

18  
2  
C.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**ENEP "ZARAGOZA"**

**ESTANDARIZACION DEL METODO  
DE ELISA PARA CUANTIFICAR  
T<sub>3</sub> Y T<sub>4</sub> EN SUERO**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:  
Químico Farmacéutico Biólogo  
**P R E S E N T A N:**  
REYNA FLORES CIMA  
ELBA LUCIA VALENCIA M.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



México, D. F.

1989



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.

I N D I C E

	Pag.
INTRODUCCION	1
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS ESPECIFICOS	17
HIPOTESIS	18
MATERIAL Y METODOS :	
1.-OBTENCION DE ANTICUERPOS	
a)Formacion de conjugados (T <sub>3</sub> -BSA/T <sub>4</sub> -BSA)	19
b)Espectros de absorción de conjugados hormonas y albúmina sérica bovina	21
c)Inmunización de conejos Nva.Zelanda	22
2.-TITULACION DE ANTISUEROS	26
3.-PURIFICACION DE ANTICUERPOS	28
4.-TITULACION DE ANTI-T <sub>3</sub> Y ANTI-T <sub>4</sub>	31
5.-ACOPPLAMIENTO DE ANTI-T <sub>3</sub> /ANTI-T <sub>4</sub> A PEROXIDASA	33

<b>6.-ELISA POR INHIBICION PARA CUANTIFICAR T<sub>4</sub> EN SUERO</b>	<b>35</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>38</b>
<b>ANALISIS DE RESULTADOS</b>	<b>68</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>70</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>72</b>

# I N T R O D U C C I O N

## I N T R O D U C C I O N

La tiroxina ( $T_4$ ) y la triiodotironina ( $T_3$ ) son hormonas , sintetizadas y secretadas por la glándula tiroides . La concentración de estas en suero es de :  $T_3$  del 50-250 ng/dl y  $T_4$  de 4.5-12 Ug/dl .

En el hombre la glándula tiroides pesa de 15-20 g está constituida por dos lóbulos unidos por un istmo a la altura del segundo a cuarto anillos traqueales .

Esta glándula esta compuesta de dos clases de células ; las células foliculares y las células parafoliculares o células C.

El folículo es la unidad funcional del tiroides y por lo tanto tiene procesos tan importantes como : a) la síntesis de la glucoproteína tiroidea específica llamada tiroglobulina y su secreción en el lumen folicular ; b) la yodación de la tiroglobulina ; c) el almacenamiento de la misma ; d) la degradación de la tiroglobulina y la liberación de hormonas tiroideas ; e) la reabsorción de tiroglobulina .

La secreción de la tiroxina y triiodotironina es controlada por el hipotálamo y por la hipófisis . El hipotálamo secreta un tripéptido conocido como hormona liberadora de tirotropina (HRT) , la cual estimula la secreción de tirotropina u hormona estimuladora del tiroides (HST) por la porción anterior de la hipófisis . La HST practicamente controla todas las etapas de la síntesis de hormonas tiroideas , incluyendo la captación de yodo , su unión orgánica , acoplamiento de las tirosinas y la liberación de yodotironinas ( $T_3$  y  $T_4$ ) . A su vez , la secreción de HST esta regulada por la concentración de  $T_3$  y  $T_4$  circulantes . Por otra parte una hipófisis normal aumentará la secreción de HST en respuesta al descenso de las cifras de hormo-

-nas circulantes , en el caso contrario las cifras altas de hormonas en sangre suprimirá la secreción de HST , es decir se regula mediante un mecanismo de retroalimentación negativa (fig. 1) .

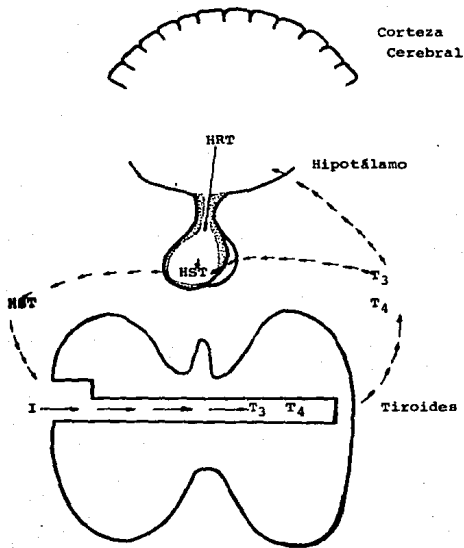


Fig.1 . MECANISMO DE RETROALIMENTACION NEGATIVA

Las hormonas tiroideas contienen yodo , por lo tanto es necesario el suministro de éste a través de la dieta , su absorción se lleva a cabo en el intestino en forma de yoduro , con lo que se asegura la formación de tiroxina y triiodotironina .

En los vertebrados es necesario la secreción de estas yodotironinas constantemente para asegurar el desarrollo encéfalico , el crecimiento corporal y para mantener dentro de los límites normales el nivel del metabolismo intermedio y la actividad funcional de la mayoría de los órganos .

La síntesis de hormonas tiroideas ( $T_3$  y  $T_4$ ) se cumple en tres pasos:

- 1 . Captación de yodo
- 2 . Síntesis de la proteína
- 3 . Yodación de esta proteína principalmente en sus residuos tirosilo y oxidación de yodotirosinas a yodotironinas hormonalmente activas ( $T_3$  y  $T_4$ ) .

Estos pasos se encuentran esquematizados en la figura 2 .

MIT : Monoyodotironilo

GBT ; Globulina enlazadora de  $T_4$

DIT : Diyodotironilo

APBT : Albúmina enlazadora y  
transportadora de  $T_4$



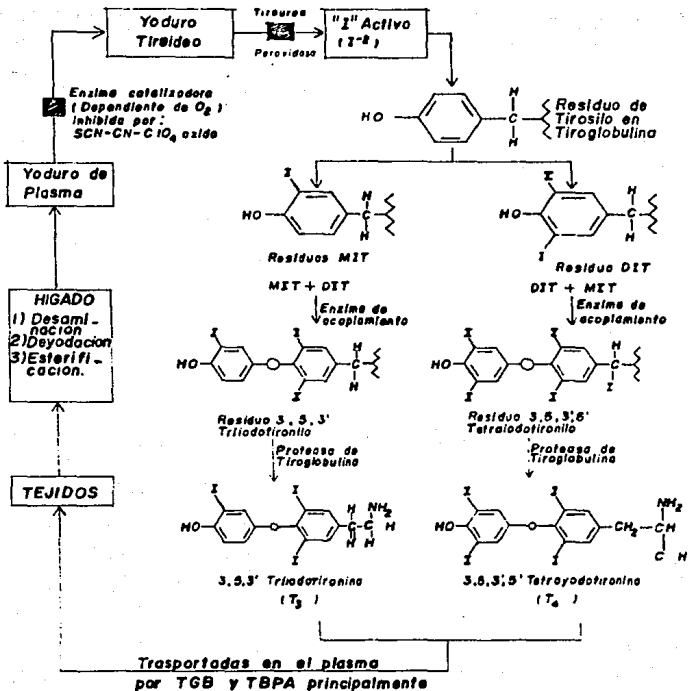


Fig. 2 FORMACION Y SECRECION DE HORMONAS TIROIDEAS

Si alguno de los pasos del sistema anterior no funciona correctamente puede entonces existir una falta o un exceso de estas hormonas , lo que conduce a hipotiroidismo o hipertiroidismo respectivamente .

El hipertiroidismo se origina por la producción no controlada de cantidades excesivas de  $T_4$  o  $T_3$  o de ambas , esto se puede deber a una enfermedad tiroidea intrínseca como el adenoma , o bien a la falta de regulación de ; la HRT o la gdatrofina coriónica , Tam bien puede ocurrir como resultado de anticuerpos contra el receptor a HST o a la destrucción del tejido tiroideo con la liberación excesiva de hormona , finalmente a la administración exógena de hormona tiroidea .

Las causas más frecuentes de este estado anormal de tiroides son las siguientes :

- 1 . Enfermedad de Graves-Basedow(bocio difuso tóxico)
- 2 . Tiroiditis :
  - a) subaguda
  - b) no dolorosa
  - c) por radiación
- 3 . Hipertiroidismo exógeno
  - a) lactogénico
  - b) ficticio
  - c) Inducido por yodo(Enfermedad de Jod-Basedow)
- 4 . Bocio tóxico multinodular
- 5 . Bocio tóxico uninodular(BTU)
- 6 . Hipertiroidismo ectópico (struma ovarii)
- 7 . Carcinoma tiroideo (Metastasis carcinoma folicular)
- 8 . Exceso de HST :

Durante el hipotiroidismo el nivel de hormonas tiroideas en el tejido periférico son defecientes y esta situación raramente se debe a una disminución en la producción de HST .

Las causas más frecuentes de este estado :

- 1 . Hipotiroidismo tiroideo
  - a) Tejido funcional insuficiente
    - 1.-Atrofia primaria
    - 2.-Tiroiditis
    - 3.-Consecutivo a terapia con  $I^{131}$  o tiroidectomía
    - 4.-Dibgenesia tiroidea (Atiroiosis)
  - b) Biosíntesis defectuosa
    - 1.-Deficiencia de Yodo
    - 2.- defectos congénitos
    - 3.-Agentes antitiroideos
    - 4.- Exceso de Yodo (a veces acompañado de bocio)
- II . Hipotiroidismo Hipofisario
  - a) Destrucción hipofisaria
  - b) Tumor hipofisario
  - c) Deficiencia aislada de HST
- III . Hipotiroidismo Hipotálamico
- IV . Sensibilidad periférica alterada

Para poder establecer un diagnóstico , sobre un estado patológico de la glándula tiroidea es necesario conocer las pruebas de laboratorio más comunes que ayudan en el diagnóstico , entre estas encontramos :

- 1 . Determinación de  $T_3$  y  $T_4$  séricas totales
- 2 . Determinación de HST
- 3 . Determinación de tiroglobulina

4. Determinación de GBT (Globulina transportadora de T<sub>4</sub>)
5. En algunos casos . Determinación de autoanticuerpos (antimicrosomales y antitiroglobulina)

Como todos estos compuestos se encuentran en concentraciones muy pequeñas (microgramos y nanogramos) en la sangre , es necesario buscar un método muy sensible para su determinación y éste método es conocido como radioinmunoanálisis , que aunque es altamente sensible tiene como desventaja el empleo de isótopos que por ser peligrosos requieren de cuidados , equipos , permiso y adiestramiento especiales , tienen vida media corta y principalmente su alto costo . Por estas razones en los últimos años se han evaluado un gran número de inmunoensayos no isótopicos con diferentes marcadores . Entre estos destaca el ensayo inmunoenzimático que se propone como la alternativa .

#### ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO

En los métodos inmunoenzimáticos se conjuga el antígeno o el anticuerpo a una enzima en vez de un isótopo y puede ser de dos tipos : ensayo inmunoenzimático homogéneo (EMIT = enzyme-multiplied immunoassay technique) el ensayo inmunoenzimático heterogéneo (ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay) . En los primeros una enzima es acoplada a un antígeno que al reaccionar con el anticuerpo hace que se altere la actividad enzimática : la ventaja de este tipo de ensayo es que no requiere de una fase sólida para la separación de reactivos que no reaccionarón , pero la desventaja es que funciona únicamente para sustancias de bajo peso molecular como drogas y medicamentos . El ELISA en cambio se basa en la utilización de una fase sólida con el fin de separar el antígeno

o el anticuerpo libre del complejo antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) . En éste el material que se utiliza como fase sólida para adherir el anticuerpo o el antígeno pueden ser tubos , microplacas , esferas , discos , los cuales pueden ser de celulosa , nylon , polivinilo , poliacrilamida , poliestireno y partículas de agarosa .

La calidad de un ensayo inmunoenzimático depende de la pureza de el antígeno o hapteno utilizado para la inmunización por tanto de la especificidad del anticuerpo y también de la enzima elegida . Esta última debe de tener una alta actividad , bajo costo y fácil de obtenerla pura ya que de esto depende la sensibilidad del ensayo . Además de peso molecular bajo y resistencia a cambios de pH y temperatura .

Las enzimas más utilizadas para el ensayo inmunoenzimático son; la peroxidasa de rábano picante (horseradish) , fosfatasa alcalina y la beta-D-galactosidasa ; la actividad enzimática se mide principalmente por fotometría .

La enzima puede acoplarse a anticuerpos o antígenos por varios procedimientos . La reacción deberá ser altamente eficiente además de que el conjugado deberá ser estable , con un cambio mínimo en la inmunoreactividad y en las propiedades catalíticas de la enzima acoplada .

El glutaraldehído es uno de los agentes más utilizados para la conjugación y ésta puede ser por el método de uno o dos pasos . El glutaraldehído reacciona con los grupos epsilon-amino de la proteína , los conjugados hechos por la conjugación de un paso , se polimerizan en exceso y sólo una pequeña porción de enzima se conjugó al anticuerpo o al antígeno y aunque la actividad del conjugado se retiene la afinidad del antígeno disminuye . Para evitar ésta des-

ventaja , se utiliza el método del glutaraldehído en dos pasos , en el cual se deja reaccionar la enzima con el glutaraldehído y una vez activada la enzima , ésta reacciona con el grupo amino del antígeno o del anticuerpo .

El método del peryodato se basa en la oxidación de grupos OH , dado que enzimas como la peroxidasa contiene varios grupos oligosácaridos. La peroxidasa se trata primero con 1-fluoruro-2,4-dinitrobenceno para bloquear los grupos amino libres y así evitar la autoconjugación . Los grupos OH de la peroxidasa activada se dejan reaccionar con los grupos amino libres (alfa y epsilon) del anticuerpo formando una base de Schiff , las cuales se reducen con borohidruro de sodio para dar enlaces estables .

Los derivados de maleimida(N;N,O-fenilenedimalcímida y la m-maleimidobenzóil-N-hidroxisuccinímida) que reaccionan con grupos sulfidrílo de la enzima , se utilizan principalmente para acoplar a beta-D-galactosidasa , debido a que esta enzima posee un gran número de grupos sulfidrílo .

#### PRINCIPIO DEL METODO DE ELISA

Existen diferentes métodos para determinación ya sea de antígenos o de anticuerpos por el método de ELISA .

Método Indirecto.-Este es un sistema utilizado para la determinación y cuantificación de anticuerpos , ya que el conjugado utilizado (anti-inmunoglobulina marcada con la enzima) puede reconocer un gran número de anticuerpos , los cuales pueden ser o estar dirigidos contra una gran variedad de antígenos (fig.3) .

Método por Inhibición.- Este sistema se utiliza para la detección de antígenos así como su cuantificación y puede ser utilizado para sustancias de bajo peso molecular , en el cual la interacción Ag-Ac del antígeno de la fase sólida y el anticuerpo marcado con la enzima es inhibida por el antígeno libre de la muestra .

La actividad enzimática que se detecta en la fase sólida es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra (Fig.4) .

Método Competitivo .- Este sistema se utiliza para la detección y cuantificación , tanto de antígeno como de anticuerpos , los cuales son de tipo directo , ya que antígeno/anticuerpo específico se conjuga directamente a la enzima . En este caso el antígeno/anticuerpo marcado con la enzima , se adiciona al mismo tiempo que el antígeno o anticuerpo de la muestra desconocida , por lo tanto existirá competencia para unirse al anticuerpo o antígeno fijado a la fase sólida . La diferencia de la degradación entre únicamente el conjugado y el conjugado más la muestra es directamente proporcional a la concentración de antígeno o anticuerpo (Fig.5) .

Método del Sandwich o del doble anticuerpo .- Este es un sistema utilizado para la detección y cuantificación de antígenos , en el cual el anticuerpo inmovilizado en la fase sólida se incuba con un antígeno estandar o antígeno de prueba . Después de un lavado el complejo antígeno-anticuerpo inmovilizado se incuba con un exceso de anticuerpo marcado con la enzima ; alternativamente el segundo Ac puede no estar marcado y se incuba con un tercer Ac de la especie animal de la cual se obtuvo el segundo Ac (anti-IgG) marcado con la enzima . En ambos casos la concentración del producto de la reacción enzimática es directamente proporcional a la concentración del estandar o del antígeno en prueba (Fig.6-7) .

1.- Unión del antígeno a la fase sólida .



lavado

2.- Adición del suero: unión del Ac.  
específicos .



lavado

3.- Adición de la antiglobulina marcada  
con la enzima que se une al Ac .



lavado

4.- Adición del sustrato .



Cantidad hidrolizada = Cantidad de anticuerpo presente

Figura 3 .- METODO INDIRECTO





1. Placa cubierta de Ag



lavado



2. Adición de la muestra de ensayo conteniendo Ag mezclado previamente con el Ac estandar .



Ag no presenta en la muestra

El Ag de la mtra. reacciona con el Ac en solución.

lavado



3. Adición del conjugado antiglobulina-enzima



El conjugado se fija al Ac inmobilizado

lavado



4. Adición del sustrato



Producción de color .

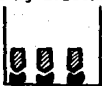
No producción de color .

Figura 4 .- METODO POR INHIBICION

1. Placa cubierta de Ac .



2a. Adición del Ag-enzima  
y el Ag desconocido



2b. Adición del Ag-enzima



Adición del sustrato



Hidrolisis del sustrato = a la concentración del Ag-enzima

La diferencia entre 3a y 3b = a la concentración de Ag desconocido

Figura 5 .- METODO COMPETITIVO

1. Placa cubierta con Anticuerpo



lavado

2. Adición de la solución conteniendo el antígeno



lavado

3. Adición del Ac específico marcado con la enzima



lavado

4. Adición del sustrato



Cantidad hidrolizada = cantidad de antígeno presente

Figura 6 .- METODO DEL SANWICH O DOBLE ANTICUERPO

1. Placa cubierta con Ac específico A(conejo)

lavado



2. Adición de la muestra en ensayo conteniendo el antígeno

lavado



3. Adición del Ac específico B(cabra)

lavado



4. Adición de antioglobulina B marcada con la enzima (anti-IgG cabra)

lavado



5. Adición del sustrato



Cantidad de hidrólisis = a la concentración de antígeno en la muestra

Figura 7 .- MODIFICACIÓN DEL METODO DEL SANDWICH

**OBJETIVO  
GENERAL**

Diseñar una técnica inmunoenzimática (ELISA) , específica sensible y reproducible para la cuantificación de  $T_3$  y  $T_4$  total en suero , capaz de poder sustituir a los equipos similares de importación .

O B J E T I V O S   E S P E C I F I C O S

1. Sintetizar los conjugados de  $T_3$ -albúmina sérica bovina y  $T_4$ --  
-albúmina sérica bovina .
2. Obtener anticuerpos anti  $T_3$  y  $T_4$  a partir de la inmunización  
de conejos Nueva Zelanda .
3. Purificar los anticuerpos anti- $T_3/T_4$  al extremo de pureza  
mediante cromatografía de afinidad .
4. Formar los conjugados de anti- $T_3/T_4$ -Peroxidasa .
5. Diseñar el ensayo inmunoenzimático (ELISA) para cuantificar  
 $T_3$  y  $T_4$  totales en suero .

### H I P O T E S I S

La cantidad de antígeno ( $T_3$  y/o  $T_4$ ) unido a una fase sólida puede ser determinada a hacerla reaccionar con el anticuerpo específico unido a una enzima . Si este se mezcla previamente con una muestra que contenga al antígeno ( $T_3$  y/o  $T_4$ ) libre , la reacción anterior será inhibida . Por lo tanto la actividad enzimática detectada en la fase sólida al agregar el substrato será inversamente proporcional a la cantidad de antígeno( $T_3$  y/o  $T_4$ ) presente en la muestra de suero .

M A T E R I A L

Y

M E T O D O S



M A T E R I A L

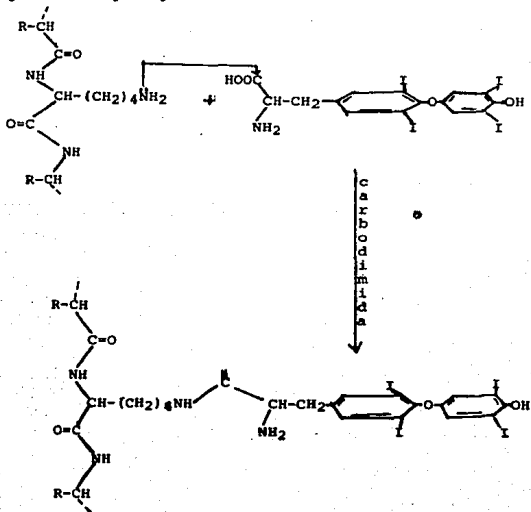
Y

M E T O D O S

FORMACION DE CONJUGADOS  
T<sub>3</sub>-BSA / T<sub>4</sub>-BSA

FUNDAMENTO :

El acoplamiento de triiodotironina/tetrayodotironina (T<sub>3</sub>/T<sub>4</sub>) a albúmina sérica bovina (BSA) se lleva a cabo por la condensación del grupo carboxilo de T<sub>3</sub>/T<sub>4</sub> con los grupos amino libres de los residuos de lisina presentes en la molécula de BSA. La hormona no acoplada se separa por diálisis.



MATERIAL Y EQUIPO :

Tubos de ensayo	13 x 100	Pyrex
Vasos de precipitados	50 y 100 ml	Pyrex
Pipetas serológicas	5 y 10 ml	Kimax
Tubo de diálisis		
Barra magnética		
Placa de agitación		Cornig
Potenciómetro		Beckman

REACTIVOS :

Albumina sérica bovina	Sigma
Carbodiimida	Sigma
Ac. clorhídrico	Becker
Hidróxido de sodio	Merck
T <sub>3</sub> /T <sub>4</sub>	SKF
Agua destilada	

METODO :

- Disolver 50 mg de T<sub>3</sub>Na ó T<sub>4</sub>Na en 2.5 ml de hidróxido de sodio 0.15 N .
- Adicionar la mezcla anterior a una solución de 100 mg de albúmina sérica bovina disuelta en 5 ml de agua destilada .
- Añadir 300 mg de carbodiimida a la mezcla anterior mediante agitación continua y constante .
- Ajustar el pH de la reacción a 9.0 mediante la adición de ácido clorhídrico .
- Incubar la mezcla de reacción toda la noche a 4°C .
- Dializar la mezcla de reacción por cinco días contra agua destilada (aprox. un litro)cambiando diariamente , mantener la mezcla de reacción a 4°C .

ESPECTROS DE ABSORCION DE  $T_3Na$  ó  $T_4Na$  : BSA :  $T_3BSA$  ó  $T_4BSA$

FUNDAMENTO :

Existe una región específica del espectro de absorción en la cual cada molécula alcanza su máxima absorción . Todas las proteínas absorben a una longitud de onda de 280 nm , debido a los restos de tirosilo que contienen , esta característica permite identificarla así como determinar el contenido de proteína en solución .

MATERIAL Y EQUIPO :

Tubos de ensayo	13 x 100	Pyrex
Pipetas serológicas	1,5 y 10 ml	Pyrex
Vasos de precipitados	100 y 50 ml	Pyrex
Pipetas Pasteur		
Espectrofotómetro		Beckman
Cubetas de cuarzo ó plástico		Beckman

REACTIVOS :

Agua destilada

$T_3Na$  /  $T_4Na$  al 0.007% en hidróxido de sodio 0.1 N

BSA al 0.007% en hidróxido de sodio 0.1 N

$T_3BSA$  /  $T_4BSA$  al 0.007% en hidróxido de sodio 0.1 N

METODO :

- Preparar una solución de  $T_3Na$ ;  $T_4Na$  ;  $T_3BSA$  :  $T_4BSA$  y BSA al 0.007% en hidróxido de sodio (p/v) .
- Correr el espectro de absorción de cada una de las soluciones desde una longitud de onda de 200 nm hasta 380 nm .

## IMMUNIZACION

Se conoce como inmunización al proceso en el cual se induce una respuesta inmunológica en un organismo , dicha respuesta puede ser humoral , celular o ambas cuando se ponen en contacto o se introduce en forma natural o artificial sustancias llamadas inmunógenos o antígenos .La eficacia de la inmunización depende de las condiciones experimentales . Estas incluyen el tipo de antígeno , el modo de inmunización (Ags son más inmunógenos por vía intramuscular ,intra-peritoneal o intradérmica , mientras que los antígenos solubles se obtienen mejores resultados por vía intravenosa) , el organismo que esta siendo inmunizado y la sensibilidad de los métodos usados para determinar la respuesta . Los inmunógenos más potentes son las proteínas macromoleculares , sin embargo las sustancias de peso molecular pequeño no son inmunogenos pero pueden reaccionar con anticuerpos de especificidad apropiada . Estas sustancias denominadas haptenos pueden provocar una respuesta inmunológica si se acoplan a una proteína portadora de volumen adecuado (P.M. mayor de 10,000 ) .

### MATERIAL Y EQUIPO :

Tubos de ensaye	50 ml	Beckman
Jeringas desechables	3 ml	Plastipack
Vortex		Corning
Conejos Nva. Zelanda		

REACTIVOS :

Conjugados BSA-T<sub>3</sub> ó BSA-T<sub>4</sub>

M. tuberculosis

INER

B. pertussis

INER

Adyuvante completo de Freud

Microlab

PROGRAMA DE INMUNIZACION

- Rasurar todo el lomo del conejo (fig.8) .
- La obtención de anticuerpos contra T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> se llevó a cabo mediante la inmunización de ocho conejos Nueva Zelanda con el conjugado T<sub>3</sub>-BSA / T<sub>4</sub>-BSA utilizando los siguientes dos esquemas de inmunización ;

ESQUEMA # 1

DOSIS	DIA	VIA DE ADMON	SANGRIA
100mg de con- jugado + 0.5ml de sol. fisio- lógica + 200mg de <u>M.tuberculosis</u> + 0.5ml de <u>B.-----</u> <u>pertussis</u>	0	intradérmica	--
Refuerzo	55	intradérmica	primera
	65		segunda
	85		tercera
Refuerzo	100	intradérmica	cuarta
	110		quinta
	124		Última

ESQUEMA # 2

DOSIS	DIA	VIA DE ADMON	SANGRIA
100mg de con- jugado + 0.5ml de solución fisiológica + 1ml de adyu- vante completo	0	intradérmica	
Refuerzo	15	intradérmica	
Refuerzo	30	intradérmica	
	45		primera
	60		segunda
	75		última

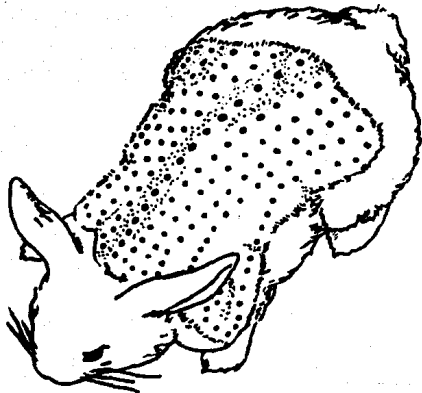


Figura 8 .- Rasurado del lomo del conejo y  
sitios de incubación .



### TITULACION DE ANTISUEROS

#### FUNDAMENTO :

La detección y cuantificación de anti-T<sub>3</sub> y anti-T<sub>4</sub> se realizó por el método de ELISA indirecto .

#### MATERIAL Y EQUIPO :

Placas de ELISA		NUNC
Incubadora (37°)		
Pipetas automáticas	50 y 100 Ul	SCOREX
Lector de ELISA		DYNATECH II

#### REACTIVOS :

Gelatina	0.05%	Merck
Acido Sulfúrico	4N	Merck
o-Fenilendiamina		Sigma
Conjugado anti-gamas de conejo-peroxidasa		Sigma
Amortiguador de fosfatos-salino (PBS pH=7.2)		
Amortiguador de citratos-fosfatos	pH=5	
Twee-20		

#### METODO :

- Sensibilizar la placa de ELISA con 50 Ul/pozo de una solución de T<sub>3</sub>Na / T<sub>4</sub>Na (10 Ug/ml) en PBS pH=11 .
- Incubar la placa toda la noche a 4°C .
- Lavar con PBS pH=7.2 tres veces por tres minutos cada una .
- Bloquear con PBS-gelatina 0.05% pH=7.2 (100 Ul/pozo) .
- Incubar la placa a 37°C por una hora .

- Lavar con PBS-Tween 20 al 0.05% tres veces por tres minutos cada uno .
- Agregar 50 Ul/pozo del suero problema , a diferentes diluciones (diluciones de 1:2 a 1:512) e incubar a 37°C durante dos horas .
- Lavar con PBS-Tween 20 al 0.05% tres veces por tres minutos cada uno .
- Agregar el conjugado anti-gamaglobulinas de conejo-peroxidasa (50 Ul/pozo) diluido 1:1000 , incubar una hora la placa a 37°C .
- Lavar con PBS-Tween 20 al 0.05% tres veces por tres minutos .
- Agregar la solución de del substrato e incubar en la obscuridad de 15-30 minutos (50 Ul/pozo) .
- Parar la reacción con ácido sulfúrico 4 N (50 Ul/pozo) .
- Leer la placa a 492 nm .

PURIFICACION DE ANTICUERPOS  
ANTI-T<sub>3</sub> Y ANTI-T<sub>4</sub>

FUNDAMENTO :

La cromatografía de afinidad es uno de los métodos de separación que facilita la purificación de cualquier biomolécula , basandose en su función biológica o en su estructura química individual . En este tipo de cromatografía se inmoviliza una sustancia (antígeno o anticuerpo) a un soporte insoluble y la molécula a separar se absorbe de manera específica y reversible ; uno de los soportes más empleado es la Sepharosa 4B(D-galactosa,4-3,6-anhidro l galactosa) que al ser tratada con bromuro de cianógeno sus grupos hidroxilo son activados para formar grupos imidocarbonato que reaccionan con sustancias con grupos amino primarios que dan como resultado enlaces isourea . Otro de los soportes empleados es el gel formado por moléculas de antígeno polimerizadas con glutaraldehído .

MATERIAL Y EQUIPO :

Vasos de precipitados	50 y 100 ml	Pyrex
Matraz Erlenmeyer	500 ml	Pyrex
Papel indicador	escala 0-11	
Columna de vidrio para cromatografía		Kimax
Placa de agitación		Corning
Espectrofotómetro		Beckman

REACTIVOS :

Sepharosa 4B		Sigma
Bromuro de cianógeno		Sigma
Hidróxido de sodio	2N	Merck
Bicarbonato de sodio	0.1M	Beker
Acido acético	0.5M	Merck
PBS	pH=7.4	
T <sub>3</sub> Na / T <sub>4</sub> Na		SKF
Antisueros		
Agua destilada		

METODO :

A) Activación de Sepharosa 4B

- Lavar con agua destilada la sepharosa 4B 5 veces con 200 ml y despues suspenderla en 50 ml de agua destilada(10g aprox.)
- Adicionar un gramo de bromuro de cianógeno a la suspensión de sepharosa 4B agitando constantemente ,manteniendo un pH=11 mediante la adición de hidróxido de sodio 2M durante ocho minutos .
- Lavar la sepharosa activada con agua destilada fría aproximadamente 1 lt .
- Lavar por último la sepharosa activada con bicarbonato de sodio 0.1 M .

B) Acoplamiento de  $T_3Na$  /  $T_4Na$  a Sepharosa 4B activada

- Disolver 150 mg de  $T_3Na$  /  $T_4Na$  en 10 ml de bicarbonato de sodio 0.1 M pH=10 .
- Mezclar la suspensión de sepharosa 4B activada con la solución de hormona anteriormente preparada .
- Agitar la suspensión resultante suavemente durante 18 hr a 4°C .
- Montar la columna y lavarla con PBS 0.01 M pH=7.4 hasta no detectar proteína a 280 nm .
- Lavar con ácido acético 0.5 M .
- Lavar nuevamente con PBS pH=7.4 . De esta manera la columna queda lista para eluir los antisueros .

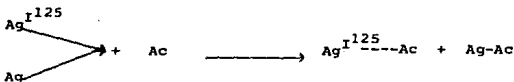
C) Elución de antisueros

- Pasar el suero por la columna respectiva .
- Lavar la columna con PBS pH=7.4 hasta no detectar proteína a 280 nm .
- Eluir los anticuerpos con ácido acético 0.5 M hasta que se obtenga una absorbancia menor a 0.02 a 280 nm .
- Lavar la columna del inmunoabsorbente con PBS pH=7.4 una vez que se han colectados los anticuerpos .
- Determinar la densidad óptica a 280 nm de cada una de las fracciones obtenidas .
- Dializar contra PBS pH=7.4 las fracciones con mayor densidad óptica , cambiando diariamente durante cuatro días .
- Concentrar la solución de anticuerpos con polietilenglicol .
- Cuantificar proteínas por el método de Coomassie ,

TITULACION DE ANTI-T<sub>3</sub> Y ANTI-T<sub>4</sub>  
(RIA)

FUNDAMENTO :

Técnica de competencia muy sensible que se basa en la reacción antígeno-anticuerpo ; se emplea un antígeno marcado con I<sup>125</sup> . Cuando se agrega un antígeno sin marcar , este compete con el antígeno marcado con I<sup>125</sup> , por una concentración limitada de anticuerpo con el cual se forma un complejo antígeno-anticuerpo no radiactivo de acuerdo a la ley de acción de masas .



MATERIAL :

Tubos de ensayo	12 x 75	Pyrex
Pipetas automaticas	50 , 100-1000 U1	Scorex
Contador de centelleo		Beckman
Centrifuga		Beckman

REACTIVOS :

$T_3^{I^{125}}$ / $T_4^{I^{125}}$	Dupont
Anti- $T_3$ y Anti- $T_4$	
Solución amortiguadora de Barbital pH=8.6	Merck
Solución amortiguadora de fosfatos 0'01 M pH=7.4	
Anilina	
Antigamaglobulinas de conejo--PEG	DPC

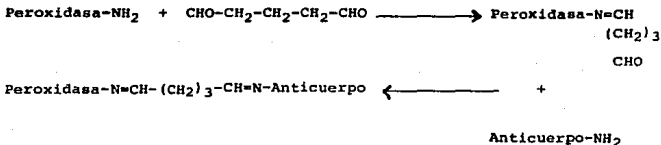
METODO :

- Preparar disoluciones de anti- $T_3$  y anti- $T_4$  de 1:10000 a 1:120000 en amortiguador de barbital para anti- $T_4$  y amortiguador de fosfatos para anti- $T_3$  .
- Preparar una solución de  $T_3$  y  $T_4$  radiactivas mas anilina a mabera de tener 20000 cuentas en 50 Ul .
- Medir 50 Ul de cada una de las disoluciones del anticuerpo más 50 Ul de  $T_3$  y  $T_4$  radiactivas , hacer esto por triplicado
- Mezclar muy bien cada uno de los tubos e incubarlos a temperatura ambiente aproximadamente 20 hr .
- Determinar el número de cuentas iniciales de cada uno de los tubos .
- Agregar 50 Ul de antigamas de conejo-PEG . Incubar 15 minutos a temperatura ambiente y centrifugar 15 minutos a 3000 rpm .
- Decantar los tubos y determinar las cuentas finales del precipitado .

ACOPLAMIENTO DE ANTI-T<sub>3</sub> / ANTI-T<sub>4</sub> A PEROXIDASA

FUNDAMENTO :

La peroxidasa se polimeriza con el glutaraldehido , donde se hace reaccionar primero el grupo amino terminal de la enzima con uno de los grupos aldehido del glutaraldehido , el exceso de este se elimina . La peroxidasa activada queda disponible para reaccionar en un segundo paso con el grupo amino terminal libre del anticuerpo , formando el conjugado anticuerpo-enzima .



MATERIAL :

Columna de vidrio para cromatografía (altura 20 cm x diámetro 1 cm )		Kimax
Pipetas Sérologicas	1 y 5 ml	Pyrex
Vasos de precipitados	10 y 500 ml	Pyrex



REACTIVOS :

Peroxidasa Rz=3	Sigma
Glutaraldehido al 1 %	Sigma
Sephadex G-25	Sigma
PBS pH=6.8	
cloruro de sodio 0.15 M	Merck
Anti-T <sub>3</sub> y Anti-T <sub>4</sub>	
Solución amortiguadora de carbonatos pH=9.5 1M	

METODO :

- Disolver 10 mg de peroxidasa en 0.2 ml de glutaraldehido al 1 % v/v en PBS 0.01 M pH=6.8 e incubar durante dieciocho horas a temperatura ambiente .
- Filtrar a través de una columna de sephadex G-25 equilibrada con cloruro de sodio 0.15 M y coleccionar las fracciones de color café que contienen la peroxidasa activada , si es necesario concentrar a un mililitro .
- A la solución de peroxidasa agregar 5 mg de anti-T<sub>3</sub> y anti-T<sub>4</sub> en un volumen de un mililitro , previamente dializado contra cloruro de sodio 0.15 M .
- Agregar 0.2 ml de solución amortiguadora de carbonatos e incubar toda la noche a 4°C .
- Agregar 0.2 ml de lisina 0.1 M pH=7.0 e incubar dos horas a temperatura ambiente .
- Dializar toda la noche contra 500 ml de PBS pH=7.4 .
- Agregar un volumen igual de glicerol y conservar el conjugado anticuerpo-peroxidasa a 4°C .

## ELISA POR INHIBICION PARA CUANTIFICAR T<sub>4</sub> EN SUERO

### FUNDAMENTO :

En este ensayo la interacción antígeno-anticuerpo , entre el antígeno acoplado a la fase sólida y un antígeno libre y un anticuerpo marcado con una enzima , es inhibida por el antígeno libre de la muestra . La actividad enzimática que se detecta en la fase sólida es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra .

### MATERIAL :

Placas de ELISA		Microtiter Cooke
Pipetas automáticas	50 , 100 y 200 U1	Scorex
Incubadora		
Tubos de ensayo	12 x 75	Pyrex
Lector de ELISA		Dynatech

### REACTIVOS :

Conjugado anti-T <sub>4</sub> -peroxidasa		
T <sub>4</sub>		SKF
o-Fenilendiamina		Sigma
Peroxido de hidrógeno	30% v/v	Backer
PBS-Tween 20	0.05% v/v pH=7.2	
PBS-gelatina	2.8 p/v	
Solución amortiguadora de citratos	pH=5,0	
PBS	pH=7.2	

METODO :

A) Curva Estandar

- Sensibilizar la placa con 50 Ul/pozo de  $T_4Na$  (10 Ug/ml) en PBS e incubar toda la noche a  $4^\circ C$  .
- Lavar con PBS pH=7.2 tres veces por tres minutos cada uno .
- Bloquear con 200 Ul/pozo de PBS-gelatina al 2% e incubar dos horas a  $37^\circ C$  .
- Lavar con 200 Ul de PBS-Tween 20 al 0.05% pH=7.2 tres veces por tres minutos cada uno .
- Preparar soluciones de  $T_4$  en las siguientes concentraciones: 1 , 4 , 10 , 16 , 24 y 32 Ug/dl .
- Mezclar cada una de las soluciones anteriores con el conjugado anti- $T_4$ -peroxidasa en relación 1:1 e incubar 15 minutos a temperatura ambiente .
- Adicionar 100 Ul/pozo de la mezcla anterior e incubar dos horas a  $37^\circ C$  .
- Lavar con 200 Ul de PBS-Tween 20 al 0.05% tres veces por tres minutos cada uno .
- Adicionar 50 Ul/pozo de la solución de o-fenilendiamina en amortiguador de citratos (5 mg/10 ml) pH=5.0 e incubar de 15-30 minutos en la obscuridad .
- Adicionar 50 Ul/pozo de ácido sulfúrico 4N .
- Leer a 492 nm la placa .

B) Sueros Problema

Seguir el mismo procedimiento hasta el paso 4 .

- Mezclar cada uno de los sueros problema con el conjugado anti-T<sub>4</sub>-peroxidasa 1:1 e incubar 15 minutos a temperatura ambiente .
- Continuar de igual manera que en el procedimiento anterior.

#### CONTROLES

Se utilizarón los siguientes controles :

- 1.- Control negativo : dos pozos con PBS durante todo el ensayo .
- 2.- Control del conjugado : dos pozos en los que se agrega sustrato más conjugado al mismo tiempo .
- 3.- Control de unión inespecifica : dos pozos a los que se les agrega conjugado más T<sub>4</sub> .

Los sueros utilizados durante este ensayo fueron proporcionados por el departamento de Medicina Nuclear del INNSZ .

R E S U L T A D O S

Y

A N A L I S I S

### 1.- CONJUGACION DE HORMONAS ( $T_3$ / $T_4$ ) A ALBUMINA SERICA BOVINA

Para verificar la unión de las hormonas a la albúmina sérica bovina se realizaron los espectros de absorción de cada uno de los conjugados , así como también de las hormonas y de la albúmina (fig.9-10) . Obteniendose como resultado , la unión de 12 moléculas de  $T_3$  por cada molécula de BSA y 11 moléculas de  $T_4$  por cada molécula de BSA .

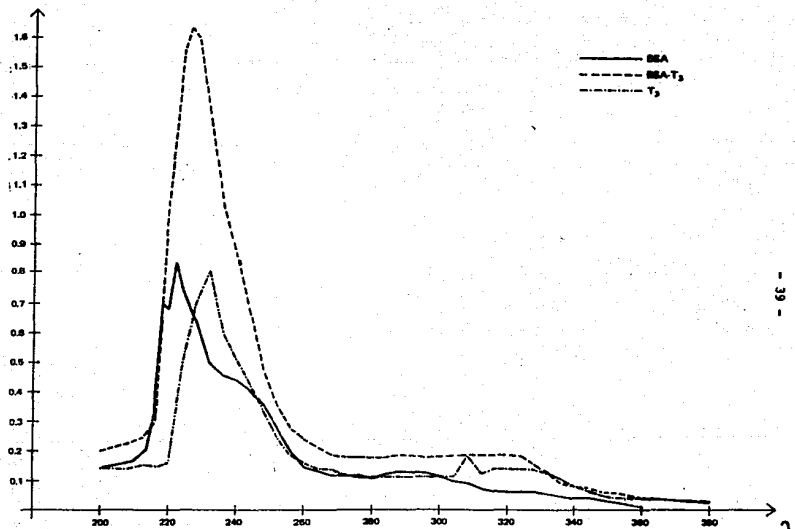


FIGURA .- 9  
 ESPECTROS DE ABSORCION  
 DE BSA-T<sub>2</sub> y T<sub>2</sub>

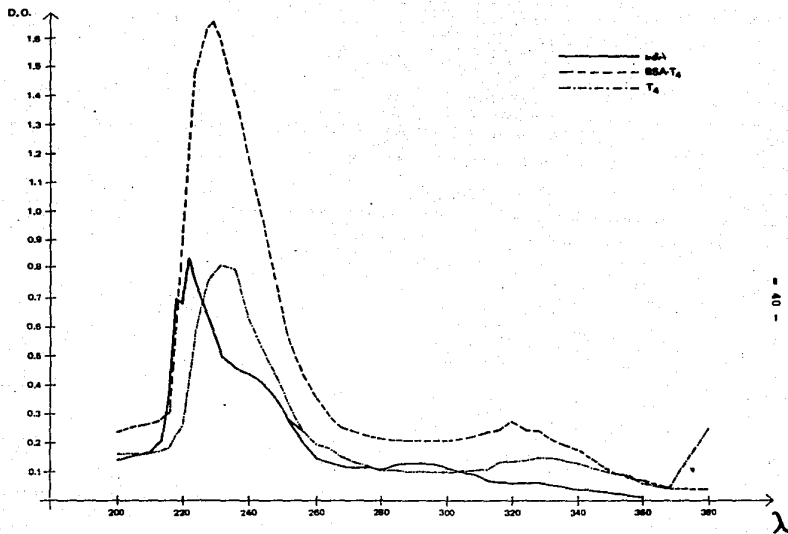


FIGURA . - 10

ESPECTROS DE ABSORCION DE BSA  
BSA-T<sub>4</sub> y T<sub>4</sub>



2.- OBTENCION DE ANTICUERPOS CONTRA T<sub>3</sub> Y T<sub>4</sub>

A.- INMUNIZACION ;

Los resultados se observan en las figuras 11-14 para anti-T<sub>3</sub> ,  
figuras 15-18 para anti-T<sub>4</sub> . De las cuales se puede decir que las  
conejas 6 y 11 fueron las mejor respondieron a la inmunización contra  
T<sub>3</sub> ; en tanto que para la inmunización contra T<sub>4</sub> el conejo que mejor  
respondió fue el 39 y en menor grado los números 31 y 32 .  
Cabe mencionar que estos conejos con mejor respuesta eran hembras .

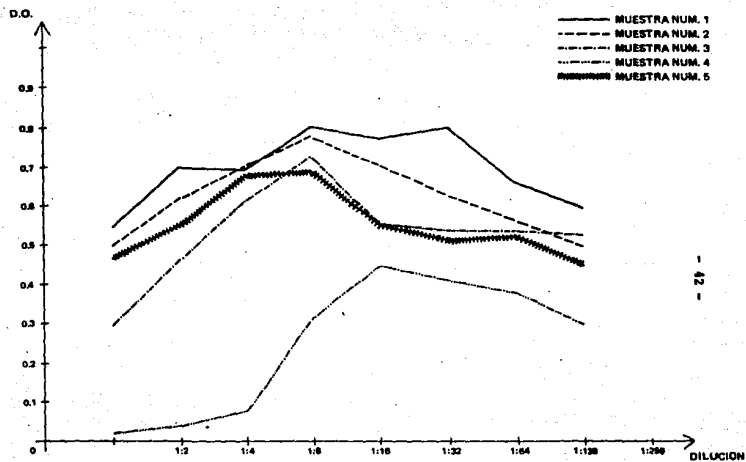


FIGURA .- 11

TITULACION DE ANTI-T, CONEJO NUM. 6

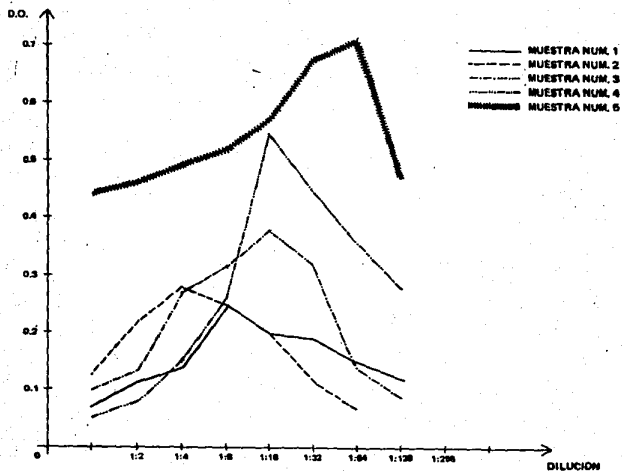
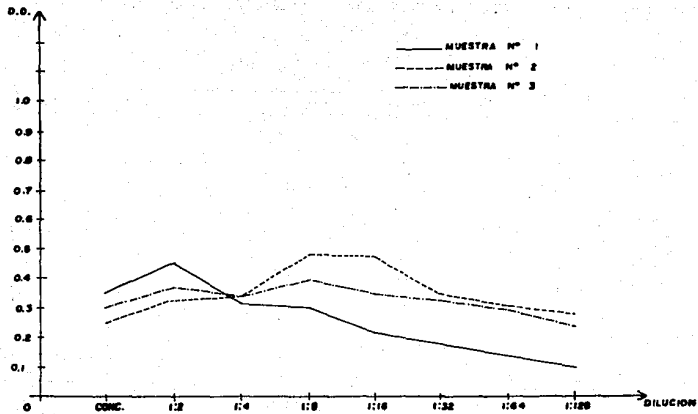


FIGURA .- 12

TITULACION DE ANTI-T, CONEJO NUM. 12



TITULACION DE ANTI-T<sub>5</sub> CONEJO NUM. 29

FIGURA.- 13

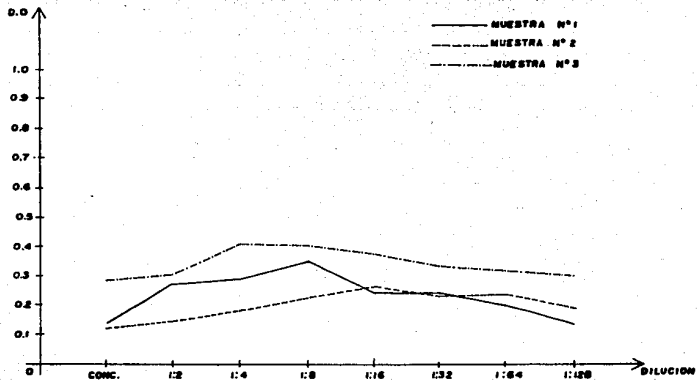


FIGURA - 14

TITULACION DE ANTI-T<sub>3</sub> CONEJO NUM. 30

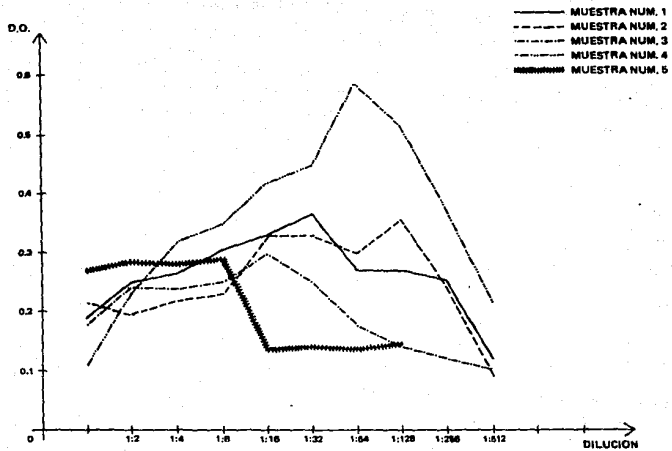


FIGURA .- 15

TITULACION DE ANTI-T<sub>4</sub> CONEJO NUM. 31

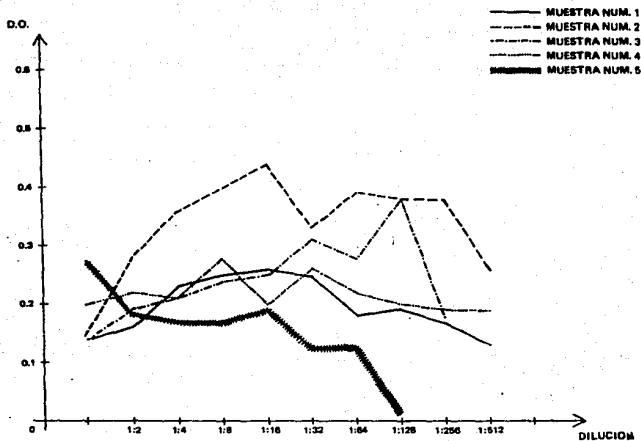


FIGURA .- 16

TITULACION DE ANTI-T. CONEJO NUM. 32

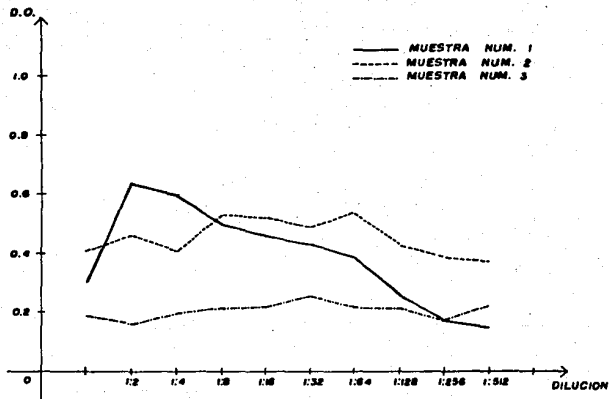


FIGURA - 17

TITULACION DE ANTI-T<sub>4</sub> CONEJO NUM. 37



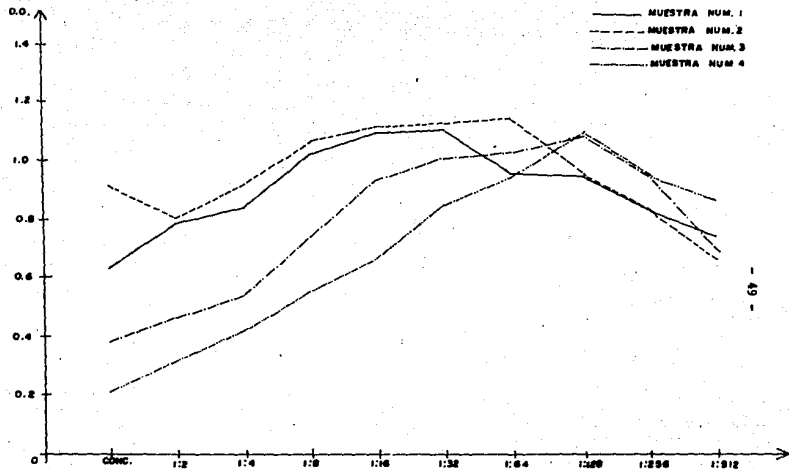


FIGURA .- 18

TITULACION DE ANTI-T<sub>6</sub> CONEJO NUM. 39

**B. - CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD**

El suero hiperinmune se purificó por medio de una cromatografía de afinidad utilizando un inmunoadsorbente compuesto de  $T_3/T_4$  unida a sepharosa 4B . Se colectaron fracciones de 5 ml , y se leyeron a 280 nm . Los resultados se observan en las figuras 19-20 Las fracciones con mayor densidad y por lo tanto con una mayor concentración de anticuerpos fueron : para anti- $T_3$  las fracciones 2-8 y para anti- $T_4$  2-7 , estas fueron concentradas con polietilenglicol 20000 (PEG) .

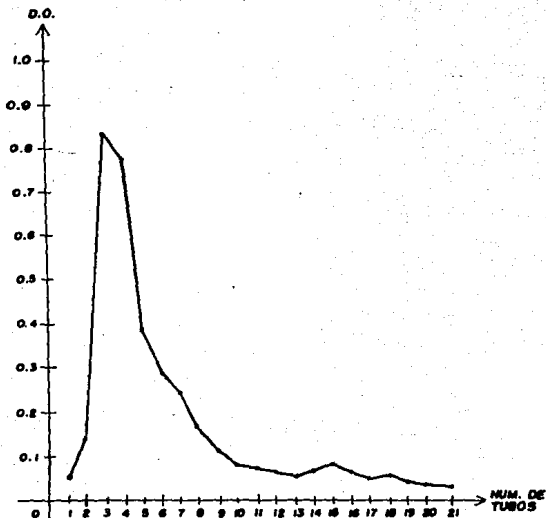


FIGURA .- 19

CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD DEL SUERO DE CONEJO  
CONTRA T<sub>3</sub>

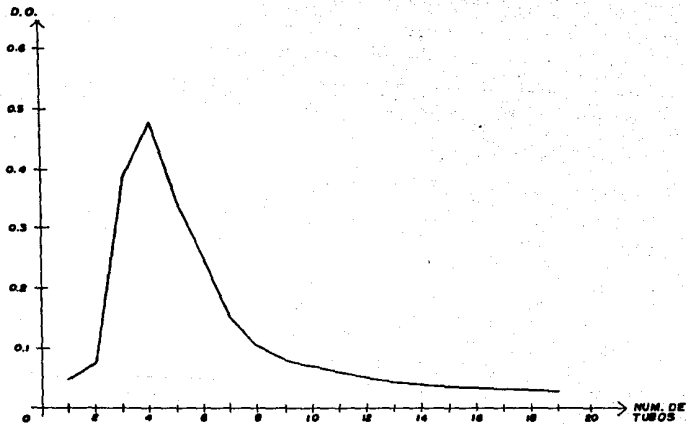


FIGURA .- 20

CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD DEL SUERO DE  
CONEJO CONTRA T<sub>4</sub>

C.- ESPECIFICIDAD Y TITULO DE ANTICUERPOS

La especificidad y titulo de estos anticuerpos (anti-T<sub>3</sub>/T<sub>4</sub>) se determinó por el método de radioinmunoanálisis (RIA) . Respecto a la especificidad se observó que existe reacción cruzada en un 6.9 % para anti-T<sub>3</sub> con T<sub>4</sub> y un 11.4 % para anti-T<sub>4</sub> con T<sub>3</sub> .

El título de anticuerpos se determinó mediante el porcentaje de enlace entre la hormona marcada con I<sup>125</sup> y los anticuerpos purificados . Los resultados se observan en las figuras 21-22 y en las tablas 1-2 de las cuales se dedujo que el título óptimo para anti-T<sub>3</sub> fué de 1:60000 y para anti-T<sub>4</sub> fué de 1:50000 .

TITULACION DE ANTI-T<sub>3</sub> POR EL EL METODO DE  
RADIOINMUNOANALISIS

TABLA 1

DILUCION	% DE ENLACE
1:10 000	13.45
1:20 000	27.19
1:30 000	32.00
1:40 000	38.59
1:50 000	49.85
1:60 000	57.03
1:70 000	52.50
1:80 000	42.09
1:100000	29.08
1:120000	11.72

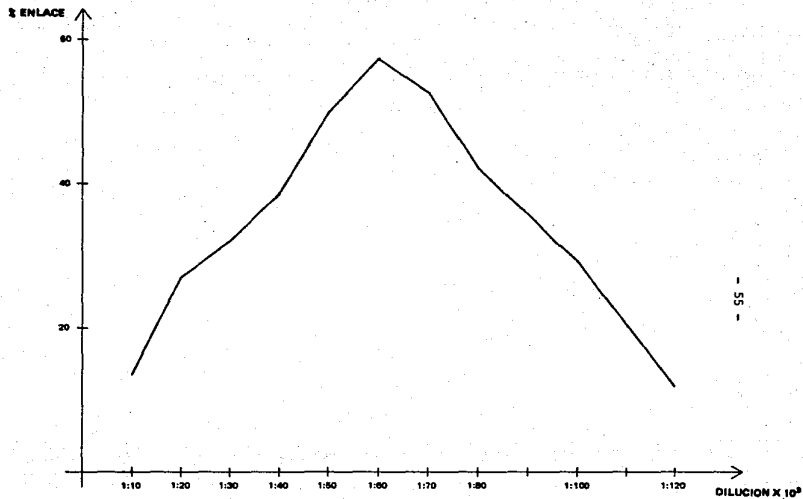


FIGURA , - 21

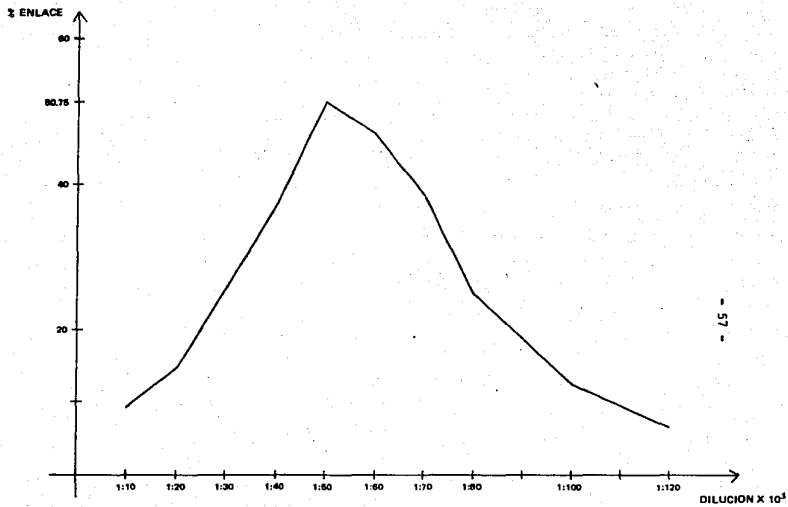
TITULACION DE ANTI-T<sub>2</sub> POR  
RADIO MUNDENSAYO

TITULACION DE ANTI-T<sub>4</sub> POR EL METODO  
DE RADIOINMUNOANALISIS

TABLA 2

<u>DILUCION</u>	<u>% DE ENLACE</u>
1:10 000	13.45
1:20 000	27.19
1:30 000	32.00
1:40 000	38.59
1:50 000	50.75
1:60 000	46.85
1:70 000	38.04
1:80 000	24.91
1:100000	10.23
1:120000	6.48





- 57 -

FIGURA - 22  
TITULACION DE ANTI-T<sub>4</sub> POR  
RADIO MUNOENSAYO

### 3.- TITULACION DE CONJUGADOS ANTI-T<sub>3</sub> / ANTI-T<sub>4</sub> -PEROXIDASA

La titulación de los conjugados antihormona-peroxidasa se determinó por el método de ELISA haciendo diluciones del conjugado antihormona-peroxidasa , para determinar la dilución a la cual se obtiene una densidad óptica mayor de 0.5 estos resultados se observan en las figuras 23-24 de donde se determinó que la dilución óptima para ambos conjugados fué de 1:1600 .

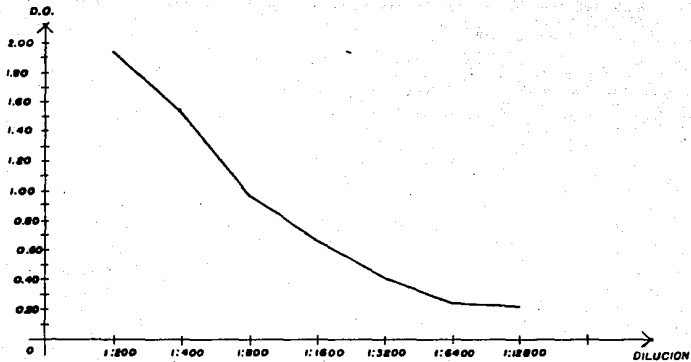


FIGURA -- 23

TITULACION DEL CONJUGADO ANTI T<sub>3</sub> PEROXIDASA  
POR EL METODO DE ELISA.

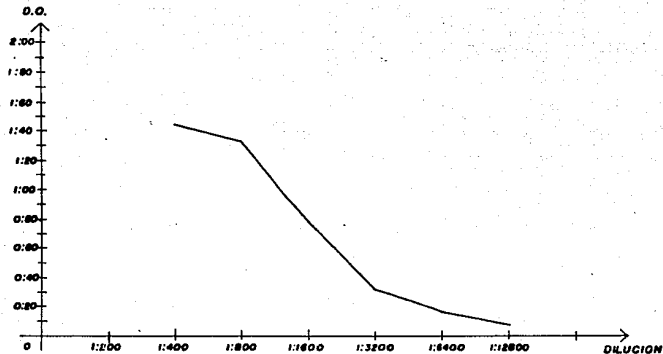


FIGURA .- 24

TITULACION DEL CONJUGADO ANTI T<sub>4</sub> PEROXIDASA  
POR EL METODO DE ELISA.

#### 4.- METODO DE ELISA PARA CUANTIFICAR $T_4$ EN SUERO

##### A.-CURVA ESTANDAR PARA CUANTIFICAR $T_4$ EN SUERO

Para realizar esta curva se determinó primero la cantidad óptima de hormona para pegar a la placa , obteniendose una concentración de 10 Ug/ml , obtenida esta concentración se procedió a trazar la curva estandar por el método de ELISA POR INHIBICION , tomando como referencia los valores normales en suero , además de los valores a los cuales se presentan patologías . Estos resultados se representan en la figura 25 y en la tabla 3 .

CURVA ESTANDAR PARA LA CUANTIFICACION DE

T<sub>4</sub> EN SUERO

TABLA 3

CONCENTRACION ( Ug/dl )	DENSIDAD OPTICA
1	0.40
4	0.20
10	0.09
16	0.045
24	0.03
32	0.03

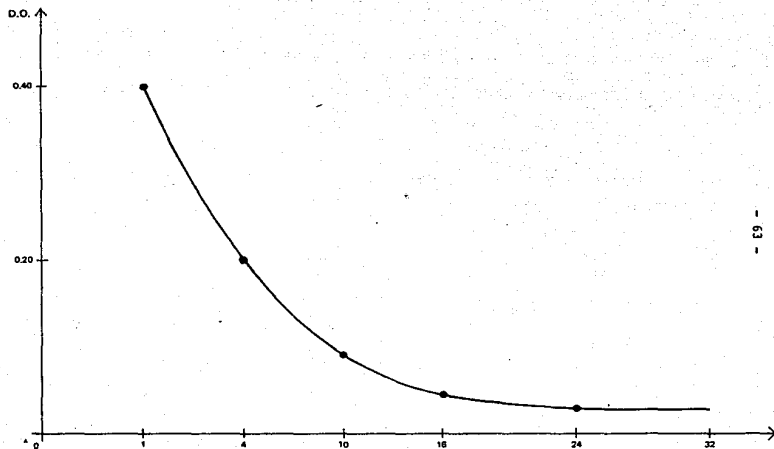


FIGURA - 25

CURVA ESTÁNDAR PARA T<sub>4</sub>

(mg/dl)

**B.- CUANTIFICACION DE T<sub>4</sub> EN SUEROS PROBLEMA**

Una vez establecida la curva estandar para T<sub>4</sub> se procedió a determinar la concentración de ésta en 60 muestras problema cuyos resultados se pueden observar en la tabla 4 .

**C.- COMPARACION DEL METODO DE ELISA CON EL METODO DE RIA**

Las muestras trabajadas habian sido ya clasificadas , como muestras hipo hiper y normales por el método de RIA , lo que dió como consecuencia que se pudiera establecer una comparación entre ambos métodos . Obteniendose resultados satisfactorios los cuales se observan en la figura 26 , y tabla 5 .



DETERMINACION DE  $T_4$  EN SUEROS PROBLEMA

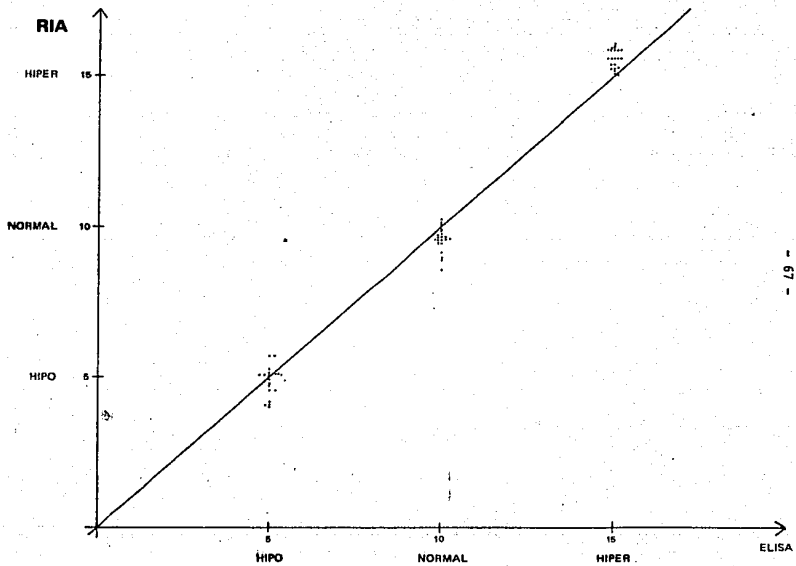
TABLA 4

MUESTRAS HIPO	MUESTRAS NORMALES	MUESTRAS HIPER
4.19	9.19	15.60
4.79	9.59	15.90
4.12	9.59	15.60
4.03	9.69	15.60
5.71	9.72	15.99
5.11	9.90	15.90
5.02	8.90	16.04
5.71	8.59	15.10
4.60	8.93	15.09
4.78	9.75	15.29
4.92	9.75	15.60
4.60	9.48	15.60
5.11	9.63	16.10
5.10	9.68	15.40
5.09	9.59	15.30
5.29	9.72	15.20
5.02	9.47	15.25
5.02	10.05	15.40
4.90	10.30	15.95
4.80	10.15	15.90

COMPARACION DEL METODO DE ELISA CON EL METODO DE RIA

TABLA 5

MUESTRAS	ELISA $\bar{X}$	RIA $\bar{X}$
HIPO	4.09	5
NORMALES	9.60	10
HIPER	15.60	15



#### ANALISIS DE RESULTADOS

La conjugación de hormonas ( $T_3/T_4$ ) a la albúmina sérica bovina fué satisfactoria ya que los resultados obtenidos son semejantes a los reportados en la literatura .

La purificación de anti- $T_3$ /anti- $T_4$  se realizo por cromatografía de afinidad uniendo las hormonas ( $T_3/T_4$ ) a sepharosa 4B para después pasar los antiseros a travez de este inmunoadsorbente , uniendose únicamente los anticuerpos especificos (anti- $T_3$ /anti- $T_4$ ) que posteriormente se separan por un cambio de pH (ácido acético 0.05M) , colectando fracciones de 5 ml de esta elución y leyendo cada una de estas a 280 nm , observandose una mayor densidad optica en las fracciones 2-8 para anti- $T_3$  y 2-7 para anti- $T_4$  , donde se puede apreciar que se encuentra la máxima concentración de anticuerpos

Para asegurar la calidad de estos anticuerpos se efectuo una evaluación de los mismos por el método de radioinmunoanálisis obteniendose como resultado un título de 1:60000 para anti- $T_3$  y 1:50000 para anti- $T_4$  lo que se considera como un título bastante aceptable por otro lado se evaluo la especificidad de los mismos teniendo como resultado una reacción cruzada de 6.9 % de anti- $T_3$  con  $T_4$  y 11.4 % para anti- $T_4$  con  $T_3$  .

El siguiente paso fué el acoplamiento de los anticuerpos a peroxidasa una vez lograda esta conjugación se tituló cada uno de los conjugados (anti- $T_3$ -peroxidasa y anti- $T_4$ -peroxidasa) obteniendose

para ambos casos un título de 1:1600 . Hasta este punto se logro la obtención y preparación de los reactivos necesarios para la estandarización del método de ELISA para la cuantificación de hormonas tiroideas en suero . Finalmente para lograr el objetivo principal de este trabajo se procedió a la estandarización del método , el cual se efectuó utilizando el método de ELISA por INHIBICION , que es considerado el método recomendable para moléculas de bajo peso molecular como lo son  $T_3$  y  $T_4$  .

Primeramente se busco la concentración óptima de hormona ( $T_4$ ) para acoplar a la fase sólida , encontrandose que esta fué de 10 Ug/ml , una vez encontrada esta concentración fué necesario trazar la curva estandar , establecida ésta se procedio a trabajar con muestras problema interpolando los resultados en la curva obteniendo de esta manera las concentraciones de  $T_4$  en cada uno de los sueros , la cual habia sido determinada anteriormente por radioinmunoanálisis y clasificados como hipo , normales , e hiper encontrada ésta por el método de ELISA fué posible evaluar el método al comparar ambos resultados (ELISA vs RIA) .

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

C O N C L U S I O N E S

### CONCLUSIONES

1.- Se lograron obtener los conjugados de T<sub>3</sub>-ASB / T<sub>4</sub>-ASB uniendo 12 moléculas de T<sub>3</sub> por cada molécula de ASB y 11 moléculas de T<sub>4</sub> por cada molécula de ASB , resultados satisfactorios y comparables a los reportados en la literatura (7) .

2.- De acuerdo a los resultados obtenidos en los conejos inmunizados , el periodo óptimo para la obtención de máximo título de anticuerpos está entre los días 65-85 para ambos esquemas . Por lo tanto los esquemas utilizados son buenos , pero para fines prácticos el más recomendable es el esquema número 2 .

3.- La purificación de anti-T<sub>3</sub> / anti-T<sub>4</sub> por cromatografía de afinidad , resulto satisfactoria ya que los anticuerpos obtenidos presentaron una afinidad y especificidad comparables a los empleados en los reactivos comerciales .

4.- La conjugación de anti-T<sub>3</sub> y anti-T<sub>4</sub>-Peroxidasa fué buena ya que para ambos casos se obtuvo un título de 1:1600 comparable éste al reportado en la literatura (2 , 13 ,25) .

5.- Observando las figuras 24 y 25 se decidió que el método de ELISA por inhibición estandarizado en este trabajo , puede ser utilizado como un método alternativo al radioinmunoanálisis como una prueba de rutina en el laboratorio de análisis clínicos .

Cabe mencionar que dados los resultados obtenidos en cada uno de los pasos de este trabajo se pueden preparar en nuestro país los reactivos necesarios para este método con la seguridad de tener reactivos de buena calidad y comparables a los utilizados en los

reactivos comerciales . Con lo anterior queda demostrado que es factible la preparación de los reactivos necesarios para otras técnicas utilizadas en el laboratorio de análisis bioquímico clínicos , tratando de evitar en lo posible el gran desembolso para nuestro país que significa la importación de reactivos .

De igual manera se trabajo para obtener la curva estándar de  $T_3$  sin embargo no se obtuvieron los resultados deseados , ya que durante todos los ensayos realizados no se pudo obtener una curva representativa con la cual se pudieran trabar las muestras problema . Por consiguiente se procedio nuevamente a realizar varios ensayos para poder definir una nueva concentración para acoplar a la placa , obteniendose que en cada nuevo ensayo este no era reproducible aún cuando se trabajara en condiciones semejantes , existen además de esta variable otras que pudieron afectar el ensayo tales como : substrato conjugado anti- $T_3$ -Peroxidasa , tiempos de incubación , temperatura de incubación . Debido al tiempo empleado en el estudio de cada una de estas variables se opto por reportar únicamente los resultados para  $T_4$  .



B I B L I O G R A F I A

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Bernard M. Jaffe , Harol R. Berhman . Methods of Radioimmuno-  
assay . Academic Press , United States of America , 1974 , 215-19 .
- 2.- Blake Ch. , Bassam ; Gould B. Marks V . Simultaneous Enzyme  
Immunoassay of Thyroid Hormones . Clin.Chem.2817(1982) 1479 .
- 3.- Bosman Dr. . Periodate (PL) for the Preparation of Peroxidase  
Label Antibody . J.Histochem.Cytochem.349(1983) 41-42 .
- 4.- Borek F , Stupp Y , Sela M. . Formation and Isolation of rabbit  
Antibodies to a synthetic antigen of Low molecular weight .  
J.Immunol.9814(1967) 739-744 .
- 5.- Brian W. . Enzyme Immunoassay (Review) . Clin.Chem.2218(1976)-  
1243-1255 .
- 6.- Bullocks , Walls K. Evaluation of some the Parameters of the  
Enzyme-linked Immunoassay . J.Infec.Dis.136(5) (1976) 279-85 .
- 7.- Brke W. , Shak-spear R. . Rapid Purification of Triiodothyronine  
and Thyroxine Protein Conjugates for Antibodies Production .  
J.Endocr.65(1975) 133-138 .

- 8.- De Groot Jeslie , Cahillif George , Martini Luciano . Endocrinologia . Edt. Panamericana , Argentina , 1984 vol.1 , 407-736 .
- 9.- Dillman , DM. . Mechanism of Action of Thyroid Hormones . Medical Clinics of North America . 69(5)(1985) 849-861 .
- 10.- Enguall Eva . Enzyme Immunoassay and ELISA and EMIT . Meth. Enzymol.70(1980) 419-439 .
- 11.- Felig Philip , Bartex D.John . Endocrinologia y Metabolismo . Edt. McGraw Hill , México , 1983 , 40-46 ; 105-109 .
- 12.- Mc, Reynolds C.W. , Sloder S. M , Schnelder R. S. . Homogeneous Enzyme Immunoassay for Thyroxine . Clin.Chem.2316(1977)
- 13.- Gharib Hossein , Ryan R. J. , Mayberry W. and Hockert T. . Radioimmunoassay for Triiodothyronine ( $T_3$ ) : Affinith and Specificity of antibody for  $T_3$  . J.Clin.Invest.33(1971) 509-516 .
- 14.- Hata Naoshige , Miyai Kiyoshi , Ito Masao , Endo Yuichi , Ligimi Yasuchi , et al : Enzyme Immunoassay of free Thyroxine in dried Blood Samples of Filter Paper . Clin.Chem.31(5)(1985) 750-753 .

- 15.- Hermann E. John . Quantitation of Antibodies Immobilized on Plastics . Meth.Enzymol.73B(1981) 239-245 .
- 16.- Hudson L. Hay Frank . Practical Immunology . 2a ed . Blackwell Scientific Publications , USA , 1980 , 204=205 .
- 17.- Ito Masao , Miyai Kiyoshi , Dei , et al.. Enzyme Immunoassay of Free Thyroxine in Serum . Clin.Chem.30(10)(1984) 1682-85 .
- 18.- Jyotsna J , Pillui M . R.A. , Gupte Jyoti H . Carbodiimide used in coupling Triiodothyronine Antibody to carboximetyl-cellylose powder for solid -phase Radioimmunoassay . Clin.Chem.32(1)(1986) 229 .
- 19.- Keita Kamikubo , Takashi Komaki , Shigenori Nakamura , Shigeki Sakata , Keigo Yasuda and Kiyoshi Miura . Theoretical consideration of the effects of dilution on estimates of free Thyroid Hormones in Serum . Clin.Chem.30(5)(1984) 634-636 .
- 20.- Kenny E. G. Dunsmoor L. Carol . Principles Problems and Strategies in the use of antigenic mixtures for the Enzyme-Linked Immunoassorbent assay . J.Clin.Microbiol.1714(1983) 655-665 .

- 21.- Landon . Enzymeimmunoassay : Techniques and Uses . Nature 268  
(11) (1977) 483-484 .
- 22.- Maeda Masako , Ito Katsutoshi , Arawa H , Tsuji A , An Enzyme-  
linked immunosorbent assay for Thyroxine in dried blood spotted  
on Filter Paper . J.Immunol.Meth.82(1985)83-89 .
- 23.- March Steven C , Parikh Indu and Cuatrecasas Pedro . A Simpli-  
fied method for cyanogen bromide activation of agarosa for  
Afinity chromatograph . Anal.Biochem.66(1974)149-152 .
- 24.- Mazzaferri L , Ernest M.D. . Endocrinology . Medical Examina-  
tion Publishing Co .United States of America , 1974 ,23-71 .
- 25.- McLaren L , Moira Lillwhite E Jane . Indirect enzyme linked  
immunosorbent assay (ELISA) : practical aspects of standardi-  
zation and quality control . Med.Lab.Sc.38(1981) 245-251 .
- 26.- Oellerich M and H. Handl . Enzyme-immunoassay . J.Clin.Chem.-  
Biochem. 22(1984) 895-904 .
- 27.- Oellerich M and H. Handl . Determination of Triiodotironine  
in serum by Enzyme and Radioimmunoasay a comparative study .  
J.Clin.Chem.Biochem.19(1981) 447-451 .

- 28.- Proença Ma. Teresa and Maura Luis Simoes . Thyroid-fuction assessment by use of enzyme-immunoassay . Clin.Chem.31(5) (1985) 767-768 .
- 29.- Porstmann Barbel , Porstmann T , Nogel E , and Evers V . Which of the commoly used marker enzyme the best results in colometric and fluorometric enzyme immunoassay , horseradish peroxidase , alkaline phosphatase or B-galactosidase ? . J.Immunol.Meths.79(1985) 37-45 .
- 30.- Robbins J.R. , Haimovich J. and Sela M. . Purification of antibodies with Immuoadsorbents prepared using bromoacetyl cellulose . Immunochem .4(1967) 11-22 .
- 31.- Spearks Kenneth and Ballowmark . The Indirect ELISA for Quantitation of specific antibody : analysis of antibody dilution curves . Diag.Immunol.1(1983) 268-275 .
- 32.- Sullivan O'J. and Marks V. Methods for the preparation of enzyme antibody conjugates for use enzyme-immunoassay . Meths.Enzymol.-73(1981) 147-166 .
- 33.- Tietz W. Noebert . Quimica Clínica Moderna . Edt.Interamericana México , 1972 , 607-633 .

- 34.- Tijssen P. and Kurkate . Highly efficient and simple active peroxidase -antibody conjugates for enzyme-immunoassay .  
Anal.Biochem.136(1984) 451-457 .
- 35.- Thorell I. and Larson M.Steven . Radioimmunoassay and Related Techniques : Methology and Clinical Applications .Edt.Mosby. 1978 .
- 36.- Vitukaitis J. , J.B.Robbins and G.T.Rose . A method for producing specific antisera with small doses of immunogen .  
J.Clin.Endocr.33(1971) 988-991 .
- 37.- Williams H.Rpbert . Tratado de Endocrinología . 3a ed. , Edt. Salvat , España ,1979 , 105-208 .
- 38.- Weir D.M. . Handboork of Experimental Immunology . third ed. Edt. Blackwell Scientific Publication . USA , 1980 , 204-205 .