



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PREPARACION DE HAPTENOS T_3 y T_4 PARA LA OBTENCION DE SUEROS PARA USO EN ENSAYO RADIOINMUNE

T E S I S
Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a :
ALBERT ZLOTNIK ESPINOSA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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
LAB. _____ 411
NO. _____
ECHA _____
*PROC. _____
S. _____



QUIMICA

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE

| | |
|---------------|--------------------------------|
| PRESIDENTE | PROFA. MAGDALENA ACOSTA SEGURA |
| VOCAL | PROF. SALVADOR MARTIN SOSA |
| SECRETARIO | PROFA. BEATRIZ MEDINA JIMENEZ |
| 1er. SUPLENTE | PROF. LIBRADO ORTIZ ORTIZ |
| 2do. SUPLENTE | PROF. HOMERO HERNANDEZ MONTES |

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

CLINICA DE TIROIDES

INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION

SUSTENTANTE

ALBERT ZLOTNIK ESPINOSA

ASESOR DEL TEMA

Q.F.B. MAGDALENA ACOSTA SEGURA



SUPERVISOR TECNICO

DR. CARLOS VALVERDE RODRIGUEZ



▲ LA MEMORIA DE MUMEK

FOR THOSE WHO LOVE ME

Mi agradecimiento para mi supervisor y amigo el Dr. Carlos Valverde-R. por su valiosa ayuda y dirección para la elaboración de este trabajo.

 Mi sincero agradecimiento -
para la Q.F.B. Magdalena Acosta S. por
su paciencia y consejos para la elaboración de este trabajo.

INDICE

PAGINA

I. Generalidades

1.1 Inmunquímica

| | |
|--|----|
| 1.1.1 Aspectos Históricos | 1 |
| 1.1.2. Algunos Conceptos y Definiciones Utiles | 2 |
| 1.1.3. Antígenos | 3 |
| 1.1.4. Haptenos : Orígenes y Concepto..... | 6 |
| 1.1.5. Bases Moleculares : Inmunogenicidad y Antigenicidad | 9 |
| 1.1.6. El tamaño de la Determinante Antigénica | 11 |
| 1.1.7. Consideraciones Celulares | 11 |

1.2 Complejos Antigénicos

| | |
|--|----|
| 1.2.1. Aspectos Históricos..... | 12 |
| 1.2.2. Elección del Soporte Proteico | 13 |
| 1.2.3. Haptenos con Grupo Carboxilo | 13 |
| 1.2.4. Haptenos con Grupo Amino | 16 |
| 1.2.5. Especificidad | 17 |

1.3 Criterio de Selección de la Metodología.....

1.4 Experiencia Previa en el Laboratorio de la Clínica de Tiroides

II. Materiales y Métodos

2.1 Fundamento del Método

| | |
|---|----|
| 2.1.1. Separación, Rendimiento y Purificación del Producto Final Deseado | 20 |
| 2.1.2. Equipo | 21 |
| 2.1.3. Material | 21 |
| 2.1.4. Reactivos | 22 |

2.2 Descripción General de la Técnica

| | |
|---------------------------------|----|
| 2.2.1. Métodos Opcionales | 23 |
|---------------------------------|----|

2.3 Protocolos Experimentales

| | |
|--|----|
| 2.3.1. Observaciones Especiales Sobre Cada Curva | 25 |
|--|----|

2.4 Criterios de Control

| | |
|--|----|
| 2.4.1. Estabilidad del Producto Obtenido | 27 |
|--|----|

III. Resultados

| | |
|-------------------------------------|----|
| 3.1 Consideraciones Generales | 29 |
|-------------------------------------|----|

| | |
|--|----|
| 3.2 Acoplamiento de la Triyodotironina | 30 |
|--|----|

| | PAGINA |
|---|--------|
| 3.2.1. Concentración de T_3 y Rendimiento de la Reacción | 30 |
| 3.2.2. Tiempo de Incubación y Rendimiento de la Reacción | 33 |
| 3.2.3. Efecto del pH en el Rendimiento de la Reacción | 33 |
| 3.2.4. Temperatura y Rendimiento de la Reacción | 38 |
| 3.2.5. Concentración de Etil Carbodiimida y Rendimiento de la - Reacción | 38 |
| 3.3 Acoplamiento de la Tetrayodotironina | 43 |
| 3.3.1. Concentración de T_4 y el Rendimiento de la Reacción | 43 |
| 3.3.2. Tiempo de Incubación y Rendimiento de la Reacción..... | 47 |
| 3.3.3. Efecto del pH en el Rendimiento de la Reacción | 47 |
| 3.3.4. Temperatura y Rendimiento de la Reacción | 47 |
| 3.3.5. Concentración de Carbodiimida y Rendimiento de la Reacción | 47 |
| 3.4 Condiciones Generales no Estudiadas | 47 |
| 3.5 Estabilidad del Producto Obtenido | 56 |
| IV. Discusión | |
| 4.1 Condiciones del Acoplamiento | 57 |
| 4.1.1. Triyodotironina | 57 |
| 4.1.2. Tetrayodotironina | 58 |
| 4.2 Factores que Modulan la Reacción de Acoplamiento | 58 |
| 4.3 Utilidad Práctica | 60 |
| 4.4 Factores del Proceso de Inmunización | 60 |
| Conclusiones | 66 |
| Apéndice 1 | 67 |
| Apéndice 2 | 67 |
| Bibliografía | 69 |

INTRODUCCION

Fue desde la época de Landsteiner cuando se inició el interés en el estudio de los haptenos y su inmunogenicidad. Sin embargo, hasta la época presente no se han reportado avances significativos en este campo, por lo que aparece ante el investigador sumamente novedoso e interesante.

Esta tesis aborda la parte inicial de un proceso de obtención de anticuerpos dirigidos contra las hormonas tiroideas T_3 (Triyodotire - nina) y T_4 (Tetrayodotironina), este es, la obtención de un antigé - nico adecuado para los fines que se persiguen. Para tal efecto, se presentaron muchos problemas prácticos que se debieron solucionar, entre ellos la obtención del soporte proteico utilizado en el presente trabajo , la tiroglobulina humana, problema que fue afortunadamente eliminado por haber constituido el tema de tesis de mi compañero Rafael Mora, a quien hago patente mi agradecimiento por este medio. Otro problema encontrado fue la falta de información en la literatura sobre el tema, y aquella que hubo disponible era muy contradictoria. Sin embargo, ahora comprendo que a pesar del trabajo que ello representó, forma parte muy importante del fin que persigue el desarrollo de una tesis profesional: la crítica constructiva de la información, que debe ser evaluada y seleccionada para ayuda y guía de una investigación.

Considero este trabajo como una aportación original al problema de la obtención de anticuerpos contra haptenos y también como una revisión de la literatura existente sobre el tema.

El enfoque que se le ha dado es fundamentalmente inmunquímico, pero intervienen procesos de interés bioquímico, fisiológico y fisi - químico. El interés actual sobre este tema se deriva del campo de la endocrinología, donde a raíz del desarrollo del radioinmunoanálisis (RIA) a principios de la década de los sesentas por Yalow y Berson (16), empezó el interés por obtener anticuerpos dirigidos contra hormonas que se deseaban cuantificar, muchas de las cuales (péptidos, esteroides, etc) se comportan como haptenos. Tal fue el interés de la Clínica de Tiroides del I.N.N. por el presente trabajo.

A partir de entonces, el RIA se ha utilizado y diversificado -

muchísimo. Se pueden ahora medir por este método desde el antígeno asociado a la hepatitis, hasta derivados cannabinoides. Sin embargo, es aún en el campo de la endocrinología donde el RIA encuentra su mayor aplicación, por sus dos características principales: a) Su elevada sensibilidad para detectar niveles hasta de picogramos (1×10^{-12} gr) de una sustancia dada y b) La ventaja de la especificidad, por permitir medir una sustancia en un medio donde pueden existir muchas sustancias parecidas sin necesidad de efectuar extracciones ni procedimientos semejantes. Estas dos características dependen de la calidad del anticuerpo utilizado y éste, a su vez, depende de la cantidad y calidad del antígeno que se use para provocar la respuesta inmune en un animal.

Queda por resolver un problema: cual es el número óptimo de grupos hapténicos unidos a una molécula de tiroglobulina humana para provocar una mejor respuesta inmune en forma de un mayor título de anticuerpos de mejor especificidad y avidéz. Actualmente en la Clínica de Tiroides del I.N.M. se estudia este punto, pero podría además servir como un tema interesante para otra tesis profesional.

Desde el punto de vista práctico, los datos de esta tesis podrían encontrar mayor aplicación en los grandes sistemas hospitalarios del país (IMSS, ISSSTE, SSA) que manejan grandes volúmenes de muestras, por lo cual existe para ellos una razón práctica para tratar de obtener sus propios reactivos, pues independientemente de las razones económicas obvias, se eliminarían trámites de importación que la situación actual del país hace difícil.

Independientemente de quien utilice esta información o el tipo de hapteno que le interese, es mi mayor deseo que este trabajo sirva de incentivo a otras personas y que el campo de los antígenos hapténicos haya sido enriquecido por esta modesta contribución.

Albert Zlotnik E.

I. GENERALIDADES

1.1 INMUNOQUIMICA

1.1.1 Aspectos Históricos.

Ha sido conocido por mucho tiempo que el contacto con organismos infecciosos como virus y bacterias tiene como consecuencia el fenómeno de la inmunización, esto es, el individuo afectado se vuelve resistente a infecciones subsecuentes por el mismo agente patógeno. Este fenómeno fue descrito desde hace 2500 años, en un relato de una epidemia en Atenas (que parece haber sido tifo o peste), por el historiador Tucídides, quien relata "... el miedo al contagio hacía que la gente no se ocupara de los enfermos o moribundos excepte aquellas personas que - habiendo padecido el mal, se habían recuperado. No existía entre ellos ninguno que fuera atacado por segunda vez". Posteriormente, a fines del siglo XVIII, el médico inglés Edward Jenner observó que aquellos individuos que habían padecido viruela vacuna (enfermedad benigna adquirida - de vacas infectadas con lo que parecía ser la forma atenuada del virus de la viruela), quedaban protegidos en epidemias de viruela. Para probar su teoría, Jenner inoculó a un niño con pus obtenido de lesiones de una trabajadora de establos; algunas semanas después, al inocular al niño con pus de un enfermo de viruela, no se produjo la enfermedad. Después de repetir su experimento muchas veces, Jenner publicó un reporte que condujo a la conclusión de que la vacunación (del latín vacca:vaca) producía inmunidad contra la viruela. Sin embargo, no fue sino hasta - 100 años después, cuando Pasteur aplicó los principios de cepa atenuada (el usó cepas envejecidas), para lograr una vacuna, nombre dado por Pasteur al inóculo que produce inmunización contra la cólera aviar. Sus observaciones pronto fueron aplicadas a muchas enfermedades infecciosas.

Actualmente, se conoce que la inmunidad contra agentes infecciosos depende de dos factores: 1. Mecanismos de naturaleza humoral que implican la producción de anticuerpos (gamma-globulinas que reaccionan con el agente y facilitan su eliminación) y, 2. De mecanismos inmunes de naturaleza celular. En 1903, Wright demostró que los anticuerpos (opsoninas) ayudaban a la fagocitosis por la respuesta celular frente a bacterias. Este mismo hecho había sido anteriormente descrito por Metchnikov -

koff (1883). Von Behring (1890), estudió la neutralización de toxinas bacterianas por anticuerpos antitoxinas obtenidos en caballos. Casi al mismo tiempo Paul Ehrlich fue el primero en estudiar cuantitativamente la reacción toxina-antitoxina.

Corresponde al gran fisicoquímico Arrhenius el uso por primera vez del término "Inmunoquímica" en 1907. Su razón la expresó en la siguiente forma: "He dado a estas lecturas el título de inmunoquímica, - pues quiero indicar con esta palabra las reacciones químicas de las substancias que son producidas en la sangre por la inyección de elementos - extraños, esto es, inmunización. De aquí se desprende además, que las - substancias con las que estos productos reaccionan, como proteínas y - fermentos, se deben considerar con respecto a sus propiedades químicas" (1). Esta definición es aun aplicable a la inmunoquímica moderna sustituyendo términos, y podemos decir que ella estudia la química de los antígenos y anticuerpos como tales y el mecanismo de su interacción.

A partir de los estudios de Von Behring y Ehrlich (10), se - descubrieron la mayoría de las reacciones serológicas conocidas actualmente. Se estableció la existencia de la bacteriolisis, al observar que el Vibrie colerae se desintegraba cuando se ponía en contacto con suero de animales inmunizados (Pfeiffer e Issaef, 1894). El fenómeno de la - precipitación se descubrió al observar que los filtrados de cultivos libres de células de Pasteurella pestis precipitaban al ponerse en contac- te con suero de animales inmunizados (Kraus, 1898). El fenómeno de aglu- tinación, en el cual las células bacterianas suspendidas en suero de un animal previamente inmunizado aglutinaban (Gruber y Durham, 1898) y fi- nalmente, a partir de 1900, se descubrió que las respuestas inmunes se podían desencadenar contra agentes no tóxicos, como proteínas de leche o clara de huevo.

De este pequeño esbozo histórico, podemos apreciar el tremen- do avance que ha tenido la inmunología en el siglo XX. A continuación, se ofrecen algunas definiciones, que son necesarias para comprender la obra de Karl Landsteiner.

1.1.2 Algunos Conceptos y Definiciones útiles.

Se considera antígeno, toda substancia inoculante que es capaz de desencadenar una respuesta inmune en un animal dado. Anticuerpos, -

son sustancias que aparecen en el suero de animales inmunizados como consecuencia de la administración de un antígeno.

El término antígeno se usa comúnmente en dos sentidos. Por una parte, describe aquella sustancia que inyectada en un animal apropiado, da lugar a la producción de anticuerpos circulantes, o bien, a cambios en la reactividad celular como por ejemplo, hipersensibilidad retardada. Por otra parte, el término describe una sustancia que tiene la propiedad de reaccionar con anticuerpos, esto es, que posee especificidad antigénica y reacciona de manera muy selectiva con su correspondiente anticuerpo pero no con otros. Sin embargo, existen sustancias que son capaces de reaccionar con anticuerpos pero que no provocan una respuesta inmune, y hay otras que son capaces de provocar respuesta inmune en unos animales pero no en otros.

El término anticuerpo se refiere a las proteínas que son producidas en respuesta a un antígeno y que reaccionan específicamente con él. Todos los anticuerpos pertenecen a un grupo especial de proteínas del suero, llamadas inmunoglobulinas. La producción de anticuerpos es la llamada inmunidad humoral, para distinguirla de otros fenómenos presentes durante la respuesta inmune, que son llamados inmunidad celular. Por ejemplo, la presencia de linfocitos sensibilizados en sangre.

La respuesta inmune es el conjunto de fenómenos que tienen lugar en un organismo cuando se pone en contacto con un antígeno.

Inmunogenicidad es la capacidad del antígeno de desencadenar la respuesta inmune.

Debido a la estrecha relación del término hapteno con el de antígeno, ambos conceptos serán tratados más a fondo.

1.1.3 Antígenos.

Como se aprecia en la tabla 1.1 los antígenos pueden ser considerados en dos clases principales: Naturales y sintéticos, estos últimos pueden ser químicamente modificados o totalmente sintéticos. Los últimos dos tipos de los antígenos sintéticos han sido desarrollados muy recientemente, y existen opiniones diversas en cuanto a su clasificación. Algunos autores mencionan tres tipos principales de antígenos, pero como los dos tipos implican algún tipo de síntesis química, se ha

preferido incluirlos dentro de los antígenos sintéticos.

Tabla 1.1

| Clase de antígeno | Origen | Ejemplos |
|--|--|---|
| Naturales | Protistas Animales Vegetales | Partículas: Eritrocitos, - bacterias, virus, pólenes, Solubles: toxinas, toxoides, proteínas, polisacáridos, etc. |
| Sintéticos: Químicamente Modificados | Antígenos naturales químicamente modificados. | Proteínas yodadas, conjugados hapteno-proteína, etc. |
| Sintéticos: Obtenidos totalmente por síntesis química. | Moléculas antigénicas químicamente sintetizadas. | Polipéptidos, poliaminocidos, copolímeros de aminoácidos, etc. |

Antígenos Naturales. Estos antígenos fueron los primeros en ser conocidos, y sin duda son los más utilizados actualmente, como por ejemplo en inmunohematología para determinar antígenos y anticuerpos en sangre (4).

La naturaleza química de los antígenos naturales es muy diversa y comprende fundamentalmente sustancias de naturaleza proteica y/o polisacáridos.

Las proteínas fueron las primeras sustancias antigénicas conocidas, pues tienen la ventaja de ser fácilmente purificables de su estado natural en la composición de plantas, animales y microorganismos. Aunque se usan ampliamente, poco se sabe de la naturaleza precisa de sus determinantes antigénicos.

La mayoría de las bacterias que se han estudiado hasta la fecha, contienen carbohidratos serológicamente activos en su pared celular. En la mayoría de los casos son capaces de reaccionar con anticuerpos, pero no provocan respuesta inmune por sí mismos. Sin embargo, en ciertos casos si son antigénicos por sí solos, por ejemplo, los carbohidratos del grupo A y C del meningococo y el polisacárido del neumococo, que son inmunogénicos en el hombre. Otros carbohidratos como dextranas, levanas y ácidos teicoicos también son inmunogénicos per se. El peso molecular del carbohidrato parece ser el factor determinante

en su inmunogenicidad. Las dextranas han sido los polímeros de este tipo que más se han estudiado. Se ha observado que dextranas de peso molecular menor de 50 000 daltons, son mucho menos inmunogénicas en el hombre, que las dextranas de peso molecular de 90 000 o más daltons (5). - El peso molecular del polisacárido del neumococo tipo III debe exceder 18 000 daltons para desencadenar respuesta inmune en ratones (6).

Experimentos similares con otros carbohidratos procedentes de la pared celular de estreptococos y neumococos han tenido la peculiaridad de producir anticuerpos de un tipo especial de inmunoglobulinas, en lugar de la heterogeneidad molecular normal (6). El estudio de estos anticuerpos ha arrojado mucha luz sobre el conocimiento del control genético de la estructura de las inmunoglobulinas y su síntesis.

La inmunogenicidad de un lípido purificado nunca ha sido demostrada y se considera que para obtener un anticuerpo adecuado contra estas sustancias, deben acoplarse con una molécula mayor de estructura proteica o polipeptídica. (15)

En las últimas dos décadas, los ácidos nucleicos han sido ampliamente estudiados por los bioquímicos, y el hallazgo de anticuerpos contra ácidos nucleicos en el suero de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES), aumentó el interés por estas moléculas complejas. El LES es una enfermedad con diversas anormalidades inmunológicas, incluyendo la presencia de anticuerpos antinucleares y anti-ácidos nucleicos en el suero de los pacientes. Frecuentemente se encuentran complejos inmunes DNA-anti-DNA depositados en los glomérulos de los riñones. Se han obtenido anticuerpos contra antígenos de ácidos nucleicos experimentalmente después de conjugación con otras moléculas, como albúmina sérica-bovina (ASB) (7). Sin embargo, a pesar del gran interés inmunológico de estos compuestos sus características inmunogénicas no están aun totalmente esclarecidas.

Antígenos Sintéticos Químicamente Modificados.

De lo anterior se puede inferir que para discernir con certeza la base química de la inmunogenicidad, debía resolverse primero el problema de la enorme complejidad de los antígenos naturales. El primer intento al respecto, fue modificar su estructura química. Así, la sustitución de pequeños grupos de estructura química conocida en los antígenos

proteicos naturales, ha sido de gran ayuda para conocer la naturaleza de la especificidad de las reacciones serológicas.

Por ser esta categoría de antígenos la que más interesa en el presente trabajo, se trata mas extensamente en la sección 1.2

Antígenos Totalmente Sintéticos. Hace aproximadamente diez o quince años, se obtuvieron polímeros sintéticos de aminoácidos, lo cual ayudó mucho al conocimiento del mecanismo molecular de la inmunogenicidad. En efecto, estudiando los cambios precisos efectuados en la estructura química de estos antígenos, ha sido posible delinear muchas de las características moleculares que influyen en la inmunogenicidad.

Una de las grandes ventajas del uso de estos antígenos es la posibilidad de obtenerlos a voluntad, con la estructura precisa deseada. En la tabla 1.2 se indican algunos ejemplos.

Tabla 1.2 : Antígenos Totalmente Sintéticos (polipéptidos) (8).

| Tipo | Ejemplo |
|--|---|
| Homopolímero | poli-L-pro |
| Pelipéptido Lineal | poli-glu ⁵⁶ -lis ³⁸ -tir ⁶ |
| Copolímero al azar | (pro ⁶⁶ gli ³⁴) _n |
| Polímero periódico o de secuencia ordenada (alfa hélice) | (tir-ala-glu) _n |
| Copolímero de muchas cadenas (ramificado) | poli (tir-glu)- poli-DL-ala-poli-lis |

Estos ejemplos ilustran el tipo de estudios que se pueden llevar a cabo con antígenos sintéticos. La información obtenida de estas investigaciones será discutida al tratar sobre las bases moleculares de la inmunogenicidad y especificidad antigénica (sección 1.1.5)

1.1.4 Haptenos; Orígenes y Concepto.

Desde los albores del siglo XX se conocía que las proteínas perdían su especificidad de especie cuando se yodaban exhaustivamente. Los anticuerpos producidos en esta forma estaban dirigidos especialmente hacia los residuos tirosina yodados comunes a estas proteínas, lo cual producía el fenómeno. Obermayer y Pick (1903), fueron los primeros en

hacer notar la gran diversidad de sustancias antigénicas. Ellos fueron también, quienes primero unieron grupos NO_2 a proteínas séricas de conejo, para encontrar que los anticuerpos producidos reaccionaban con proteínas similarmente tratadas de caballo, cuy, pollo, pero no con proteínas de conejo no tratadas. Llegaron a la conclusión de que los anticuerpos formados eran capaces de reconocer los grupos NO_2 u otras estructuras modificadas de las moléculas nitradas.

Sin embargo, no fue hasta los experimentos clásicos de Landsteiner (9), usando pequeñas moléculas bien definidas unidas a proteínas, cuando los informes de la especificidad de estas reacciones inmunológicas empezaron a difundirse. Landsteiner fue quien introdujo el término "hapteno" (del griego, que significa "agarrar"), para describir "sustancias libres de proteínas específicas que, aunque reactivas in vitro, no inducen, o inducen una pobre respuesta inmune in vivo, para diferenciarlas de los antígenos completos, que poseen ambas propiedades" (9).

Aunque el término "hapteno" se asocia frecuentemente a sustancias de peso molecular bajo, la definición anterior indica que el término puede ser aplicado a cualquier sustancia que no desencadene, por sí misma, la formación de anticuerpos; esto es, que no sea inmunogénica, pero sí capaz de reaccionar con anticuerpos formados contra una molécula inmunogénica completa. Dentro de ese grupo podemos incluir sustancias muy variadas como algunos compuestos aromáticos, ciertas drogas (penicilina), algunos oligosacáridos, ácidos nucleicos y nucleótidos y ciertos péptidos y lípidos. Todos ellos pueden ser haptenos. En la tabla 1.3 se muestran los haptenos más conocidos que han dado mucha información sobre la especificidad antigénica (8).

Landsteiner demostró que cuando los tres isómeros del ácido aminobencensulfónico (orto, meta y para) se diazocaban, se unían a una proteína y se usaban para inmunizar animales los anticuerpos producidos eran capaces de diferenciar entre los tres isómeros. En experimentos similares, Landsteiner y Van der Scheer (11) demostraron por inhibición de la precipitación que los anticuerpos dirigidos contra el ácido sulfónico podían distinguir entre éste y el azobenceno en el cual el grupo sulfonato está sustituido por un arzonato o un grupo carboxilo. Estos experimentos demuestran claramente la especificidad tan precisa que pue-

Tabla 1.3 Ejemplos de haptenos comunes

| Grupo | Estructura | Modo de unir al soporte |
|--------------------|---|--|
| Azobenczoato | $R-N=N-\text{C}_6\text{H}_4-\text{COO}^-$ | Enlaces azo con anillos aromáticos de tirosina, histidina y $\epsilon\text{-NH}_2$ de lisina. |
| Azobencenarzoato | $R-N=N-\text{C}_6\text{H}_4-\text{AsO}_3\text{H}^-$ | |
| Azobencensulfonato | $R-N=N-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_3^-$ | |
| Dinitrofenol | $R-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2$ | Sustitución Nucleofílica - usando un derivado halogenado como 2-4 dinitrofluorobenceno. El NH_2 usado es de lisina. |
| Trinitrofenol | $R-\text{C}_6\text{H}_2(\text{NO}_2)_3$ | |

R= representa la proteína soporte.

de exhibir la reacción antígeno-anticuerpo. Landsteiner también usó carbohidratos en sus experimentos, y demostró que la especificidad del anticuerpo por el ácido D-tartárico y el L-tartárico. Ese trabajo es un ejemplo excelente de la utilidad de los antígenos sintéticos para conocer la especificidad de la respuesta inmune.

Otro aspecto de los antígenos artificiales es el efecto que tiene el modificar moléculas poco antigénicas y la respuesta que producen en un organismo dado. Un caso es la gelatina, a la cual se le pueden unir varios grupos para estimular su antigenicidad (12). Cuando el aminoácido aromático tirosina se incorpora en un 2% a la gelatina, aumenta la inmunogenicidad de ésta última. Cuando se añaden cantidades de 10% o mayores, la gelatina se vuelve muy inimmunogénica pero los anticuerpos formados se dirigen contra la tirosina.

A partir de entonces (1930's), es decir a partir de los descubrimientos de Landsteiner, las técnicas de acoplamiento de haptenos a proteínas han tenido un desarrollo muy modesto en comparación con otros campos de la inmunología. Actualmente se denomina grupo hapténico a los sustituyentes acoplados a proteínas, y a éstas se les denomina proteínas conjugadas. Se utiliza también el término soporte en analogía con matrices químicas usadas en otros métodos de investigación bioquímica.

1.1.5 Bases Moleculares: Immunogenicidad y Antigenicidad.

Sela (2) dice en su reporte: "Nuestro conocimiento sobre diversos parámetros moleculares como son : composición, peso molecular, - forma, accesibilidad, carga eléctrica, configuración óptica y estérica - , etc. que controlan la antigenicidad, esto es, la inmunogenicidad y la especificidad antigénica, se ha incrementado en años recientes, debido en parte al empleo de antígenos sintéticos. La simplicidad de estas moléculas facilita la interpretación de los resultados, y permite detectar efectos tales como variación genética de la respuesta inmune, que no son fácilmente observables con antígenos naturales, por ser estas sustancias muy complejas". Por esta razón, a continuación se da una breve revisión de estos parámetros.

Estructura y Composición : A este respecto parece que lo importante es - que el hapteno presente un anillo en su estructura y por ello, entre los aminoácidos, son la tirosina y la fenilalanina los más usados. Los homopolímeros de alfa-amino-ácidos generalmente no son inmunogénicos, pero - los polímeros de dos aminoácidos si lo son en cuyes y conejos. Se han ob-tenido excelentes inmunógenos con polímeros constituidos por tres o cuatro aminoácidos (13). Ya hemos visto además, que al adicionar tirosina a gelatina aumenta la inmunogenicidad de ésta última.

Conformación Óptica y Estérica: Se ha reconocido que el arreglo espacial de las proteínas es importante para mantener la especificidad antigénica , pues las proteínas desnaturalizadas casi no reaccionan con anticuerpos de la proteína nativa. Se han realizado otros experimentos con antígenos sintéticos, que han llevado a la misma conclusión.(2)

Ya se mencionó el alto grado de especificidad de los anticuerpos en su reacción con antígenos ópticamente diferentes. En general, los polímeros de D-aminoácidos son menos inmunogénicos que sus correspondientes polímeros de L-aminoácidos. La unión de L-aminoácidos al exterior de una macromolécula sintética que consta de D-aminoácidos la convierte en un buen inmunógeno. A la inversa, una molécula compuesta de L-aminoácidos y rodeada de D-aminoácidos es un mal inmunógeno. Parece que este efecto se debe al metabolismo incompleto de éstos últimos, ya que su retención en el animal por largos periodos de tiempo resulta - en una pobre respuesta inmune (14).

Tamaño: Antes se pensaba que sustancias de peso molecular menor de 5-10 000 daltons no eran inmunogénicas. Esto parece ser cierto únicamente para los antígenos proteicos, pues otras moléculas de peso molecular tan bajo como 450 daltons (ver tabla 1.4) han demostrado ser inmunogénicas per se. Son capaces tanto de inducir la formación de anticuerpos como de provocar alteraciones en la reactividad celular.

Tabla 1.4 Inmunógenos de Peso Molecular Bajo (8).

| Inmunógeno | Peso Molecular | Especie Inmunizada |
|--|----------------|--------------------|
| poli-Glu ⁵⁰ -Ala ⁴⁰ -Tir ¹⁰ | 4000 | conejo |
| tri-dinitrofenil | | |
| bacitracina | 1928 | cuy |
| Angiotensina | 1031 | cuy |
| p-azobencenarzonato- | | |
| tri-L-tirosina | 750 | conejo, cuy |
| N-acetil-L-tirosina | 451 | cuy |

Forma Física: La forma física de un antígeno cuando se inyecta a un animal es sumamente importante en su inmunogenicidad. Las proteínas, los ácidos nucleicos, y los antígenos sintéticos tienen diferente inmunogenicidad cuando se presentan en la forma de agregados o en forma no agregada. En general, la formación de agregados en los antígenos proteicos aumenta su inmunogenicidad. Muchos antígenos son altamente inmunogénicos cuando se administran en adyuvante de Freund completo (una emulsión agua en aceite en la que está suspendido Mycobacterium tuberculosis muerto), o bien cuando son adsorbidos en precipitados de alúmina (15).

Los adyuvantes mantienen niveles efectivos y bajos de antígeno en los tejidos, provocando al mismo tiempo inflamación en el lugar de la inoculación, por lo que se acumulan macrófagos que unen antígeno para reaccionar con células B y T, iniciando así una efectiva respuesta inmune. (15).

Carga: Varios estudios han demostrado que la carga neta de antígenos sintéticos, que se ha variado sistemáticamente por alteraciones en su composición de aminoácidos, no es requerimiento esencial para la inmunogenicidad y que, dentro de ciertos límites, no afecta la cantidad de an-

tiuerpos producidos. Sin embargo, se sabe que moléculas excesivamente cargadas producen respuestas "pobres". Parece existir una relación inversa entre la carga neta de la molécula inmunogénica y la magnitud de la respuesta que produce. (13)

1.1.6 El Tamaño de la Determinante Antigénica.

El tamaño aproximado de la región antigénica que entra en combinación con el sitio de unión del anticuerpo (conocido como fragmente Fab), ha sido estimado por varios investigadores usando diferentes tipos de antígenos. En general, el método consiste en estimar el tamaño de la determinante antigénica inhibiendo el sitio de unión del anticuerpo con antígenos homólogos de peso molecular creciente. En la tabla 1.5 se exponen algunos de esos resultados.

Tabla 1.5 : Tamaño aproximado de la determinante antigénica. (8)

| Antígeno | Composición y Tamaño aprox. de la determinante (Å) | |
|---------------------------------|--|---------------|
| Dextrana | 6 residuos azúcares | 34 x 12 x 7 |
| Acido Nucleico | 4 ó 5 residuos purina o pirimidina | 15 x 20 |
| <u>Bacillus anthracis</u> | hexapeptido | 36 x 10 x 6 |
| poli-Ala-ASB | pentalanina | 25 x 11 x 6.5 |
| poli-lis-ASC | penta(hexa)lisina | 27 x 72 x 6.5 |
| poli-lis-fosforil-ASB | pentalisina | 27 x 17 x 6.5 |
| <hr/> | | |
| ASC- albúmina sérica de conejo. | | |
| ASB- albúmina sérica de bovino. | | |

1.1.7 Consideraciones Celulares.

Además de los aspectos moleculares que afectan la inmunogenicidad, se debe considerar el estado inmunológico del animal. Se sabe ahora que un animal genéticamente capaz de responder a un antígeno necesita tres tipos de células que cooperan para formar anticuerpos : 1) linfocitos timo dependientes (T), 2) linfocitos derivados de la médula ósea (B) y 3) macrófagos. Durante esta respuesta hay una fase en la cual el antígeno es reconocido por receptores en las células linfoides que son capaces de unirse específicamente a él.

Estas reacciones de cooperación y reconocimiento difieren de -

acuerde a la naturaleza del antígeno. Los linfocitos T, tienen la función de ayudar a la respuesta inmune al desencadenar la respuesta de los linfocitos B hacia el antígeno. Sin embargo, no todos los antígenos requieren estos efectos de ayuda de los linfocitos T, vgr., el lipopolisacárido de bacterias Gram negativas, el polisacárido del neumococo, etc. (8) Estos antígenos presentan determinantes antigénicos repetidos y se les conoce por ello como antígenos "timo-independientes". En cambio, los antígenos naturales requieren de esta ayuda y por ello se les llama "timo-dependientes". (15)

La presentación de un antígeno en forma libre de agregados, o en dosis muy elevadas, puede hacer que un animal que normalmente produce anticuerpo se vuelva tolerante hacia ese antígeno. Parece que los linfocitos T son responsables de este estado. Los mecanismos por los cuales las células son estimuladas a producir anticuerpos, o por el contrario a no presentar respuesta, son todavía un misterio.

1.2 COMPLEJOS ANTIGENICOS.

1.2.1 Aspectos Históricos.

Fue en 1917, cuando Landsteiner empezó a preparar lo que él llamó "antígenos conjugados artificiales para investigar una creencia o dogmática....., que era necesaria una constitución peculiar de las proteínas para la producción de anticuerpos". (9) Estos dos primeros conjugados proteicos los preparó mediante la acilación de los grupos amino de la albúmina sérica, con cloruros o anhídridos de ácidos butíricos, isobutíricos, mono, di y tricloroacéticos, etc. Landsteiner distinguió que la especificidad original del soporte proteico cambiaba por la introducción de nuevos grupos hapténicos. Por ello, para estar seguro de estar detectando anticuerpos contra el grupo hapténico, los probó con conjugados hechos con una proteína no relacionada u homóloga al animal inmunizado.

Landsteiner también determinó el número óptimo de haptenos necesarios para obtener la mejor respuesta inmune, y su conclusión fue que el hapteno en exceso o en defecto conducía a una respuesta inmune pobre. Para ASB (albúmina sérica de bovino) 10 grupos hapténicos fue el óptimo. (11)

Así, el trabajo de Landsteiner estableció la mayoría de las -

reglas del trabajo actual, y las contribuciones posteriores han sido - por lo general refinamientos de técnicas. Una excepción notable fue el desarrollo del radioinmunoanálisis por Yalow y Berson (16). Este procedimiento ha conducido a una expansión considerable de las técnicas inmunológicas, y a una creciente preocupación por entender mejor el problema de los haptenos y la formación de anticuerpos dirigidos contra ellos.

1.2.2 Elección del Soporte Proteico.

Los soportes proteicos utilizados en diferentes laboratorios - incluyen fracciones de globulinas, albúminas séricas de varias especies, hemocianina, ovalbúmina, tiroglobulina y fibrinógeno y se seleccionan en función a su disponibilidad, del hapteno que se desea acoplar, y del procedimiento que se planea utilizar. Se ha reportado que en general, los complejos hapteno-albúmina resultan más solubles que los de gamma-globulinas u ovalbúmina (17). Dichos complejos pueden ser utilizados para inmunización, pero presentan problemas para caracterizar el anticuerpo. Se recomienda como lo más adecuado contar con complejos insolubles para la inmunización (ver sección 1.1.5) y usar complejos solubles para caracterizar el anticuerpo.

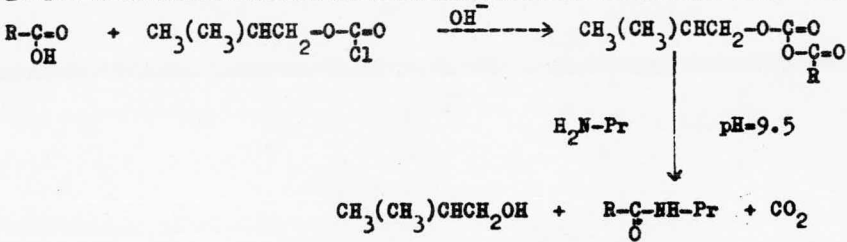
1.2.3 Haptenos con Grupo Carboxilo.

Esta clase de haptenos poseen un grupo carboxilo de manera natural, como por ejemplo los pequeños péptidos angiotensina y bradicinina, el ácido salicílico, la aspirina, etc. Otros haptenos tienen grupos activos a los cuales se puede unir un carboxilo, sin embargo para su comportamiento en las diferentes reacciones de acoplamiento en que intervienen los grupos carboxilo, esta diferencia no importa. A continuación se describen brevemente estas reacciones.

Método del Anhídrido Mixto: Se aprovecha para sintetizar uniones peptídicas (18). El procedimiento de reacción se lleva a cabo directamente con el hapteno, y se han logrado acoplar de 15 a 30 grupos hapténicos por molécula de albúmina. Algunos esteroides y otras hormonas como la tiroxina (19) han sido unidas por este procedimiento, el cual se ilustra en la figura 1.1

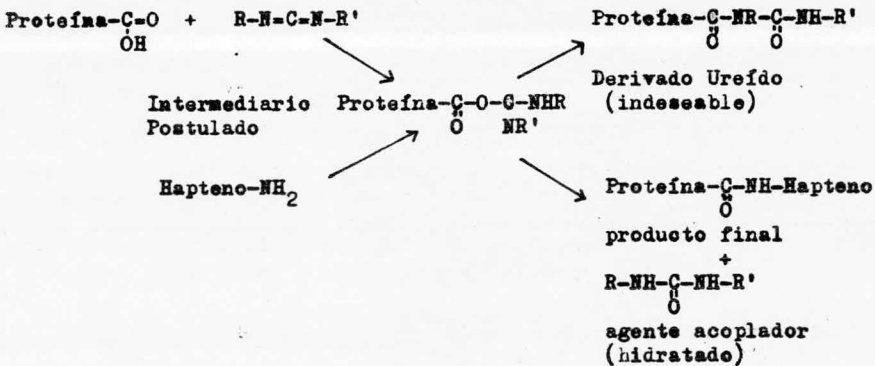
Método de las Carbodiimidias: Las carbodiimidias son compuestos recientemente sintetizados (20,21). Las carbodiimidias son capaces de acoplar muchos tipos de grupos funcionales, incluyendo ácidos carboxílicos, aminas,

Figura 1.1 Procedimiento del Anhidrido Mixto.



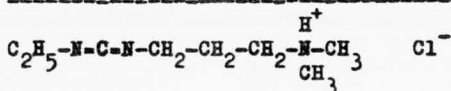
fosfatos, alcoholes, tioles, etc. (22,23) con la formación de amidas, ésteres, y demás. El acoplamiento probablemente se produce al menos en dos pasos, como se ilustra en la fig. 1.2, en donde se muestra la unión de un hapteno a un soporte proteico en las reacciones A y B por medio de un enlace amida. (23)

Figura 1.2 Mecanismo portulado de enlace hapteno-proteína por medio de carbodiimidas como agentes acopladores. (24)

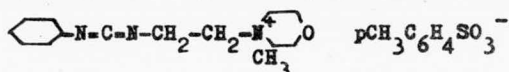


Las carbodiimidas pueden, además, unirse a grupos carboxilo y por rearrreglo, formar una urea estable N-sustituida. Esta adición al soporte proteico puede dar lugar a la producción de anticuerpos dirigidos contra estos grupos ureidos. Sin embargo, para minimizar las complicaciones de la formación de anticuerpos dirigidos contra ureas sustituidas, se pueden usar dos tipos de carbodiimidas solubles en agua, cuyas fórmulas se encuentran en la figura 1.3

Figura 1.3 Fórmulas estructurales de dos carbodiimidas hidrosolubles.



Clorhidrate de 1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)carbodiimida.
Comercialmente "Etil CDI" (Sigma Laboratories Inc.)



Meta-p-toluensulfonate de 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4)-etil) carbodiimida. Comercialmente "Morpho CDI" (Sigma Laboratories Inc.)

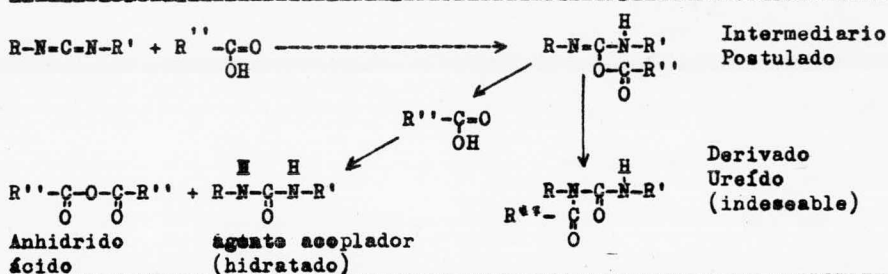
Existen además otros tipos de carbodiimidas liposolubles, lo cual proporciona al método gran versatilidad. En la figura 1.2, el lugar de la proteína lo puede tomar el hapteno y viceversa. Este hecho es importante, pues de esta manera el hapteno puede reaccionar por el grupo carboxilo o el amino y además, el derivado ureído se forma entonces con el hapteno, y por tener un peso molecular bajo, puede separarse fácilmente. El hapteno que haya reaccionado con la proteína de la manera deseada, quedará unido a ésta, y en esta forma se facilita la separación hapteno-ureído y complejo antigénico final proteína-hapteno. La separación se efectúa fácilmente por medio de diálisis.

Sin embargo, en muchos casos el derivado ureído no interfiere para los fines del anticuerpo que se persigue, y basta con minimizar su formación por rearrreglo controlando el pH de la reacción. De esta manera se obtienen mayores rendimientos (24).

Bajo condiciones adecuadas, se puede obtener un anhidrido ácido de la proteína, lo cual es conveniente pues se puede cristalizar y guardar para uso posterior. Esto equivale al primer paso de la reacción de la figura 1.3 El segundo paso se efectúa añadiendo el hapteno que se desea acoplar. Este procedimiento se ilustra en la figura 1.4

Un problema al usar este método es que las referencias en la literatura son muy contradictorias respecto a las condiciones físicas del acoplamiento (7,17,19,24,25,28,30,33,35,38,39,40,46), tales como temperatura, tiempo de la reacción, pH al cual se debe llevar a cabo, y las concentraciones de los reactivos que intervienen.

Figura 1.4 Formación del Anhidrido Acido (25).



R y R' representan grupos alquile. R''-COOH puede ser la proteína o el hapteno. Solamente el intermediario postulado y el anhidrido ácido (crystalizable) reaccionan con grupos amino para formar uniones peptídicas.

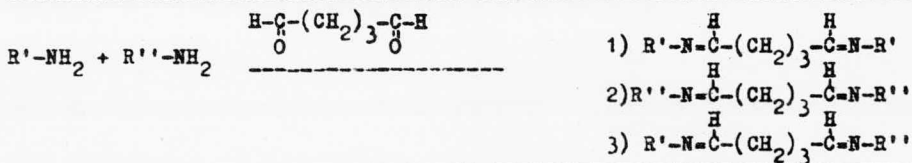
1.2.4 Haptenos con Grupos Amino.

Esta clase de haptenos puede subdividirse en haptenos con aminas aromáticas y aquellos con aminas alifáticas.

En el caso de las aminas aromáticas, el método más usado es la diazoación introducida por Landsteiner (9). En esta clase se incluyen también haptenos con grupo nitro aromático, los cuales se pueden reducir a grupos amino.

Las aminas alifáticas pueden acoplarse utilizando carbodiimidas (ver sección 1.2.3). Otro procedimiento consiste en convertirlas a p-nitro benzoilclorure. Los derivados amida pueden ser reducidos por catálisis reductiva, o por otros procedimientos, al derivado p-aminobenzoico, que puede ser unido a una proteína por diazoación (9). Uno de los métodos más utilizados es el del glutaraldehído, un reactivo bifuncional que forma bases de Schiff con grupos amino libres (26, 27). La reacción se ilustra en la figura 1.5

Figura 1.5: Reacción de acoplamiento para aminas primarias (glutaraldehído). Formación de tres productos principales.



De esta manera se han acoplado muchas sustancias, entre ellas Triyodotironina (T_3) por Nejad y col. (28). Su principal problema es la formación de dímeros y polímeros de proteína y hapteno, junto con la formación del producto deseado. Otra desventaja respecto al método de las carbodiimidas, es la formación de una base de Schiff en lugar de un enlace peptídico el cual se sabe que es más estable in vivo. Esto es importante cuando los haptenos acoplados son moléculas biológicamente activas, que pueden ocasionar problemas metabólicos en los animales que se pretenda inmunizar.

1.2.5 Especificidad.

Landsteiner estableció, en sus estudios preliminares, que la especificidad del anticuerpo se dirige principalmente a la porción del hapteno más alejada del grupo funcional que lo une al soporte proteico. Este hecho debe tenerse en cuenta cuando se trata de obtener un anticuerpo altamente específico, para uso en determinaciones en fluidos del organismo que contienen otras sustancias estructuralmente parecidas. El antígeno ideal será aquel en el que ninguno de los grupos estructuralmente importantes del hapteno se encuentren unidos a la proteína, sino expuestos. Una cadena de varios carbonos entre el soporte y el hapteno también conduce a una mayor especificidad (35).

1.3 CRITERIO DE SELECCION DE LA METODOLOGIA.

Como ya se mencionó anteriormente, el objeto de esta tesis es la preparación de un antígeno hapténico adecuado para obtener anticuerpo contra las hormonas tiroideas triyodotironina y tetrayodotironina, las cuales se derivan del aminoácido tirosina, con el cual comparten estructuras similares y solamente difieren en el número de yodos que contienen. Aunque posteriormente trataremos más a fondo sus características es por razones de su estructura por lo que se decidió utilizar carbodiimidas como agentes acopladores. Su empleo ofrece varias ventajas:

- a) Simplicidad. Es un método directo, no requiere mucho material y los reactivos se pueden obtener comercialmente.
- b) Permite el acoplamiento por el grupo amino del hapteno y el carboxilo de la proteína o viceversa. Este es un factor controlable para fines de especificidad.
- c) Las desventajas en cuanto a la formación de ureidos en nuestro caso -

no son importantes por no tener estructuras relacionadas que pudieran cruzar con el anticuerpo formado.

Como soporte proteico se decidió emplear la tiroglobulina humana por las siguientes razones:

- a) La facilidad de obtenerla en el laboratorio por fraccionamiento salino con sulfato de amonio del extracto tiroideo de glándulas obtenidas - post-mortem y posterior purificación por filtración molecular en gel de dextran. (32)
- b) Su peso molecular de 660,000 (29) que le confiere una antigenicidad muy elevada.
- c) Es la proteína "natural" de la que provienen las hormonas tiroideas. Por efecto de una proteasa, la T_3 y la T_4 son liberadas de la proteína. De hecho, la proteína ya contiene T_3 y T_4 unidas de manera natural. Con añadir otros grupos hapténicos se espera dirigir la respuesta inmune en la forma deseada.
- d) Skowsky y Fisher indican en su reporte (30) que la tiroglobulina es especialmente adecuada para inducir antigenicidad a moléculas pequeñas. Indican además, que Chopra, Nelson y Solomon (48) obtuvieron buenos resultados al usar tiroglobulina, a diferencia del caso al usar albúmina sérica bovina, en el cual no obtuvieron respuesta alguna.
- e) Normalmente, la tiroglobulina no se encuentra en la circulación, o se encuentra en muy poca cantidad, lo cual es una ventaja sobre la albúmina. Además, la tiroglobulina utilizada es humana, o sea de una especie alejada respecto a los animales inmunizados.

Por otra parte, un factor que motivó el empleo de este método - fue una experiencia previa con carbodiimidias en el acoplamiento de gastrina sintética con albúmina sérica bovina (hapteno-soporte respectivamente) para preparar un complejo que se usó como inmunógeno en otro estudio y que se describe en forma breve a continuación.

1.4 EXPERIENCIA PREVIA EN EL LABORATORIO DE LA CLINICA DE TIROIDES.

La gastrina es una molécula proteínica sintetizada en la cavidad gástrica. Consta de 17 aminoácidos y tiene un peso molecular de 2500 daltons (aprox.) (38). El fragmento activo es un pentapéptido de peso molecular 769.7. La gastrina empleada se obtuvo del equipo "Gastrodiagnost" que se usa en la Clínica para estimular la secreción de jugo gástrico;

su presentación es en ampollitas de 2 ml con 0.5 mg de pentagastrina. Como el volumen para tener 5.5 mg de pentagastrina sería muy grande para la reacción, se liofilizó el contenido de la ampollita por separado y el total se disolvió en N-N dimetilacetamida (0.6 ml). El pH de esta solución fue de 7.4 ; a esta solución se añadieron 7.32 mg de albúmina sérica bovina disuelta en 0.5 ml de amortiguador de fosfatos pH 7.4 y un exceso de agente acoplador, el clorhidrato de 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (100 mg) en 0.6 ml de amortiguador de fosfatos pH 7.4 0.01 mol/lt.

La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por un lapso de 24 horas, tiempo durante el cual se vuelve ligeramente opalescente. El conjugado se dializó durante 72 horas contra una solución 0.15 mol/l. de NaCl, 0.01 mol/l. de fosfatos, pH 7.4; el amortiguador de diálisis se comparó a un original, preparado de la misma manera para realizar pruebas presuntivas que evidenciaron la eficiencia de la unión. Se leyó la absorbancia a 280 nm del amortiguador de diálisis antes y después de realizada ésta. Conociendo el coeficiente de extinción molar de la pentagastrina (12 700), se puede calcular la cantidad de pentagastrina dializada y la diferencia representa la gastrina unida (más un poco de gastrina no unida y no dializada, dato que se obtiene de los controles realizados sin agente acoplador).

El rendimiento de la reacción por este método se calculó en un 33.8%, lo que representa la unión de 4.34 moles de pentagastrina por mol de albúmina.

Esquema de inmunización: Se utilizó un conejo macho Nueva Zelanda, joven adulto de 3 Kg. Se inyectó 1 ml de este antígeno hapténico cada tres días por vía subcutánea en múltiples sitios en el lomo, emulsificando el antígeno 1:1 en adyuvante de Freund completo por 18 días. Después se continuó el esquema con inoculaciones similares cada semana, y al mes se aplicaron refuerzos cada mes. Después de cinco meses de inmunización, el conejo presentó hipersensibilidad. En este punto, se sangró totalmente al animal por punción cardíaca, se separó el suero y se liofilizó. Este suero presentó banda en prueba de difusión de Ouchterlony contra la solución del conjugado, la albúmina sérica bovina y contra pentagastrina solamente.

II. MATERIALES Y METODOS

2.1 FUNDAMENTO DEL METODO

El objetivo consiste en obtener un antígeno artificial para preparar un complejo antigénico y con él inmunizar animales de laboratorio. Para ello, es necesario tomar en cuenta cuales son los factores experimentales críticos del procedimiento y diseñar además parámetros que permitan determinar el rendimiento y efectividad del procedimiento empleado.

2.1.1 Separación, Rendimiento y Purificación del Producto Final Deseado.

Nuestros haptenos, es decir, la T_3 y la T_4 , tienen pesos moleculares respectivamente de 673.0 y 798.9 daltons como sales sódicas (29). El soporte proteico que se decidió emplear es la tiroglobulina humana (660 000 daltons, aprox.) (32) por razones ya conocidas. El método de elección para separar sustancias de estos pesos moleculares tan diferentes es desde luego, la diálisis. A su vez, este método proporciona la ventaja de separar el producto final de los haptenos libres, que son dializables, pues los haptenos unidos al soporte proteico no lo son. El agente acoplador que se utiliza es el clorhidrato de 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, cuyas propiedades se han discutido anteriormente. El peso molecular de este compuesto es 191.5 (24), lo cual le hace fácilmente dializable. Esto nos permite eliminar además del exceso de hapteno que no reacciona, el agente acoplador, lo cual es necesario para terminar la reacción, y proporciona de esta manera el producto final purificado.

Las condiciones del método hacen necesario conocer las características técnicas de la membrana de diálisis. La empleada para estos experimentos tiene un límite de peso molecular dializable de 14 000 daltons. Además de tener en cuenta este dato, deben correrse controles de varios tipos: Control del soporte proteico y de hapteno sin catalizador (equivale al "daño" o unión inespecífica) y un control de hapteno solamente. En ambos casos teóricamente debe dializarse todo el hapteno.

Para determinar el rendimiento de la reacción, el método más exacto y conveniente para el laboratorio de la Clínica de Tirocoides es el usar una dilución isotópica del hapteno, ya que así, midiendo la radioactividad de la mezcla de reacción, se puede obtener una proporción porcen

tual con respecto a la radioactividad total utilizada, lo cual nos da directamente el % de unión de una cantidad conocida del hapteno (véase apéndice 1).

Las características generales de una dilución isotópica son: - Se compone de una porción mínima (en masa) de una sustancia químicamente pura, marcada radioactivamente (con algún isótopo radioactivo). Tiene además, una concentración conocida en masa de la misma sustancia químicamente pura no marcada. El comportamiento de la sustancia marcada y la no marcada es químicamente idéntico. El comportamiento biológico es también igual.

Sobre estas bases, se pueden mantener constantes unas variables mientras se estudian otras. Como ya se ha mencionado, las variables por estudiar son la temperatura, el pH, la concentración de hapteno y el tiempo de reacción.

2.1.2 Equipo:

En el presente caso, el equipo es relativamente complicado debido a la necesidad de usar radioactividad. Sin embargo no representó ningún problema para el desarrollo experimental debido a que el sitio de trabajo contaba ya con todo lo indispensable.

Potenciómetro: Es necesario conocer el pH de la mezcla de reacción, por ello se requiere un potenciómetro de preferencia con un microelectrodo integrado, que incorpora el electrodo de referencia y el indicador en uno solo.

Incubador con agitación: Se precisa contar con un incubador del tipo "Dubonof" que permite regular y mantener estable en un intervalo determinado la temperatura y la agitación de la mezcla de reacción.

Agitador "Vortex" : Necesario para la agitación homogénea.

Contador de Centelleo para Radiaciones Gamma: Este es sin duda el equipo más sofisticado que requiere la presente técnica. Tiene un cristal de yoduro de sodio activado por lo general con yoduro de talio (36) y que presenta un orificio central por el cual se introduce la muestra. En esta forma se logra un máximo de eficiencia en el conteo por razones de geometría.

Agitadores Magnéticos : Para efectuar la diálisis.

2.1.3 Material.

Material de vidriería: Se requiere de pequeño volumen. Tubos de ensayo de 13 x 100 son adecuados. No se necesita de ningún requisito en especial, a no ser el contar con personal adiestrado en el lavado de material radioactivo. Se usan además micropipetas, y vasos de precipitado de tamaño grande (1000 ml). En realidad el laboratorio convencional cuenta con todo lo indispensable.

Tubo de diálisis: Se prefiere de 2.5 cm de diámetro; en cada muestra se usan tramos de 5 cm.

2.1.4 Reactivos :

Clorhidrato de 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; obtenida de laboratorios Sigma (USA).

3,5,3' Triyodotironina en sal sódica Sigma (USA).

3,5,3',5' Tetrayodotironina en sal sódica, Sigma (USA).

N-N dimetilformamida como solvente orgánico para la T₃ y la T₄ obtenida de Laboratorios Merck.

Fosfato Monobásico de Potasio (Merck).

Fosfato Dibásico de Potasio (Merck).

Cloruro de Sodio Q.P. (Baker).

Hidróxido de Sodio (Merck).

Acido Acético (Baker).

Reactivos Radioactivos :

Triomet (¹²⁵I-T₃) Abbott.

Tetramet (¹²⁵I-T₄) Abbott.

Reactivos Biológicos.

Tiroglobulina Humana: Obtenida en el laboratorio de la Clínica de Tiroideas por Mora, R. (32), por técnicas de precipitación salina y filtración molecular por Sephadex G-200. El material se extrajo a partir de glándulas tiroideas humanas obtenidas por necropsias, las cuales fueron proporcionadas por el Departamento de Patología del I.N.N.

2.2 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA TÉCNICA.

- 1) Se pesan las cantidades deseadas de soporte proteico y agente acoplador y se disuelven en un volumen conocido de solución salina isotónica - amortiguada al pH que se desea estudiar. Para ajustar el pH se puede hacer con ácido acético al 3%, debido a que el pH sin ajustar es alcalino.
- 2) Para preparar la dilución isotópica se calcula un volumen de hormona

marcada para ajustar a unos 2500 pg. (\pm 10 microlitros). Se añade a 1.0 ml de N-N dimetilformamida. Se pesa la cantidad deseada de hapteno "Merie" "frío" (sin marca) y se solubiliza también. Esta solución se protege de la luz.

3) Se fija la temperatura del baño incubador a la que se desea llevar a cabo la reacción, y se procede a añadir la solución del hapteno a la de soporte-catalizador, gota a gota, agitando en el Vortex después de cada gota. Cuando se termina dicha operación se ajusta rápidamente el pH que se desea estudiar y la mezcla de reacción se coloca en el baño incubador con agitación. Nuevamente se puede ajustar el pH con ácido acético al 3%. Se protege la mezcla de reacción de la luz, debido a la fotosensibilidad del intermediario (24).

4) El tiempo de incubación depende del estudio que se esté llevando a cabo.

5) Al terminar el tiempo de incubación se transfiere la mezcla de reacción a un tubo de diálisis, y se dializa exhaustivamente contra solución salina amortiguada al mismo pH de la mezcla de reacción. Dializar "exhaustivamente" implica realizar el proceso al menos durante 24 horas, contra un volumen al menos 100 veces mayor que la mezcla de reacción.

6) Se separa la bolsa de diálisis que contiene la mezcla de reacción del amortiguador de diálisis, y se cuenta el contenido de radioactividad en ambos compartimientos. Para esto, como ya se ha mencionado, se ha utilizado una dilución isotópica del hapteno. La comparación del contenido de radioactividad de la mezcla de reacción con el líquido exterior de diálisis nos da un valor en % de hormona incorporada al soporte proteico, y de hormona libre, lo cual se grafica contra la condición física estudiada. (véase apéndice 1).

7) Se repite el experimento un número de veces adecuado dependiendo de los valores que se obtengan; si éstos son bastante constantes, pocas veces bastan, pero si varían mucho, se repiten más veces para tener un valor estadístico significativo. Los resultados y sus interpretaciones se discuten en el capítulo de resultados.

2.2.1 Métodos Opcionales.

El problema fundamental de la presente técnica reside en determinar de manera confiable la cantidad de hapteno unido al soporte protei

co, lo que significa disponer o diseñar un método que permita detectar pequeñas cantidades de hapteno en el amortiguador de diálisis, ya que - generalmente se requiere detectar miligramos de éste en 250 ml (o más) de amortiguador de diálisis.

Es claro que el método presentado anteriormente usando radioactividad es con mucho el más confiable, pero en el caso de no disponer del hapteno marcado o bien de contar con las facilidades de trabajo de isótopos radioactivos, se deben considerar métodos opcionales como son: Espectrofotométrico: Por este método se puede determinar la concentración de las hormonas tiroideas T_3 y T_4 a longitudes de onda de 319 y 333 nm respectivamente (34). Este es el método de elección cuando no se dispone del equipo indispensable para efectuar el estudio por medio de radioactividad. El tratamiento estadístico a partir de este momento es similar.

Cuantificación del contenido de yodo. Este método es poco sensible, por lo que se haría necesario concentrar las hormonas en el líquido de diálisis, lo que puede realizarse por cromatografía por exclusión molecular o bien por cromatografía de afinidad. Después se procedería a determinar el contenido de yodo. Este método tiene muchos problemas, por lo tardado de la técnica y sobretodo por lo poco confiable de los datos obtenidos.

2.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTALES.

1) En todos los experimentos se utilizaron cantidades constantes de soporte proteico y de agente acoplador. Las cantidades que se pesan de tiroglobulina son de 10 mg y se hacen reaccionar con 30 mg de etil carbodiimida, disolviéndose en 1.5 ml de solución salina pH 5.6. No se requiere un sistema amortiguador especial por las propiedades amortiguadoras de la tiroglobulina. Posteriormente ajustaremos el pH a la mezcla de reacción. De esta manera se empieza a llevar a cabo el primer paso de la reacción de acoplamiento al activar el catalizador los grupos carboxilo expuestos de la tiroglobulina formándose el intermediario postulado.

2) Se pesan las cantidades por estudiar del hapteno, el cual se solubiliza en 1.0 ml de N-N dimetilformamida (ver preparación de la dilución isotópica sección 2.2) Las cantidades estudiadas de T_3 fueron 3.62 mg, 8.15 mg, 16.315 mg y 32.62 mg.

3) En este caso y en los restantes se fijó por conveniencia la tempera -

tura del baño incubador a 25°C, el pH se ajustó a 5.6 según un reporte previo (39), y el tiempo de incubación fue de 24 horas con agitación - continua.

4) Después de este tiempo de incubación las muestras, cada una por du - plicado, se dializan contra 250 ml de amortiguador de fosfatos 0.01 - mol/l, pH 5.6 en solución salina isotónica, guardando los amortiguado - res de diálisis de cada baño. El tiempo de diálisis se fijó con experi - mentos previos con dilución isotópica del hapteno exclusivamente y se en - contró suficiente un tiempo de 24 horas.

5) Se cuenta la radioactividad y se miden y grafican los resultados.

2.3.1 Observaciones Especiales Sobre Cada Curva.

Triyodotironina:

1) Curva de concentración: Temperatura de 25°C, pH de 5.6, Tiempo de in - cubación de 24 horas (se ensayaron 3.26 mg, 8.15 mg, 16.315 mg, y 24.47 mg de T₃).

2) Curva de Tiempo: Temperatura de 25°C, pH de 5.6, concentración del - hapteno de 16.315 mg.

3) Curva de pH: Temperatura de 25°C, Tiempo de incubación de 30', concen - tración del hapteno de 16.315 mg.

4) Curva de Temperatura : Concentración del hapteno de 16.315 mg, Tiempo de incubación de 30' y pH de 5.6

En todo el estudio de la cinética del acoplamiento TgH-T₃, se utilizaron cantidades constantes de tiroglobulina humana (10 mg) y de - agente acoplador etil carbodiimida (30 mg).

5) Efecto del agente acoplador: Concentración de hapteno de 16.315 mg, - Tiempo de incubación de 30', Temperatura de 25°C, pH de 5.6 . Concentra - ciones de agente acoplader ensayadas de 3 mg a 30 mg.

Tetrayodotironina :

1') Curva de Concentración : Temperatura de 45°C, pH de 5.6, Tiempo de incubación de 30', concentraciones de T₄ ensayadas de 3 a 25 mg.

2') Curva de Tiempo : Temperatura de 45°C, pH de 5.6, Concentración del hapteno de 10 mg.

3') Curva de pH: Temperatura de 45°C, Concentración del hapteno 10 mg, - Tiempo de incubación de 30'.

4') Curva de Temperatura:Concentración del hapteno de 10 mg, Tiempo de -

incubación de 30', pH de 5.6

En todo el estudio de la cinética de acoplamiento TgH-T₄, se utilizaron cantidades constantes de tiroglobulina humana (10 mg) y de agente acoplador etil carbodiimida (30 mg).

5') Efecto del agente acoplador: Concentración del hapteno 10 mg, pH de 5.6, Temperatura de 45°C, Tiempo de incubación de 30'. Concentraciones del agente acoplador estudiadas de 2.4 a 25 mg.

Excepción hecha de las curvas del agente acoplador que se realizaron al final, se siguió este orden en la metodología, empleando concentraciones constantes de tiroglobulina y agente acoplador porque no son unos reactivos tan difíciles de conseguir en comparación con los haptenos. Por ello, se consideró aprovechar al máximo las hormonas principalmente. La concentración del soporte proteico, 10 mg, se eligió por ser similar a la concentración molar de albúmina sérica bovina que se emplea comúnmente en estos casos. El hecho de usar 30 mg de agente acoplador fue siguiendo un criterio de usar un exceso.

2.4 CRITERIOS DE CONTROL.

Una vez realizada la optimización de la reacción, tenemos un producto del cual debemos saber su composición y estabilidad. Un problema que se debe conocer es la posible formación de complejos poli-hapténicos (33,35). Para ello, se incubó el hapteno con el agente acoplador (cantidades óptimas encontradas) para determinar si es posible formar un "poli-aminoácido" que no sea dializable. Se empleó el tubo de diálisis utilizado en los otros experimentos, de límite de poro de 14 000 daltons.

Otro experimento útil es correr cromatografía en capa fina, para lo que se necesita para el sistema de aminoácidos en el presente trabajo:

Butanol

Acetato de etilo

Acido acético

Revelador Ninhidrina

El único material necesario es una cámara de cromatografía, y un atomizador para el revelador. Las placas de cromatografía se pueden obtener comercialmente (Kodak), de preferencia sin indicador fluorescen-

te para poder detectar manchas bajo luz ultravioleta.

2.4.1 Estabilidad del Producto Obtenido.

Se estudia la estabilidad debido a que los haptenos aquí utilizados son hormonas tiroideas, y como tales, biológicamente activas. Su concentración en el suero de mamíferos determina tres estados: hipertiroidismo, eutiroidismo e hipotiroidismo (29,43). Es comprensible entonces que la importancia que tiene la estabilidad del complejo "in vivo". Aun pequeñas cantidades liberadas del complejo son capaces de causar problemas metabólicos al animal que se utiliza para inmunización. (44) De aquí que se haya considerado pertinente efectuar los siguientes experimentos:

1) Estabilidad del complejo con el tiempo. Se estudia la estabilidad del complejo por medio de diálisis a intervalos de 3 días estimando la cantidad de radioactividad liberada por éste, haciendo la corrección adecuada respecto a la vida media del isótopo utilizado (^{125}I) cuya actividad se encuentra en la figura 2.4.1:

Figura 2.4.1 Estado de Actividad del isótopo ^{125}I con el tiempo.

| Días transcurridos | Actividad | Días transcurridos | Actividad |
|--------------------|-----------|--------------------|-----------|
| 0 | 100% | 33 | 68.3% |
| 3 | 96.6% | 36 | 66.0% |
| 6 | 93.3% | 39 | 63.7% |
| 9 | 90.1% | 42 | 61.6% |
| 12 | 87.1% | 45 | 59.5% |
| 15 | 84.1% | 48 | 57.4% |
| 18 | 81.2% | 51 | 55.5% |
| 21 | 78.5% | 54 | 53.6% |
| 24 | 75.8% | 57 | 51.8% |
| 27 | 72.4% | 59 | 50.6% |
| 30 | 70.7% | 60 | 50.0% |

2) Estabilidad del Complejo en Condiciones Simuladas "in vivo". Complejos antigénicos obtenidos bajo condiciones óptimas de rendimiento se incuban una semana en suero de conejo normal (no inmunizado), pH 7.2, volumen 1:1 (suero de conejo:complejo antigénico) en presencia de un exceso de ANS (ácido amino naftol sulfónico) como bloqueador de las proteí-

nas transportadoras de T_3 y T_4 presentes en el suero del conejo. Concentración de ANS de 10 mg/ml. (28) Se añade como conservador timerosal al 0.1% y se incuba a 37°C. Al cabo de una semana se dializa exhaustivamente contra amortiguador de fosfatos 0.01 mol/l pH 7.2 Se incuba una semana por considerar un tiempo suficiente para que actúen los macrófagos - sobre el antígeno.

3) Estabilidad del Complejo Liofilizado: El complejo obtenido de experimentos realizados bajo condiciones de óptimo rendimiento se liofiliza, y se incuba posteriormente de ser reconstituido en solución salina en condiciones idénticas al experimento anterior "in vivo".

Reactivos para los experimentos de estabilidad:

Complejos antigénicos obtenidos bajo condiciones óptimas.

Suero de conejo normal.

ácido amino naftalen sulfónico.

timerosal (merthiolate).

fosfato monobásico de potasio.

fosfato dibásico de potasio.

Material requerido:

El de vidrio descrito anteriormente.

agitadores magnéticos.

termómetro y parrilla eléctrica.

liofilizadora.

contador de centelleo para radiaciones gamma.

III. RESULTADOS

3.1 CONSIDERACIONES GENERALES.

Antes de pasar a exponer los resultados obtenidos se considera conveniente aclarar algunos puntos esenciales para su correcta interpretación y que se encuentran desarrollados en forma más amplia en los apéndices 1 y 2.

a) Tratamiento Estadístico de los Datos. Esto es muy importante, ya que se debe tener en cuenta que el uso de técnicas de conteo radioactivo - (ver sección 2.1.1.) así lo exige. Las curvas obtenidas representan el - promedio + dos desviaciones estándares. ($\bar{x} \pm 2 \text{ d.e.}$). Sin embargo, en algunos experimentos se obtuvieron datos que se encontraban alejados de la media, lo cual hacía suponer que se trataba de una falla experimental y no tanto de un fenómeno real. Para considerar esos casos, se recurrió a criterios estadísticos que permitan eliminar, basados en probabilidad de error experimental, esos datos "incongruentes". Para ello, se utilizó el criterio de Chauvenet (31), cuyo fundamento y desarrollo, junto con un ejemplo, se desglosan en el apéndice 2.

b) Sistemas estadísticos integrados al contador de centelleo gamma. En general el aparato está equipado con un sistema de "discriminación" de - impulsos contables, registrando solamente aquellos que caen dentro de un margen de energía preprogramable para cada radioisótopo en particular. - Los discriminadores reciben la señal, que en el caso que sea energéticamente similar en los dos y sea recibida en un intervalo de tiempo dado - (comúnmente este lapso es de 60×10^{-4} segundos)(36), será transmitida a la "lógica" del aparato. Esta subunidad consiste en un sistema de computación de señales que las trata de acuerdo a sistemas estadísticos definidos (existen dispositivos preprogramables, basados en criterios estadísticos conocidos como distribuciones de Poisson) y las transmite al circuito contador del canal correspondiente del aparato. De la eficiencia del sistema anteriormente descrito depende la eficiencia de conteo de un aparato dado. En el caso particular del aparato utilizado, el auto-gamma scintillation spectrophotometer (Packard), la eficiencia estimada en experimentos control fue del 62% aproximadamente, comparado con - una eficiencia total teórica del 100% al contar un isótopo de actividad específica y masa conocida.(37) Lo más importante en este caso, es que -

la eficiencia del aparato sea constante.

c) Límite de Detección del Aparato. Este se calcula estimativamente como el doble de la radioactividad de "fondo" del aparato, o sea, la radioactividad del ambiente cuando el aparato cuenta vacío. Por ello, cuando en un experimento la radioactividad es muy baja (caso que se podría presentar al contar alcuotas del amortiguador de diálisis), un sólo conteo no se puede tomar como dato fidedigno, y exige que se repita mínimo 4 veces. Todos los datos que componen las curvas cumplen con estos requisitos.

3.2 ACOPLAMIENTO DE LA TRIYODOTIRONINA.

Todos los experimentos de la cinética de acoplamiento de triyodotironina a tiroglobulina humana tienen las siguientes características comunes:

- a) Todos ellos fueron contados en el mismo aparato y bajo condiciones idénticas.
- b) Los reactivos químicos y biológicos fueron de un mismo lote.
- c) Como la hormona marcada ($^{125}\text{I}-\text{T}_3$) tiene una vida media de 45 días, se utilizaron lotes diferentes de la hormona para la dilución isotópica. En la curva de concentración y en la de tiempo, se empleó hormona de un mismo lote (ac. específica 253 uCi/ug). En la curva de pH y en la de temperatura se utilizó otro lote (ac. específica 225 uCi/ug).

3.2.1 Concentración de T_3 y Rendimiento de la Reacción.

Las cantidades de T_3 ensayadas fueron 3.26 mg, 8.15 mg, 16.31 mg y 24.47 mg que en radio molar representan 320,800, 1600 y 2400 moles por mol de tiroglobulina, respectivamente, basadas en el peso molecular de la T_3 como sal sódica de 673.0 y de 660 000 para la tiroglobulina humana.

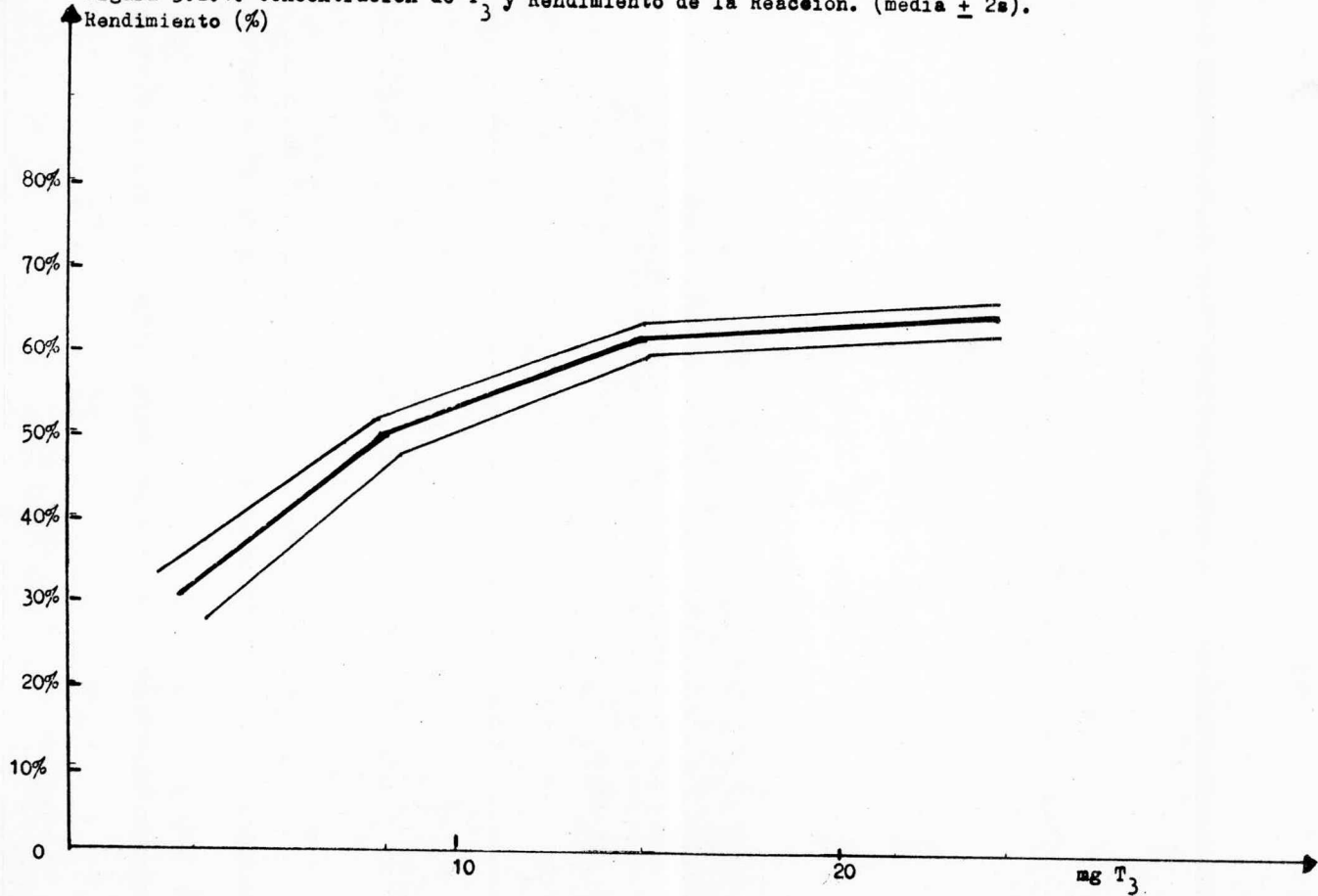
En la tabla 3.2.1 se han agrupado los resultados observados para cada concentración de hapteno ensayada. Cada observación fue realizada por duplicado y se realizaron un total de 6 experimentos para cada concentración.

Utilizando los promedios $\pm/2$ d.e. se puede construir una gráfica en la que se representa el efecto que ejerce sobre el rendimiento de la reacción el incrementar la concentración de hapteno (figura 3.2.1) La curva exhibe una meseta lo cual sugiere saturación de la proteína, es de

Tabla 3.2.1 :Concentración de T_3 y Rendimiento de la Reacción.

| Cono. T_3 (mg) | % Rendimiento | \bar{x} | s | 2s |
|------------------|---------------|-----------|------------|------------|
| 3.26 | 32.97% | 32.31% | ± 2.90 | ± 5.80 |
| | 29.3% | | | |
| | 33.1% | | | |
| | 31.4% | | | |
| | 37.3% | | | |
| | 29.8% | | | |
| 8.15 | 52.49% | 50.42% | ± 2.1 | ± 4.2 |
| | 48.3% | | | |
| | 48.45% | | | |
| | 49.6% | | | |
| | 53.3% | | | |
| | 50.4% | | | |
| 16.315 | 63.99% | 63.99% | ± 1.49 | ± 2.98 |
| | 64.90% | | | |
| | 65.23% | | | |
| | 61.93% | | | |
| | 62.99% | | | |
| | 63.96% | | | |
| 24.472 | 63.36% | 63.66% | ± 1.46 | ± 2.92 |
| | 62.97% | | | |
| | 64.39% | | | |
| | 66.30% | | | |
| | 62.10% | | | |
| | 62.66% | | | |

Figura 3.2.1. Concentración de T_3 y Rendimiento de la Reacción. (media \pm 2s).



cir, el rendimiento de la reacción parece no aumentar bajo las condiciones analizadas más allá de cierto límite. Sin embargo, ello no quiere decir que la reacción termine. Un análisis a fondo de este fenómeno, que sin duda es el más interesante de todo el estudio se encuentra en el capítulo de discusión.

3.2.2 Tiempo de incubación y Rendimiento de la Reacción.

El interés por determinar el efecto de esta variable deriva esencialmente de que la mayoría de los trabajos publicados (33,7,38) emplean tiempos de reacción hasta de 24 horas, mientras que la publicación original sobre el método sugiere que un tiempo de incubación de 30 minutos es suficiente (24).

Se estudió el tiempo de incubación utilizando la concentración de T_3 de 16.31 mg, pues es el punto que sugiere una meseta del rendimiento. La temperatura se mantuvo fija a 25°C y el pH a 5.6; los tiempos de incubación analizados fueron : 15, 30, 60 y 120 minutos. Los datos de la reacción a las 24 horas se tomaron de la curva de concentración (Tabla 3.2.1.) por tener las mismas condiciones experimentales para una concentración de 16.31 mg de T_3 .

En la tabla 3.2.2. se han agrupado los resultados obtenidos de la influencia del tiempo de incubación en el rendimiento de la reacción. Cada observación fue realizada por duplicado y el total de experimentos realizados fue 6 para cada tiempo de incubación ensayado (pag.34)

Se observa claramente en la figura 3.2.2. que ilustra la influencia del tiempo de incubación sobre el rendimiento de la reacción, que después de 30 minutos de incubación el rendimiento virtualmente no aumenta, disminuyendo únicamente la desviación estándar por pequeño margen. Este resultado implica que basta con 30 minutos de incubación como recomienda la primera referencia publicada de este método de acoplamiento (24).

3.2.3. Efecto del pH en el Rendimiento de la Reacción.

Para analizar el efecto del pH sobre el rendimiento de la reacción, se utilizaron en todos los experimentos las variables óptimas encontradas hasta ahora. Es decir, la concentración de hapteno fue de 16.3 mg, el tiempo de reacción fue de 30 minutos y la temperatura se mantuvo a 25°C. Los valores de pH de la reacción se estudiaron de 5.0 a 8.4; es

Tabla 3.2.2. Tiempo de Incubación y Rendimiento de la Reacción TgH-T₃

| Tiempo | % Rendimiento | \bar{x} | s | 2s |
|-------------|---------------|-----------|--------|--------|
| 15 minutos | 37.33% | 39.88% | ± 1.91 | ± 3.82 |
| | 42.50% | | | |
| | 41.30% | | | |
| | 40.50% | | | |
| | 38.30% | | | |
| | 39.40% | | | |
| 30 minutos | 62.18% | 62.28% | ± 2.07 | ± 4.14 |
| | 60.30% | | | |
| | 64.30% | | | |
| | 65.20% | | | |
| | 60.22% | | | |
| | 61.5% | | | |
| 60 minutos | 55.87% | 58.425% | ± 1.93 | ± 3.86 |
| | 57.63% | | | |
| | 58.49% | | | |
| | 59.63% | | | |
| | 57.49% | | | |
| | 61.44% | | | |
| 120 minutos | 64.98% | 63.99% | ± 3.68 | ± 7.36 |
| | 60.55% | | | |
| | 67.33% | | | |
| | 58.30% | | | |
| | 66.45% | | | |
| | 66.33% | | | |

Figura 3.2.2. Tiempo de Incubación y Rendimiento de la Reacción TgH-T₃ (media ± 2s).

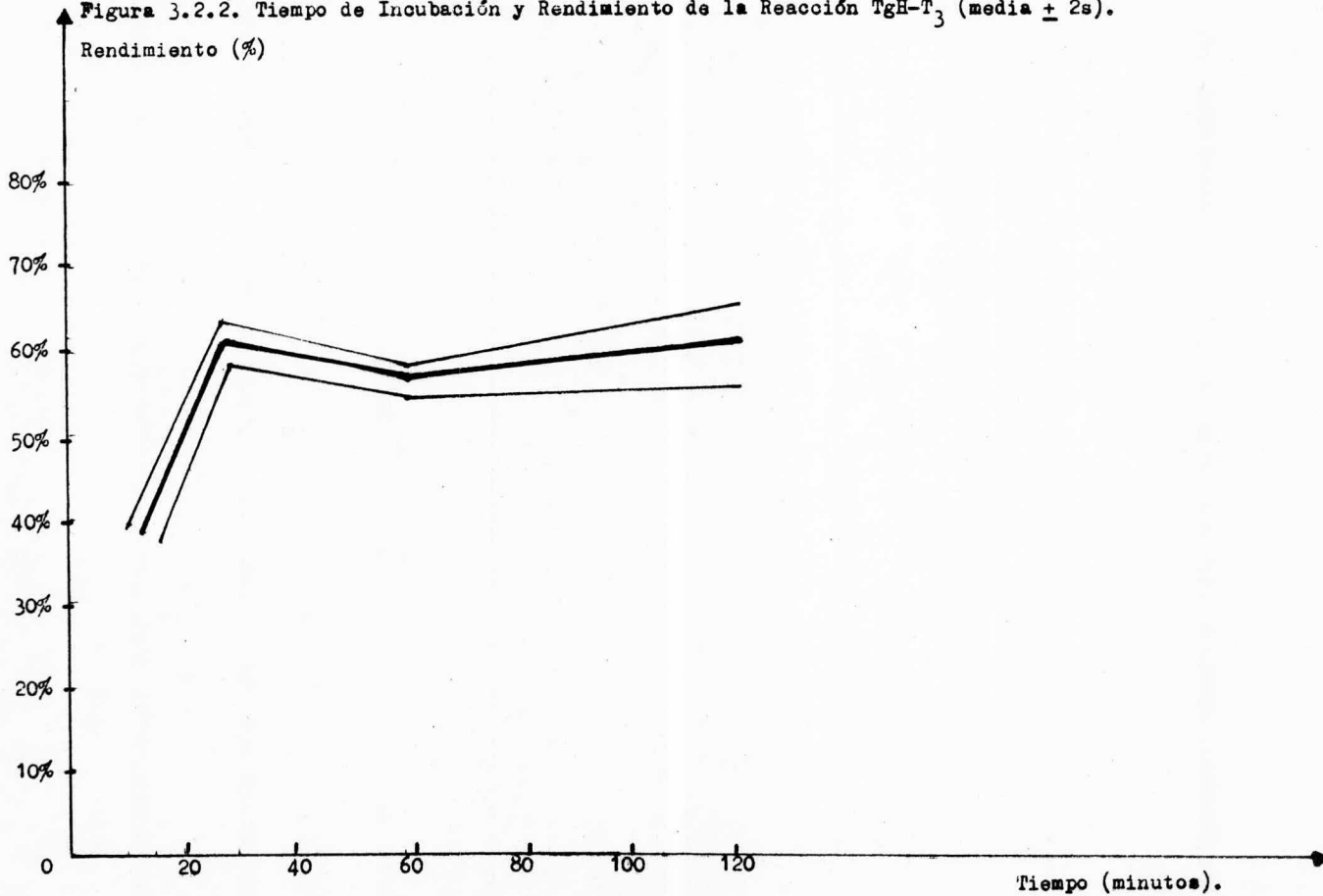
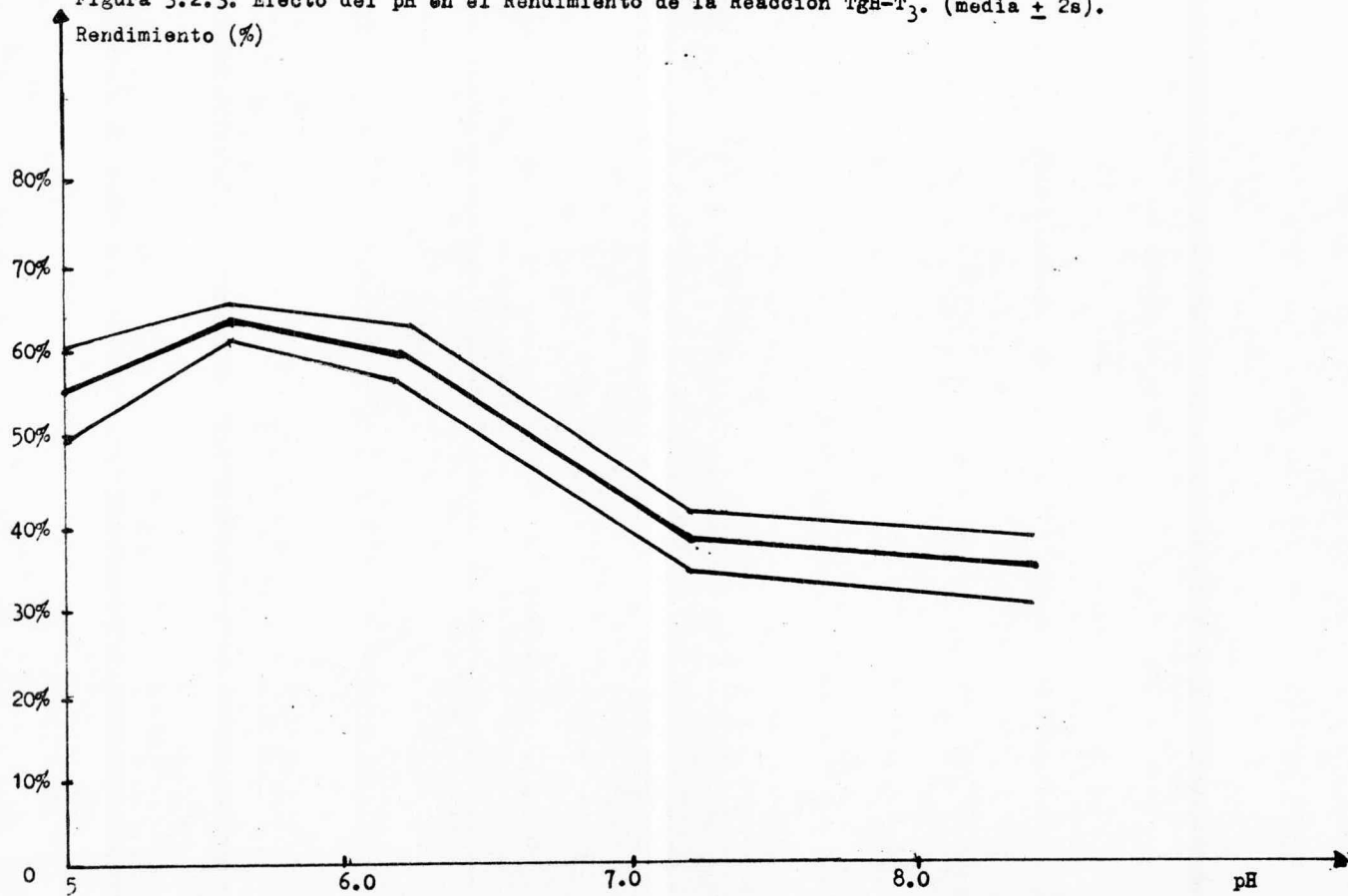


Tabla 3.2.3 Efecto del pH en el Rendimiento de la Reacción TgH-T₃.

| pH | % Rendimiento | \bar{x} | σ | 2σ |
|-----|---------------|-----------|------------|--------------|
| 5.0 | 50.70% | 54.80% | ± 4.04 | ± 8.08 |
| | 54.76% | | | |
| | 53.45% | | | |
| | 60.30% | | | |
| 5.6 | 64.67% | 64.69% | ± 1.77 | ± 3.54 |
| | 65.30% | | | |
| | 66.50% | | | |
| | 62.30% | | | |
| 6.2 | 63.13% | 60.5% | ± 2.88 | ± 5.76 |
| | 57.20% | | | |
| | 59.05% | | | |
| | 62.73% | | | |
| 7.2 | 40.10% | 40.23% | ± 2.75 | ± 5.5 |
| | 36.40% | | | |
| | 41.90% | | | |
| | 42.50% | | | |
| 8.4 | 41.97% | 36.92% | ± 3.46 | $\pm 6.92\%$ |
| | 35.20% | | | |
| | 36.20% | | | |
| | 34.30% | | | |

Figura 3.2.3. Efecto del pH en el Rendimiento de la Reacción TgH-T₃. (media ± 2s).



muy importante ajustar el pH de la reacción con cuidado ya que el punto isoelectrónico de la tiroglobulina humana es de 4.74 (32).

Los resultados obtenidos se ilustran en la figura 3.2.3 y se encuentran en la tabla 3.2.3; en este caso el número de experimentos realizados para cada valor de pH (cada uno por duplicado) fue de cuatro. La curva nos recuerda una actividad enzimática en función del pH. Es claro que el óptimo de la reacción es a pH 5.6

3.2.4. Temperatura y Rendimiento de la Reacción.

Para estudiar esta variable, se decidió utilizar intervalos entre los 4° y los 45°C, pues a temperaturas mayores se corre el riesgo de desnaturar la proteína. Se usaron las mismas condiciones, con pH de 5.6; la tabla 3.2.4 muestra los resultados obtenidos.

En la gráfica obtenida al graficar los resultados (figura 3.2.4.) se observa que el incremento de la temperatura aumenta el rendimiento de la reacción, fenómeno que de nueva cuenta nos recuerda una actividad enzimática como se ilustran en función de la temperatura.

3.2.5 Concentración de Etil Carbodiimida y Rendimiento de la Reacción.

De acuerdo a los informes publicados (33,7,38,39) todas las reacciones de acoplamiento hapteno-Tgh anteriores se realizaron utilizando de 30 mg de etil carbodiimida; sin embargo, es muy importante para conservar reactivos y economizar en el proceso conocer la concentración mínima necesaria de carbodiimida con la cual se lleva a cabo la reacción. El agente acoplador es el clorhidrato de 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, que tiene un peso molecular de 191.5 (24); eso quiere decir que podemos calcular y expresar la concentración ensayada en moles de agente acoplador por mol de hapteno, por esta razón se decidió determinar que influencia tiene un exceso en la reacción.

Las cantidades de carbodiimida estudiadas fueron 2.4 mg, 12 mg, 24 mg y 36 mg, donde las relaciones molares carbodiimida: hapteno son 1:1, 5:1, 10:1, y 15:1 respectivamente. Todas las curvas se realizaron bajo las siguientes condiciones:

- a) Para Triyodotironina, 16.31 mg.
- b) pH 5.6
- c) Temperatura 45°C.
- d) Tiempo de incubación de 30 minutos.

Tabla 3.2.4. Temperatura y Rendimiento de la Reacción TgH-T₃.

| Temperatura (°C) | % Rendimiento | \bar{x} | σ | 2σ |
|------------------|---------------|-----------|----------|-----------|
| 4°C | 62.43% | 61.26% | ± 2.68 | ± 5.36 |
| | 60.13% | | | |
| | 58.20% | | | |
| | 64.30% | | | |
| 25°C | 58.97% | 63.22% | ± 2.97 | ± 5.94 |
| | 63.71% | | | |
| | 64.39% | | | |
| | 65.82% | | | |
| 37°C | 73.97% | 70.6% | ± 2.27 | ± 4.54 |
| | 69.86% | | | |
| | 68.16% | | | |
| | 70.87% | | | |
| 45°C | 68.93% | 72.98% | ± 2.87 | ± 5.74 |
| | 74.59% | | | |
| | 75.38% | | | |
| | 73.03% | | | |

Figura 3.2.4. Temperatura y Rendimiento de la Reacción TgH-T₃. (media \pm 2s)

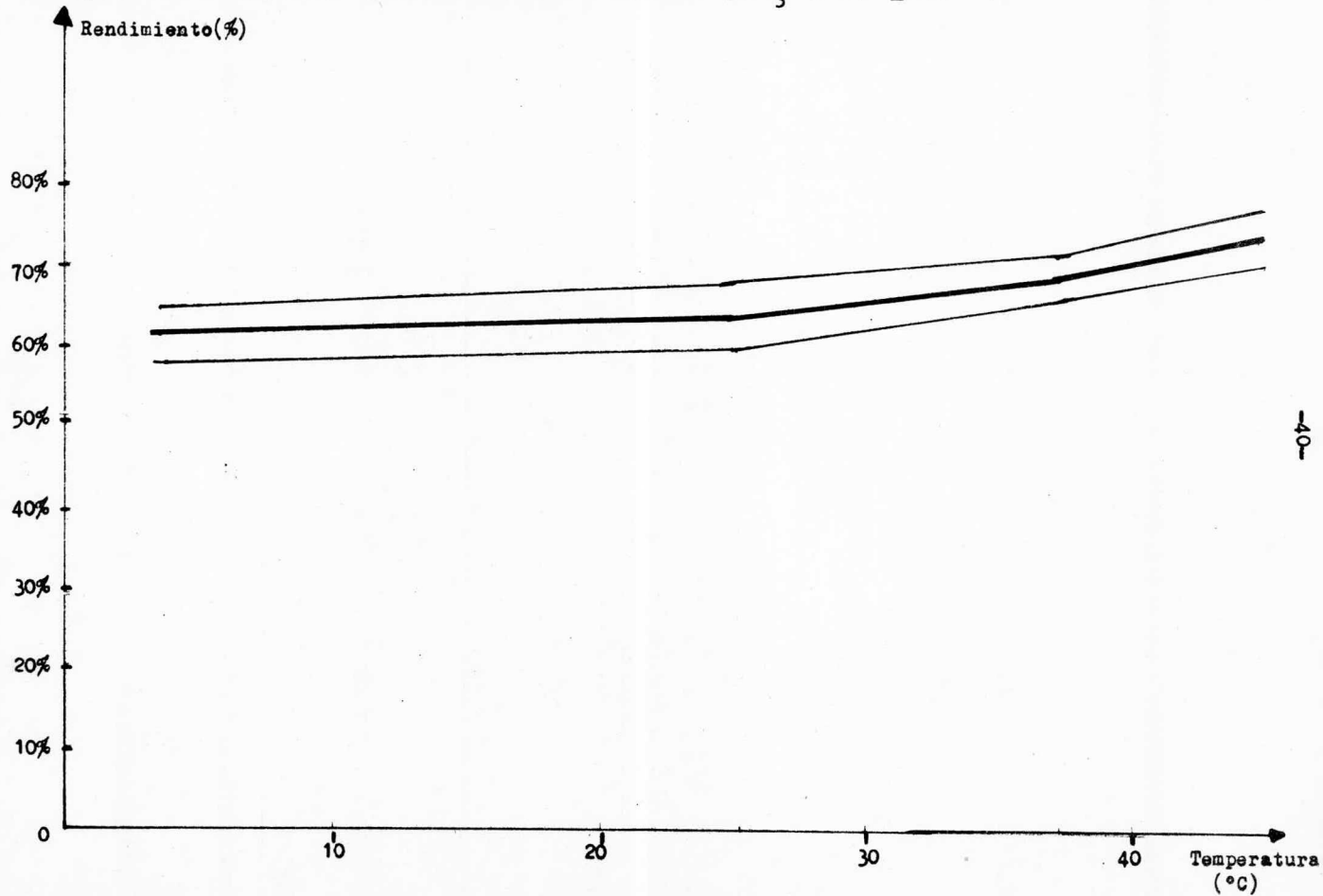
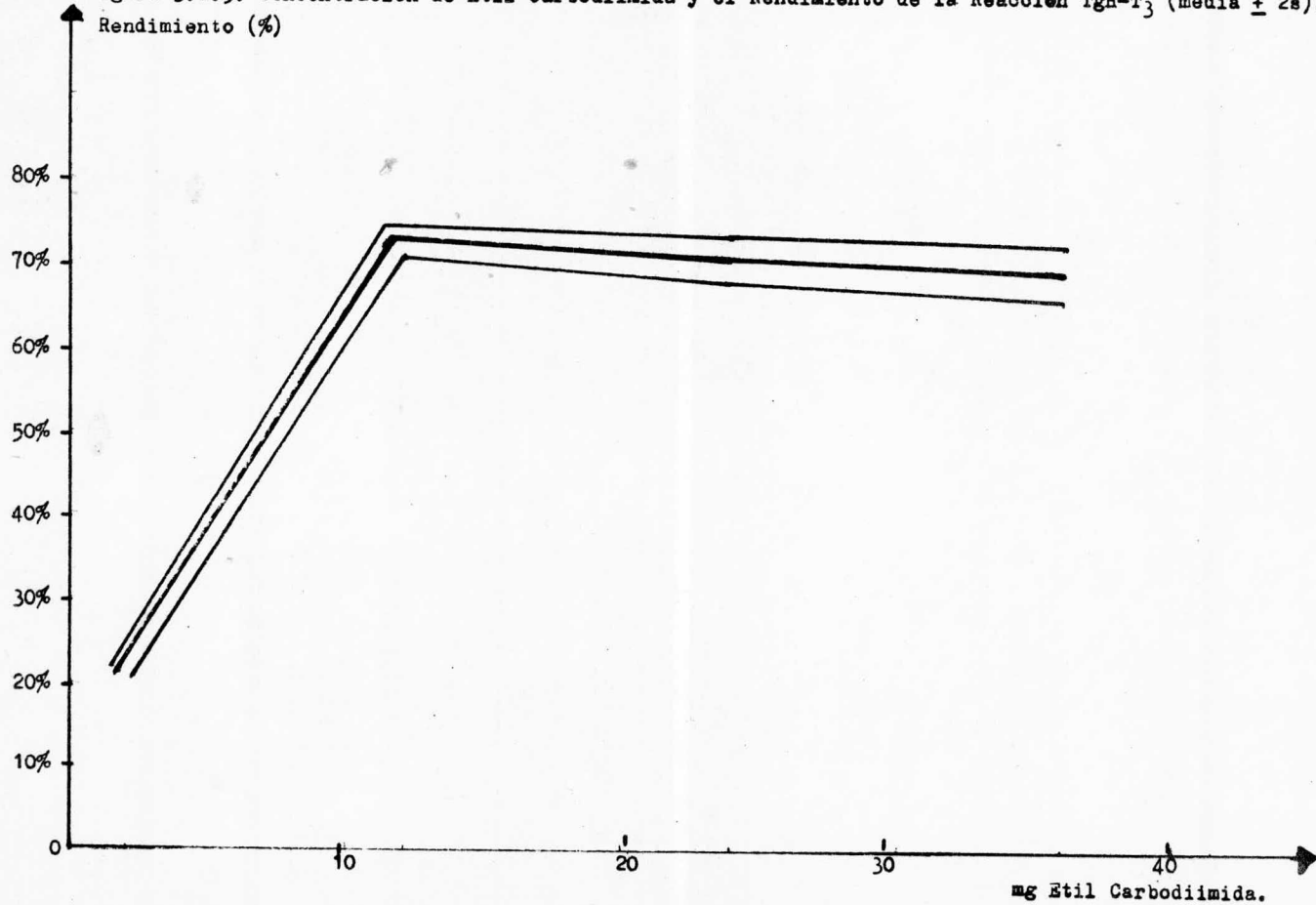


Tabla 3.2.5. Concentración de Etil Carbodiimida y el Rendimiento de la Reacción TgH-T₃.

| mg carbodiimida | % Rendimiento | \bar{x} | s | 2s |
|-----------------|---------------|-----------|--------|--------|
| 2.4 | 23.4% | 22.85% | ± 1.23 | ± 2.46 |
| | 22.9% | | | |
| | 21.6% | | | |
| | 23.5% | | | |
| 12 mg | 71.3% | 73.08% | ± 1.8 | ± 3.6 |
| | 73.4% | | | |
| | 73.3% | | | |
| | 74.3% | | | |
| 24 mg | 70.5% | 72.23% | ± 2.03 | ± 4.06 |
| | 72.8% | | | |
| | 73.4% | | | |
| | 72.2% | | | |
| 36 mg | 72.5% | 72.3% | ± 2.65 | ± 5.30 |
| | 71.3% | | | |
| | 75.1% | | | |
| | 70.3% | | | |

Figura 3.2.5. Concentración de Etil Carbodiimida y el Rendimiento de la Reacción TgH-T₃ (media ± 2s).



Los resultados de estos experimentos se muestran en la tabla 3.2.5; se observa que la reacción alcanza una meseta rápidamente y que probablemente la cantidad de agente acoplador suficiente para el óptimo de la reacción se encuentra entre los 2.4 y 12 mg. De la curva (figura 3.2.5) se puede extrapolar un valor aproximado de una relación molar 3:1 (carbodiimida:hapteno), esto es, 7.2 mg. Sin embargo es importante - señalar que independientemente de determinar que punto es el exacto, es - más importante conocer el efecto sobre la reacción (o más exactamente sobre el soporte proteico) el exceso de carbodiimida (ver sección 1.2.3.) Este posible efecto se discute en el próximo capítulo.

3.3 ACOPLAMIENTO DE LA TETRAYODOTIRONINA.

Todas las curvas de estudio de la cinética del acoplamiento de la T_4 a la TgH tienen las siguientes características:

- Realizadas con datos obtenidos del mismo contador de centelleo.
- Se utilizó la hormona marcada ($^{125}\text{I}-T_4$) (Tetramet, Abbott) que tiene una vida útil de 45 días (act. específica 239 uCi/ug) y que alcanzó para realizar todos los estudios.
- Todos los reactivos químicos y biológicos fueron de un mismo lote.

Debido a los experimentos realizados con T_3 y por tratarse de moléculas muy parecidas, se creyó conveniente que al fijar ciertas variables para estudiar otra, aquellas se fijaran conforme al óptimo encontrado en el caso de la T_3 .

3.3.1 Concentración de T_4 y el Rendimiento de la Reacción.

Para estudiar las concentraciones de T_4 , se decidió lógicamente comparar el punto de la meseta de la curva de T_3 (en equivalentes molares) que es de 2.42×10^{-5} moles, y que para el peso molecular de la T_4 es de 798.9 (40) y resultó de:

$$798.9 \text{ g} \text{ ----- } 1 \text{ mol}$$

$$x \text{ g} \text{ ----- } 2.42 \times 10^{-5} \text{ moles}$$

$x = 19.66 \text{ mg}$ (para comodidad de trabajo se utilizaron 20 mg) y sus divisiones: 3,5,7,9,10,15,20 y 25 mg. Las demás condiciones fijas fueron: Tiempo de incubación de 30 minutos, pH de 5.6, y temperatura de 45°C; la tabla 3.3.1 muestra los resultados obtenidos. Cada observación se realizó por duplicado y se realizaron en total 6 experimentos para cada concentración. Como se aprecia en la figura 3.3.1 -

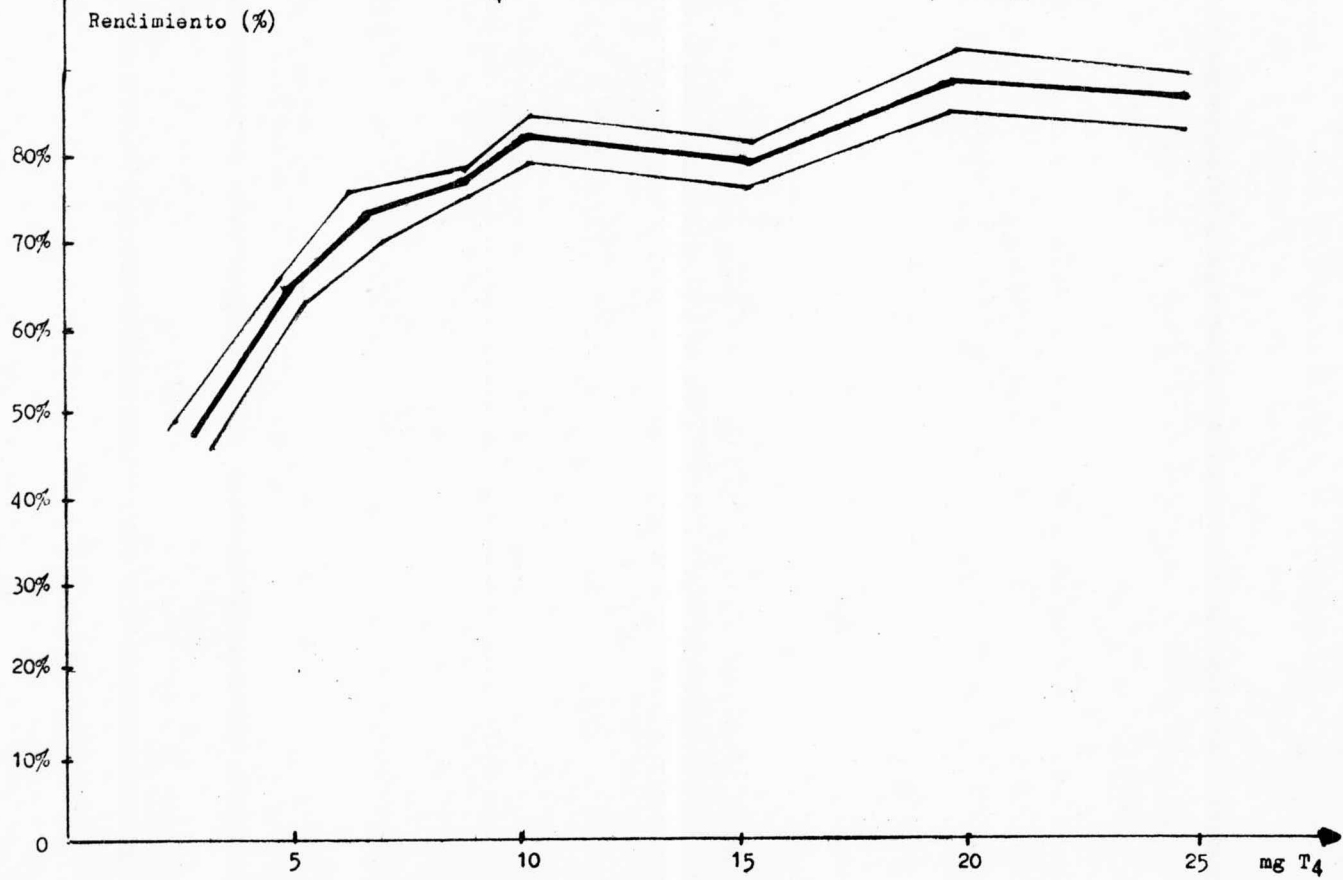
Tabla 3.3.1. Concentración de T_4 y el Rendimiento de la Reacción.

| Conc. T_4 (mg) | % Rendimiento | \bar{x} | s | 2s |
|------------------|---------------|-----------|------------|------------|
| 3.00 | 48.0% | 48.58% | ± 2.19 | ± 4.38 |
| | 49.3% | | | |
| | 51.6% | | | |
| | 50.2% | | | |
| | 46.3% | | | |
| | 46.08% | | | |
| 5.00 | 64.53% | 65.08% | ± 1.9 | ± 3.8 |
| | 67.50% | | | |
| | 66.90% | | | |
| | 63.42% | | | |
| | 62.65% | | | |
| | 65.48% | | | |
| 7.00 | 76.97% | 76.07% | ± 2.47 | ± 4.94 |
| | 74.60% | | | |
| | 73.58% | | | |
| | 73.60% | | | |
| | 78.90% | | | |
| | 78.78% | | | |
| 9.00 | 77.66% | 79.88% | ± 1.69 | ± 3.38 |
| | 79.30% | | | |
| | 80.50% | | | |
| | 82.35% | | | |
| | 78.60% | | | |
| | 80.87% | | | |
| 10.00 | 85.3% | 84.10% | ± 1.76 | ± 3.52 |
| | 83.6% | | | |
| | 82.3% | | | |
| | 86.3% | | | |
| | 85.5% | | | |
| | 82.14% | | | |

Tabla 3.3.1 (Continuación).

| Conc. T ₄ (mg) | % Rendimiento | \bar{x} | s | 2s |
|---------------------------|---------------|-----------|--------|--------|
| 15.00 | 80.5% | 81.98% | ± 1.77 | ± 3.54 |
| | 79.3% | | | |
| | 81.8% | | | |
| | 83.6% | | | |
| | 83.2% | | | |
| | 83.48% | | | |
| 20.00 | 83.60% | 87.36% | ± 3.04 | ± 6.08 |
| | 83.30% | | | |
| | 89.30% | | | |
| | 89.50% | | | |
| | 89.65% | | | |
| | 88.81% | | | |
| 25.00 | 85.30% | 86.10% | ± 2.51 | ± 5.02 |
| | 87.80% | | | |
| | 84.30% | | | |
| | 82.60% | | | |
| | 89.50% | | | |
| | 87.10% | | | |

Figura 3.3.1. Concentración de T_4 y el rendimiento de la Reacción. (media. \pm 2 s).



el rendimiento presenta una meseta a la concentración de 10 mg, ya que después de este valor el rendimiento no aumenta.

3.3.2. Tiempo de Incubación y Rendimiento de la Reacción.

Para determinar el tiempo óptimo de incubación se procedió a ensayar 15, 30, 45 y 60 minutos manteniendo fijas las siguientes variables : concentración de T_4 10 mg, temperatura de 45°C, pH de 5.6; La tabla 3.3.2. resume los resultados obtenidos. Se ve claramente que a los 30 minutos la reacción alcanza un máximo de rendimiento. En 45 y en 60 minutos las desviaciones estándar se reducen, pero de hecho a los 30 minutos la reacción ya es completa.

3.3.3. Efecto del pH en el Rendimiento de la Reacción.

El efecto del pH se analizó para los valores 5.0, 5.6, 6.2, 7.2 y 8.4; las condiciones fijas fueron: concentración de T_4 de 10 mg, tiempo de incubación de 30 minutos y temperatura de 45°C. En la tabla 3.3.3. se han concentrado los datos obtenidos de estos experimentos y se puede apreciar que a los intervalos estudiados el pH óptimo es de 5.6; (la figura 3.3.3. ilustra estos datos).

3.3.4. Temperatura y Rendimiento de la Reacción.

Se ensayaron los siguientes valores de temperatura : 4°C, 25°C , 37°C y 45°C; las variables fijas fueron: concentración de T_4 10 mg, tiempo de la reacción de 30 minutos y pH de 5.6; los datos de la tabla 3.3.4. y la figura 3.3.4. muestran que la temperatura óptima es de 45°C. No se ensayaron temperaturas mayores por riesgo de desnaturalizar la proteína.

3.3.5. Concentración de Carbodiimida y Rendimiento de la Reacción.

Esta curva se realizó en analogía a la realizada con T_3 ; las concentraciones ensayadas corresponden a las mismas cantidades debido a que en ambos casos se usó la misma concentración molar de hapteno. Los resultados de la tabla y la figura 3.3.5. ilustran que se alcanza una meseta entre los valores de 2.4 y 12 mg, igual que en el caso de la T_3 .

3.4 CONDICIONES GENERALES NO ESTUDIADAS.

Entre las condiciones que no se estudiaron está el volumen de la mezcla de reacción. Este se fijó a 1.5 ml para disolver la tiroglobulina + carbodiimida y a 1.0 ml para la solución del hapteno. Como ya se mencionó anteriormente, la tiroglobulina y carbodiimida se disolvieron en solución salina, mientras que el solvente para el hapteno fue la N-N

Tabla 3.3.2. Tiempo de Incubación y Rendimiento de la Reacción TgH-T₄.

| Tiempo (minutos) | % Rendimiento | \bar{x} | s | 2s |
|------------------|---------------|-----------|--------|--------|
| 15 | 43.60% | 46.35% | ± 2.48 | ± 4.96 |
| | 49.50% | | | |
| | 46.8% | | | |
| | 45.80% | | | |
| 30 | 85.60% | 84.95% | ± 1.2 | ± 2.4 |
| | 84.20% | | | |
| | 86.30% | | | |
| | 83.70% | | | |
| 45 | 84.20% | 83.50% | ± 1.05 | ± 2.10 |
| | 84.50% | | | |
| | 82.20% | | | |
| | 83.10% | | | |
| 60 | 84.10% | 84.50% | ± 0.91 | ± 1.82 |
| | 83.50% | | | |
| | 85.60% | | | |
| | 84.80% | | | |

Figura 3.3.2. Tiempo de Incubación y Rendimiento de la Reacción TgH-T₄ (media ± 2s).

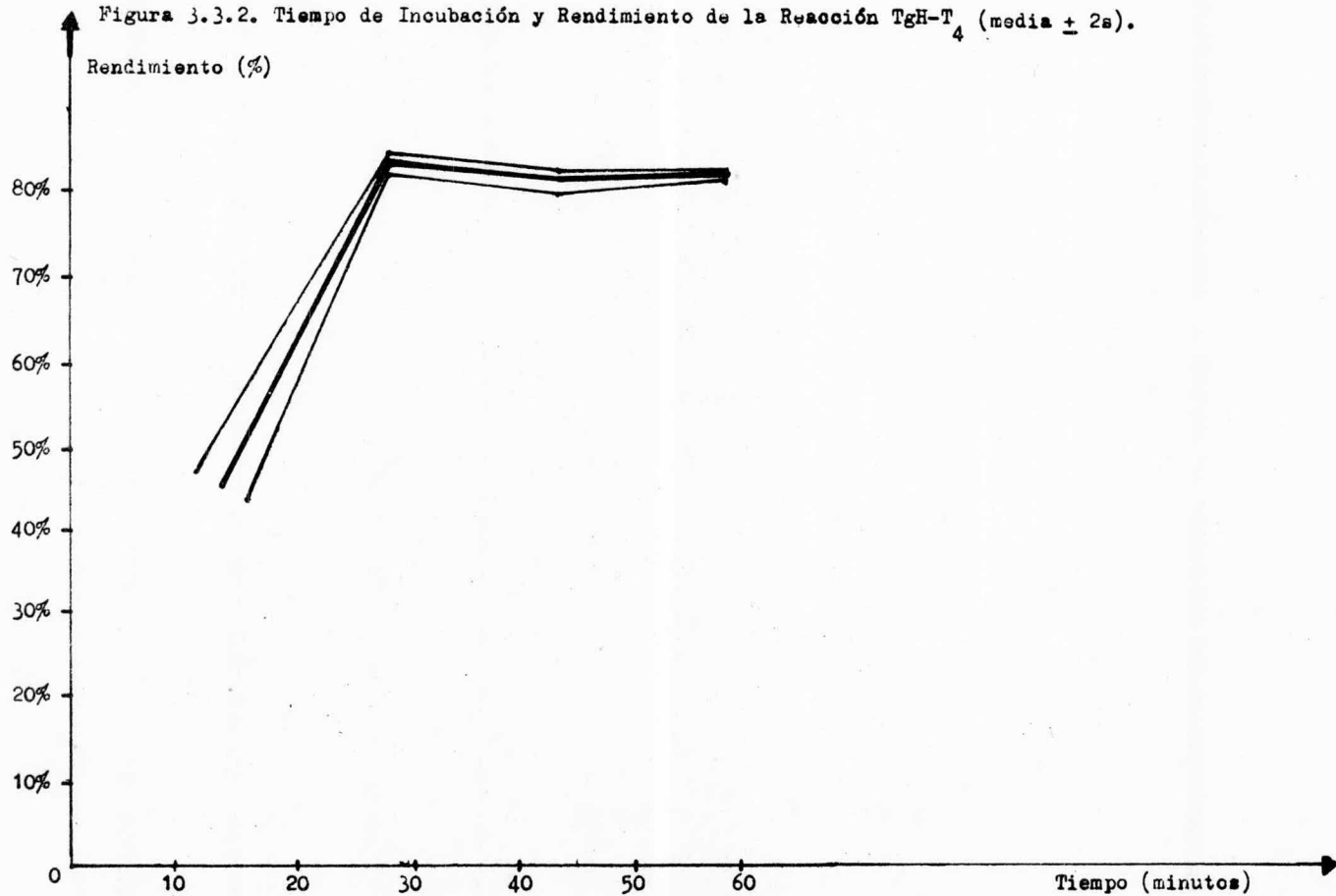


Tabla 3.3.3. Efecto del pH en el Rendimiento de la Reacción TgH-T₄.

| pH | % Rendimiento | \bar{x} | s | 2s |
|-----|---------------|-----------|--------|--------|
| 5.0 | 67.50% | 72.50% | ± 3.48 | ± 6.96 |
| | 73.50% | | | |
| | 75.60% | | | |
| | 73.40% | | | |
| 5.6 | 85.60% | 84.90% | ± 1.45 | ± 2.90 |
| | 83.20% | | | |
| | 84.30% | | | |
| | 86.50% | | | |
| 6.2 | 75.30% | 74.90% | ± 1.11 | ± 2.22 |
| | 76.50% | | | |
| | 74.20% | | | |
| | 73.60% | | | |
| 7.2 | 53.20% | 54.90% | ± 2.6 | ± 5.2 |
| | 52.30% | | | |
| | 57.80% | | | |
| | 56.35% | | | |
| 8.4 | 40.50% | 39.74% | ± 3.18 | ± 6.36 |
| | 36.20% | | | |
| | 43.70% | | | |
| | 38.55% | | | |

Figura 3.3.3. Efecto del pH sobre el Rendimiento de la Reacción TgH-T₄. (media \pm 2s).

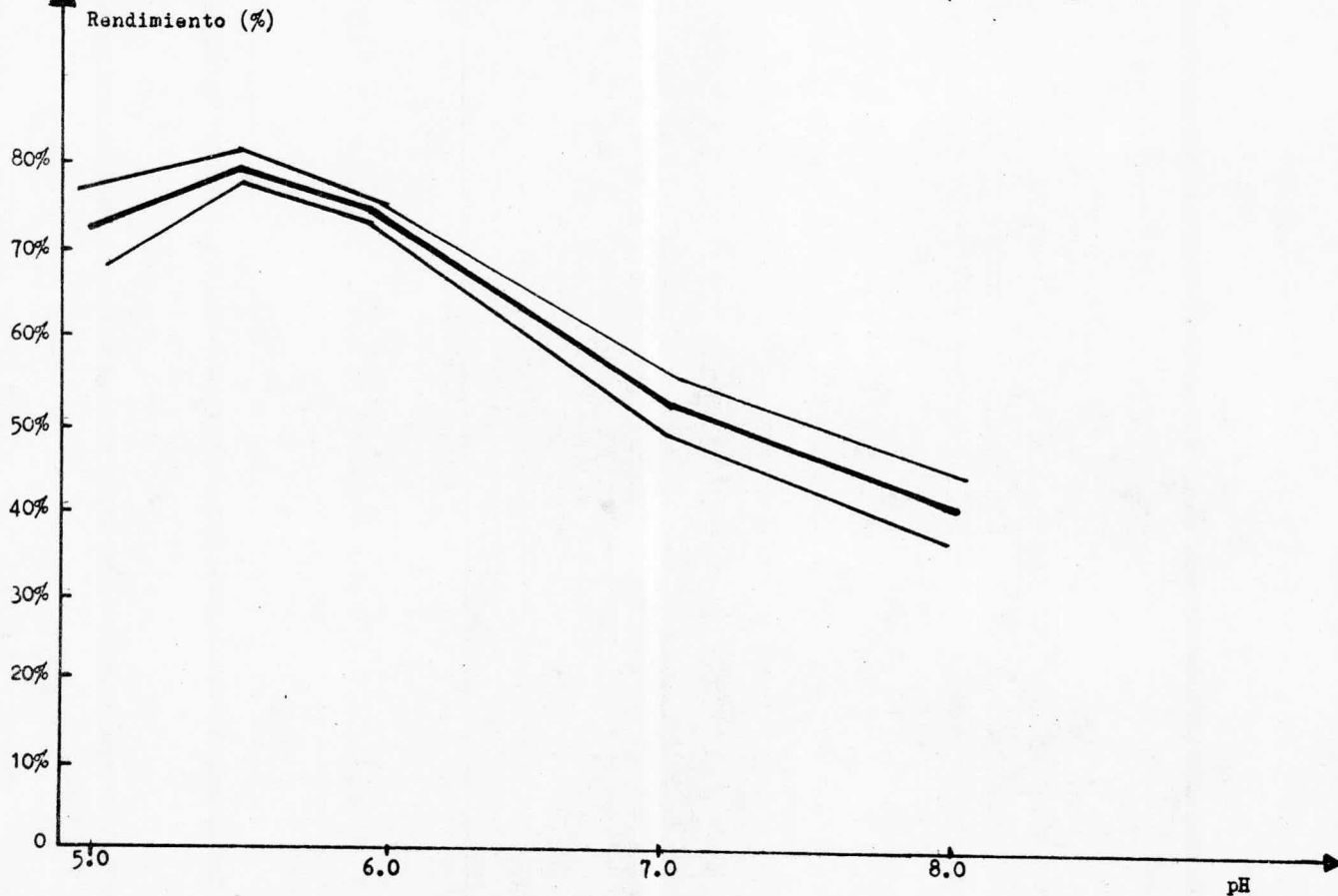


Tabla 3.3.4. Temperatura y Rendimiento de la Reacción TgH-T₄.

| Temperatura (°C) | % Rendimiento | \bar{x} | s | 2s |
|------------------|---------------|-----------|--------|--------|
| 4°C | 62.30% | 63.48% | ± 1.47 | ± 2.94 |
| | 65.50% | | | |
| | 63.50% | | | |
| | 62.50% | | | |
| 25°C | 70.30% | 70.80% | ± 1.95 | ± 3.90 |
| | 73.20% | | | |
| | 68.50% | | | |
| | 71.20% | | | |
| 37°C | 80.50% | 80.15% | ± 1.29 | ± 2.58 |
| | 81.30% | | | |
| | 78.30% | | | |
| | 80.50% | | | |
| 45°C | 84.50% | 84.10% | ± 1.51 | ± 3.02 |
| | 83.70% | | | |
| | 82.30% | | | |
| | 85.90% | | | |

Figura 3.3.4. Temperatura y Rendimiento de la Reacción TgH-T₄. (media ± 2 s).

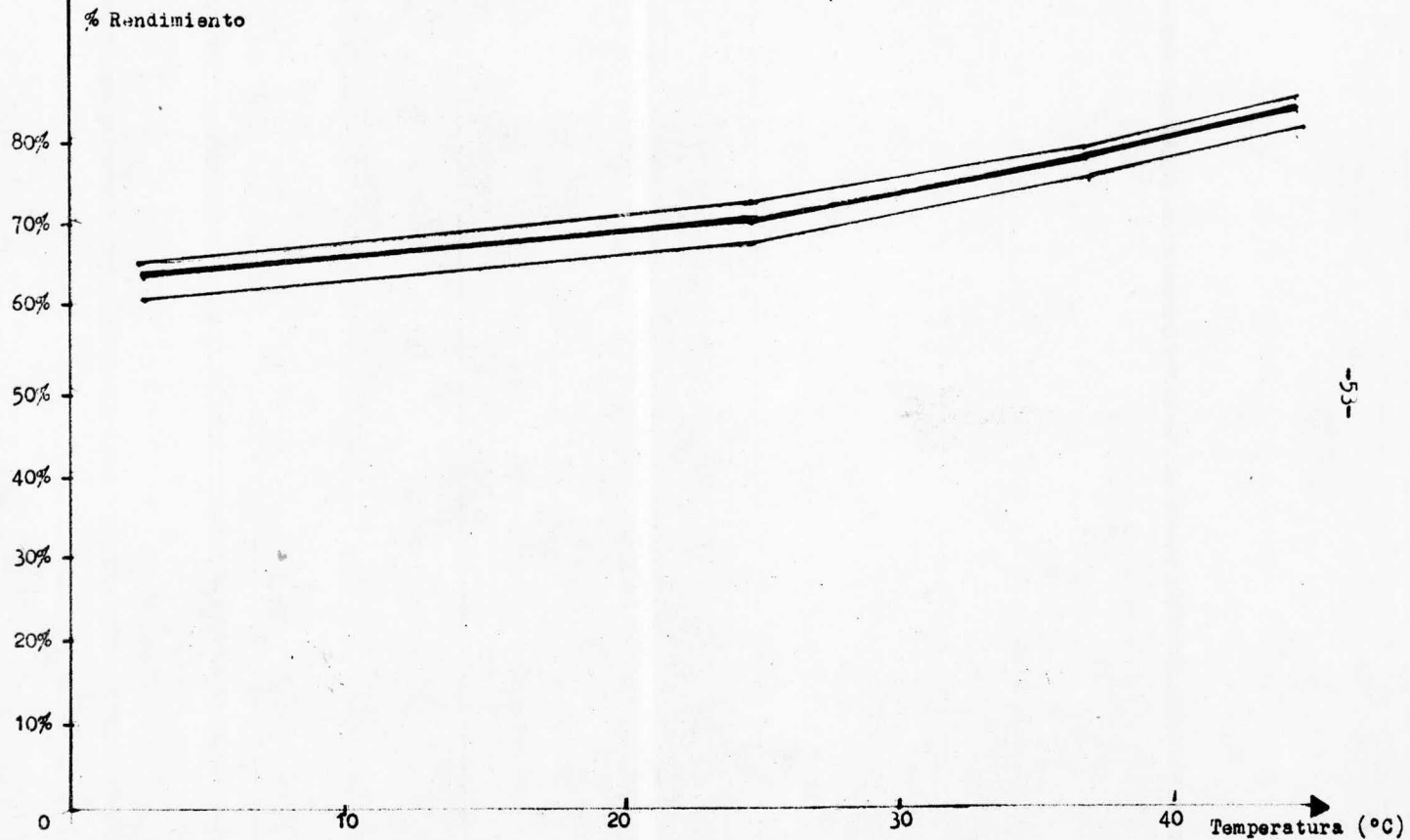
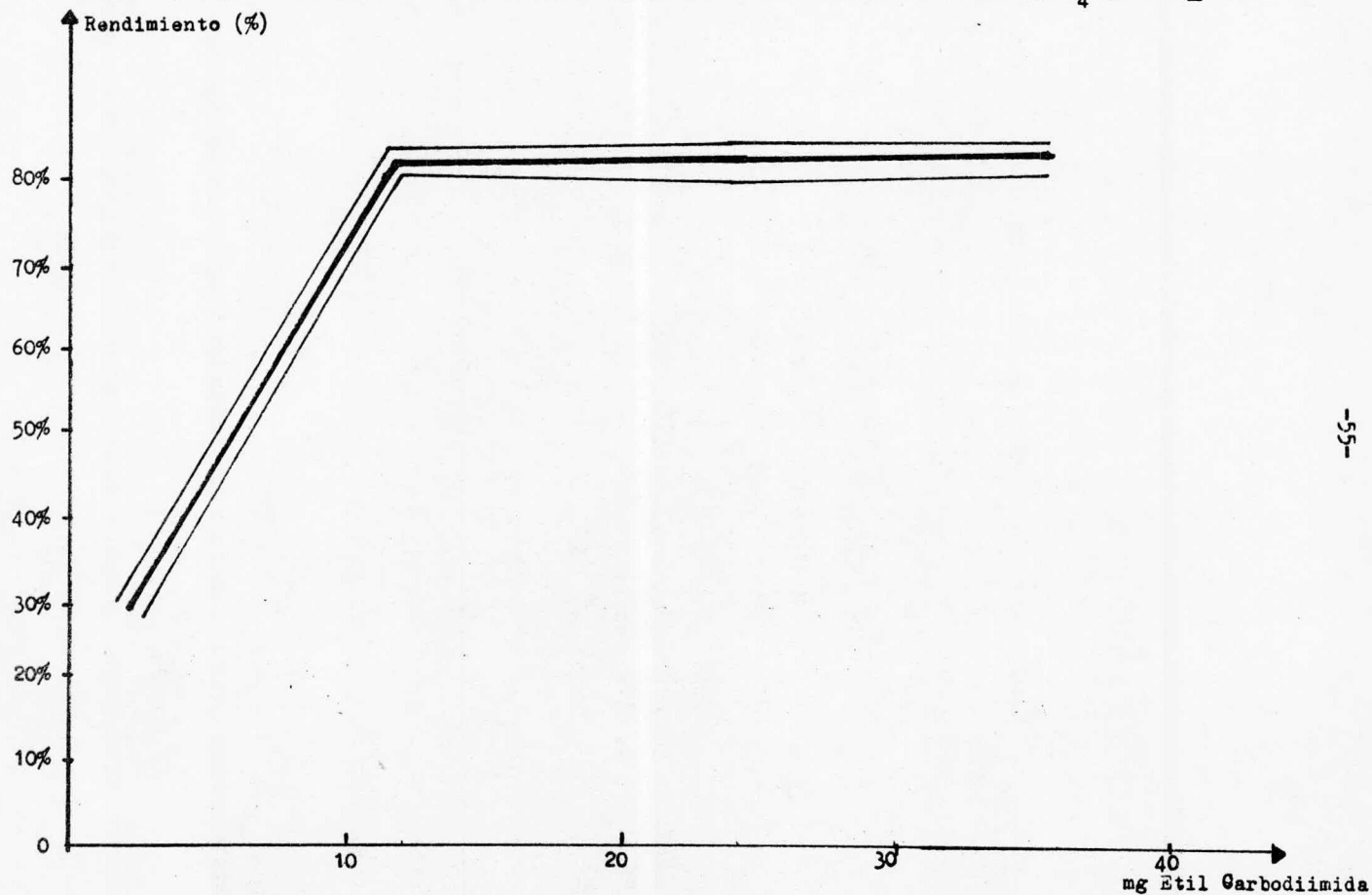


Tabla 3.3.5. Concentración de Carbodiimida y el Rendimiento de la Reacción TgH-T₄.

| Conc. Carbodiimida (mg) | % Rendimiento | \bar{x} | s | 2s |
|-------------------------|---------------|-----------|--------|--------|
| 2.4 | 28.50% | 27.85% | ± 1.26 | ± 2.52 |
| | 27.40% | | | |
| | 26.30% | | | |
| | 29.20% | | | |
| 12 | 84.30% | 84.0% | ± 1.30 | ± 2.60 |
| | 85.60% | | | |
| | 83.50% | | | |
| | 82.50% | | | |
| 24 | 86.80% | 85.10% | ± 1.2 | ± 2.4 |
| | 85.60% | | | |
| | 85.70% | | | |
| | 83.30% | | | |
| 36 | 83.70% | 84.65% | ± 1.14 | ± 2.28 |
| | 84.35% | | | |
| | 84.25% | | | |
| | 86.30% | | | |

Figura 3.3.5. Concentración de Carbodiimida y el Rendimiento de la Reacción TgH-T₄ (media ± 2s).



dimetilformamida. Otras condiciones no estudiadas se consideraron estandarizadas y se discuten en el siguiente capítulo.

3.5. ESTABILIDAD DEL PRODUCTO OBTENIDO.

Los experimentos de estabilidad se realizaron de la manera descrita en materiales y métodos. Los resultados indicaron que bajo las siguientes condiciones: Temperatura de 4°C y pH de 5.6, se liberan 0.32 % de hapteno en un mes, lo que equivale en el caso de la T₃ a 33 microgramos. Este resultado corresponde a la diálisis de seis haptenos guardados por un mes y contando el amortiguador de diálisis.

El otro experimento realizado con haptenos incubados en condiciones que reflejan condiciones "in vivo" dió un resultado de 0.27% de liberación que corresponde a unos 28 microgramos de hapteno liberado en un lapso de una semana. Se repitió para un mes y se encontró una liberación adicional de 0.05%, o sea unos 5 microgramos.

Los resultados del complejo dializado después de una liofilización en condiciones similares dió un resultado de 0.3% ± 0.06% de liberación lo cual es ligeramente más alto que los resultados del experimento anterior. Se podría decir que la liofilización no afecta la estabilidad y es además un buen método de conservar el complejo antigénico para uso posterior, muy práctico para esquemas de inmunización muy prolongados. Todos los experimentos anteriores se realizaron por duplicados, al menos.

Problemas de contaminación no se presentaron y se guardaron complejos de cuatro maneras: liofilizados, congelados a -20°C, en refrigeración a 4°C y a temperatura ambiente añadiendo un conservador (timerosal al 0.1%). Se prefiere sin embargo usar los dos primeros métodos cuando el periodo de reposo del complejo sea muy prolongado. Después de un lapso muy prolongado, (seis meses o más) se recomienda dializar el complejo por unos dos días antes de inocularlo.

IV. DISCUSION

Todos los aspectos de las condiciones estudiadas sugieren que el método utilizado es confiable y las desviaciones estándar en ningún caso son muy grandes.

4.1. CONDICIONES DEL ACOPLAMIENTO.

4.1.1. Triyodotironina.

El tiempo de incubación óptimo quedó establecido en 30 minutos para ambos haptenos. Se puede entonces suponer que es más crítico el tiempo de la primera fase de la reacción (formación del intermediario, - ver sección 1.2.3), que el acoplamiento final del hapteno. De ser así, - posiblemente sea semejante con este método, el tiempo requerido para el acoplamiento de haptenos de esta misma naturaleza (con grupos amino) a - un soporte proteico que sea tiroglobulina. Otra ventaja del tiempo de in - cubación menor al utilizado en la mayoría de los autores, es que el so - porte proteico está expuesto por menos tiempo a la presencia del agente acoplador, pues se debe recordar que la carbodiimida al activar a la pro - teína sufre un rearrreglo que puede resultar en un derivado urefido inde - seable para fines de inmunización. El punto central demostrado por este experimento es que bastan 30 minutos para terminar la reacción. Se apre - cia además un aspecto de turbidez exterior de la mezcla de reacción que va de acuerdo a su porcentaje de acoplamiento. Al terminar la reacción, existe un aspecto opalescente y turbio.

Inicialmente Odell y Abraham (39) reportaron el pH óptimo de - esta reacción como de 5.6. Otros autores dicen que usan pH de 7.2 (38, - 24) o simplemente no lo mencionan (33). Son también Odell y Abraham qui - nes informan que la tiroglobulina es el soporte proteico de elección y - más tarde, Skowsky y Fisher (30), reportaron que la tiroglobulina es es - pecialmente adecuada para inducir antigenicidad a moléculas pequeñas. - Mencionan que para el caso de la reacción con carbodiimidas, el pH es un punto sumamente importante, puesto que influye directamente en la acti - vidad del soporte proteico. Esto es, que el pH influye directamente en - la formación del intermediario y del anhídrido ácido, con lo cual única - mente se necesita la reacción del soporte proteico y la carbodiimida. Es - to quiere decir que el pH de 5.6 sería general para cualquier acoplamiento de haptenos siempre que se utilizara tiroglobulina y carbodiimida. Es

ta hipótesis se cumple al parecer en nuestro caso, pues los dos haptenos (T_3 y T_4) se acoplan con mayor rendimiento al mismo pH, 5.6; sin embargo, debido a que se probaron solamente dos haptenos diferentes, es muy arriesgado dar una conclusión al respecto.

Para el caso de la temperatura de reacción por el hecho de cumplirse para dos haptenos diferentes que estructuralmente son aminoácidos, podemos generalizar que la eficiencia de la reacción de acoplamiento aumenta con la temperatura, pues la probabilidad del número de choques entre las moléculas aumenta. El límite está dado por la labilidad del soporte proteico a la temperatura y este límite se estima en 50°C. Temperaturas superiores pueden alterar la estructura cuaternaria de la proteína (41).

4.1.2. Tetrayodotironina.

En general tenemos un panorama similar al de la T_3 . Esto apoya la hipótesis que se expone en la sección anterior.

Para el caso del experimento de la temperatura, la mayor diferencia está entre 25-37°C. Esto es de tenerse en cuenta pues es obvio que se corre un poco más de riesgo con la temperatura de incubación de 45°C. El riesgo consiste en que cuando se dispone de un aparato confiable de incubación si la temperatura aumenta puede desnaturalizarse la proteína; tal vez por esta razón se pudiera optar por la temperatura de 37°C, aunque el óptimo encontrado es sin duda 45°C.

El tiempo de incubación y el pH son similares al caso de la T_3 . Para las curvas del catalizador es significativo encontrar una cantidad mínima necesaria similar para ambos casos. De nuevo, esto se puede usar como apoyo a la hipótesis de que el paso importante es la formación del intermediario. Otra utilidad de estos experimentos es la economía de los reactivos cuando se conocen estos datos.

4.2 FACTORES QUE MODULAN LA REACCION DE ACOPLAMIENTO.

De las variables analizadas sin duda la más importante es la concentración del hapteno. Para ambos el principio de la reacción se observa un ascenso en el rendimiento de la misma, el cual alcanza una estabilidad en cuanto al rendimiento, lo que representa, en el caso de la T_3 (sección 3.2.1) y en la T_4 (sección 3.3.1); no una estabilización en la masa efectiva de hapteno unido, la cual sigue aumentando constantemente.

En el caso de la T_3 la meseta se presenta primero en una concentración de 16.31 mg, con un rendimiento del 63.99%. El dato concreto es que se acoplaron 10.44 mg, a 10 mg de tiroglobulina, lo que en moles representa 1023.8 moles de T_3 unidas a una mol de tiroglobulina. En el siguiente punto se usó una masa de 24.47 mg de T_3 y el rendimiento fue en este caso de 63.66%, por lo que se unieron 15.5 mg de T_3 , lo que representa 1527.9 moles de T_3 unidas por mol de tiroglobulina. Este hecho indica que no se alcanza una saturación de la proteína y permite postular la formación de grupos funcionales al mismo tiempo que la reacción se va llevando a cabo. Esto es posible teóricamente; la reacción se va llevando a cabo entre el carboxilo activo (expuesto) de la proteína y el grupo amino del hapteno. Sin embargo, en el caso particular que nos ocupa, los haptenos usados son aminoácidos, por lo que aún al quedar unidos por el grupo amino a la proteína, su grupo carboxilo queda expuesto y de esta manera puede acoplarse otro hapteno en esa posición. Para verificar el fenómeno descrito, se procedió a incubar hapteno con agente acoplador de acuerdo con controles descritos en la sección 2.2.1, para observar si es posible la formación de un "poli-aminoácido" que no fuera dializable. Se recordará que el tubo de diálisis utilizado tiene un límite de exclusión de 14 000 daltons, lo que significa que los haptenos utilizados (con un peso molecular la T_3 de 673.0 y la T_4 de 798.8) tienen que formar al menos un complejo de 18 aminoácidos unidos para alcanzar un peso molecular no dializable. Los resultados de controles de este tipo indican que en efecto, una pequeña proporción de radioactividad no es dializable (en promedio un 9%), lo que indica una posibilidad de este tipo de producto formado. Es para corroborar esta hipótesis que se corrió un cromatograma en placa fina (descrita en la sección 2.2.1), encontrándose una mancha de $R_f = 0.85$ para la T_4 nativa. La mancha que apareció del hapteno "poli- T_4 " presenta un $R_f = 0.346$, lo que claramente indica que se trata de otro compuesto. El sistema utilizado fue butanol:acetato de etilo:ácido acético:agua (1:1:1:1), y se reveló con ninhidrina.

Respecto a cual es el número de grupos hapténicos óptimos que se debe unir al soporte proteico para producir una respuesta inmune adecuada (esto es, humoral), Weigle, High y Nakamura (45) han reportado que un exceso de grupos hapténicos en el soporte proteico puede producir

fenómenos variados en el animal inmunizado, usualmente de hipersensibilidad tardía. Existen así linfocitos T sensibilizados contra el antígeno pero los anticuerpos específicos circulantes son mínimos. Para el objetivo que nos ocupa, este efecto es indeseable, pero no se sabe mucho sobre sus causas.

Desgraciadamente, no conocemos reportes que discutan el número óptimo de grupos hapténicos unidos a tiroglobulina humana para lograr una respuesta inmune adecuada. Estudios similares realizados con albúmina sérica bovina por Reichlin, Sehnure y Vanoe (46) dan como óptimo 10 - 20 grupos hapténicos por molécula de ASB. Actualmente se lleva a cabo en la Clínica de Tiroides del I.N.N., un programa de inmunización encaminado a responder a esta pregunta. Sin embargo, en programas de inmunización preliminares, se observó que la inmunización de dos conejos blancos Nueva Zelanda, de 3 kilos de peso, machos, jóvenes adultos, en dosis de 1 mg de complejo (concentración de hapteno 16.31 mg) cada semana por dos meses, en volumen 1:1 con adyuvante de Freund completo, inoculados por vía subcutánea en múltiples sitios del lomo, dió en ambos animales al cabo de 5 meses de inmunización, títulos de 1:500 de anticuerpo contra T_3 , que virtualmente no cruza con T_4 (0.3%). Este hecho no quiere decir que la concentración de 16.315 mg de T_3 sea la óptima, pues como ya se indicó, ese aspecto es objeto de otro estudio para llegar a conclusiones fundamentadas.

4.3 UTILIDAD PRACTICA.

Se han integrado todos los datos hasta aquí discutidos en dos gráficas, que ilustran de manera clara cada una en su caso, (T_3 y T_4), los grupos hapténicos que se unen al soporte proteico. Esto es, se pueden obtener a voluntad complejos antigénicos con el número deseado de grupos hapténicos cuando se mantienen constantes las condiciones de utilizar tiroglobulina humana (10 mg), tiempo de incubación de 30 minutos, pH de 5.6, temperatura de 45°C y al menos 7.2 mg de etilcarbodiimida. - Tales gráficas se ilustran en las figuras 4.3.1 y 4.3.2.

4.4 FACTORES DEL PROCESO DE INMUNIZACION.

La respuesta inmune es un fenómeno complejo en el que intervienen muchos pasos desde la introducción de un antígeno hasta la producción de anticuerpos específicos. El caso de los haptenos es especialmen-

Figura 4.3.1. Número de grupos hapténicos unidos por molécula de TgH en función de la conc. de T₃

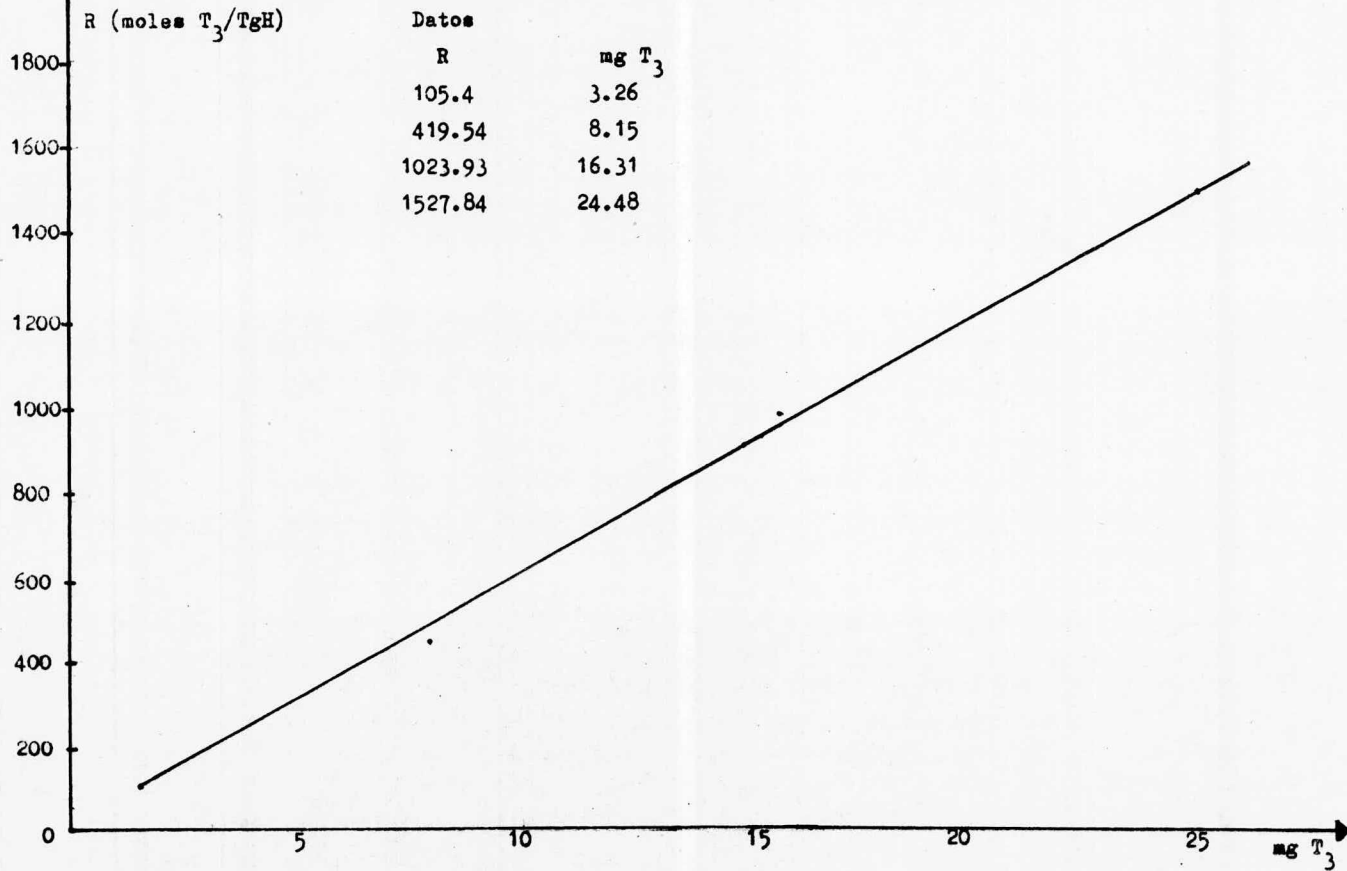
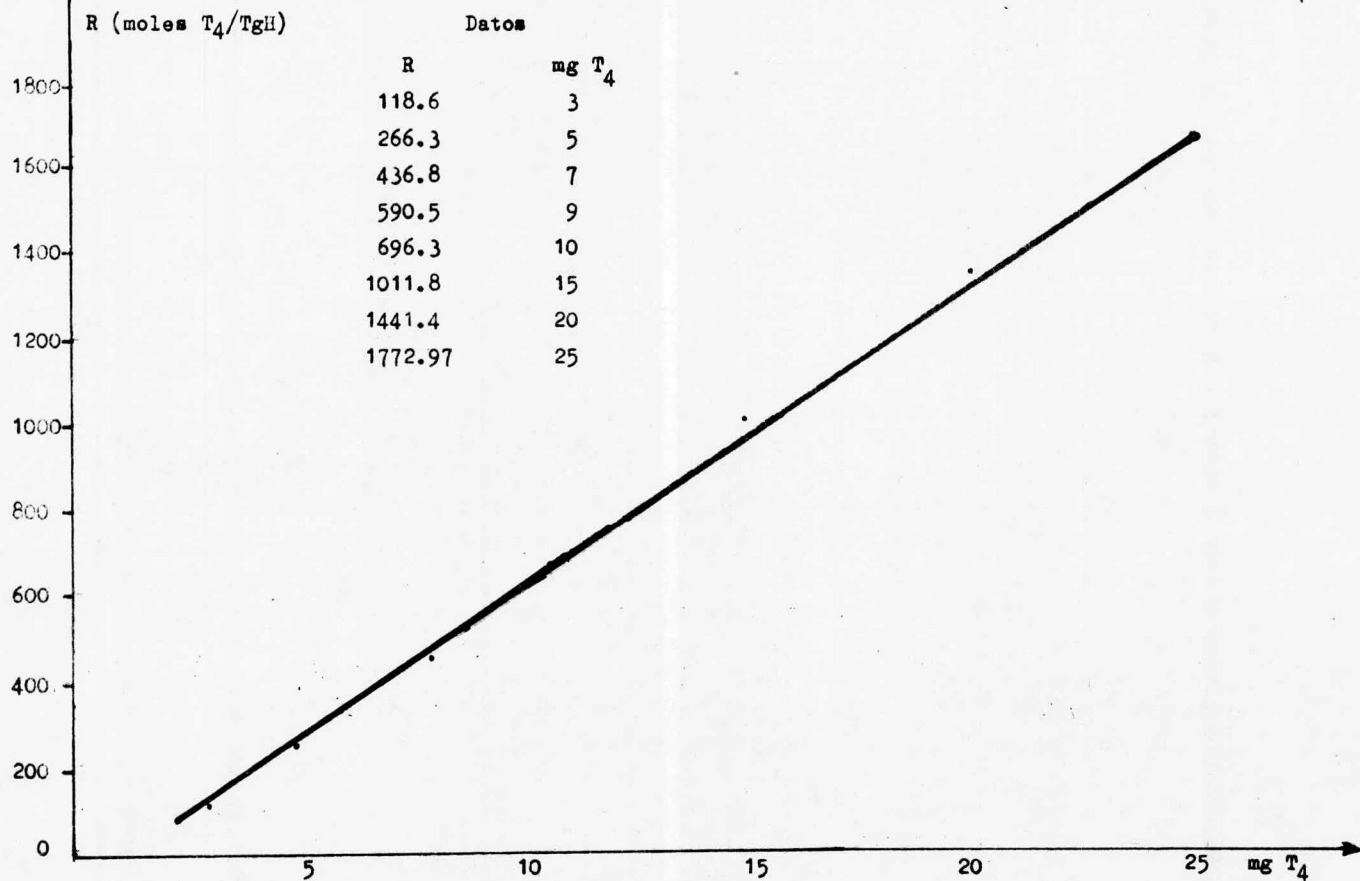


Figura 4.3.2. Número de grupos hapténicos unidos por molécula de TgH en función de la conc. de T₄.



te complejo, pues la respuesta depende de factores tales como la incorporación molar del hapteno al soporte proteico, el número de determinantes antigénicos expuestos después de la conjugación, además de factores comunes a todos los antígenos como son el esquema de inmunización, la dosis y la vía de administración, y finalmente las especies de animales inmunizados. En la mayoría de los reportes de la literatura, solamente un pequeño porcentaje de los animales inmunizados con complejos antigénicos - con complejos antigénicos que usan soportes proteicos como la ASB o poliaminocidos sintéticos, presentan respuesta en forma de anticuerpos de especificidad adecuada para uso en RIA. Skowsky y Fisher (30), obtuvieron datos que sugieren que la tiroglobulina es un soporte proteico especialmente adecuado para conferir antigenicidad a moléculas pequeñas. Encontraron respuesta en el 100% de los conejos inmunizados con un complejo vasopresina-TgB, encontrando además en los animales un cuadro de diabetes clínica que sugería inactivación de la vasopresina circulante por los anticuerpos.

Los factores que hacen que la tiroglobulina sea un soporte proteico tan apropiado no se conocen. Se sabe que la composición de la tiroglobulina de varias especies es muy similar (47). Weigle, High y Nakamura (45), han demostrado que la tiroglobulina de conejo se altera "in vivo" por las condiciones locales del granuloma cuando se administra en adyuvante de Freund completo, y es por ello capaz de terminar un estado de tolerancia inmunológica en conejos. Tal vez sea la degradación proteolítica de la tiroglobulina en fragmentos más pequeños la causa de su antigenicidad. Finalmente, existe evidencia que sugiere que la inmunogenicidad de un soporte proteico está directamente relacionada a su estabilidad "in vivo" (48). La tiroglobulina es una molécula grande (660 000) - con muchas uniones peptídicas intramoleculares que ayudan a su estabilidad, por lo que es posible que sea degradada lentamente en otros animales.

Otro recurso utilizado para estimular la respuesta en los animales contra el hapteno y minimizar la respuesta contra el soporte proteico, es el uso de diferentes soportes proteicos (47). Así, sería recomendable usar como soporte proteico una mezcla de tiroglobulinas, por ejemplo, bovina, humana y porcina. Se conoce que esta mezcla produce lesión -

nes en la glándula tiroidea de los conejos inmunizados por presencia - de autoanticuerpos. De aquí la conclusión de que la tiroglobulina de - conejo comparte determinantes antigénicas de tiroglobulinas de otras - especies.

Algo aún no discutido es el efecto que tendrá administrar un antígeno en el cual se formarán "cadenas" de haptenos por el fenómeno de formación de grupos activos. Odell (39) y Chopra(48), sugieren que debe tener un efecto benéfico para la especificidad de los anticuerpos formados, si bien es cierto que puede resultar en un complejo antigénico más lábil a la acción de proteasas, etc. presentes "in vivo". Esto último parece no suceder con complejos preparados con la técnica que describe la presente tesis, pues los experimentos de control de la estabilidad - indican que se libera muy poco hapteno. Desde luego que no se puede comparar bien con las condiciones reales "in vivo", pero el problema de llevar a cabo un experimento en un animal para probar la estabilidad del - hapteno estaba fuera de las posibilidades de la Clínica de Tiroides.

Los problemas que se presentan al investigador interesado en producir sus reactivos para radioinmunoanálisis (RIA) son múltiples y de - naturaleza variada. Sin embargo, es indudable que no obstante lo "sofisticada" o "altamente especializada" que resulta la técnica, es, sin duda, actualmente la más sensible para medir específicamente muchas sustancias de interés biomédico. En México, se emplea en pocos laboratorios, - debido al costo de los reactivos, a que se requiere equipo especial y personal capacitado. En la medida en que seamos capaces de producir reactivos propios de buena calidad, estas técnicas encontrarán más aceptación en el medio científico y clínico y será posible hacer llegar sus beneficios a un mayor número de personas.

En el caso particular del RIA en hormonas tiroideas, éste constituye una de las pruebas más importantes de diagnóstico de disfunción tiroidea. Tan sólo en la Clínica de Tiroides del I.N.N. se realizan de cada hormona un promedio de 2500 pruebas al año y su costo resultaría muy elevado si no se estuvieran empleando reactivos producidos por el mismo laboratorio. En el interior de la República, el Colegio Superior de Agricultura Tropical de Villahermosa, Tabasco lleva actualmente a cabo un programa de capacitación en técnicas de RIA enfocada hacia el cam-

po de la medicina veterinaria, y en Durango, Guadalajara y otras ciudades de la República se desarrollan técnicas de RIA en hormonas tiroideas con material muchas veces suministrado por la Clínica de Tiroides del - I.N.N. Se comprende pues que el esfuerzo por establecer y aplicar estas técnicas es profundo, y de allí la importancia de conocer el aspecto de la producción de reactivos.

En el campo de los antígenos sintéticos, esta Tesis pretende - ampliar el conocimiento y los métodos para su mejor utilización.

CONCLUSIONES

- 1) Para el caso de las hormonas tiroideas usadas como haptenos, no se alcanza una saturación de la proteína soporte, lo que permite obtener complejos antigénicos con el grupo hapténico deseado y el número de estos grupos hapténicos se puede fijar a voluntad, trabajando bajo condiciones establecidas.
- 2) El tiempo de reacción para las dos hormonas tiroideas al acoplarse a la tiroglobulina humana, usando etil carbodiimida como agente acoplador quedó establecido en 30 minutos.
- 3) El pH óptimo para llevar a cabo la reacción de acoplamiento de ambas hormonas fue de 5.6 .
- 4) En general la reacción aumenta en rendimiento con la temperatura, - siendo 45°C la óptima para ambas hormonas.
- 5) Se comprobó la formación de complejos de poli-aminoácidos durante la reacción. Esto abre la posibilidad de investigar este fenómeno para posibles usos en inmunización.
- 6) Una relación molar de 3:1 (agente acoplador :hapteno) es suficiente - para llevar a cabo la reacción, para el caso de la T₃ y la T₄ como haptenos y tiroglobulina humana como soporte proteico.

APENDICE 1

Fórmulas estadísticas necesarias para efectuar los cálculos:

Promedio o media : $\bar{x} = \sum X/n$

donde X es el valor obtenido experimentalmente y n el número de ensayos.

Desviación estándar (s) :

$$s = \pm \sqrt{\sum (x')^2/n-1}$$

donde $x' = X - \bar{x}$

APENDICE 2

Criterio De Chauvenet

Desde un punto de vista estrictamente estadístico no se pueden descartar valores a menos que se pruebe error por probabilidad experimental, para lo cual se puede utilizar el criterio de Chauvenet.

El ejemplo a continuación está basado en la curva de concentración de T₃, (sección 3.2.1., tabla 3.2.1.). (pag.31). Supongamos que se obtuvo un valor de 53.5% para la concentración de 16.31 mg ; claramente se ve que es muy diferente de los demás valores obtenidos. Se tiene la idea de no tomar en cuenta ese valor, pero debemos tener un límite en base al cual desechar o no valores. Se siguen los pasos siguientes:

Calcular:

| X | X - \bar{x} | Datos Conocidos: |
|--------|---------------|---------------------|
| 63.99% | 0 | $\bar{x} = 63.99\%$ |
| 64.90% | 0.9 | $s = \pm 1.49$ |
| 65.23% | 1.23 | $n = 7$ |
| 61.23% | -2.07 | |
| 62.99% | -1.01 | |
| 63.69% | 0.04 | |
| 53.60% | 10.40 | |

a) Calcular :

$$\text{ert}(hx') = 2n-1/2n$$

como n=7 $\text{ert}(hx') = (2 \times 7) - 1 / 2 \times 7 = 13/14 = 0.928$

b) Obtener el valor de hx' de las tablas de erf (hx') (31); erf (hx') es la función error de hx' dada por:

$$2/3.14159 \int_0^{hx'} e^{-(hx')^2} dx'$$

Y representa simplemente la probabilidad de que un error pueda exceder el valor x' .

c) h es el módulo de precisión y está dado además por :

$$h = \pm 1/s^2$$

d) Como conocemos ex' , y tenemos hx' del paso b, podemos calcular el valor observado de h . Si h , calculada del paso c, es más grande que h de b, la observación puede ser excluida del cálculo de la media.

En este caso :

$$x' = 10.399$$

$$\text{erf}(hx') = 0.928 \text{ de las tablas sabemos que } hx' = 1.28$$

$$\text{entonces : } h = 0.123$$

Calculando h como en el caso e :

$$h = 1/1.489 \times 1.414 = \pm 0.475$$

Como 0.475 es mayor que 0.123, la observación se elimina.

Pasamos a analizar el siguiente dato más desviado, que es de 61.93%, con un $x' = -2.069$ $n = 6$ (ya se eliminó un dato).

$$\text{erf}(hx') = 0.916 \quad hx' = 1.23 \quad \text{y } h = 0.6186$$

Calculando h del paso c :

$h = \pm 0.4749$; como 0.6186 es mayor que 0.4749, la observación se retiene, y por ende, todas las demás. Se deben analizar en secuencia desde el valor más desviado hasta los menos, pero es raro que se elimine más de un dato. Cuando esto sucede, debemos sospechar que el método experimental se encuentra fuera de control y que las técnicas experimentales deben ser revisadas buscando posibles errores.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Arrhenius, S. 1907. *Immunochemistry*. Macmillan, 1st Ed., New York.
- 2.- Sela, M. 1969. Antigenicity, some molecular aspects. *Science* 166 : 1365.
- 3.- Sela, M. 1966. Studies on antigenicity. *Advan. Immunol.* 5: 29.
- 4.- Hughes-Jones, N.C. 1967. Case studies on Rh neonatal disease. *Immunology* 12 : 565.
- 5.- Kabat, E.A. and A.E. Bezer. 1958. Antigenic carbohydrates. *Arch. - Biochem. Biophys.* 78 : 306.
- 6.- Mc Master, P.R.B., A.L. Schade, J.F. Finnerley, M.B. Coldwell and B. Prescott. 1970. Antigenicity of type III pneumococcal polysaccharide in mice. *Fed. Proc.* 29 : 812.
- 7.- Halloran, J.M. and W.Ch. Parker. 1965. The preparation of nucleotide protein conjugates: carbodiimides as coupling agents. *J. Immunol.* 96 : No. 3, 373.
- 8.- Steward, W.M. 1974. *Immunochemistry*. Chapman and Hall, London.
- 9.- Landsteiner, K. 1945. *The specificity of serological reactions*. rev. ed. Harvard University Press, Cambridge, Mass. Reprinted by Dover Publications, New York, 1962.
- 10.- Ehrlich, P. 1910. *Studies in Immunology*. Wiley, New York.
- 11.- Landsteiner, K. and J. Van der Scheer. 1936. The specificity of haptens antibodies. *J. Exp. Med.* 63 : 325.
- 12.- Krause, R.M. 1970. Reactions of carbohydrate antibodies. *Advan. Immunol.* 12 : 3.
- 13.- Reporte Técnico No. 448. 1969. Factors regulating the immune response. OMS.
- 14.- Jaton, J.L. and M. Sela. 1968. Antigenicity of aminoacids. *J. Biol. Chem.* 243 : 5616.
- 15.- Davis, D.B., R. Dulbecco, N.H. Eisen, S.H. Ginsberg and B.W. Wood. 1973. *Microbiology*. 2nd. Ed. Harper and Row Inc. Hagerstown, Md.
- 16.- Berson, S.A. and R.S. Yalow. 1971. Radioimmunoassay : a status report. In *Immunology : Current Knowledge of Basic Concepts in Immunology and Their Clinical Applications*. R.A. Good and D.W. Fisher, editors. Sinauer Associates, Stamford, Conn. 287.
- 17.- Butler, V.P. Jr. and S.M. Beiser. 1976. Antibodies to small molecu-

- les:biological and clinical applications. *Advan. Immunol.* 17 :135.
- 18.- Vaughan, J.R.Jr. and R.L. Osato. 1952. Preparation of peptides - using mixed carbonic carboxylic acid anhydrides. *J.Am.Chem.Soc.* 74 :676.
- 19.- Churchill, W.H. and D.F. Tapley. 1964. Antibodies specific for thyroxine and its analogues. *Nature* 202 : 29.
- 20.- Sheehan, J.C., P.A. Cruickshank, G.L.Boshart. 1956. Uses of urea - anhydrides : carbodiimides. *J.Org.Chem.* 21:439.
- 21.- Sheehan J.C., P.A. Cruickshank and J.J. Hlavka. 1956. Synthesis of carbodiimides. *J.Org. Chem.* 21 : 439.
- 22.- Khorana,H.G. 1953. Reactions of coupling agents. *Chem.Rev.* 53:145.
- 23.- Sheehan, J.C. and G.P. Hess. Uses of urea derivatives. *J.Am.Chem. Soc.* 77 :1067. (1955).
- 24.- Goodfriend,T.L., L.Levine and G.D. Fasman. 1964. Antibodies to bradikinin and angiotensin : A use of carbodiimides in immunology. *Science* 144: 1344.
- 25.- Abraham, E.G. and P.K. Grover. 1972. Covalent linkage of hormonal - haptens to protein carriers for use in radioimmunoassay. In *Principles of Protein Binding Analysis*. D.W. Odell and W. Daughaday editors. Cambridge University Press, Cambridge, Mass. 134.
- 26.- Habeeb, A.F.S.A. and R. Hiramoto. 1968. Antibodies for amino group haptens. *Arch. Biochem. Biophys.* 126 : 16.
- 27.- Avrameas, S. and T. Ternynok. 1969. Coupling properties of glutaraldehyde. *Immunochemistry* 6 : 53.
- 28.-Nejad, I., J. Bollinger, N.A. Mitnick, P. Sullivan and S. Reichlin. 1975. Measurement of plasma and tissue triiodothyronine concentrations in the rat by radioimmunoassay. *Endocrinology* 96 : No. 3, 773.
- 29.- Berson S. and J.H. Cahnmann. 1972. Iodoamino acids. In *Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology*. S.Berson, editor. North - Holland Publishing Co. The Netherlands. 27.
- 30.- Skowsky,R.W. and A.D. Fisher. 1972. The use of thyroglobulin to induce antigenicity to small molecules. *J. Lab. Clin. Med.* 80 No. 1 : 134.
- 31.- Brewer, J.M., J.A. Peace and B.R. Ashworth. 1974. *Experimental Techniques in Biochemistry*, Chap. 2, Treatment of Gaussian Measurement Data, Prentice-Hall, New Jersey.
- 32.- Mora, R. Tesis Profesional. 1977. Aislamiento y Purificación de Ti-

roglobulina Humana. Facultad de Química, UNAM.

- 33.- Brown, L.B., P.R. Ekins, M.S. Ellis, and S.W. Reith. 1970. Specific antibodies to triiodothyronine. *Nature* 226 : 359.
- 34.- Hallaba E. and G. El-Shaboury. 1973. An improved method of labeling thyroid hormones with radioiodine. *J. Nuc. Med.* 15 : No. 4, 270.
- 35.- Erlanger F.B. 1972. Principles and methods for the preparation of drug protein conjugates for immunological studies. *Pharmacological - Reviews* 25 : No. 2, 271.
- 36.- Birks, J.B. 1964. *The Theory and Practice of Scintillation Counting*. Pergamon Press, New York.
- 37.- Wang C.H. and D.L. Willis. 1965. *Radiotracer Methodology in Biological Sciences*. Prentice-Hall, New Jersey.
- 38.- Jaffe M.B. and N.J. Walsh. 1965. *Immunological Methods of Investigation*. Prentice-Hall, inc. New York.
- 39.- Odell, D.W., A.G. Abraham, R.W. Skowsky, A.M. Hescor and A.D. Fisher. Production of antidera for radioimmunoassay. In *Principles of Protein Binding Analysis*. S. Berson, editor. Prentice-Hall, New York. (1972).
- 40.- Rall, E.J. and J.I. Kopin. 1967. Coupling of haptens using carbodiimides. *J. Immunol.* 108 : No. 5. 758.
- 41.- Lehninger, A. 1968. *Biochemistry*. Worth Publishers, Philadelphia, Pa.
- 42.- Spiro, M.J. 1970. Studies on the protein portion of thyroglobulin. *J. Biol. Chem.* 245: 5820.
- 43.- Chavarría, J. 1975. *Enfermedades del Tiroides*. La Prensa Médica - Mexicana.
- 44.- Cody, V. 1976. Thyroid hormones : binding, structure and function. *International Congress of Biochemistry*, 408-3-279, Hambourg, FRG.
- 45.- Weigle W.O., G.J. High and R.M. Nakamura. 1969. The role of Mycobacteria and the effect of proteolytic degradation of thyroglobulin on the production of autoimmune thyroiditis. *J. Exp. Med.* 130: 243.
- 46.- Reichlin, M. J.J. Schnure and V.T. Van der Scheer. 1968. Induction of antibodies to porcine ACTH in rabbits with non-steroidal polymers of BSA and ACTH. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 128: 347.
- 47.- Neigh D.W. 1967. *Natural and Acquired Immunologic Unresponsiveness*. World Publishing Co. 130.

48.- Chopra I.J., J.C. Nelson, D.H. Solomon et al. 1971. Production of antibodies specifically binding T_3 and T_4 . J. Clin. Endoc. Metab. 32: 299.