

302 827
Nº 7
2 E.



UNIVERSIDAD MOTOLINIA A. C.

ESCUELA DE QUIMICA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

IMPLEMENTACION DE UN RADIOINMUNOANALISIS PARA LA DETECCION
DE ANTICUERPOS ANTI-PEROXIDASA TIROIDEA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a

LAURA ISABEL ESTRADA JOE

México, D.F.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**TRABAJO REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE
MEDICINA NUCLEAR Y CLINICA DE TIROIDES DEL
INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN
BAJO LA TUTORIA DE LA QFB MA. GUADALUPE LOPEZ CARRASCO**

A ti Señor, Gracias por la vida, porque has sido mi guía, amigo y compañero cada uno de los momentos de mi vida.

A mis padres, Antonio e Isabel por su amor, confianza, ejemplo y apoyo incondicional.

A mis hermanos, Toño y Alex, por su cariño, apoyo y comprensión.

A la Q.F.B. Ma. Guadalupe López Carrasco por su enseñanza, cuidado y orientación, Así como el tiempo que me dedicó para la realización de este trabajo.

A la memoria del Dr. Jorge Maisterrena Fernández por la confianza deposita en mí.

A mi amiga y compañera la Q.F.B. Teresa González Pichardo por su confianza y ayuda en todos estos años, especialmente en la realización de esta tesis.

A todo el personal de los departamentos de Medicina Nuclear y Clínica de Tiroides, Infectología, Patología y Gastroenterología del I.N.N.S.Z. por su inapreciable ayuda y colaboración en la elaboración de esta tesis.

A mis amigos, porque siempre han estado conmigo.

INDICE

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 Planteamiento del problema.....	1
1.2 Objetivo.....	2
1.3 Hipótesis.....	2

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1 Características generales de los microsomas.....	3
2.2 Propiedades moleculares de la TPO.....	3
2.3 Características enzimáticas de la TPO.....	4
2.4 Propiedades fisicoquímicas de la TPO.....	5
2.5 Características antigénicas de la TPO.....	6
2.6 Papel de la TPO en la biosíntesis de la hormonas tiroideas.....	8
2.7 Acción inmunológica de la TPO.....	11
2.8 Aplicación clínica de la detección de anticuerpos anti-TPO.....	14
2.9 Sistemas inmunométricos para la detección de anticuerpos anti-TPO.....	16
2.10 Radioinmunoanálisis (R.I.A.).....	19

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Diagrama.....	25
3.2 Material.....	26
3.2.1 Material biológico.....	26
3.2.2 Material de laboratorio.....	27

3.2.2.1 Material diverso.....	27
3.2.2.2 Equipo.....	27
3.2.2.3 Reactivos.....	28
3.3 Preparación de soluciones.....	29
3.4 Metodología.....	35

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Resultados.....	37
4.2 Discusiones.....	50

CAPITULO V

CONCLUSIONES.....	52
--------------------------	-----------

BIBLIOGRAFIA.....	53
--------------------------	-----------

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años se ha podido demostrar, que una gran diversidad de enfermedades tiroideas son de origen autoinmune, situación por la cual la cuantificación de anticuerpos antitiroideos, (anti-tiroglobulina y anti-microsoma) adquiere gran importancia en el diagnóstico y seguimiento de las mismas. (22, 24, 42)

También ha quedado demostrado que el componente antigénico de mayor importancia en los microsomas tiroideos es la enzima peroxidasa, razón por la cual la mayor parte de los sistemas analíticos que permiten su detección utilizan preparaciones purificadas de la enzima. (32, 37)

En la actualidad existe en el mercado una gran diversidad de sistemas analíticos que permiten la detección de los anticuerpos anti-peroxidasa tiroidea (anti-TPO), mediante la utilización de eritrocitos, partículas de gelatina, reacciones colorimétricas catalizadas enzimáticamente o empleando trazadores radiactivos. Sin embargo, la disponibilidad de los mismos en un laboratorio de análisis clínicos se ve obstaculizada por razones económicas (altos costos del material), administrativas (aduanales y permisos especiales) y técnicas (inherentes a la complejidad de la metodología), situación que vuelve prioritaria la implementación de un sistema analítico sencillo que cumpliendo con todos los parámetros de control de calidad (sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y estabilidad de los reactivos) permita la autosuficiencia a un costo razonable.

1.2 OBJETIVO

Implementar y estandarizar en el laboratorio un sistema de radioinmunoanálisis (R.I.A.), que permita de una manera sencilla la detección y cuantificación de anticuerpos anti-peroxidasa tiroidea (anti-TPO) en fluidos biológicos con especificidad, sensibilidad y reproducibilidad comparables con los que se obtienen en sistemas comerciales, a un costo más accesible.

1.3 HIPOTESIS Considerando que el R.I.A. es una metodología altamente sensible y específica, que permite identificar la presencia de concentraciones de analito del orden de 10^{-9} g/l, es posible implementar un sistema que no sólo permita la detección, sino también la cuantificación de anticuerpos anti-TPO, en muestras biológicas provenientes de sujetos con enfermedad tiroidea de origen autoinmune.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1 CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS MICROSOMAS

Los microsomas son fracciones subcelulares con forma vesicular que se localizan tanto en las microvellosidades, como en la superficie apical y plasmática de las células foliculares de la glándula tiroides humana (tirocitos). (12, 13, 37)

Los microsomas provienen del citoplasma como parte esencial del retículo endoplásmico liso. Tienen un diámetro aproximado de 0.3 a 0.5 μ y están limitados por una membrana sobre la cual se encuentran adheridos unos gránulos de aproximadamente 150 Å de diámetro que son cúmulos de peroxidasa tiroidea (TPO). (12, 23, 32, 37)

El componente antigénico de los microsomas está relacionado con la TPO; su composición bioquímica inmunológica y molecular, indica que la TPO es el único autoantígeno que compone a los microsomas. (13, 23, 31, 32)

2.2 PROPIEDADES MOLECULARES DE LA TPO

La TPO es una enzima sintetizada en el retículo endoplásmico liso, como una hemoproteína glicosilada de cadena larga, con un peso molecular que varía entre 101 y 110 kDa. (13, 37, 38, 41)

La TPO tiene una estructura tridimensional y globular debido a la presencia de puentes disulfuro que condicionan la formación de algunas isoformas de la enzima. (41)

La molécula se compone de 933 aminoácidos (a.a.) de los cuales solamente 5 a lo largo de la molécula (109, 280, 564, 780 y 793), son glicosilados. La enzima se encuentra anclada a la membrana celular en la región que comprende los aminoácidos 848 a 871. Fig. 1 (42, 52)

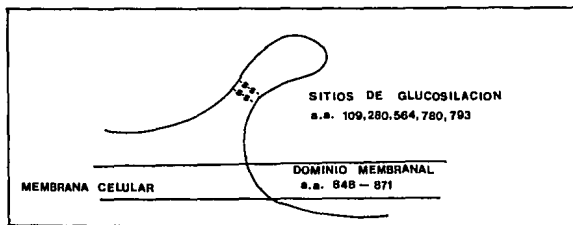


FIG 1. ESTRUCTURA DE LA PEROXIDASA TIROIDEA (TPO)

2.3 CARACTERISTICA ENZIMATICAS DE LA TPO

La TPO es una oxido-reductasa que presenta en su estructura dos sitios catalíticos: un donador aromático con acción oxidativa y un segundo sitio reconocido para reducciones no orgánicas. (24, 41)

La enzima se ha identificado en al menos dos isoformas, con diferente actividad enzimática e inmunogénica, codificadas por la presencia de dos especies de RNAm para la TPO humana:

a) TPO I.- también llamada TPO verdadera, presenta mayor actividad enzimática y está formada por 933 aminoácidos.

b) TPO II.- es llamada pseudo TPO, cuya actividad enzimática es menor, está conformada por 876 aminoácidos.

En ambos casos aproximadamente el 10 % de la molécula está constituida por carbohidratos. (8, 18, 33, 52)

Al ser una oxido-reductasa, la TPO se ve involucrada en dos pasos importantes del proceso de biosíntesis de las hormonas tiroideas; consecuentemente, su actividad es modulada por la tirotrófina (TSH) y depende del mecanismo de la adenilato ciclasa (AMPc). La TPO participa inicialmente en la iodinación de los residuos tirosínicos unidos a la tiroglobulina y posteriormente cataliza su acoplamiento intramolecular, evento necesario para la formación de las hormonas tiroideas (tiroxina y triyodotironina) . (8, 16, 17, 33, 41, 45)

2.4 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA TPO

La TPO tiene un peso molecular que varía entre 101 y 110 kDa. Es una molécula soluble en desoxicolato de sodio, triton X-100, cloruro de potasio (KCl) y en menor proporción en solución de algunas enzimas como la papaína y la tripsina.

Su punto isoeléctrico se encuentra a un pH entre 5.75 y 5.90 (31, 32)

2.5 CARACTERISTICAS ANTIGENICAS DE LA TPO

La TPO es considerada un antígeno secuestrado, debido a que no se encuentra en contacto directo con el sistema inmunológico. Se ha identificado como único autoantígeno presente en los microsomas tiroideos, y desde otro punto de vista también se considera un antígeno organo-específico. (13, 37, 40, 52)

Los sitios antígenicos presentes en la molécula son expresados por un gen recombinante especial para la TPO humana, que es un marcador genético polimórfico codificado en el cromosoma 6. (22, 20, 36)

En varios estudios realizados con anticuerpos monoclonales, se han identificado aparentemente 12 sitios de afinidad inmunológica a lo largo de la molécula de la enzima; estos son expresados y reconocidos por los anticuerpos después de catalizar la iodación de las tirosinas. (9, 21, 27)

Se sabe que los sitios catalíticos y antígenicos se expresan muy cerca uno del otro en la molécula de la enzima, por lo cual al formarse el complejo antígeno-anticuerpo se inhibe el proceso de oxidación-reducción en el que interviene la enzima. (27, 28, 41)

Varios reportes acerca de la estructura de la TPO indican que tanto la TPO I como la TPO II se encuentran presentes en padecimientos tiroideos autoinmunes. Sin embargo, la TPO I al tener mayor actividad inmunogénica, se presenta con mayor frecuencia. Ambas formas enzimáticas son reconocidas por los epítopes específicos de los autoanticuerpos. (7, 18)

La localización de los epítopes por los autoanticuerpos anti-TPO induce patogénesis en las enfermedades tiroideas de origen autoinmune. (2, 20, 23, 27, 33)

Se han identificado diferentes fragmentos de la TPO humana que son reconocidos por autoanticuerpos específicos, principalmente en sujetos con tiroiditis de Hashimoto. Estos fragmentos se localizan en el carboxilo medio de la molécula, en el aminoácido 455. También se han localizado epítopes en el nitrógeno terminal del aminoácido 456 y en el carbono terminal del aminoácido 631. Un epítope muy importante es el que se encuentra en el carboxilo terminal de la molécula. (2, 20, 23, 25, 33, 42)

Estudios recientes indican que los sitios de mayor antigenicidad se localizan en la cadena peptídica entre los aminoácidos 100 - 119, 625 - 644, 708 - 727; también se presume la existencia de reacción cruzada entre los aminoácidos 110 - 129 de la TPO y los aminoácidos 2746 - 2765 de la tiroglobulina. (2, 24, 33)

Entre las diferentes peroxidasa, principalmente la lactoperoxidasa (LPO) y la peroxidasa tiroidea (TPO), existe homología entre las cadenas de aminoácidos. Para la TPO, entre el aminoácido 592 - 613 y para la LPO, entre los aminoácidos 564 - 589; en ambas enzimas, los doce últimos aminoácidos son idénticos presentando una secuencia. (Ver Fig. 2)

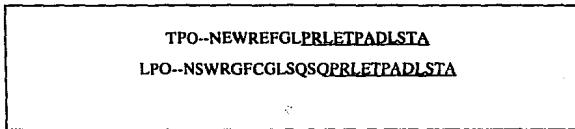


Fig.2 HOMOLOGIA DE LA SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LA TPO Y LA LPO

En ellas, las dos prolinas en donde se forman los puentes disulfuro son importantes como sitios de exposición de la molécula. (2, 9, 24, 28)

Todos los anticuerpos anti-TPO producidos reconocen la región de aminoácidos del 513 -633; sin embargo, existen anti- cuerpos específicos que se producen en determinadas patologías y reconocen regiones específicas. Tanto en la enfermedad de Graves como en la tiroiditis de Hashimoto existe formación de anticuerpos que reconocen las cadenas de aminoácidos 592 - 613 y 570 - 592; específicamente, en la tiroiditis de Hashimoto se producen anticuerpos para la región comprendida entre los aminoácidos situados en las posiciones 608 - 633. (4, 9, 41, 45, 50)

Otros autores han descrito que los carbohidratos de la molécula no están involucrados con la antigenicidad de la misma. (24, 28, 45)

2.6 PAPEL DE LA TPO EN LA BIOSINTESIS DE LAS HORMONAS

TIROIDEAS

Como se mencionó anteriormente la TPO se encuentra involucrada en dos pasos importantes del proceso biosintético de las hormonas tiroideas.

- a) Iodinación de los residuos tirosínicos unidos a la tiroglobulina.
- b) Acoplamiento intramolecular de los residuos tirosínicos iodados previamente para la formación de las hormonas tiroideas (tiroxina y triyodotironina). (5, 6, 25)

Por este motivo es de gran importancia hacer mención con más detalle, del proceso bioquímico involucrado en la biosíntesis de las hormonas tiroideas.

La biosíntesis de las hormonas tiroideas se lleva a cabo en varios pasos importantes que pueden esquematizarse como se observa a continuación:

- 1.- Captación del yodo plasmático por la célula tiroidea.
- 2.- Oxidación del yodo catalizado por la TPO.
- 3.- Iodinación de los componentes tirosoínicos que están presentes en la tiroglobulina.
- 4.- Acoplamiento de las moléculas iodadas para la formación de hormonas tiroideas.
- 5.- Captación de las hormonas, liberación y excreción de las mismas al torrente sanguíneo.

El yodo obtenido principalmente por ingestión, después de ser ingerido, pasa al torrente sanguíneo para ser incorporado a las células foliculares de la glándula tiroidea mediante dos mecanismos:

- a) Difusión desde el líquido extracelular.
- b) Transporte activo de la bomba de yodo, con la formación de un gradiente electroquímico membranar e intracelular dependiente de la TSH, con la consecuente intervención del sistema ATPasa, sodio (Na^+), y potasio (K^+). (5, 46, 50)

Una vez captado el yodo por los tirocitos, el yoduro es transformado en yodo orgánico. En este proceso interviene la TPO, estimulada por la presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2); esta reacción se lleva a cabo en la interfase célula-coloide. (Ver Fig. 3) (5, 46)

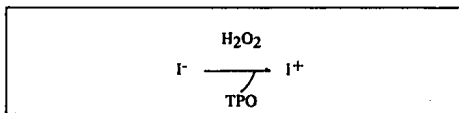


Fig. 3 REACCIÓN DE OXIDACIÓN DE YODURO A YODO ORGÁNICO, CON INTERVENCIÓN DE LA TPO.

El proceso de incorporación de yodo ya oxidado en los compuestos orgánicos como la tiroglobulina, en los residuos tirosinicos, se denomina organificación. Este proceso se efectúa dentro del coloide folicular y mediante él, el I^+ es incorporado al anillo fenólico de las tirosinas, a través de radicales libres. (Ver Fig. 4)

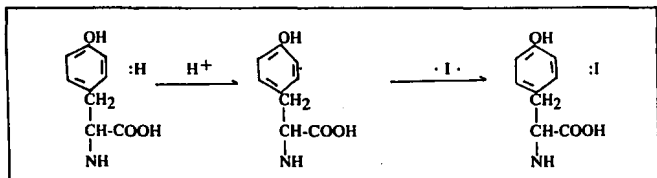


Fig. 4 REACCION DE IODINACION DE LOS RESIDUOS TIROSINICOS, A TRAVES DE RADICALES LIBRES.

Posteriormente se produce el acoplamiento de monoyodotironinas y diyodotironinas, para la formación de triyodotironina (T_3) y tiroxina (T_4).

El proceso se efectúa a través de dos mecanismos:

a) Mecanismo intramolecular: se piensa que ocurre dentro de la misma molécula de tiroglobulina y es posible que en él intervenga la TPO. (Ver fig. 5)

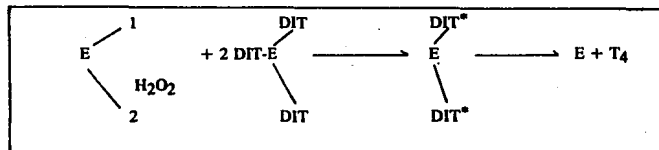


Fig. 5 MECANISMO DE ACOPLAMIENTO INTRAMOLECULAR.

b) Mecanismo intermolecular: se efectúa entre dos moléculas de tiroglobulina para la formación de triyodotironina (T₃) y tiroxina (T₄).

Las moléculas de tiroglobulina y sus residuos acoplados son captados por la célula tiroidea, por medio del proceso de pinocitosis y tras una ruptura proteolítica de los enlaces tiroglobulina-hormonas tiroideas, estas últimas son liberadas al torrente sanguíneo. (Fig. 6) (5, 22, 31, 50)

2.7 ACCION INMUNOLOGICA DE LA TPO

La TPO es reconocida como un autoantígeno órgano-específico, presente en sujetos con enfermedades tiroideas de origen autoinmune. (2, 11, 24, 25,33)

Los anticuerpos en contra del antígeno microsomal o TPO son detectados en sueros humanos de pacientes sintomáticos y asintomáticos con enfermedad tiroidea de origen autoinmune. (2, 13, 14, 24, 33)

En estudios *in-vitro*, se ha demostrado que los anticuerpos anti-TPO tienen un efecto citotóxico sobre las células tiroideas, que se activa al fijarse complemento y en asociación con las células K; este efecto puede abolirse por la inactivación del sistema del complemento y se explica en base a la presencia del complejo de histocompatibilidad tipo II. (2, 12, 13, 24, 33, 53)

La presencia de anticuerpos anti-TPO puede llegar a inhibir la actividad de la TPO, debido a la formación del complejo antígeno-anticuerpo, provocando una disminución en la iodación de los residuos tirosínicos en el proceso de biosíntesis de hormonas tiroideas ó

TEJIDO SANGUINEO

CITOPLASMA
CELULA FOLICULAR

FOLICULO

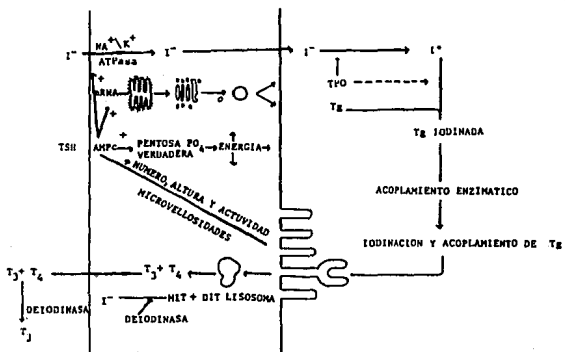


FIG. 6 BIOSINTESIS DE HORMONAS TIROIDEAS

disminución del acoplamiento de los residuos tirosínicos ya iodinados en el mismo proceso bioquímico. (2, 14, 25, 52)

La concentración de anticuerpos anti-TPO está relacionada con el grado de infiltración linfocitaria de la glándula tiroides. La presencia de estos anticuerpos, *per se*, no implica la destrucción del tejido. (24, 33, 34, 53)

El efecto citotóxico de los anticuerpos anti-TPO se asocia a la infiltración linfocitaria y de células plasmáticas sobre las células de la glándula tiroides. La presencia de anticuerpos anti-TPO se ve favorecida por el aumento de la producción de la enzima que a su vez está regulada indirectamente por la concentración de TSH. (15, 35, 42, 44)

Análogamente a otras enfermedades autoinmunes, las enfermedades tiroideas autoinmunes presentan una predisposición genética y ambiental, ya que se han reconocido diferentes marcadores genéticos polimórficos, codificados en el cromosoma 6, que son específicos para el factor de histocompatibilidad clase II, con alotipos HLA específicos. (DR3 para tiroiditis atrófica y enfermedad de Graves y DR5 para tiroiditis de Hashimoto). (1, 8, 14, 15, 36, 44)

Es probable que teniendo conocimiento sobre estos marcadores genéticos ya localizados, en un futuro se pueda regular, en el organismo, la producción de anticuerpos anti-TPO. (1, 36)

2.8 APLICACION CLINICA DE LA DETECCION DE ANTICUERPOS

ANTI-TPO

La importancia en la detección de anticuerpos anti-TPO y contra otros antígenos tiroideos, radica no solamente en el diagnóstico clínico, sino que permite efectuar un seguimiento adecuado de los pacientes con diferentes tiropatías, especialmente aquellas de origen autoinmune. (1, 35, 44)

Existe una gran variedad de padecimientos tiroideos en los que se presentan títulos positivos de anticuerpos anti-TPO; sin embargo, en algunas enfermedades autoinmunes no tiroideas pueden presentarse títulos positivos no considerables de anticuerpos anti-TPO. (1, 25, 34)

Podemos mencionar una gran variedad de enfermedades tiroideas de origen autoinmune como:

- a) Hipertiroidismo autoinmune
- b) Enfermedad de Graves
- c) Tirotoxicosis
- d) Bocio multinodular tóxico
- e) Tiroiditis
 - T. subaguda de Quervain
 - T. aguda
 - T. linfocítica focal
 - T. autoinmune atrófica
 - T. de Hashimoto (crónica)

(1, 5, 31, 44)

Las tiroiditis, que son consideradas enfermedades órgano- específicas, constituyen un amplio grupo de procesos caracterizados por lesiones inflamatorias en el seno de la glándula tiroides. Sin embargo, este grupo de padecimientos es sumamente heterogéneo en cuanto a su etiología, características clínicas y evolutivas. (1,5,26,34,44)

La infiltración linfocitaria en la glándula tiroides constituye una característica importante en este grupo de padecimientos y dicha situación se correlaciona en forma importante con la presencia de anticuerpos anti-tiroideos (anti-TPO y anti-Tg) (5)

En la tiroiditis subaguda de Quervain se presentan granulomas que contienen células gigantes típicas y células epiteliales así como un gran número de granulocitos, razón por la cual se dice que esta tiroiditis es de tipo granulomatoso. Generalmente se inicia por una infección viral (influenza), que provoca la liberación de tiroglobulina y TPO, induciendo así la formación de anticuerpos anti-tiroideos que se presentan en la circulación periférica en títulos medianos. (5, 28, 34)

Otro tipo de tiroiditis agudas también granulomatosas en donde se presentan células gigantes, inicia por un cuadro infeccioso presentándose títulos de anticuerpos anti-TPO y anti-Tg muy bajos.

En la tiroiditis atrófica focal se presentan títulos no muy altos para anticuerpos anti-TPO y bajos o negativos para otros anticuerpos anti-tiroideos. (5, 20, 44)

La tiroiditis de Hashimoto es el padecimiento más estudiado de entre esta serie de enfermedades, debido a que en el proceso patológico que implica, los anticuerpos anti-TPO juegan un papel muy importante.

La tiroiditis de Hashimoto se caracteriza por ser una enfermedad órgano-específica, que se inicia con hipertiroidismo y formación de bocio difuso, observándose posteriormente destrucción de los folículos tiroideos. En su evolución se presenta infiltración linfocitaria, monocítica y de células plasmáticas asociada a los centros germinales, situación que se traduce posteriormente, tanto en un funcionamiento disminuido o hipotiroidismo, como en la formación de anticuerpos anti-tiroideos (anti-TPO y anti-Tg). (5, 9, 34, 44)

En aproximadamente el 90% de los pacientes con tiroiditis de Hashimoto, se observan títulos para anticuerpos antitiroideos medianamente positivos a francamente elevados especialmente en el caso de anticuerpos anti-TPO, por lo que estos anticuerpos son considerados como indicador de patogenicidad al correlacionarse con el grado de actividad de la enfermedad y la destrucción de la glándula tiroidea. (4, 5, 9, 20, 34)

2.9 SISTEMAS INMUNOMETRICOS PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-TPO

Se han implementado diferentes sistemas inmunométricos, para la detección y cuantificación de anticuerpos antitiroideos y entre ellos, de los anticuerpos anti-TPO:

- 1.- Inmunodifusión
- 2.- Fijación del complemento
- 3.- Hemaglutinación pasiva
- 4.- Aglutinación en partículas de látex
- 5.- Inmunofluorescencia (método inmunohistoquímico)
- 6.- Inmunoenzimático (E.L.I.S.A.)
- 7.- Radioinmunoanálisis (R.I.A.)

8.- Inmunorradiométrico (I.R.M.A.)

En los últimos años se han empleado principalmente sistemas analíticos como el I.R.M.A., E.L.I.S.A. y R.I.A., que presentan una elevada sensibilidad y especificidad para la detección del analito. (4, 7, 12, 30, 39)

1.- Inmudifusión: se realiza en un medio semisólido que generalmente es agar. El objetivo de esta técnica es detectar la formación del complejo antígeno-anticuerpo (Ag-Ac), por la presencia de precipitado; no es una prueba muy sensible ya que con ella pueden detectarse niveles de alrededor de 1 g/l de analito. (4, 7, 19)

2.- Fijación del complemento: las reacciones Ag-Ac en las cuales se activa el sistema del complemento, no producen ninguna manifestación visible, por lo que requieren de un indicador que evidencie el fenómeno. Generalmente se utilizan eritrocitos de carnero que al lisarse liberan hemoglobina (Hb). Es un método semicuantitativo con sensibilidad de orden de 10^{-1} g/l, por lo que su utilidad se limita a concentraciones elevadas de antígeno. (4, 7, 19, 39)

3.- Hemaglutinación pasiva: es un método más sensible que la inmunodifusión (10^{-4} g/l), aunque constituye también un procedimiento semicuantitativo. Esta prueba se basa en el fenómeno de aglutinación, que ocurre con células sensibilizadas (eritrocitos) en presencia de un antígeno específico. (4, 7, 9, 39)

4.- Aglutinación en partículas de látex: técnica semicuantitativa con sensibilidad semejante a la que presenta el sistema de hemaglutinación. Su fundamento es similar a ella, con la diferencia que las partículas sensibilizadas son de látex. (4, 7, 9, 39)

5.- Inmunofluorescencia: es un método inmunohistoquímico o citoquímico, ya que se realiza preferentemente en tejido obtenido por biopsia, utilizando un anticuerpo específico marcado con fluoresceína, que permite la localización del antígeno, con la ayuda de un microscopio especial. (4, 7, 39)

6.- Inmunoenzimático E.L.I.S.A. (Enzyme Linked Immunoabsorbed Assay): es un sistema analítico recientemente desarrollado, altamente sensible (10^{-6} g/l) y específico por lo que se emplea para cuantificación, sin embargo, es de mayor costo en relación con los anteriores. En él uno de los componentes del complejo Ag-Ac es marcado con una enzima (fosfatasa alcalina o peroxidasa) que al ponerse en contacto con un sustrato adecuado que sirve como revelador, da lugar a un compuesto colorido que puede medirse fotométricamente. (4, 7, 19, 34, 39)

7.- Radioinmunoanálisis R.I.A.: esta metodología tiene un alto grado de sensibilidad; se basa en la reacción Ag-Ac detectable gracias a la presencia de un trazador radiactivo (generalmente 125 I). En este sistema se establece una competencia entre el antígeno natural y el antígeno radiomarcado, por unirse a un receptor específico. La sensibilidad de esta metodología es del orden 10^{-9} g/l . (4, 7, 48)

8.- Inmunorradiométrico I.R.M.A.: es un método alternativo, tan sensible y específico como el R.I.A.; es prácticamente una modificación de éste. En él, el antígeno a cuantificar se combina con un anticuerpo radiomarcado y en lugar de establecerse una competencia con el trazador por una cantidad limitada de anticuerpo, éste último se presenta en exceso. Su mayor inconveniente es la disposición de anticuerpos con un grado de pureza adecuado para su marcación (4, 7, 30, 48)

2.10 RADIOINMUNOANALISIS (R.I.A.)

El R.I.A. constituye una metodología analítica altamente sensible y específica que se utiliza para la cuantificación de diferentes analitos (péptidos, hormonas, vitaminas, fármacos, etc...) que se encuentran en muy bajas concentraciones en el torrente sanguíneo (10^{-9} g/l).

El sistema involucra la formación del complejo antígeno anticuerpo (Ag-Ac), mismo que se hace evidente por la presencia de un trazador radiactivo en uno de sus componentes. En él se establece una competencia entre el antígeno natural y el antígeno radiomarcado por unirse a una cantidad limitada de un receptor específico o anticuerpo, dando lugar a la formación de dos diferentes complejos Ag-Ac (frío o estable) y Ag-Ac* (caliente o radiomarcado)

La cantidad de compuesto radiomarcado unido es inversa a la concentración del analito presente en la muestra a cuantificar.

El sistema de R.I.A. está constituido por :

- a) Un receptor específico (Ac) que se une a la sustancia a medir (ligando o antígeno).
- b) Un ligando marcado con un isótopo radiactivo (Ag^*), para constituir un trazador.
- c) Antígeno no marcado o natural (Ag) empleado como estándares de concentraciones conocidas, que permitirán establecer una correlación con el problema.
- d) Agente de separación entre el ligando unido al receptor y el libre (agentes específicos y no específicos) Tabla I

TABLA I : METODOS DE SEPARACION DEL TRAZADOR UNIDO Y LIBRE PARA R.I.A.

METODO		MATERIAL EMPLEADO
ADSORCION	FRACCION LIBRE	CARBON CUBIERTO CON DEXTRAN
	FRACCION UNIDA	RESINAS DE INTERCAMBIO IONICO
PRECIPITACION INESPECIFICA DE LA FRACCION UNIDA	SOLVENTES ORGANICOS	ETANOL, POLIETILENGLICOL
	SALES	SULFATO DE AMONIO
	ACIDOS	TRICLOROACETICO
PRECIPITACION INMUNOLOGICA DE LA FRACCION UNIDA(ESPECIFICA)		DOBLE ANTICUERPO
FASE SOLIDA		POLIMEROS RECUBIERTOS DE ANTICUERPO PARTICULAS DE HIERRO O SILICATOS UNIDOS A MOLECULAS DE ANTICUERPO

Las propiedades de unión de los reactantes en un radioanálisis se ven afectados por diferentes factores. La especificidad del sistema depende del receptor, que generalmente es un anticuerpo producto de la inmunización de un animal para obtener inmunoglobulinas específicas. La sensibilidad del sistema está limitada por dos factores: la avidéz del receptor y la actividad específica del trazador. La especificidad es única para la unión y la avidéz denota la potencia de unión. (4, 7, 48)

La formación del complejo Ag-Ac no es propiamente una reacción química; durante élla se establecen interacciones de complementaridad entre la determinante antigénica y la región variable del anticuerpo, interviniendo fuerzas de atracción y repulsión de ambas moléculas.

Esta reacción está sujeta a la Ley de Acción de Masas que dice: " La velocidad de la reacción es directamente proporcional a la concentración de las masas activas en la reacción ". La formación del complejo Ag-Ac se ve influenciada por la concentración de los reactantes y tiende al equilibrio. (Ver Fig. 7)

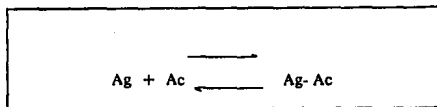


Fig. 7 REACCION ANTIGENO-ANTICUERPO

Existe una constante de proporcionalidad, que es función de la concentración de reactantes y productos. (Ver Fig.8)

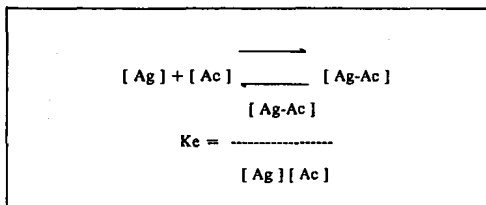


Fig. 8 EQUILIBRIO DE LA REACCION ANIGENO-ANTICUERPO

El sistema se puede ver afectado en su equilibrio por diferentes factores, tales como: pH, temperatura, concentración de los reactantes, fuerza iónica, etc... (4, 7, 44, 48)

Como ya se mencionó, el R.I.A. necesita de un trazador radiactivo para evidenciar la reacción; este trazador debe comportarse homologamente al antígeno natural. Entre los núclidos radiactivos más utilizados están : C¹⁴, H³ y I¹²⁵, Para su elección es importante tomar en consideración el tiempo de vida media radiactiva (T^{1/2}), el tipo de elementos que conforman la molécula a ser marcada y la labilidad de la misma, ya que algunos compuestos sufren alteraciones importantes en su estructura durante el proceso de radiomarcación, alterando su comportamiento y propiedades antigénicas. (4, 7, 44, 48)

Tomando en consideración todas estas características el I¹²⁵ es el radionúclido más utilizado para la metodología de R.I.A.

El marcaje para obtener una molécula trazadora se basa en la introducción de un isótopo radiactivo en la estructura de ésta, mediante un método químico o biológico adecuado. Se han descrito varios métodos de radiomarcaje; los más empleados en la actualidad son: Lactoperoxidasa (LPO) y Iodogen, los cuales tienen su fundamento en una

reacción de oxidación para la introducción de un átomo de 125 en la molécula de interés.
(29, 49)

Cualquiera que sea la técnica de marcación empleada, el Ag^* , deberá someterse a un proceso de purificación, para que pueda utilizarse en el sistema analítico. Con este fin se han utilizado diferentes procedimientos fisicoquímicos tales como: cromatografía en capa fina, cromatografía en papel, cromatografía de exclusión molecular, intercambio iónico, diálisis, cromatografía líquida de alta presión (HPLC). La elección del sistema de purificación dependerá de su disponibilidad y eficiencia para la molécula marcada, buscando siempre la sencillez y rapidez del procedimiento. (4, 7, 48, 49)

Existen dos modalidades de la metodología de R.I.A.

1.- Sistema competitivo

2.- Sistema no competitivo

1.- Sistema competitivo: es el más común, está dirigido a la cuantificación de un ligando, al establecerse una competencia entre éste y el antígeno radiomarcado; como resultado de la reacción hay formación de complejos, frío o estable ($Ag-Ac$) y caliente o radiomarcado ($Ag-Ac^*$). (4, 7, 48)

En este sistema se limita la cantidad del receptor, para que la competencia que se establece por éste pueda correlacionarse con la cantidad de complejos marcados formados. El tiempo para que se efectúe la reacción depende de las concentraciones de los reactantes.

2.- Sistema no competitivo: en este tipo de sistemas, el marcado con un radioisótopo es un anticuerpo, razón por la cual es particularmente útil cuando el ligando

no es de fácil radiomarcación. El ligando debe presentar al menos dos regiones moleculares con capacidad para unirse al receptor.

El receptor o anticuerpo se encuentra acoplado a una matriz sólida insoluble. Debe existir una fase adicional, anticuerpo radiomarcado (Ac^*), que al reaccionar con el complejo previamente formado ($Ag-Ac$), dé lugar a un complejo $Ac-Ag-Ac^*$. (4, 7, 30, 48)

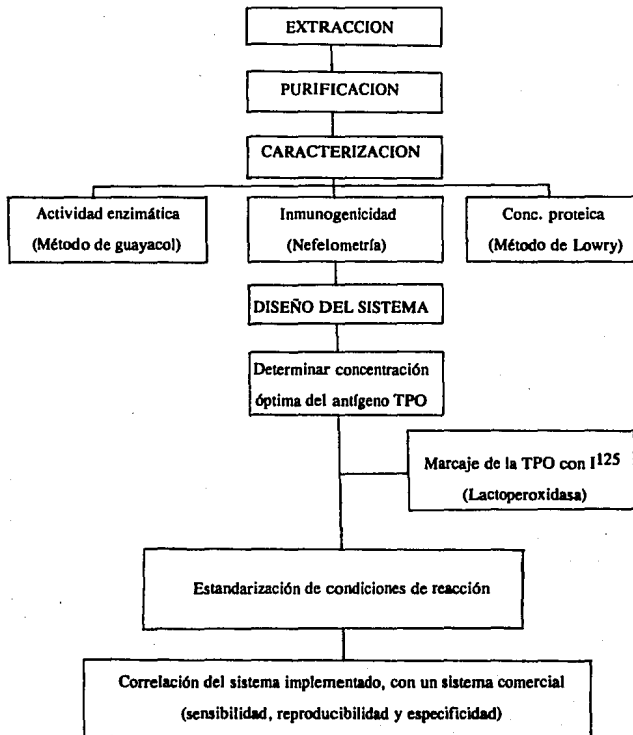
La mayor utilización de los sistemas competitivos ha sido la detección de moléculas antigénicas de bajo peso molecular, mientras que los sistemas no competitivos se han orientado para cuantificar sustancias de peso molecular mayor. (4, 7, 30, 48)

En ambos sistemas, la concentración del analito presente en la muestra problema puede cuantificarse por interpolación en la curva dosis-respuesta construida en base al comportamiento de a los estándares de concentración conocida. (7, 48)

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DIAGRAMA



3.2 MATERIAL

3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

- Tejido tiroideo obtenido de autopsia de sujetos normales y preservado a -70°C (INNSZ)
- Sueros humanos procedentes de pacientes con enfermedad tiroidea autoinmune, con diversos títulos de anticuerpos anti-TPO (INNSZ)
- Sueros humanos normales (INNSZ)
- Sueros control positivos y negativos (Fujirebio. Inc.)

3.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO

3.2.2.1 Material diverso

- Probetas graduadas Pyrex (50, 100 ml)
- Tubos de ensayo de vidrio Pyrex (130 X 100 mm, 160 X 100 mm, 120 X 75 mm)
- Vasos de precipitado Pyrex (25, 80, 100, 150 ml)
- Matraces aforados Pyrex (25, 50, 100, 1000 ml)
- Pipetas serológicas graduadas Pyrex (1, 5, 10 ml)
- Pipetas automáticas Oxford, de volumen variable (20 - 1000 μl)
- Pipetas Pasteur de punta larga
- Pinzas para soporte
- Soporte universal
- Gradillas de alambre para 90 tubos
- Membrana para diálisis,
PM 12 -14 kDa (Spectropor membrane-tubing)
- Tijeras
- Bisturí
- Pinzas de disección

- Celdillas para Nefelómetro Behring (OVI 04-05-Behring Institute)
- Celdillas para espectrofotómetro Beckman (DU-65)
- Tubos de poliestireno Eppendorf

3.2.2.2 Equipo

- Balanza analítica Mettler H 35
- Balanza gravimétrica Harvar Trip balance OHAUS Scale Corp
- Ultracongelador Revco-ULTRA low temperature freeze
- Homogenizador Polytron 111118 (Williams Brinkmann Inst.) Canadá
- Centrífuga refrigerada TJ-6 (Beckman)
- Centrífuga refrigerada RC-5B (Sorval)
- Ultracentrífuga Combi Kinematica OMBH
- Agitador magnético (Aparatos Científicos) Sol-Bat-C-127
- Nefelómetro laser (Behring Lasser Nephelometer) 3180411200734
- Espectrofotómetro UV/Vis DU 65 Spectrophotometer (Beckman)
- Columna de vidrio para cromatografía 22.0 x 2.7 cm (LKB)
- Columna de vidrio para cromatografía 1.0 x 10 cm (Pyrex)
- Potenciómetro Weston 1277 (Corning)
- Microscopio electrónico
- Equipo de ultrafiltración Amicon 8200 PM 10X (Amicon Corporation)
- Contador de radiación gamma tipo pozo 1277 Gammamaster (LKB-Wallac)

3.2.2.3 Reactivos

- NaCl	(J.T.Baker, Q.P.)
- KH_2PO_4	(J.T.Baker, A.C.S.)
- K_2HPO_4	(J.T.Baker, A.C.S.)
- Na_2HPO_4	(J.T.Baker, A.C.S.)
- NaCl 0.09 %	(PISA)
- KCl	(J.T.Baker, Q.P.)
- Albúmina bovina fracción V	(Sigma Chemicals, Q.P.)
- Na_2CO_3	(J.T.Baker, Q.P.)
- NaOH	(J.T. Baker, A.C.S.)
- Tartrato de sodio y potasio	(J.T.Baker, Q.P.)
- Reactivo Folin-Ciocalteu	(Sigma Chemicals, A.G.)
- Guayacol	(J.T.Baker, A.G.)
- H_2O_2 al 30%	(Merck, A.G.)
- HCl	(J.T.Baker, U.P.)
- H_2SO_4	(J.T.Baker, A.C.S.)
- Polietilenglicol-E 6000	(Sigma Chemicals)
- NaI-125 100 mCi/ml en NaOH pH 7-11	(Amersham Co, A.C.S.)
- Lactoperoxidasa 60-80 U/mg proteína	(INC. Biochemicals)
- Sephacryl S-200	(Pharmacia Fine Chem)
- Tween 20	(CIS Bio International, A.G.)
- Sephadex G-100	(Pharmacia Fine Chem)
- OPD-2HCl (O-Fenilendiamina-2HCl)	(Abbott Laboratories)
- Sera Tek, Microsomal antibody Test	(Fujirebio Inc.)
- Solución amortiguadora de barbituratos-EDTA 0.05M, pH 8.6	(Sigma Chemicals, A.G.)

- Anti-gamma globulina
- CuSO_4

(DAKO, G.N.)
(J.T.Baker, Q.P.)

Nota:

- U.P. = Ultrapuro
- Q.P. = Químicamente puro
- A.G. = Grado analítico
- G.N. = Grado Nefelométrico
- A.C.S. = Reactivo que cumple con las especificaciones de la Reagent chemicals.

3.3 PREPARACION DE SOLUCIONES

A) Soluciones de uso general

1.- Solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS) 0,02M, pH 7.4

NaCl	8.77 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.09 g
KH_2PO_4	2.04 g
KCl	0.22 g

Aforar a 1000 ml con agua destilada, ajustar pH.

2.- KCl 3M en solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 7.0

NaH_2PO_4	0.138 g
Na_2HPO_4	0.141 g
KCl	22.35 g

Aforar a 100 ml con agua destilada, ajustar pH.

3.- Solución amortiguadora de fosfatos 0.05M, pH 7.0

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 6.90 g

Na_2HPO_47.09 g

Aforar a 1000 ml con agua destilada, ajustar pH

B) Soluciones para concentración protéica

4.- Albúmina 100 mg/ml en solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS) 0.02M, pH 7.4

Albúmina.....500 mg

PBS 0.02M, pH 7.4..5 ml

5.- Solución A (Lowry): Carbonato de sodio 2% en NaOH 0.1N, tartrato de sodio y potasio 1%, sulfato cúprico 2%

Na_2CO_3 2.00 g

NaOH0.40 g

Aforar a 100 ml con agua destilada

CuSO_4 2.00 g

Aforar a 100 ml. Adicionar 1 ml a la primera solución

Tartrato de sodio y potasio.....1.00 g

Aforar a 100 ml. Adicionar 1 ml a la primera solución

6.-Solución B (Lowry):

Reactivo de Folin 1:1 con agua destilada

C) Soluciones para actividad enzimática

7.- Guayacol (O-metoxifenol) 0.1M

Guayacol10.9 ml

Aforar a 1000 ml con agua destilada

8.- H₂O₂ 0.03M

H₂O₂1.02 ml

Aforar a 1000 ml con agua destilada

9.- H₂SO₄ 1N

H₂SO₄.....27.2 ml

Aforar a 1000 ml con agua destilada

10.- OPD·2HCl

OPD·2HCl.....12.8 mg

Diluir 10 minutos antes de usarse con 300 µl de PBS 0.02M, pH 7.4 - H₂O₂ 1%

D) Soluciones para Nefelometría

1.- Solución amortiguadora de fosfatos - Tween - PEG, pH 7.0

KH₂PO₄0.47 g

K₂HPO₄ ·3 H₂O.....2.12 g

NaCl7.43 g

PEG E-600040.0 g

Tween-205.0 ml

NaN₃.....1.0 g

Aforar a 1000 ml con agua destilada, ajustar pH

E) Soluciones para Radiomarcación

1.- Solución amortiguadora mezcla salina de barbituratos, 0.05M, pH 8.6.

Barbiturato de sodio8.0 g
Acido barbitúrico5.8 g
EDTA3.5 g

Aforar a 1000 ml con agua destilada, ajustar pH

2.- H₂O₂ 0.03 µg

H₂O₂ al 30%5.0 µl

Aforar a 1 ml con agua destilada

F) Soluciones para Radioinmunoanálisis

1.- Solución diluyente para R.I.A. TRIS-HCl, 0.1M NaCl-0.15M-BSA-Tween 20,
pH 7.5

TRIS-HCl..... 1000 ml
NaCl8.8 g
BSA5.0 g
Tween-20..... 1.0 ml

Mezclar los reactivos y conservar a 4°C.

2.- Solución PEG-E 6000 Salino 4%

PEG-E 600040.0 g

NaCl9.0 g

Aforar a 1000 ml con agua destilada

3.4 METODOLOGIA

A) Extracción del Antígeno.

1.- Descongelar el tejido tiroideo y pesarlo; desmenuzar finamente el tejido en amortiguador de fosfatos salino 0.02M, pH 7.4 , hasta obtener una suspensión.

2.- Centrifugar la suspensión tisular a 1100 x g durante 20 minutos a una temperatura de 4°C, con el objeto de eliminar restos celulares muy pesados.

3.- Centrifugar el líquido sobrenadante del paso anterior a 9000 x g durante 20 minutos, a una temperatura de 4°C.

4.- Centrifugar el líquido sobrenadante a 105 000 x g durante 60 minutos, desechar el sobrenadante y conservar el precipitado que contiene el antígeno microsomal. (17, 19)

B) Identificación, purificación, caracterización y cuantificación del antígeno.

1.- Observar la presencia de los microsomas por microscopía electrónica de barrido.

2.- Solubilizar el antígeno microsomal, llevando el precipitado a un volumen mínimo de una solución de KCl 3M, en solución amortiguadora de fosfatos 0.01M, pH 7.0; dejar en agitación durante 16 horas. (32)

3.- Cromatografiar en Sephacryl S-200, eluir con solución amortiguadora de fosfatos 0.05M, pH 7.0 y colectar aproximadamente 80 fracciones de 1.5 ml cada una. (45, 46)

4.- Determinar la presencia de proteínas en estas fracciones mediante su lectura en espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm.

5.- Evidenciar la presencia de TPO midiendo su actividad enzimática, por el método de oxidación del guayacol. (16, 17, 18)

6.- Como un paso adicional se evidenció la presencia de la enzima, haciéndola reaccionar con OPD. (47)

7.- Determinar la actividad inmunogénica por Nefelometría, empleando anticuerpos específicos.

8.- Cuantificar la concentración de la enzima por la técnica de Lowry, comparando con un patrón de albúmina. (27)

C) Radioiodinación del antígeno.

1.- Considerando que la inmunoreactividad se encontró más conservada en la tercera fracción y la actividad enzimática era aceptable (630 U), se seleccionó ésta para la radiomarcación, utilizando para éllo 20 μg de TPO.

2.- En un microvial Eppendorf adicionar 20 μg de TPO, 0.5 mCi (18.5 MBq) de $\text{NaI-}^{125}\text{I}$, 4 μg de Lactoperoxidasa (LPO) y 0.03 μg de H_2O_2 (2 μl).

- 3.- Agitar en vortex durante exactamente 30 seg.
- 4.- Parar la reacción mediante la adición de 500 μ l de solución amortiguadora de fosfatos 0.05M, pH 7.0
- 5.- Centrifugar a 250 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 4°C
- 6.- Someter a purificación por columna de sephadex G-100 y eluir con solución amortiguadora mezcla salina de barbituratos, 0.05M, pH 8.6
- 7.- Colectar fracciones de aproximadamente 500 μ l y monitorear la actividad presente. (48, 49)

D) Estandarización del sistema analítico (R.I.A.)

- 1.- Diluir las muestras séricas 20 veces con solución diluyente de TRIS-HCl-NaCl-BSA-Tween-20, pH 7.5
- 2.- Preparar solución de antígeno marcado (TPO-I-125) a obtener una actividad entre 40,000 y 50,000 cpm en 50 μ l , utilizando para éllo solución diluyente y la alícuota con mayor actividad, obtenida de la purificación de la radiomarcación del antígeno.
- 3.- En tubos de vidrio de 120 X 75 mm, adicionar 50 μ l de la muestra prediluida y 50 μ l del antígeno radiomarcado, incubar 16 horas a 37° C.
- 4.- Adicionar 2 μ l de anti-inmunoglobulina G e incubar 1 h a 37° C.

- 5.- Adicionar 500 μ l de PEG-E 6000 Salino al 4%; mezclar en vortex.
- 6.- Centrifugar a 3000 rpm durante 30 minutos a una temperatura de 4°C
- 7.- Decantar cuidadosamente y dejar escurrir los tubos invertidos, sobre papel absorbente; contar la radiactividad presente.
- 8.- Interpolar los problemas en la curva patrón construída con muestras de concentraciones conocidas (estándares).
- 9.- Comparar los resultados obtenidos por R.I.A., con aquéllos obtenidos sometiendo las muestras a inmunoadglutinación (sistema comercial). (3, 30, 47)

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 RESULTADOS

Como lo muestra la Figura 9, en la primera parte del procedimiento de extracción y purificación de la peroxidasa tiroidea, se evidenció la presencia de estructuras microsomales en el precipitado producto de la ultracentrifugación a 105,000 x g.

En lo que respecta a la purificación de la enzima en Sephacryl S-200, la Figura 10 permite identificar, mediante la D.O. a 280 nm, una amplia zona con mayor probabilidad para contener a la enzima (fracciones 25 a la 50).

La medición de actividad enzimática con OPD, proporcionó resultados positivos para la misma zona, aunque con diferente intensidad a lo largo de ésta.

La medición de actividad peroxidásica, (ensayo de guayacol), definió dentro de esta gran área cuatro zonas con diferente actividad enzimática.

La actividad inmunogénica observada, de acuerdo a los resultados de la nefelometría, fue también diferente. La determinación de la concentración proteica se realizó de acuerdo a la técnica de Lowry. Estos datos se observan mejor en la Figura 11. (Ver Tabla II)

Las alícuotas pertenecientes a cada una de estas zonas, se mezclaron y concentraron por ultrafiltración en Amicon (PM 8200) La concentración proteica de ellas permitió establecer en estos términos el rendimiento del procedimiento que fué del 12.5%, cifra comparable a la reportada por otros autores.

Los resultados obtenidos al radiomarcarse la enzima con I^{125} se muestran en la Figura 12. La eficiencia de iodación fue del 30%, manteniéndose la actividad inmunogénica de la enzima en un 88%. El producto de la iodación mostró una actividad específica de 7.5 Ci/g de la enzima. (ver Tabla III)

En lo que respecta al R.I.A., como se muestra en la Figura 13 se obtuvo un mejor desplazamiento del sistema al someterse ésta a una incubación a temperatura de 37° C durante 16 h, ya que a temperatura ambiente la respuesta obtenida fue menor. El adecuado desplazamiento del sistema se corroboró al procesar diluciones seriadas de un suero con títulos muy elevados para anticuerpos anti-TPO.

El coeficiente de variación intraensayo fue de 3%, mientras que el interensayo fue de 5%. La sensibilidad del sistema es de 0.5 U/ml. (ver Tabla IV)

La comparación de los resultados obtenidos por R.I.A. y el sistema comercial (inmunoaglutinación), mostró un coeficiente de correlación de 0.87 como puede apreciarse en la Figura 14, indicándose los datos correspondientes en la Tabla V.

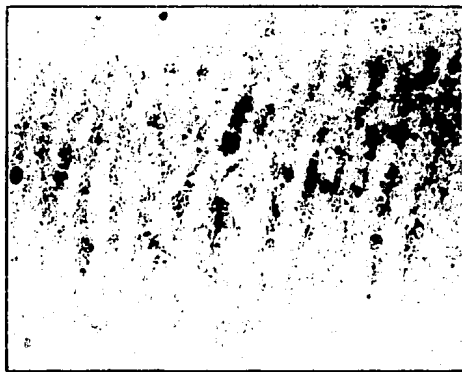


FIG. 9a MICROGRAFIA DE MICROSOMAS (10^3 X)

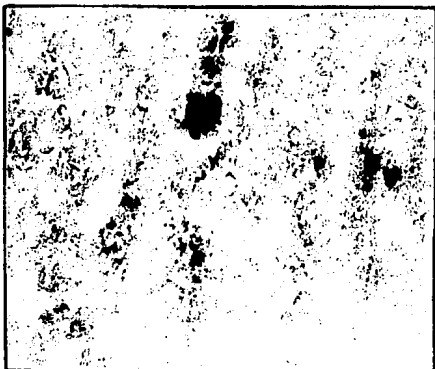


FIG. 9b MICROGRAFIA DE MICROSOMAS (12 x 10³ X)

TABLA II: PURIFICACION, CARACTERIZACION Y CUANTIFICACION DE TPO

FRACCION NUMERO	D.O. (280 nm)	O.P.D. (470 nm)	GUAYACOL (U)	NEFELOMETRIA (U)	LOWRY (mg/ml)
01	000	010	010	0.10	0.4
02-24	010	010	010	0.10	<0.1
25	257	010	010	0.10	4.3
26	588	010	010	0.10	6.2
27	1082	010	010	0.10	3.5
28	3183	010	010	0.10	3.1
29	3183	010	010	0.10	3.1
30	3183	010	010	0.10	2.0
31	3183	020	131	5.21	1.7
32	3183	060	295	8.04	3.1
33	3183	210	158	9.95	2.3
34	3183	400	216	11.33	3.0
35	3183	530	166	6.20	2.8
36	3183	600	171	5.31	3.0
37	3183	620	130	2.79	3.1
38	3183	700	250	3.92	3.5
39	3183	700	573	2.70	3.6
40	3183	750	133	2.85	2.7
41	3183	680	666	6.50	2.5
42	3183	640	370	5.68	2.3
43	3183	640	164	12.24	1.7
44	3183	610	628	12.15	0.9
45	3183	450	313	12.81	1.6
46	2704	460	136	9.88	0.9
47	2218	380	462	11.50	2.5
48	1885	330	186	8.97	3.0
49	1837	290	010	8.52	3.0
50	1624	280	010	9.45	2.2
51	1486	190	010	10.61	2.2
52	1378	180	010	8.57	3.1
53	1238	160	010	8.58	1.9
54	1146	160	010	6.93	2.6
55	1012	160	010	5.14	1.7
56	912	140	010	4.24	1.0
57	882	150	010	2.25	1.4
58	749	160	010	0.10	1.0
59	739	110	010	0.10	0.8
60	616	090	010	0.10	0.5
61-79	069	010	010	0.10	0.1
80	050	010	010	0.10	0.1

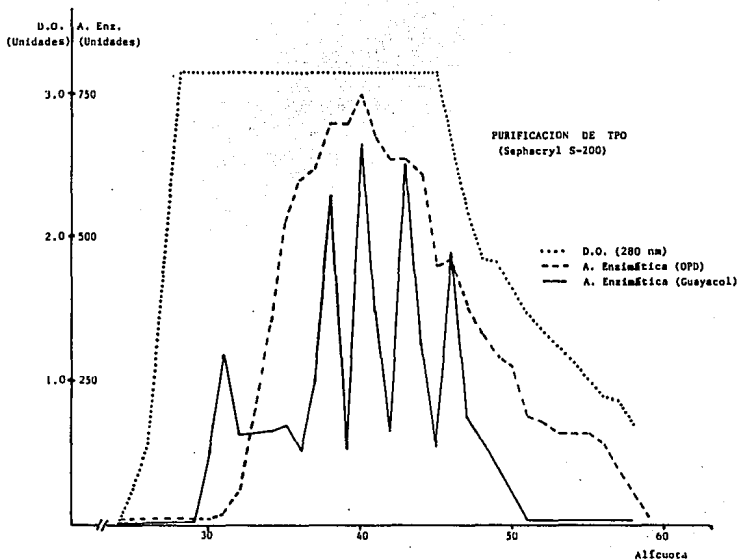


FIG. 10 PURIFICACION DE LA TPO EN SEPHACRYL S-200 Y ACTIVIDAD ENZIMATICA

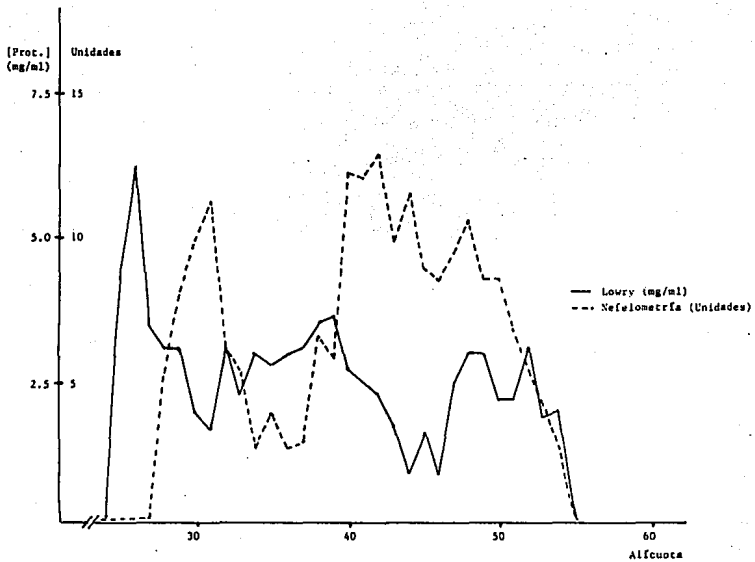


FIG. 11 INMUNOGENICIDAD Y CONCENTRACION PROTEICA

TABLA III: RADIOMARCACION DE TPO, PURIFICACION EN SEPHADEX G-100

NUMERO DE FRACCION	PURIFICACION (c.p.m.)	INMUNOREACTIVIDAD (c.p.m.)
01	---	-----
02	---	-----
03	---	-----
04	1386	10785
05	690	5325
06	222	3315
07	418	195
08	9426	1035
09	63284	37005
10	77895	68565
11	17206	7785
12	1670	7695
13	544	1095
14	90	585
15	42	10
16	10	-----
17	---	-----

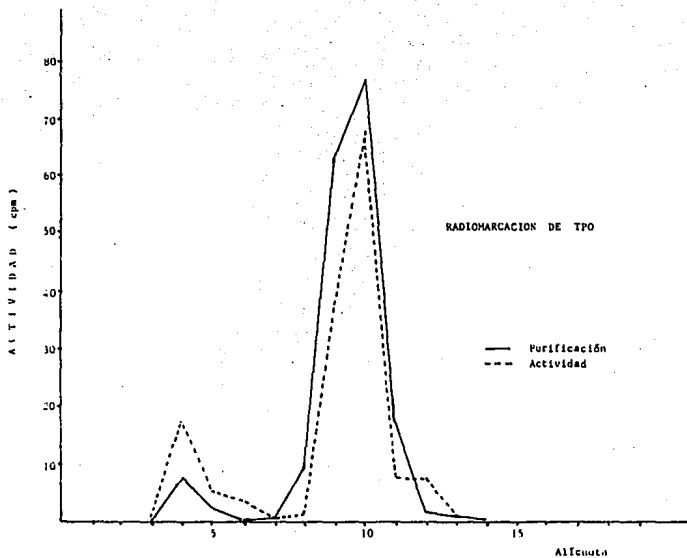


FIG. 12 RADIOMARCACION DE LA TPO, PURIFICACION EN SEPHADEX G-100 E INMUNOREACTIVIDAD

TABLA IV: ESTANDARIZACION DEL SISTEMA DE R.I.A.

ESTANDAR (U/ml)	20°C (UNION)	37°C (UNION)
0.0	1.3	1.2
0.5	3.1	4.1
2.0	6.3	9.7
5.0	9.0	17.0
10.0	13.9	25.0
100.0	30.0	61.5
1000.0	35.5	65.0

SUERO AcTPO(+)	UNION
S/diluir	39.5
1/2	58.0
1/4	65.0
1/8	53.5
1/16	26.3
1/32	13.7

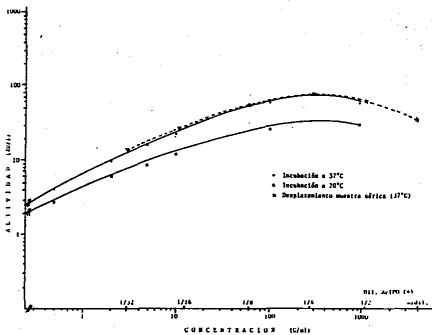


FIG 13 ESTANDARIZACION DEL SISTEMA DE R.I.A.

TABLA V: COMPARACION DE LOS DOS SISTEMAS
 RADIOINMUNOANALISIS -INMUNOAGLUTINACION (R.I.A. - I.A)

TITULO (I.A.)	(R.I.A.) U/ml
Negativo.....	0.3
Negativo.....	0.4
Negativo.....	0.5
Negativo.....	1.0
Negativo.....	1.9
1/800.....	1.3
1/800.....	1.5
1/800.....	2.0
1/800.....	3.5
1/1600.....	2.5
1/1600.....	3.5
1/1600.....	4.3
1/3200.....	5.0
1/3200.....	5.4
1/3200.....	6.5
1/6400.....	7.3
1/6400.....	8.0
1/6400.....	9.7
1/12800.....	10.0
1/12800.....	15.5
1/12800.....	20.5
1/12800.....	25.0
1/12800.....	26.7
1/25600.....	28.0
1/25600.....	32.5
1/25600.....	37.3
1/25600.....	42.7
1/51200.....	45.9
1/51200.....	55.4
1/51200.....	57.9
1/51200.....	62.5
1/102400.....	57.4
1/102400.....	65.6
1/102400.....	80.0
1/102400.....	95.7
1/204800.....	105.0
1/204800.....	125.0
1/204800.....	> 150.0

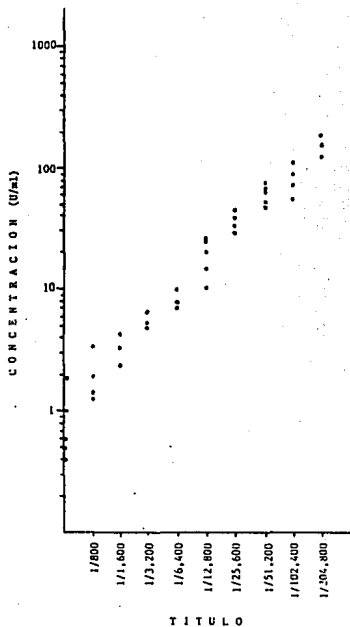


FIG. 14 COMPARACION DE LOS DOS SISTEMAS R.I.A. E I.A.

4.2 DISCUSION

Considerando que la TPO es el principal constituyente de los microsomas tiroideos, la observación al microscopio electrónico de las estructuras microsomales en el precipitado procedente de la ultracentrifugación del tejido tiroideo evidencia la presencia de la enzima en dicha fracción.

La presencia de cuatro zonas con diferente concentración proteica y actividad peroxidásica, resultantes de la purificación del extracto conteniente de la enzima en Sephacryl S-200 sugiere la presencia tanto de isoformas de la enzima (fracciones 2 y 3), como de agregados (fracción 1) o productos de degradación (fracción 4), resultantes de las condiciones inherentes al método de purificación.

La mayor actividad peroxidásica encontrada en las fracciones 2 y 3 (dos picos de 570 U y 660 U en la fracción 2 y un pico de 630 U en la fracción 3), así como la mayor actividad inmunogénica de éstas, fundamentan esta hipótesis y apoyan la selección de la fracción 3 como la mejor para emplearse como antígeno en el establecimiento del sistema de R.I.A.

En lo que se refiere al rendimiento del procedimiento descrito para la extracción y purificación de la peroxidasa tiroidea, que fué de 12.5%, éste es similar al reportado por otros autores que han utilizado procedimientos diferentes. (3, 30)

La radiomarcación de la enzima utilizando lactoperoxidasa (LPO), proporcionó con una eficiencia del 30%, un producto radiomarcado con actividad específica bastante elevada 7.5 Ci/g (27.75×10^7 Bq), que conserva su inmunorreactividad prácticamente íntegra (88%). (3, 30, 49)

Considerando los resultados obtenidos, respecto al mejor desplazamiento de la curva estandar, mayor sensibilidad del sistema y menor coeficiente de variación en las mediciones, se seleccionaron como condiciones definitivas del sistema, el tiempo de 16 h y la temperatura de 37° C. La muestra se trabajó en dilución 1:20 en base a información bibliográfica. (3, 30)

El desplazamiento de la curva elaborada con diluciones seriadas de un suero proveniente de un sujeto con tiroiditis de Hashimoto, mostró un desplazamiento semejante al de los estándares de concentraciones conocidas, situación que refuerza la validez del sistema establecido.

El alto grado de correlación que se encontró al comparar el sistema propuesto (unidades), con el sistema comercial de inmunoaglutinación (título), certifica la validez del sistema de R.I.A. Las discrepancias observadas en los resultados presentes, principalmente en los sueros de títulos bajos para anticuerpos anti-TPO, son atribuibles tanto a la sensibilidad del sistema, como a la presentación de los principales epítopes del antígeno.

La especificidad del sistema quedó demostrada al obtener resultados negativos (< 1.5 U/ml) utilizando sueros previamente identificados como negativos para anticuerpos anti-TPO y títulos medianos a altos con actividad para anticuerpos anti-tiroglobulina (anti-Tg).

CAPITULO V

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos es posible elaborar las siguientes conclusiones:

1.- Se describió un nuevo procedimiento de aislamiento y purificación de peroxidasa tiroidea que permite, con buen rendimiento la obtención de la enzima bajo sus dos isoformas.

2.- Se establece un protocolo de radiomarcación, que permite con buena eficiencia y poco daño a la proteína, obtener una actividad específica adecuada.

3.- Se cumplió con los objetivos del trabajo al ser posible el establecimiento de un sistema de R.I.A. que permite de una manera sencilla, con especificidad, sensibilidad y reproducibilidad adecuados, cuantificar anticuerpos anti-TPO en muestras séricas, situación que puede en un futuro ampliarse a otro tipo de fluidos biológicos.

4.- Si bien es cierto que el trabajo desarrollado requiere del manejo de diversas áreas del laboratorio químico, en ocasiones con alto grado de especialización, los logros alcanzados se traducen en la disponibilidad del material analítico, que puede ser empleado en forma rutinaria en el laboratorio clínico.

5.- La información obtenida al comparar ambos sistemas, pone de manifiesto la mayor sensibilidad del R.I.A. para la detección de Ac-TPO, situación que concuerda con los resultados reportados por otros autores.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Andrew, J., Ahmna, M., and Kenneth, D. The role of T lymphocytes in autoimmune thyroid disease. Endocr and Metab Clin of North America, 16:2(287-326), 1987.
- 2.- Baker, J.R., Magee, M., Shen, M., Kaplan M., Identification of localized autoantibody epitopes in the aminoacid 513-633 region of thyroid peroxidase (TPO). Thyroid . 3(Suppl.T-87) 1993.
- 3.- Beever, K., Bradbury, J., et al. Highly sensitive assays of autoantibodies to thyroglobulin and to thyroid peroxidase. Clin Chem, 35:9(1944-1954), 1989.
- 4.- Bird, T., Stephenson, H. Evaluation of a tanned red cells technique for thyroid microsomal antibodies. J. Clin Path. 26(623-627), 1973.
- 5.- Burrow, G., Oppenheimer, J. Thyroid function disease. Ed. Saunders Co., U.S.A., 1989.

6.- Czarnocka, B., Ruf, J., Ferand, M., Carayon, P., Lissitzky, S. Purification of the human thyroid peroxidase and its identification as the microsomal antigen involved in autoimmune thyroid diseases. FEBS 2954:190-1(147-152), 1985.

7.- Edwards, W. Radioimmunoassay. En: Immunoassay, William Heinemann Medical Books, 1a. ed., London, 1985.

8.- Elisei, R., Vassart, G., Ludgate, M. Demonstration of the existence of the alternatively spliced form of thyroid peroxidase in normal thyroid. J. Clin Endocr and Metab , 72:3(700- 702), 1991.

9.- Finke, R., Seto, P., Rapoport, B. Evidence for the highly conformational nature of the epitope(s) on human thyroid peroxidase that are recognized by sera from patients with Hashimoto's thyroiditis. J. Clin Endocr and Metab , 71:1(53-59),1990.

10.- Freeman, L.M., Donald, M. Radioimmunoassay, a seminar in Nuclear Medicine, Ed. William Hernemman, Medical Books, London, 1975.

11.- Goodburn, et al. The preparation of thyroid microsomal antigen for use in the indirect microELISA method for the detection of anti-thyroid microsomal antibody. Clin Chem Acta 119(291-297), 1982.

12.- Hammada, N., Grimm, L., Mori, H., DeGroot, L. Identification of thyroid microsomal antigen by western blot and immunoprecipitation , J. Clin Endocr and Metab, 61:1(120-128), 1981.

13.- Hammada, N., Portmann, L., DeGroot, L. Characterization and isolation of microsomal antigen. Clin Invest, 79(819- 825), 1987.

14.- Hammada, N., Jaeduck, N., Portmann, L., Ito, K., De- Groot, L. Antibodies against denatured and reduced thyroid microsomal antigen in autoimmune thyroid diseases, J. Clin Endocr and Metab, 64:2(230-238), 1987.

15.- Hiromatsu, Y., Fukusawa, H., and Wall, J. Cytotoxic mechanisms in autoimmune thyroid disorders and thyroid associated ophthalmopathy, Endocr and Metab Clin of North Am, 16:2(269-286), 1987.

16.- Hosoya, T. Turnip peroxidase. The reaction mechanisms of turnip peroxidase A1, A2 and D, J. Biochem, 47:6(794-803), 1960.

17.- Hosoya, T., Kondo, Y., Vi, N. Peroxidase activity in thyroid gland and partial purification of the enzyme. J. Biochem, 52:3(180-189), 1962.

18.- Hosoya, T., Morrison, M. **The isolation and purification of thyroid peroxidase.** J Biol Chem, 242:12(2828-2836), 1967.

19.- Kajita, Y., et al. **Labelling and immunoprecipitation of thyroid microsomal antigen.** FEBS 2756:87-2(334-338), 1985.

20.- Kaufman, K., Filetti, S., Seto, P., Rappoport, B. **Recombinant human thyroid peroxidase generated in eukariotic cells: a source of specific antigen for the immunological assay of antimicrosomal antibodies in the sera of patients with autoimmune thyroid diseases** J. Clin Endocr and Metab. 70:3(724-728), 1990.

21.- Kaufman, K., Rappoport, B., Seto, P., Chazebak, G. **Generation of recombinant, enzymatically active human thyroid peroxidase and its recognition by antibodies in sera of patients with Hashimoto's thyroiditis.** J. Clin Invest. 84(394 - 403), 1989.

22.- Kendler, D., Martin, A., Magnusson, R., Davies, T. **Detection of autoantibodies to recombinanthuman thyroid peroxidase by sensitive enzyme immunoassay.** Clin Endocr, 33(751-760), 1990.

23.- Khoury, E., Bottazzo, G., Roitt, I.M. **The thyroid " Microsomal" antibody revisited,** J. Exp Med. 159 (577-591) 1984.

24.- Kimura, S., Kotani, T., McBride, W., Umeki, K. **Human thyroid peroxidase complete cDNA and protein sequence chromosome mapping and identification of two alternately spliced mRNA's** *Biochem.* 84(5555-5559), 1987.

25.- Kohno, Y., Hiyama, Y., Shimojo, N., Nakajima, H., Hosoya, T. **Autoantibodies to the thyroid peroxidase in patients with chronic thyroiditis: effect of antibody binding on enzyme activities.** *Clin Exp.* 65(534-541), 1986.

26.- Kriss, J., McKenzie, M., Orgazzi, J. **Autoimmune thyroid diseases,** *Endocrinology and Aging.* , vol#(pp), 1987.

27.- Lowry, O., Rosebrough, N. **Protein measurement with the folin phenol reagent.** *J. Biol and Chem.* 193:265(265-275), 1951.

28.- Maastricht, J., Koenig, R., Kaplan, M., Arscott, P. **Identification of localized autoantibody epitopes in thyroid peroxidase.** *J. Clin Endocr and Metab.* 75:1(121-126), 1992.

29.- Marchalonis, S. **An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins.** *J. Biochem G. B.* 113:229(299-305), 1969.

30.- Mariotti, S., Russoba, A., Pisani, S., Pinchera, A. A new solid phase immunoradiometric assay for antithyroid microsomal antibody, *J. Clin Endocr and Metab.* 56:3(467-472), 1983.

31.- Mariotti, S., Caturegli, P., Piccolo, P., Barbesino, G., Pinchera, A. Antithyroid peroxidase autoantibodies in thyroid diseases. *J. Clin Endocr and Metab.* 71:3(661-669), 1990.

32.- Mariotti, S., Pinchera, A., Maccocci, C., Urbano, L., Chiovato, L. Solubilization of human thyroid microsomal antigen. *J. Clin Endocr and Metab.* 1:3(661-669), 1990.

33.- Nogayama, Y., Seto, P., Rappoport, B. Characterization by molecular cloning of smaller forms of thyroid peroxidase messenger ribonucleic acid in human thyroid cells as alternatively spliced transcripts. *J. Clin Endocr and Metab.* 71:2(383-390), 1990.

34.- Nichols Institute. Antithyroid peroxidase antibody (anti-TPO). Clinical applications, *Ref Labs Nichols*, rev 7(358), 1991.

35.-Peter, J.B. Thyroid autoimmunity in search of antibodies. *Diag Med*, Jul-Aug(1-7), 1981.

36.- Philips, D., McLachlan, S., Stephenson, A., Roberts, D., Moffitt, A. Autosomal dominant transmission of autoantibodies to thyroglobulin and thyroid peroxidase. J. Clin Endocr and Metab , 70:3(742-746), 1990.

37.- Pinchera, A., Mariotti, S., Chiovato, L., Vitti, P., López, G., Lombardi, A., Anelli, S. Cellular localization of the microsomal antigen and the thyroid peroxidase antigen. Acta Endocr(Copenh), 281(57-62), 1987.

38.- Potman, L., Fitch, F., Havran, W., Hamada, N., Characterization of the thyroid microsomal antigen and its relationship to thyrod microsomal antibodies. J. Clin Inv., 81(1217- 1224), 1988.

39.- Roman, S., Korn, F., Davies, T. Enzyme Linked Immuno- sorbent microassay and haemagglutination compared for detection of thyroglobulin and thyroid microsomal autoantibodies. Clin Chem. 302(246-251), 1984.

40.- Ruf, J., Czarnocka, B. Thyroid peroxidase in the organ-specific "Microsomal" autoantigen involved in thyroid autoimmunity. Acta Endocr(Copenh). 281(49-56), 1987.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

41.- Ruf, J., Toubert, M., Czarnocka, B., Durand-Gorde, J. **Relationship between immunological structure and biochemical properties of human thyroid peroxidase.** Endocrinology, 125:3(1211-1218), 1989.

42.- Scherboum, W., Bogner, V., Weinhermer, B., Bottazzo, G. Au. **Radiimmunoassay and related techniques**, The Mosby Co., 1st. ed., St Louis, MO, 1978.

43.- Scherboum, W., **On the Clinical importance of the thyroid microsomal and thyroglobuline antibody determination.** Acta Endoc. (Copenh)2, 81, 1987(325-329)

44.- Stites D. Fudenberg. H., Stobo J., Wells V. **Inmunología básica y Clínica.** Ed. Manual Moderno, México 1985.

45.- Sugawara M. **Coupling of Loadtyrosine Catalyzed by human thyroid peroxidase.** In vitro, J. Clin. Endoc. and Met., 60, 6, 1985(1069-1075)

46.- Sugawara M. Hagen G. A. **Thyroid hormone formation catalyzed by human thyroid peroxidase.** J. Lab. Med. INC., 99, 4, 1982(580-585)

47.- Van Weemen S,B. and Schwers A. Immunoassay using antigen enzyme conjugates. FEBS Letters, 15, 2, 32 1971

48. -Thorell, J. ,Larson, Radiimmunoassay and related technic. The Mosby, St. Louis 1968

49.- Thorell, J., Johasson, . Enzymatic iodination of polipeptides with I-125 to high specific activity. Biochem et Biophys Acta, 251(363-369), 1971.

50.- Werner, S., Ingbar,H., Baverman, E.L. The thyroid. A fundamental and clinical Text . J.B.Lippincott Co, 5^a ed., Philadelphia, 1986.

51.- Yokoyama, N., et al. The antigens; Thyroglobulin/Microsomal antigen. Clin and Sci Data Ind, 1(4-6), 1988.

52.- Yokoyama, N., Taurog, A., Kleen, G. Thyroid peroxidase and thyroid microsomal autoantibodies. J. Clin Endocr and Metab , 68:4(766-772), 1989.

53.- Yokoyama, N., Taurog, A., Dorris, M., Kleen, G. Studies with purified human thyroid peroxidase and thyroid microsomal autoantibodies. J. Clin Endocr and Metab , 70:3(758-765), 1990.