala además el peso húmedo de cada una, y el volumen de solución extractora que se utilizó en cada caso.

Una vez realizado el aislamiento de las proteínas hidrosolubles (Sección 2.4) se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Lowry en cada uno de los extractos. Estos resultados se muestran en la tabla 4. En esta tabla se observa que no existe relación entre la cantidad de proteínas extraídas y el peso de la glándula (tabla 3). Esto ha sido señalado por varios autores, (42, 43) quienes explican que este hecho se debe a que la concentración de proteínas en el coloide tiroideo, y principalmente de tiroglobulina, depende del estado metabólico y nutricional del organismo al cual pertenece la glándula, aún tratándose, como en este caso, de individuos fallecidos por causas no relacionadas con patología tiroidea.

#### 3.2. Precipitación Salina Fraccionada.

En la figura 4 se muestra la curva de solubilidad de la tiroglobulina - en soluciones de sulfato de amonio de diferente concentración. En esta figura se observa que la precipitación máxima de la tiroglobulina ocurre a concentraciones de sulfato de amonio de 1.6 a 1.7 M; (38 a 41% de saturación), siendo máxima a la concentración

Tiroides	Peso Húmedo	Aspecto	ml. Sol. Extractora
I	13.50 g	normal	40.5
II	17.40 g	normal	52.0
III	9.27 g	normal	30.0
IV	22.74 g	normal	70.0 ml.

Tabla 3. Características de las glándulas tiroides procesadas.

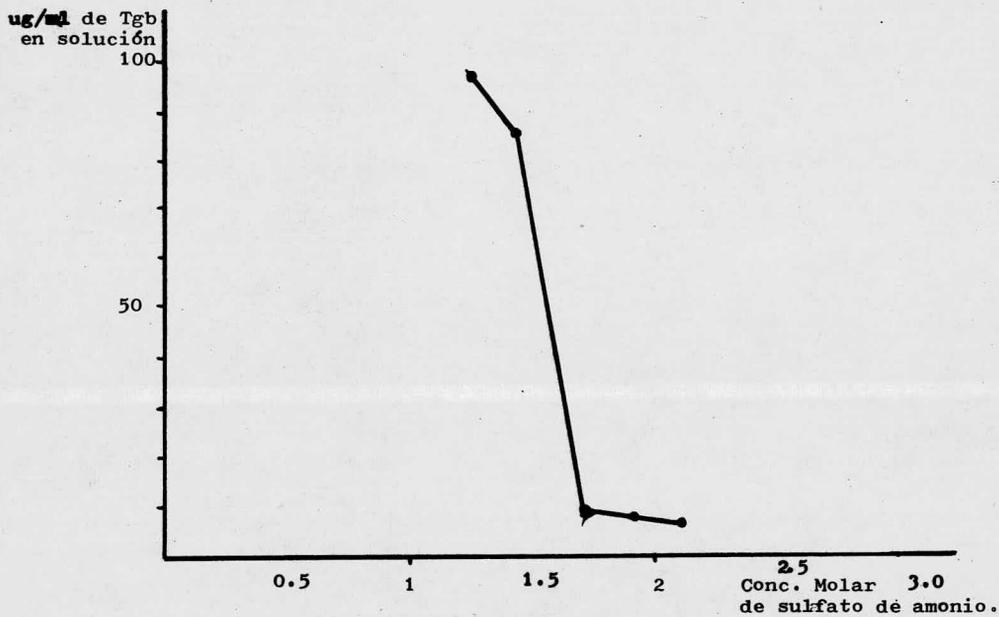


Fig.4. Curva de solubilidad de la tiroglobulina bovina en función de la concentración de sulfato de amonio. Se observa que la máxima precipitación ocurre entre 1.6 y 1.7 M ( 38 a 42% de saturación aproximadamente).

Tiroides	Proteínas Totales Extraídas	Proteínas (mg)/g de tejido
I	1.012 g	74.9
II	1.560 g	89.6
III	1.020 g	110.0
IV	2.607 g	114.6

Tabla 4. Proteínas extraídas de las glándulas tiroideas.

de 1.7 M (41 % sat). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Derrien (6) y por otros autores (24, 38).

Una vez comprobadas las propiedades de solubilidad de la tiroglobulina, se sometieron los extractos crudos de tiroides a la precipitación salina fraccionada, siguiendo el diagrama indicado en la figura 2.

Como se observa en el diagrama mencionado, el procedimiento consta de cuatro precipitaciones sucesivas. Para calcular el rendimiento obtenido en cada precipitación, así como después de todo el proceso, se realizó la determinación de proteínas en las muestras indicadas en dicho diagrama. Estos resultados se encuentran resumidos en la tabla 5.

En la tabla mencionada se observa que utilizando la técnica descrita, la cantidad de proteínas precipitables al 42 % de saturación de sulfato de amonio, representan aproximadamente el 60 % de las proteínas totales de los extractos crudos de tiroides, excepto en la tiroides III, en la que el rendimiento fué de 77%. Como ya se ha mencionado, estas proporciones son altamente dependientes del estado metabólico y nutricional del organismo a que pertenece la glándula, por lo que no se puede hacer una observación con apoyo firme a esta diferencia.

En la misma tabla se muestran las cantidades de proteínas obtenidas de cada glándula, por gramo de tejido húmedo, mediante la precipitación salina. Estas cantidades pueden considerarse como indicativas de un buen rendimiento, ya que va-

Tiroides	Concentración Inicial Extracto Crudo	1ª Pp	2ª Pp	3ª Pp	4ª Pp	mg/g tejido	Rend. Final
I	1012 mg	870 mg	760 mg	670 mg	580 mg	42.9	58 %
II	1560 mg	1400 mg	1170 mg	1010 mg	920 mg	52.8	60 %
III	1200 mg	1080 mg	1000 mg	950 mg	920 mg	99.2	77 %
IV	2600 mg	2250 mg	1900 mg	1720 mg	1579 mg	69.0	60 %

Tabla 5. Rendimiento del procedimiento de precipitación salina fraccionada.

rios autores informan que las proteínas precipitables a la saturación de sulfato de amonio mencionada, son cerca del 80% de las totales, o de 50 a 100 mg/g de tejido húmedo, siendo la tiroglobulina la que constituye la mayor parte de ellas (6, 30).

### 3.3. Identificación y Pureza de la Tiroglobulina.

Con el objeto de identificar la tiroglobulina y determinar el grado de pureza en los extractos crudos de tiroides, así como en los productos obtenidos después de la purificación por precipitación salina, se realizó la electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida.

En la figura 5 se observa el patrón electroforético de tiroglobulina - bovina estándar, el cual muestra la banda de la tiroglobulina ( I ), que es bastante bien definida y homogénea. También se observa una zona difusa de proteínas heterogéneas ( II ), de mayor movilidad electroforética que la Tgb, que como se ha sugerido ( 46 ), pueden corresponder a fracciones de tiroglobulina disociada por deterioramiento al almacenarla. Los patrones electroforéticos de los extractos crudos de las tiroides fueron idénticos en todos los casos, y mostraron 7 bandas visibles, (Fig. 6) - una entre ellas la Tgb, identificada por su movilidad electroforética al compararla - con la Tgb estándar.

Las proteínas obtenidas por precipitación salina, mostraron al someterse a la electroforesis, estar compuestas principalmente por tiroglobulina, aunque todavía se encuentran presentes otras dos proteínas (Fig. 7). Estas dos proteínas (IV y VII), pueden corresponder a un dímero de la Tgb (banda IV), y a una subunidad de la misma (banda VII),

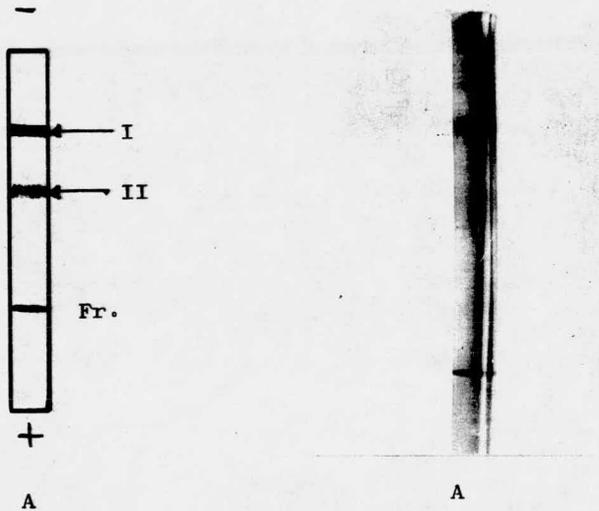


Fig.5. Patrón electroforético de la tiroglobulina bovina estándar, en electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida. I.- Tiroglobulina; II.- Probables productos de deterioro. Fr. Frente móvil de azul de bromofenol.

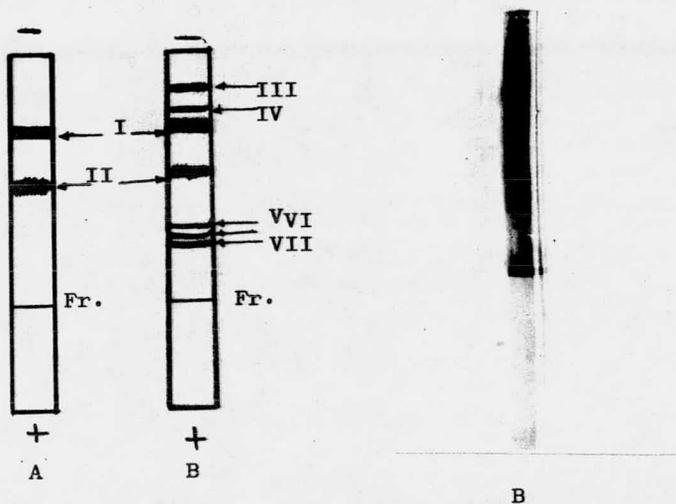


Fig. 6. Patrón electroforético de los extractos crudos de glándulas tiroideas (B). Se identificó la presencia de la Tgb en dichos extractos por comparación con el patrón electroforético de la Tgb bovina estándar, (A). En los extractos crudos se observaron además otras proteínas. (III aVII).

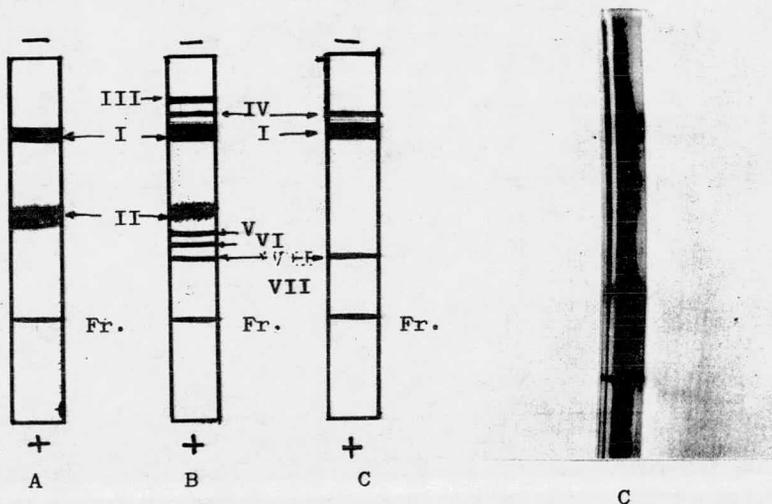


Fig.7. Comparación de los patrones electroforéticos de Tgb bovina estándar, (A), extracto crudo de tiroroides, (B), y tiroglobulina humana purificada por precipitación salina con sulfato de amonio. La purificación por este método, eliminó cuatro de las proteínas presentes en dichos extractos, quedando la Tgb contaminada aún por dos proteínas (IV y VII).

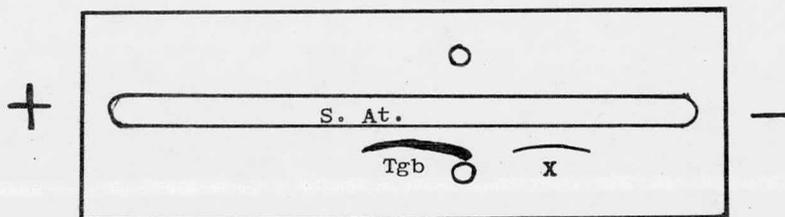


Fig.8. Inmunoelectroforésis de los extractos crudos de tiroides. Se observa la banda de precipitación de la Tgb. Se observa también otro antígeno tiroideo no identificado (X) . (S.At.- Suero inmune antitiroides, humana) **Dichos** extractos no reaccionaron inmunológicamente con suero inmune antihumano polivalente.

puesto que no mostraron propiedades antigénicas diferentes a las de la Tgb humana. (Ver más adelante).

Como se deduce de estos resultados, el método de precipitación salina utilizado, elimina por lo menos 4 proteínas de los extractos crudos de tiroides, dando como producto tiroglobulina humana de pureza mediana que contiene como impureza dos proteínas no identificadas, que aparentemente se encuentran en proporción - mucho menor que la Tgb. Esto ocurrió de manera idéntica en las cuatro glándulas tiroides procesadas.

La identificación y la pureza de la Tgb se determinaron también mediante inmunoelectroforesis (IEF). En este caso se sometieron a dicha prueba los extractos crudos de tiroides, y las proteínas obtenidas por precipitación salina. Los sueros inmunes utilizados fueron un suero inmune antitiroides humana (ovino), y un suero inmune anti suero humano (conejo) (Hyland).

La figura 8 muestra el resultado de la IEF del extracto crudo de tiroides, (en los cuatro casos idéntico), el cual presentó la aparición de dos bandas de precipitación con el suero inmune antitiroides, lo que indica la presencia de dos antígenos tiroideos en los extractos crudos. La banda más gruesa y alargada, de migración anódica corresponde a la tiroglobulina. Esta banda de la Tgb había sido caracterizada en el sistema de IEF, en experimentos preliminares utilizando Tgb humana pura, proporcionada por la División de Endocrinología del Hospital Vargas de Caracas, Venezuela. La otra banda, menos ostensible no se identificó. Los extractos

crudos de tiroides no mostraron bandas de precipitación utilizando suero inmune anti suero humano, lo que indica la ausencia de antígenos séricos en dichos extractos.

En la figura 9 se muestra la IEF de las proteínas obtenidas por precipitación salina. Esta prueba mostró en este caso, una sola banda de precipitación con el suero inmune antitiroides, de movilidad electroforética semejante a la de la Tgb, aunque menos alargada. No hubo precipitación con el suero inmune antisuero humano.

De la anterior prueba se concluyó que desde el punto de vista inmunológico, mediante la precipitación salina fraccionada se obtuvo una purificación de la tiroglobulina sin afectar sus propiedades inmunológicas, eliminando otro antígeno tiroideo, presente en los extractos crudos.

#### 3.4. Cromatografía por Exclusión Molecular.

La columna cromatográfica, (empacada con Sephadex G-200), tenía las siguientes características;

$$V_t = 490.87 \text{ ml.}$$

$$V_o = 150 \pm 10 \text{ ml.}$$

$$V_g = 340 \pm 10 \text{ ml.}$$

Dadas las propiedades del gel utilizado, y de acuerdo a la teoría propuesta en la sección 2.6, aquellas proteínas con un volumen de elución mayor al volumen vacío, ( 150 ml ), tendrían un peso molecular menor de 200 000 D, y aquellas

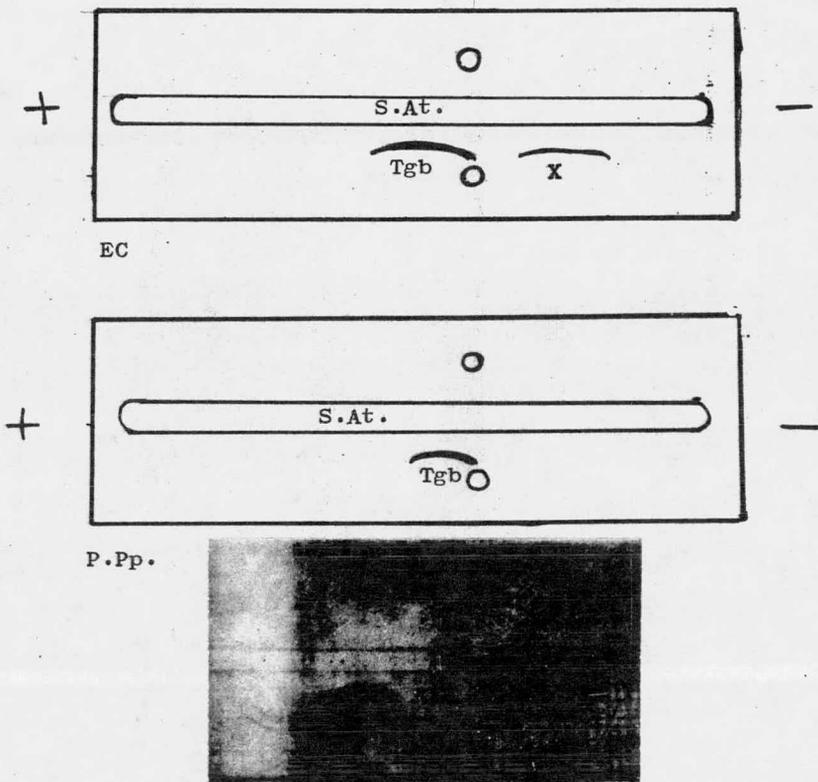


Fig.9. Comparación de las inmunoeléctroforesis de extracto crudo de tiroides (EC), y de la Tgb purificada por precipitación salina (P.Pp.). Este método eliminó el otro antígeno tiroideo no identificado (X).

con un volumen de elución igual al volumen vacío, serían proteínas con un peso molecular igual o mayor a 200 000 D.

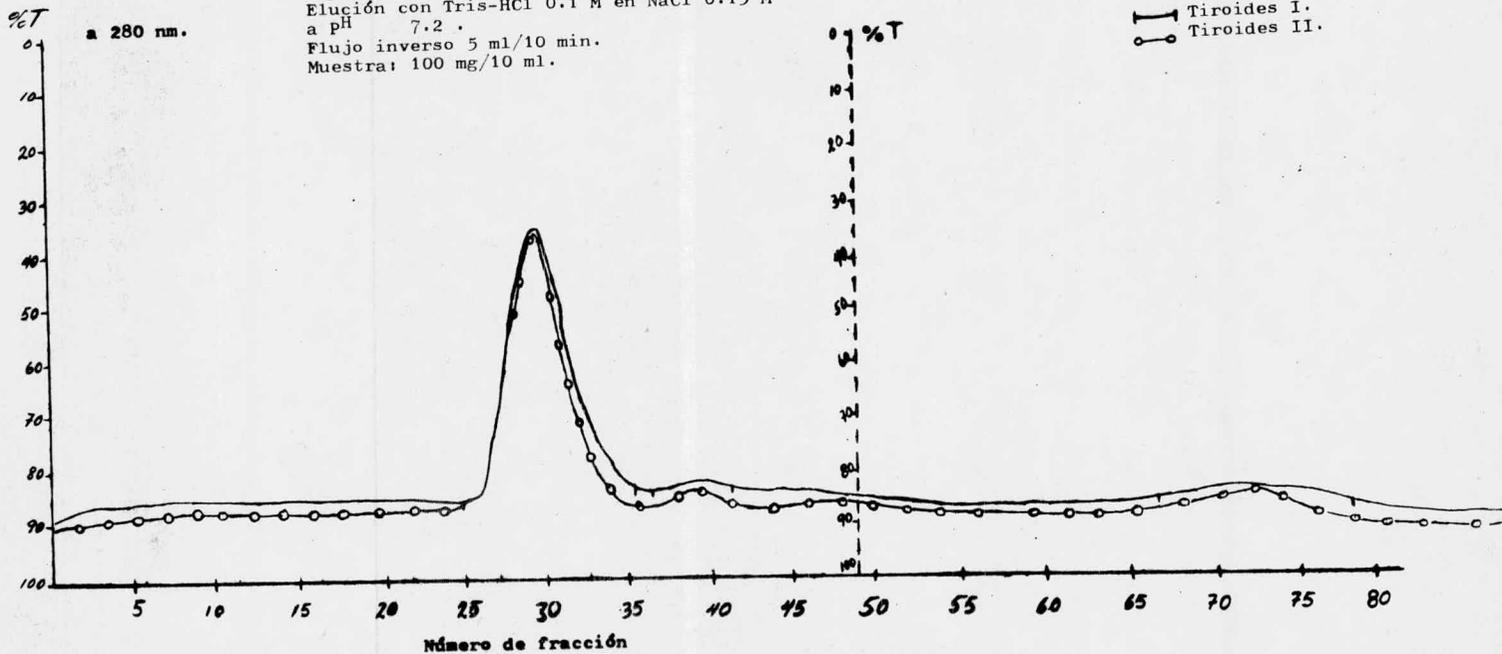
En la figura 10, se muestra el cromatograma obtenido mediante el registro de la absorción a 280 nm de las fracciones eluidas de la columna cromatográfica. Debido a que los patrones electroforéticos de los productos de la precipitación salina de las cuatro glándulas resultaron ser idénticos, se propuso que dichos productos estaban compuestos por las mismas proteínas, por lo que los estudios cromatográficos se realizaron sólo con las proteínas obtenidas de las glándulas I y II.

Los cromatogramas resultaron ser casi idénticos, mostrando tres bandas de absorción. La primera muy pronunciada y simétrica, con un volumen de elución de 145 ml, (Fracciones 25 a 35) corresponde a proteínas con peso molecular igual o superior a 200 000 D, puesto que su volumen de elución está dentro del volumen vacío de la columna (coeficiente de partición  $K = 0$ ). Puesto que la Tgb tiene un peso molecular que excede el límite de exclusión (660 000 D), se eluiría dentro del volumen vacío. Esto se comprobó, como se menciona más adelante, mediante la electroforesis discontinua de las proteínas que constituyen esta primera banda de absorción.

Las otras dos bandas de absorción eran muy dispersas y bastante pequeñas en comparación con la primera, y corresponden a proteínas de peso molecular menor de 200 000 D, ya que su volumen de elución (185 a 205 ml, fracciones 37 a 41 para la segunda, y 340 a 395 ml, fracciones 68 a 79 para la tercera), son mayores

Fig. 10. Cromatogramas de elución de Tgb purificada por precipitación salina.

Sephadex G-200  
Elución con Tris-HCl 0.1 M en NaCl 0.15 M  
a pH 7.2 .  
Flujo inverso 5 ml/10 min.  
Muestra: 100 mg/10 ml.



que el volumen vacío de la columna.

También se puede observar en el cromatograma que las proteínas con peso molecular mayor a 200 000 D, constituyen del 85 al 90% del total de proteínas obtenidas por precipitación salina fraccionada. De acuerdo con estos resultados y los obtenidos mediante la electroforesis discontinua de los productos de la precipitación salina, se consideró que la tiroglobulina constituye la mayor fracción de las proteínas con peso molecular mayor al límite de exclusión de la columna, aisladas mediante la cromatografía en gel.

Sin embargo, existía la posibilidad de que alguna de las dos proteínas ( o las dos ), detectadas al finalizar la precipitación salina fraccionada, tuvieran peso molecular mayor de 200 000 D, y se eluyeran junto con la Tgb, en este sistema cromatográfico. Para verificar o desechar la posibilidad anterior, las fracciones colectadas que mostraron absorción a 280 nm, se concentraron por diálisis bajo presión, y se sometieron a electroforesis discontinua e inmunoelectroforesis.

La electroforesis de la fracción 1, mostró dos bandas ( fig. 11) una de ellas la Tgb, intensa y homogénea. La otra corresponde a otra proteína de menor movilidad electroforética, presente también en el producto de la precipitación salina ( Banda IV). En la figura 12 se muestra la inmunoelectroforesis de la primera fracción utilizando suero inmune anti-tiroideos. En ella se observa únicamente la banda de precipitación característica de la tiroglobulina. Las fracciones 2 y 3 no mostraron -

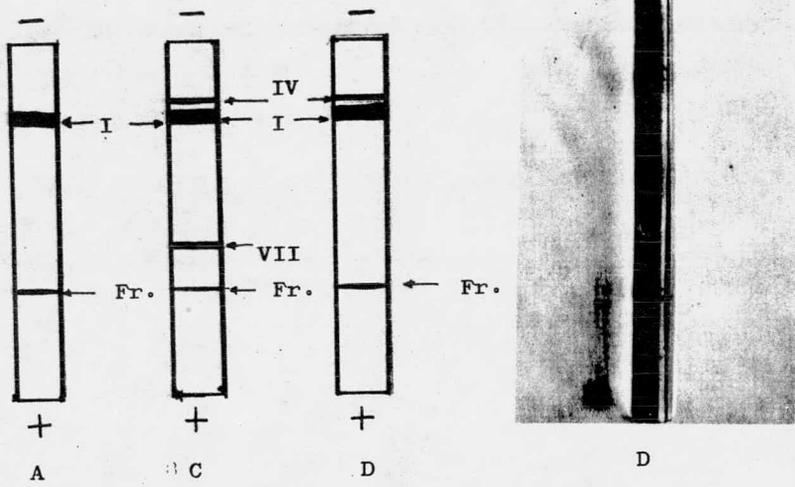


Fig.11. Patrones electroforéticos de tiroglobulina bovina estándar (A), Tgb humana purificada por precipitación salina (B), y Tgb humana purificada por cromatografía en Sephadex G-200 (C). La cromatografía por exclusión molecular eliminó la proteína contaminante VII, quedando la otra proteína (Banda IV) junto con la Tgb, por lo que dicha proteína debe poseer un peso molecular mayor a 200 000 probablemente mayor al de la Tgb.

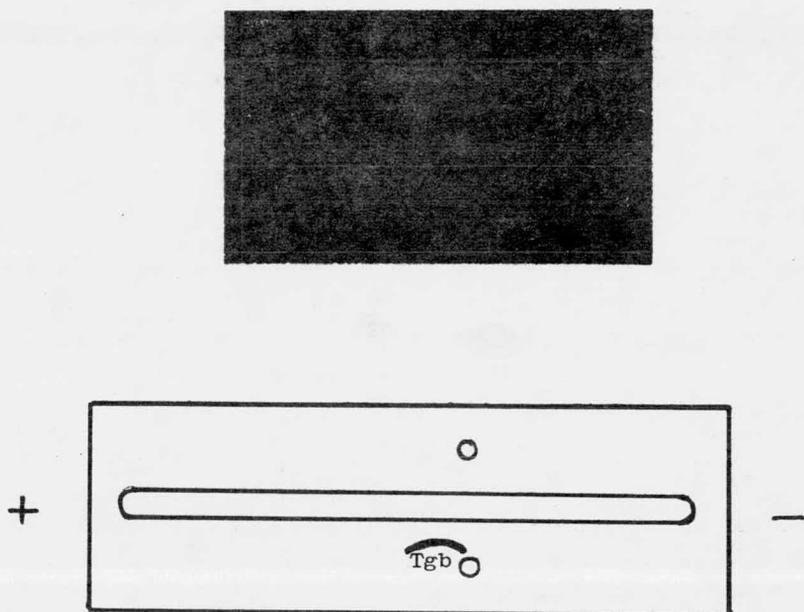


Fig.12. Inmunoelectroforésis de la Tgb purificada por cromatografía en Sephadex G-200. Se observa la banda de precipitación de la Tgb.

resultados en ninguna de las dos técnicas, probablemente debido a que se perdieron en los procedimientos de concentración.

De los resultados anteriores se concluye que la cromatografía en gel utilizando Sephadex G-200, elimina una proteína contaminante presente en la fracción purificada mediante precipitación salina, de mayor movilidad electroforética y menor peso molecular que la Tgb. Por otra parte, en la Tgb purificada se encuentra aún una proteína no identificada, de peso molecular mayor de 200 000 D, y de menor movilidad electroforética que la Tgb. De acuerdo con el sistema electroforético empleado, se puede suponer que la proteína contaminante tiene un peso molecular mayor que la Tgb. (El sistema de electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida - separa a las moléculas de acuerdo a su movilidad electroforética y a su peso molecular). Por otra parte, el hecho de que este contaminante proteínico no muestre reactividad inmunológica diferente que la de la Tgb hace suponer, que considerando lo anterior esta proteína sea un dímero de la Tgb, que puede corresponder a la yodoproteína tiroidea de 27 S descrita por Shulman y Witebsky. ( 30 ).

### 3.5. Almacenamiento y Conservación de la Tiroglobulina.

Indudablemente que durante el aislamiento, y los diferentes pasos de purificación, la tiroglobulina se vió sujeta a variaciones de temperatura, de pH, y de fuerza iónica, a pesar de que se intentó mantener estas variaciones dentro de un mínimo. Son estas variaciones las que afectan, en algunos casos de manera irrevers\_i

ble, la conformación y la estabilidad de las proteínas, sobre todo si éstas tienen una conformación estérica globular, como es el caso de la tiroglobulina.

La tiroglobulina se sometió a técnicas de conservación que permitieran su uso a corto y largo plazo, tales como la liofilización, el almacenamiento a  $-4^{\circ}\text{C}$ , y el congelamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Estas técnicas causan deterioramiento de una parte de las proteínas que se van a almacenar. Para determinar que método de almacenamiento era el mejor para la conservación de la Tgb, se realizó una evaluación del deterioramiento sufrido por la Tgb al almacenarla en las condiciones anteriormente mencionadas.

Como se menciona en la descripción del método de precipitación salina, al finalizar el proceso la tiroglobulina obtenida se liofilizó. Esto se realizó con el objeto de tomar fracciones pequeñas de proteínas y reconstituirlas en volúmenes pequeños para facilitar el manejo de la técnica cromatográfica ( 13, 47 ). Se debe señalar, que aunque se ha informado de un gran deterioro de la tiroglobulina almacenada ( 46 ), principalmente debida a disociación, esto ocurre de manera detectable sólo cuando la Tgb se almacena a la temperatura de 0 a  $4^{\circ}\text{C}$  y en soluciones de baja fuerza iónica.

En nuestro caso, la Tgb obtenida por precipitación salina se liofilizó, y la purificada por cromatografía se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  en solución de NaCl 0.15 M - amortiguada con tris-HCL a pH 7.2.

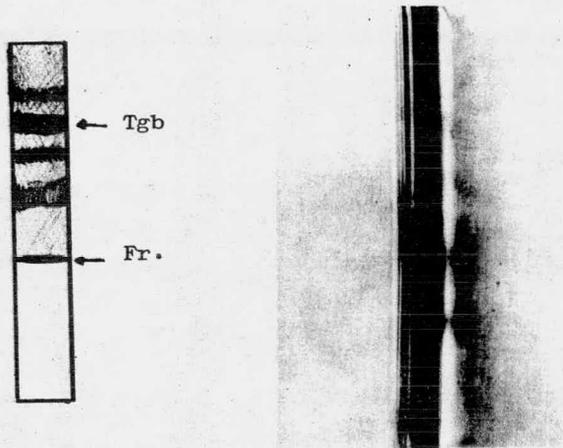


Fig.13. Patrón electroforético de Tgb humana purificada por los métodos descritos en esta tesis, que se almacenó por 15 días a 30 días a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se observa el deterioro sufrido por la Tgb .

Para observar el deterioro sufrido por la Tgb por almacenamiento, se tomó una fracción de 10 ml de la Tgb purificada por cromatografía y se almacenó a temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$ , y transcurrido un tiempo (2 y 3 meses), se realizó la electroforesis discontinua de estas muestras y de la Tgb liofilizada obtenida por cromatografía. Los resultados indicaron que la Tgb no sufrió un deterioro detectable mediante la electroforesis almacenándola liofilizada o a la temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , mientras que en el caso de la almacenada a  $4^{\circ}\text{C}$  ocurrió un considerable daño a la Tgb pues en su patrón electroforético aparecieron zonas difusas a lo largo del gel, y además la banda característica de la Tgb no era muy homogénea ( Fig. 13 ).

De lo anterior se concluyó que la manera óptima para almacenar la Tgb es liofilizándola, o manteniéndola congelada en solución a pH 7.2 a  $-20^{\circ}\text{C}$ . - ( Como un dato para el apoyo de este hecho, una muestra de la Tgb humana purificada por los métodos descritos y almacenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  por un año, mostró un patrón electroforético idéntico al que tenía antes de almacenarla).

### 3.6. Resumen.

Para purificar la tiroglobulina humana, teniendo como materia prima glándulas tiroides humanas normales, se emplearon los métodos de precipitación salina fraccionada y de cromatografía por exclusión molecular.

La tiroglobulina humana se identificó comparando el patrón electroforético de los productos obtenidos, con el de tiroglobulina humana estándar, así como

por su reactividad inmunológica en inmunoeléctroforesis utilizando un suero inmune antitiroides humana.

Los resultados indicaron que la purificación por precipitación salina proporciona un buen rendimiento, (60 a 80%), aunque la tiroglobulina humana así obtenida no es totalmente pura, ya que aún está contaminada por dos proteínas no identificadas en esta tesis. Es probable que estas proteínas correspondan a un dímero de la tiroglobulina y a una subunidad de la misma, ya que no mostraron propiedades inmunológicas diferentes que la Tgb, al realizar la inmunoeléctroforesis utilizando suero inmune antisuero humano, es lógico concluir que estas proteínas no son séricas.

La posterior purificación del producto de la precipitación salina, mediante cromatografía en Sephadex G-200, elimina una proteína con peso molecular menor de 200 000 D, que probablemente corresponda a la subunidad de la Tgb, pero no elimina otra, como lo muestra la electroforesis discontinua de la fracción eluida de la columna que contiene la Tgb. Probablemente esta proteína corresponda a un dímero de la Tgb.

En lo que respecta al rendimiento de los métodos, se obtuvieron 3g de tiroglobulina humana, del procesamiento de cuatro glándulas tiroides. Las características de pureza e inmunológicas del material obtenido, cumplen de manera satisfactoria los objetivos de esta tesis. La mejor comprobación de la utilidad del material obtenido en esta tesis ha sido el desarrollo de trabajos posteriores (44, 45), en que la tiroglobulina obtenida ha sido utilizada como soporte para haptenos (hormonas tiroideas) con excelentes resultados.

Por otra parte, en esta tesis se obtuvo como resultado adicional, que la manera óptima para almacenar la tiroglobulina sin que ésta sufra deterioro considerable, es manteniéndola en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ , o liofilizándola.

#### 4. CONCLUSIONES.

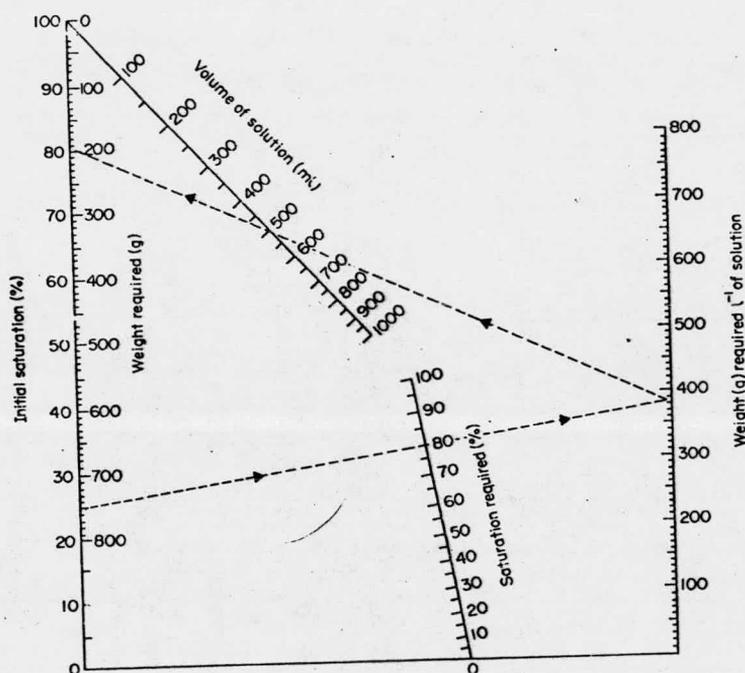
Empleando metodologías relativamente simples, económicas, y sobre todo accesibles al lugar donde se desarrolló esta tesis, fué posible obtener tiroglobulina humana en la cantidad ( 3 g ) , y grado de pureza necesarias para el desarrollo de estudios inmunológicos en la obtención de sueros inmunes contra hormonas tiroideas, que constituyó el tema de una tesis profesional posterior (44) y otro trabajo ( 45 ).

En el desarrollo de este último trabajo , la tiroglobulina purificada en la presente tesis mostró cualidades de solubilidad superiores a las de tiroglobulinas obtenidas mediante fuentes comerciales.

Por lo tanto, se puede concluir que se cumplieron satisfactoriamente los objetivos impuestos al inicio de este trabajo.

## 5. APENDICE

A. 1. Nomograma utilizado para el cálculo de la saturación de las soluciones de sulfato de amonio. (Original de: Dixon, M., *Biochemical J.* 54, 457 (1953).).



El peso de sulfato de amonio sólido requerido para obtener la saturación deseada, se obtiene de la siguiente manera: se traza una línea recta que pase a través de la saturación inicial y de la final que se desea, obteniéndose en el eje de la extrema derecha el peso requerido para 1 lt. de solución. Una línea que parte de este pun

to, a través del volumen real proporciona, en su intersección con el eje vertical de la extrema izquierda, el peso requerido para tal volumen. La solubilidad del sulfato de amonio, varía solamente cerca del 3% entre las temperaturas de 0° y 25°C. La concentración saturante al 100% de una solución, es aproximadamente 4.05 M, en este intervalo de temperatura.

#### A. 2. Determinación de proteínas. Método de Lowry y cols. ( 17 ).

##### Reactivos:

Solución A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Sigma, USA) al 2% en NaOH 0.1 N (Merck)

Solución B:  $\text{CuSO}_4$  (Sigma, USA) al 1% en solución acuosa, mezclada inmediatamente antes de usar volumen a volumen, con solución acuosa de Tartrato doble de sodio y potasio (Sigma) al 2%.

Solución C: (Reactivo de trabajo), se mezclan 50 ml de solución A con 1 ml, de solución B inmediatamente antes de usarse.

Solución D: Solución al 1.0 N de reactivo de Folin-Ciocalteu. (Merck)

Solución estándar de albúmina sérica bovina al 22% en agua a pH 7.2

##### Procedimiento.

Junto con los problemas se procesó una curva estándar utilizando la solución de albúmina sérica bovina, en concentraciones variables de 0 a 100  $\mu\text{g/ml}$ .

Se toman muestras de 0.5 ml de los problemas y de los estándares, y se les adicionan 4 ml. de la solución C. Se dejan en reposo por 10 min, adicionando después 0.4 ml de la solución D. Se agitan los tubos, y se dejan en reposo por 30 minutos, al cabo de los cuales se determina la absorción de cada uno, a 600 nm en un fotómetro (Coleman), ajustado a 100% de transmisión con un blanco de reactivos.

A. 3. Electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida. Ornstein y Davis ( 5 ).

Materiales: Tubos de vidrio de 70 X 5 mm.

Cámara para electroforesis discontinua

Fuente de poder de 0-600 V. (LKB. Produkter)

Electrodos.

Jeringa hipodérmica de 10 ml con aguja del # 23.

Tubo de polietileno de 8 cm de largo y 0.6 mm. de diámetro.

Solución de silicón (Agepon Agfa) al 1% en sol. acuosa.

Reactivos:

a) Soluciones del gel separador. (componentes/100 ml. de sol.)

Solución 1: HCL 1 .0 N..... 48.0 ml.

Tris.\* .....36.6 g. (Sigma)

TEMED.\*\*.....0.23 ml (Eastman)

\* Tris (Hidroximetil)aminometano

\*\* N, N, N', N',-Tetrametilendiamina

Solución 2: Cyanogum 41 \*\*\*..... 20 g. (Fisher)

Solución 3: Persulfato de amonio ..0.14g. (Merck)

Mezclar las soluciones anteriores inmediatamente antes de polimerizar el gel, en las siguientes proporciones:

1 parte Sol. 1

2 partes Sol. 2

1 parte de agua bidestilada

4 partes Sol. 3.

b) Soluciones del gel espaciador. (Componentes/100 ml sol ac.)

Solución A:  $H_3PO_4$  1 M.....25.6 ml.

Tris.....5.7 g.

Aforar y ajustar el pH a 6.9

Solución B: Cyanogum 41.....12.5 g.

Solución C: Riboflavina..... 4.0 mg. (Eastman)

Al momento de usarse, mezclar las soluciones anteriores en las proporciones siguientes:

1 parte solución A

2 partes de sol. B

1 parte de solución C.

\*\*\* Mezcla de 95% Acrilamida y 5% Bisacrilamida.

c) Solución amortiguadora para la cámara de electroforésis.

(Amortiguador de la corrida).

Tris..... 6.0 g.

Glicina..... 28.8 g. (Merck)

Aforar a 1 lt., y ajustar el pH a 8.3 con HCL o NaOH. Para la electroforésis, esta solución amortiguadora se emplea al 10% en solución acuosa.

d) Solución acuosa al 0.001 de azul de bromofenol. (Sigma)

e) Acido acético al 7 % en solución acuosa. (Baker)

f) Colorante negro de amida (Amido Black 10B), al 1% en ácido acético al 7%. (Eastman).

#### Procedimiento.

Los tubos de vidrio, perfectamente limpios, desengrasados y siliconizados, se tapan por un extremo utilizando papel parafilm, y se colocan en el soporte cuidando que se mantengan en posición vertical. En un vaso de precipitado limpio, se prepara la mezcla del gel separador, utilizando las proporciones anteriormente mencionadas.

Una vez hecha la mezcla, se toma ésta con la jeringa, y por medio del tubo de polietileno acoplado a la aguja, se adiciona la mezcla a los tubos hasta una altura de 5 cm. Para evitar la formación de menisco en la parte superior del líquido en gelación, se colocó una capa de agua bidestilada de aproximadamente 3 mm

de grosor en la parte superior de la mezcla del gel separador.

Los tubos se dejaron en reposo por 30 minutos, al cabo de los cuales la polimerización del gel se había completado. Se elimina la capa de agua de la parte superior del gel, y se adiciona el gel espaciador recién preparado de acuerdo a las proporciones mencionadas, hasta una altura de 5 mm. sobre el gel separador, y se adiciona otra capa de agua.

Posteriormente, se colocan los tubos a la luz del sol por 30 minutos; efectuada la polimerización, se elimina la capa de agua y el espacio vacío de los tubos se llena con la solución amortiguadora de corrida, y se colocan en la cámara de electroforesis.

Una vez preparados los geles, se aplicaran las muestras. Empleando como patrones de referencia tiroglobulinas porcina y bovina, (la semejanza entre las tiroglobulinas de las tres especies permite utilizarlas como patrón).

Las muestras se prepararon de la siguiente manera: aquellas que se encontraban liofilizadas, se reconstituyeron en el amortiguador de tri-s-glicina pH 8.3, y las que se encontraban en solución, se dializaron contra este amortiguador por 24 horas y tres cambios de la solución amortiguadora. En todos los casos se ajustó la concentración de proteínas entre 1-2 mg/ml. Para aplicar las muestras a los tubos, se preparó una mezcla de 0.9 ml. de muestra problema y 0.1 ml. de solución acuosa de sacarosa al 50%, adicionando 100 microlitros de estas muestras, una en cada tubo.

Para observar el frente móvil durante la electroforesis, se adicionaron 0.5 ml. de la solución de azul de bromofenol al 0.001%, a la solución amortiguadora de la cámara superior.

Se aplicó la corriente eléctrica, colocando el polo negativo en la parte superior de la cámara, y el polo positivo en la parte inferior. La intensidad de la corriente se ajustó a 2 mA. por tubo manteniéndola por 2 horas.

Transcurrido el tiempo de la corrida, los geles se sacaron de los tubos, colocándolos por 20 minutos en tubos de ensayo conteniendo solución de negro de amida en ácido acético al 7% para la tinción y fijación de las proteínas.

Después, los geles se pasaron a tubos de plástico horadados, y éstos se colocaron en un vaso de precipitado de 3 lts. con agitación mecánica por 24 hs., eliminándose el exceso de colorante con ácido acético al 7%.

Ya eliminado el exceso de colorante, los geles se sacaron de los tubos de plástico y se colocaron en tubos de ensayo con ácido acético al 7% para su conservación.

#### A. 4. Inmunoelectroforesis.

##### Material.

Suero inmune anti-humano polivalente, (conejo).

Suero inmune anti tiroides total humana, (oveja).

Amortiguador de Veronal-Acetat a pH 8.2 y fuerza iónica de 0.04.

Solución acuosa de azul de bromofenol al 0.001 %.

Solución colorante de negro de amida al 0.1%.

Solución salina isotónica.

Solución al 10% de timerosal. (ac.)

Agarosa al 2% en amortiguador de dietil barbiturato-acetato.

Papel filtro Whatman # 1.

Portaobjetos.

Soporte horizontal para los portaobjetos. (Immunoframes)

Micropipeta de 10 ul.

Cámara de electroforesis.

Fuente de poder de 0 a 600 V.

Electrodos.

Vasos de precipitado de varios volúmenes.

Jeringas desechables

Horador de 2.5 mm. de diámetro.

Hojas de bisturí.

### Procedimiento.

Los portaobjetos perfectamente lavados y desengrasados, se colocaron en los soportes de plástico, y sobre ellos se vertió la solución de agarosa al 2% a 40°C, a esta solución se le habían adicionado 0.1 ml de solución de timerosal al 10% por ca

da 100 ml de solución. Se dejó solidificar el gel, y posteriormente se realizaron - cortes circulares de 2.5 mm. de diámetro a aproximadamente 1.5 cm. de distancia de un extremo de los portaobjetos. Así mismo, se practicaron dos cortes paralelos a 3 mm. de distancia uno de otro, así como a 3 mm de distancia del corte circular. Es tos cortes se hicieron de 3 cm de longitud aproximadamente.

Posteriormente, se retiró el gel de agarosa de los cortes circulares, y los soportes con los portaobjetos se colocaron en la cámara de electroforesis previamente saturada con la solución amortiguadora. Después de 15 minutos, se colocaron 10 ul de muestra problema, en los pozos del gel, y se colocaron hoja de papel Whatman humedecidas con amortiguador, haciendo contacto con la solución de la cámara y con los extremos de los soportes conteniendo el gel.

Se conectó la corriente a la cámara, colocando el catodo del lado de los pozos y estableciendo un potencial de 90 V., por dos horas se observó y el movimiento de las muestras, por el corrimiento de una pequeña fracción de azul de bromofenol ligado a la albúmina sérica humana.

Posteriormente a la corrida electroforética, se retiró el agar contenido entre los cortes paralelos formando un canal. En este canal se adicionaron los sue ros inmunes utilizados para observar las propiedades antigénicas de las muestras analizadas.

Adicionados los sueros inmunes, se colocaron las placas en un lugar

fresco por 48 horas, se lavaron con solución salina isotónica, y se tñieron con colorante negro de amida para observar mejor la precipitación de los complejos inmunes.

#### A.5. Cromatografía en Sephadex G-200.

El manejo del Sephadex, se realizó de acuerdo a 1 método descrito por los fabricantes en el manual "Sephadex-Gel filtration in theory and practice", (47) - de Pharmacia Fine Chemicals, y en la referencia 13.

##### Material.

Sephadex G-200, Superfine. (Pharmacia Fine Chemicals)

Columna cromatográfica de 2.5 X 100 cm. (Pharmacia Fine Chem.)

Solución eluente de tris (hidroxi)metilaminometano 0.1 M en NaCl  
0.1 M (Merck).

Espectrofotómetro de luz ultravioleta. (LKB)

Colector de fracciones automático. (LKB)

Bomba peristáltica. (LKB).

## BIBLIOGRAFIA

1. Anderson J.W., W.M. Conahey, D. Alarcón-Segovia, F.R. Emslander y K.G. Wakim. 1967. Diagnostic value of thyroid antibodies. *J. Clin. - Endocr.* 27: 937.
2. Adant M. y P. Spehl. 1934. Studies on the immunologic properties of thyroglobulin. 1934. *Compt. rend. soc. biol.* 117: 230.
3. Claget A.J. y Weigle W.O. 1974. Roles of T and B lymphocytes in the termination of unresponsiveness to autologous thyroglobulin in mice. *J. Exp. Med.* 139: 643.
4. Daniel P.M., O.E. Pratt, I.M. Roitt y G. Torrigiani. 1967. The release of thyroglobulin from the thyroid gland into thyroid lymphatics; the identification of thyroglobulin in the thyroid lymph and blood of monkeys by physical and immunological methods, and its estimation by radioimmunoassay. *Immunology*: 12: 489.
5. Davis B.J. 1964. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 121: 404.
6. Derrien Y., R. Michel y J. Roche. 1948. Recherches sur la préparation et les propriétés de la thyroglobuline pure. I. *Biochem. Biophys. Acta.* 2: 454.
7. Derrien Y., R. Michel, y J. Roche. 1949. Recherches sur la préparation et les propriétés de la thyroglobuline pure. II. *Biochem. Biophys. Acta.* 3: 436.
8. Edelhoch H. 1960. The properties of thyroglobulin. I. The effects of alkali. *J. Biol. Chem.* 235: 1326.
9. Edelhoch H., y R.E. Lippoldt. 1960. The properties of thyroglobulin. II The effects of sodium dodecylsulfate. *J. Biol.Chem.* 235: 1335.
10. Edelhoch H. 1962. The properties of thyroglobulin. VIII. The iodination of thyroglobulin. *J. Biol. Chem.* 237: 2778.
11. Edelhoch H. y R.E. Lippoldt. 1962. The properties of thyroglobulin. IX. The molecular properties of iodinated thyroglobulin. *J. Biol. Chem.* 237: 2788.

12. Edelhoch H., M.S. Carlomagno y G. Salvatore. 1969. Iodine and the structure of thyroglobulin. *Arch. Biochem. Biophys.* 134: 264.
13. Gordon H. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida y almidón. Ed. El Manual Moderno. México 1975.
14. Hersicovics A. 1969. Biosynthesis of thyroglobulin. Incorporations of ( $1-^{14}\text{C}$ ) galactose, ( $1-^{14}\text{C}$ )-mannose and ( $4,5-^3\text{H}$ )-leucine, into soluble proteins by rat thyroid in vitro. *Biochem. J.* 112: 709.
15. Heidelberg M. y K.O. Pedersen. 1935. The molecular weight and isoelectric point of thyroglobulin. *J. Gen. Physiol.* 19: 95.
16. Hektoen L., H. Fox y Schulhoff K. 1927. Specificness in the precipitin reaction of thyroglobulin. *J. Infect. Dis.* 40: 641.
17. Lowry D.J., A.L. Rosenbrough, A.L. Farr y R.J. Randall. 1951. Protein - measurement with Folin's phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265.
18. Maurer H.R. 1971. Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis. Ed. Walter de Gruyter. New York U.S.A.
19. O'Donell J.I., R.L. Baldwin y W.J. Williams. 1958. Correlation of the  $\text{N}^{\alpha}$  alpha reaction of thyroglobulin with the tipe of breakdown produced by papain *Biochem. Biophys. Acta.* 28: 294.
20. Papazolu A. 1911. Contributions a l'etude de la pathogenie de la maladie de Basedow. *Compt. rend. soc. de biol.* 71: 671.
21. Peak R.L., D.B. Willis, G.K. Asimakis y P.W. Deiss. 1974. Radioimmunologic assay for antithyroglobulin antibodies. *Lab. Clin. Med.* 84: 907.
22. Rall J.E., J. Robbins y H. Edelhoch. 1960. *Ann. New York Acad. S.<sub>N</sub>C.<sub>C</sub>* 86: 373.
23. Robbins J., J.Wolf y J.E. Rall. 1964. *Endocrinology.* 64: 37.
24. Robbins. J. y J.E. Rall. 1960. Proteins associated with te thyroid hormones. *Phys. Rev.* 40: 415.
25. Robbins J. 1963. Thyroglobulin fractionation on DEAE-cellulose columrs. *J. Biol. Chem.* 238: 182.

26. Roitt I.M. y G. Torrigiani. 1967. Identification and estimation of undergraded thyroglobulin in human serum. *Endocrinology*. 81: 421.
27. Rose N.R. y E. Witebsky. 1956. Studies on organ specificity. V. Changes in thyroid glands of rabbits following active immunizations with rabbit thyroid extracts. *J. Immunol.* 76: 417.
28. Rose N.R., J.H. Kite y T.K. Doebbler. 1962. Experimental autoimmune thyroiditis. En: Mechanism of cell and tissue damage produced by immune reactions. Grabar P. y P. Miescher. (Editores.) p. 161. Second International on Immunopathologie. Basel, Benno Schwabe.
29. Seed R.W., y I.H. Goldberg. 1965. Biosynthesis of thyroglobulin; II Role of subunits, iodination and ribonucleic acid synthesis. *J. Biol. Chem.* 240: 764.
30. Shulman S., y E. Witebsky. 1962. Studies on organ specificity. XII. Fractionation of hog thyroid extract. Preparation of thyroglobulin and thyralbumin. *J. Immunol.* 88: 221.
31. Shulman S. y J.P. Armenia. 1963. Studies on thyroid proteins. I. the components of hog thyroid tissue, and the preparation of purified thyroglobulin, by column chromatography. *J. Biol. Chem.* 238: 2723.
32. Shulman S. 1971. Thyroid antigens and autoimmunity. *Adv. Immunol.* 14: 85.
33. Spiro R.G., y M.J. Spiro. 1965. The carbohydrate composition of the thyroglobulin of several species. *J. Biol. Chem.* 240: 997.
34. Spiro M.J. y R.G. Spiro. 1968. Glycoprotein biosynthesis: studies on thyroglobulin. Thyroid sialyltransferase. *J. Biol. Chem.* 243: 6529.
35. Spiro R.G. y M.J. Spiro. 1968. Glycoprotein biosynthesis.; studies on thyroglobulin. Thyroid galactosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 243: 6529.
36. Tata J.R. 1976. Thyroglobulin. Mystery solved. *Nature*. 259: 527.
37. Valenta L., M. Roques, J. Torresani, M. Rolland, y S. Lissitsky. 1968. Human thyroglobulin. Physicochemical properties in relation to iodine contents. *Biochem. Biophys. Acta.* 168: 507.
38. Vassart G., S. Refetoff, H. Brocas, C. Dinsart y J.E. Dumont. 1975. Translation of thyroglobulin 33s messenger as a means of determining thyroglobulin - quaternary structure. *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.)* 72: 3839.

39. Van Zyl A., y H. Edelhoof. 1967. The properties of thyroglobulin. XV. The function of the protein in the control of diiodotyrosine synthesis. *J. Biol. Chem.* 242: 2423.
40. Weigle W.O. 1975. Experimental autoimmune thyroiditis. En: *Endocrine Decennial Pathology, 1966-1976*, p. 229. Sommers C.S. (Editor). Appleton-Century-Crofts. New York, U.S.A. 1975.
41. William R.H. 1974. *Textbook of Endocrinology*. W.B. Saunders Co. U.S.A.
42. Ui Nobuo: Synthesis and chemistry of iodoproteins. (1974), En: *Handbook of Physiology. Section 7; Endocrinology. Volumen III: Thyroid*. American Physiological Society. U.S.A. 1974.
43. Taurog A. Synthesis of iodoaminoacids. 1974 . En: *Handbook of Physiology Section 7; Endocrinology. Volumen III; Thyroid*. American Physiological - Society. U.S.A. 1974.
44. Zlotnik A. 1977. Preparación de haptenos T3 y T4 para la obtención de sueros para uso en radioinmunoensayo. Tesis Profesional. Facultad de Química. UNAM.
45. Zlotnik. A., (Valverde-R. C.), Mora B.R. y Acosta M: 1977. Coupling of haptens using carbodiimide; optimization of the binding reaction to proteins. (Resumen) *Rev. Invest. Clin.*: 29, 104.
46. Mullin R.B.; R.E. Levison; A. Friedman; D.E. Henson; R.J. Winand y L.D. Kohn. 1977. Delayed hypersensitivity in Graves disease and exophthalmos; Identification of thyroglobulin in normal human orbital muscle. *Endocrinology* 100: 351.
47. Sephadex. *Gel Filtration in theory and practice*. 1970. Pharmacia Fine Chemicals. Upsala. Suecia.



# Impresiones Lupita

MEDICINA No. 25

FRACC. COPILCO UNIVERSIDAD  
CIUDAD UNIVERSITARIA, D. F.  
TEL. 548-49-79