

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE
MEXICO

51261
L
2ej

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES "ZARAGOZA"

RADIOINMUNOANALISIS DE HORMONA PARATIROIDEA: OBTENCION
Y CARACTERIZACION DE UN ANTICUERPO (RB-INN), ESPECIFICO
PARA REGION MEDIA Y CARBOXILOTERMINAL.

T E S I S

Que para obtener el grado de maestría en Investigación en
Biología de los Sistemas Humanos

presenta:

RICARDO MARTINEZ
VARGAS.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1990



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.

I N D I C E D E F I G U R A S

Secuencia de aminoácidos de la pre-pro-PTH humana. pp.10

Configuración de la molécula de PTH 1-84, de acuerdo a la distribución de masas y por difracción de rayos X. pp.13

Electroforesis en SDS, de sueros RB-INN; utilizando tinción argéntica. pp.24

Perfil de purificación del radioligando PTH(1-125), con columna de bio-gel P-60. pp.25

Titulación del anticuerpo RB-INN. pp. 26

Porcentaje de unión máxima obtenida con las fracciones del perfil de elución. pp.28

Desplazamiento del porcentaje de unión, obtenida con el anticuerpo RB-INN, utilizando las fracciones 1-34, 44-68 y la hormona íntegra 1-84. pp.29

Determinación de PTH, en el sobrenadante del líquido de incubación de células paratiroides, empleando los anticuerpos CH:1, anti-MM y el RB-INN. pp.30

I N D I C E D E C U A D R O S

Secuencia de aminoácidos de PTH-bovina, PTH-humana y PTH-porcina. pp.11

Metabolismo de la hormona paratiroidea, en el humano. pp.15

Efecto metabólico hipercalcémico y en la adenilato ciclasa de diferentes fragmentos de la PTH. pp.16

Técnica de preparación del radioligando PTH(I-125). pp.20

Concentraciones en suero de PTH de sujetos normales. pp.31

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

La homeostásis del calcio en el humano está supe-
ditada principalmente a la interacción de tres sistemas de
regulación hormonal. El primero de ellos y con mucho el --
más importante es el sistema de la PTH, el segundo el de -
la $1\alpha,25$ dihidrocolecalfiferol o vitamina D_3 y el tercero
de los sistemas esta gobernado por las acciones de la calci-
tonina(1). La PTH actúa regulando: 1)La dinámica de la re-
sorción y la secreción del calcio del esqueleto, que es la
principal reserva de éste catión en el organismo. 2)La ex-
creción de calcio por el riñón y 3)El balance entre la ab-
sorción intestinal de calcio y los requerimientos orgánicos
del mismo. Así entonces la calcémia se regula principalmen-
te por la actividad secretora de PTH, misma que a su vez -
aumenta cuando el calcio extracelular disminuye y viscever-
sa(2). Es de hacer notar que la PTH tambien influye de ma-
nera primordial en la homeostásis del fósforo, favorecien-
do la excreción urinaria de éste al aumentar la actividad
de la hormona(3).

La importancia de la actividad de las glándulas
paratiroides, la sospechó por vez primera en 1836 Paynard
veterinario de Lyon, Francia, que observó la muerte de los

perros a los pocos días de haberles extraído la glándula -
tiroides. Poco tiempo después, entre 1839 y 1842, Albers -
publica la primera descripción anatómica de las glándulas
paratiroides. Los primeros estudios de la función de las pa-
ratiroides los realiza Remark en el año de 1855. Virchow -
en 1863 describe las glándulas en el hombre y en 1880 ---
Sandström describe la presencia de cuatro glándulas parati-
roides(4). Gley en 1891 demuestra que la paratiroidectomía
total es incompatible con la vida(5). Afirmandose la inde-
pendencia total entre la glándula tiroides y la paratiroides,
idea que se confirma con los estudios embriológicos
de Khön realizadas en 1895.

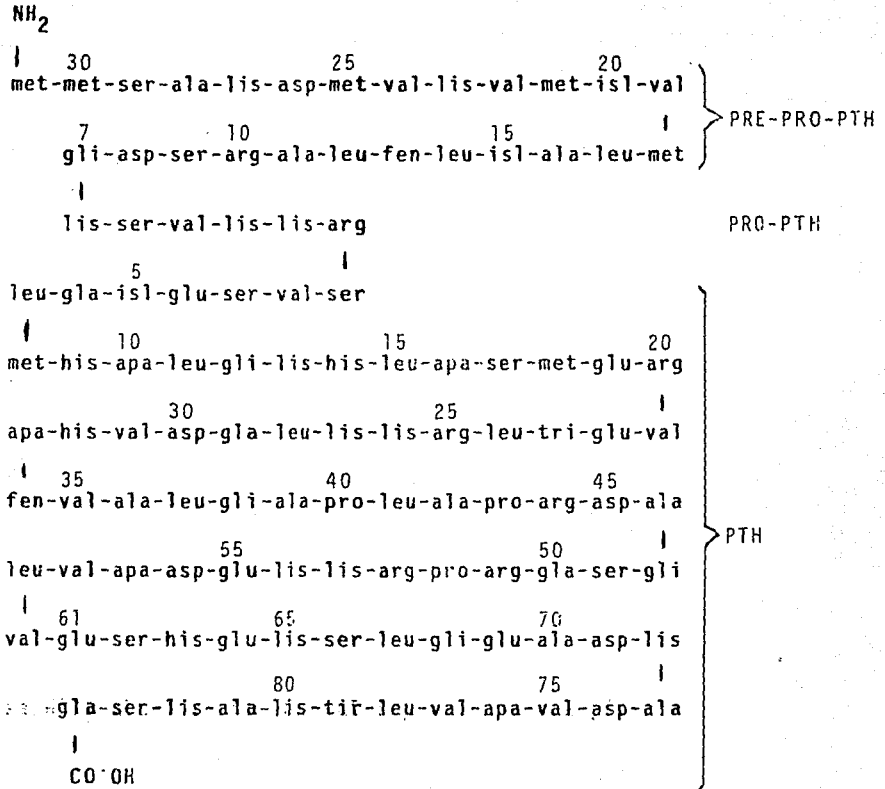
Las glándulas paratiroides se encuentran en número
de cuatro (cuyos tamaños no rebasan los 5mm c/u.), si-
tuadas en la pared posterior de la glándula tiroides.
Cada glándula paratiroides está su vez dividida en celdi-
llas constituidas de tejido colágeno, en las que se encuen-
tran tres tipos de células; a) células principales, cuyo ta-
maño es menor a 12 micras, b) células espumosas, de tamaño
mayor que las anteriores (entre 20-30 micras) y células --
oxifílicas que poseen granulaciones inconstantes, variando
de acuerdo a la especie. Todas éstas células contienen --
gran cantidad de mitocondrias; como característica impor-
tante cada glándula está irrigada tan solo por una arte-
ria terminal, rama del plexo tiroideo(6).

El origen embriológico de las glándulas parati-

roides es a partir de la tercera y cuarta bolsas faríngeas siguiendo un esquema de desarrollo similar al que presenta la hipófisis, a partir de una evaginación hueca en cuyas paredes proliferan cordones macizos, que formarán la parte secretora de la glándula, la evaginación primitiva que une a la glándula con la orofaringe se atrofia posteriormente (7).

Las manifestaciones de enfermedad paratiroidea se han descrito desde 1850, en lo que respecta al síndrome tetánico por Lausart y Trousseau; en 1891 se relacionó con problemas óseos por Von Recklinghausen, a partir de los cuales partieron los primeros estudios clínicos de las paratiroides con Hanson en 1923 y más particularmente con Collip en 1925(8). En 1978 Keutman, publicó la secuencia completa de la PTH humana (figura 1), estructura que fué deducida de trabajos previos(9) y únicamente un aminoácido fué revisado en 1981 cuando la secuencia de codificación del DNA para la PTH-h fué establecida(10) y más recientemente sintetizadas(11). En todas las especies que sintetizan PTH, se trata de un polipéptido de 84 aminoácidos, lineal, con peso molecular aproximado de 9,500 daltons (PTH-h= 9,418), basados en estudios de filtración en gel y en cromatografía de intercambio iónico, la PTH del perro, pollo y rata son similares en tamaño y características a las especies porcina, bovina y humana, reportándose discrepancias menores en algunos residuos aminoácídicos. (cuadro 1).

F I G U R A 1



SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LA PRE-PRO-PTH HUMANA
 SOLAMENTE EL PEPTIDO 1-84, ES SECRETADO AL EXTERIOR
 DE LA-CELULA PARATIROIDEA

ala-val-ser-glu-ile-gla-fen-met-his-apa-ile-gli-lis-his-leu
 ser leu

ala-val-ser-glu-ile-gla-fen-met-his-apa-ile-gli-lis-his-leu

20

30

ser-ser-met-glu-arg-val-glu-tri-leu-arg-lis-lis-leu-glu-asp
 asp

ser-ser-leu-glu-arg-val-glu-tri-leu-arg-lis-lis-leu-glu-asp

40

val-his-apa-fen-val-ala-leu-gli-ala-ser-ile-ala-tir-arg-asp
 pro-leu pro

val-his-apa-fen-val-ala-leu-gli-ala-ser-ile-val-his-arg-asp

50

60

gli-ser-ser-gla-arg-pro-arg-lis-lis-glu-asp-val-leu-val-glu
 ala-gli

gli-gli-ser-gla-arg-pro-arg-lis-lis-glu-asp-val-leu-val-glu

70

ser-his-gla-lis-ser-leu-gli-glu-ala-asp-lis-ala-asp-val-asp
 glu asp apa

ser-his-gla-lis-ser-leu-gli-glu-ala-ala-lis-ala-asp-val-asp

80

val-leu-ile-lis-ala-lis-pro-gla → PTH bovina

tir ser → PTH humana

val-leu-ile-lis-ala-lis-pro-gla → PTH porcina

Secuencia de aminoácidos de la PTH bovina(**superior**), humana (**línea media**) y porcina(**línea inferior**). Únicamente se hace hincapie en los residuos en los cuales se diferencia de la PTH humana, se muestran completas las secuencias de la PTH bovina y porcina.

La estructura secundaria y terciaria propuesta - por Fiskin(12), a través de estudios realizados con microscopía electrónica de campo oscuro, consiste de dos estructuras conectadas por un corto puente. Las localizaciones de la alfa-helice, la beta configuración y la región de giros beta fueron deducidos por los métodos predictivos de Chou y Fasman(13). La organización en tercera dimensión de la molécula de PTH visualiza las configuraciones aminoterminal y carboxiloterminal (figura 2).

La PTH 1-84 es la especie predominante en la células glandulares y del líquido intersticial que las rodea de alrededor del 85%(14). La hormona inicialmente sintetizada es una molécula de 115 aminoácidos, denominada pre-pro-PTH, que sigue dos pasos proteolíticos después de que es liberada del RNA ribosomal(15), el producto que se almacena en el aparato de Golgi, es sometido a hidrólisis separando 24 aminoácidos y formándose un precursor de la PTH denominado como pro-PTH de 90 aminoácidos, finalmente éste péptido al almacenarse en los gránulos secretores pierde 6 aminoácidos, quedando la hormona nativa 1-84(16).

La secreción de la PTH 1-84 a la circulación es intermitente y no se llega a suprimir en su totalidad(17). La PTH 1-84 una vez que ingresa en la circulación, se cataboliza en los tejidos periféricos, principalmente en hígado y riñón, en donde se originan fragmentos de PTH(18); éstos y la misma PTH 1-84, se eliminan de la circulación por el riñón mediante mecanismos de filtración y reabsorción -

FIGURA 2



Molécula de la PTH 1-84
vista de perfil



Molécula de la PTH 1-84
vista de frente



Molécula de la PTH 1-84
presentando los giros
beta y alfa.

Configuración de la molécula de PTH 1-84, de acuerdo a distribución de masas en campo oscuro, por difracción de rayos X. ((12,13)

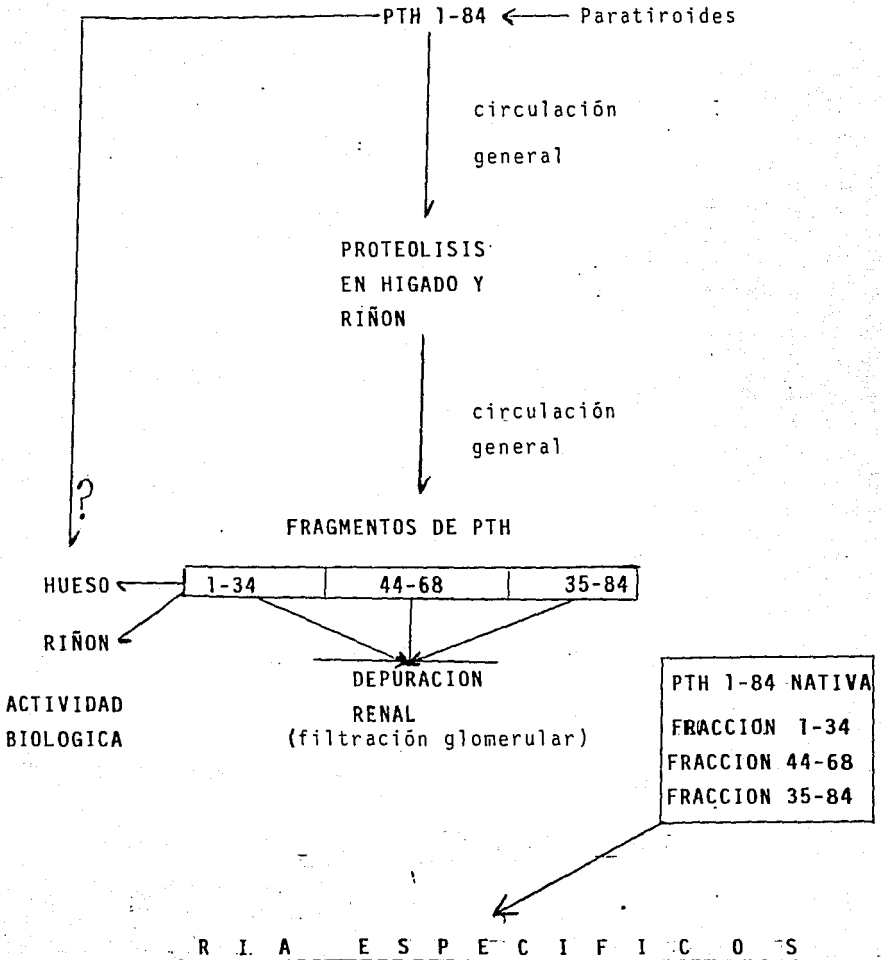
tubular(19). La PTH 1-84 tiene actividad biológica en riñón y dudosa en hueso(20). Cuadro 2.

Por la orina no se excreta ninguna forma de PTH. En la sangre se han identificado tres fragmentos principales de la hormona que son; el fragmento aminoterminal 1-34 con gran actividad biológica en hueso y riñón; el fragmento carboxiloterminal 35-84 y el fragmento 44-68, ambos sin actividad biológica(21). Así entonces la concentración de PTH en sangre, cuantificada en los radioinmunoanálisis, es ta constituida por una mezcla heterogenea de estos tres fragmentos, que dependen en su proporción de tres procesos diferentes: 1) secreción; 2) metabolismo en hígado y riñón y 3) depuración renal(22). La potencia relativa de los diferentes fragmentos en relación a la acción de la PTH 1-84 se muestra en el cuadro 3.

Los anticuerpos con los que se cuenta para la determinación de PTH, tienen especificidad por una o varias regiones de la molécula de PTH(23). Todos los RIA independientemente de la región específica de la hormona que reconozca, cuantifican también la hormona íntegra 1-84. En la actualidad se cuentan con varios anticuerpos para determinar PTH y se diferencian en esencia de: a) Los que reconocen el fragmento aminoterminal 1-34; b) los que reconocen el fragmento carboxiloterminal 35-84 y c) los que reconocen la molécula media 44-68. Es muy importante tomar en cuenta la región específica que el anticuerpo determina, para interpretar correctamente los resultados.

CUADRO 2

METABOLISMO DE LA
HORMONA PARATIROIDEA



C U A D R O 3

SECUENCIA PEPTIDICA	POTENCIA RELATIVA/mol.	
	Hipercalcémica	Activación de la adenilato ciclasa
PTH 1-84	100	100
PTH 1-34	132	77
PTH 1-31	74	10
PTH 1-28	0.2	5
PTH 1-27	0.2	0.2
PTH 1-26	0.2	0.3
PTH 2-34	64	3
PTH 3-34	0.2	0.3
PTH 1-12 + PTH 13-34	0.2	-
PTH 37-84	0	-
PTH 53-84	0	0

Efecto metabólico, encontrado en el suero de perros, al administrar diferentes fragmentos de PTH bovina.

En la discriminación entre el diagnóstico de hiperparatiroides y normales, así como entre hipercalcémicos por malignidad y de hipocalcémicos con respuesta paratiroidea normal o insuficiencia renal moderada, la sensibilidad de los RIA anti-PTH MM y anti-PTH 35-84 para identificarlos es buena; sin embargo, para la identificación de los hiperparatiroides es baja; para estos casos, es superior el RIA que determina la región aminoterminal, así como los métodos radioinmunométricos y los citoquímicos(24).

La producción convencional de anticuerpos requiere de seleccionar un animal de fácil manejo, de preferencia lo más alejado de la escala filogenética para obtener rápida respuesta inmune con la administración de pequeñas cantidades de inmunógeno; de adecuados métodos para la purificación del inmunógeno; del manejo cuidadoso del mismo en la preparación e introducción en el animal seleccionado y, finalmente de la facilidad en la obtención y colección del suero hiperinmune(25).

M A T E R I A L
Y
M E T O D O S

A) Obtención de anticuerpos contra PTH y contra IgG de pollo:

El primer anticuerpo anti-PTH(RB-INN), se obtuvo en un pollo de la cepa White Leghorn de 2.5 kgs. de peso, -- con libre acceso al agua y al alimento, en condiciones de -- luz-oscuridad ambientales, bajo el siguiente programa de inmunización: El día "0", con 50 mcg de PTH-b 1-84 (inmunonuclear NRB:NB01) y adyuvante completo de Freund; en los días 15, 20 25 y 30 con 25, 12, 6 y 3 ug. de PTH y adyuvante incompleto. En todos los casos se administraron volúmenes de 1.0 ml. repartidos en dos aplicaciones, en el cojinete de la pata y en el músculo pectoral, las reinmunizaciones se realizaron cada 45 días con 2.6 mcg. de PTH y adyuvante incompleto. Las sangrías se realizaron cada 45 días, por punción de la vena braquial del ala entre las 07.00 y las 09.00 hrs.; se separó el suero, se liofilizó y se almacenó en alícuotas de 1.0 ml. -- dentro de tubos Eppendorff.

El segundo anticuerpo anti-IgG de pollo(C1-INN), se obtuvo en conejos de la cepa Nueva-Zelanda. En el día "0", se administraron 100 mcg. de IgG purificada de pollo(26) y ad

adyuvante completo de Freund; los días 15, 25, 35, 40 y 55 se administrarán 50, 25, 12, 6 y 3 mcg. de IgG de pollo y adyuvante incompleto de Freund; al igual que para la obtención del primer anticuerpo, los volúmenes finales fueron de 1.0 ml. (0.5 ml. de antígeno en solución de PBS), y se administraron en dos aplicaciones en el musculo dorsal vertebral. Las reinmunizaciones se realizaron con IgG y adyuvante incompleto cada 40 días. Las sangrias se realizaron en las mismas condiciones que para el primer anticuerpo, por punción de la arteria medial de la oreja con con punzocat del #21, previamente empapado de una solución de Heparina (1,000 u.i./ml.).

B) Preparación de PTH-h 1-84 radioactiva con I-125.

El radioligando de PTH 1-84, se preparó de acuerdo al método descrito por Mallette y B.; la actividad específica determinada por electroforesis en papel (3.0 mm. de grosor), en buffer de barbital sódico fué de 600 uCi/mcg. de hormona. Para la purificación de PTH-b 1-84 (I-125), se colectaron alícuotas de 1.0 ml. de una columna de Bio-gel P-60 de 1x70 cms con flujo de 8 ml./hr., a 4°C. La PTH-h (I-125) eluye en el frente del primer volumen (V_1); en las fracciones 28 a 38 se adicionan 0.3 ml. de solución de barbital pH 7.4 con 10% de suero hipoparatiroideo. Se seleccionaron las cinco primeras alícuotas, para relizar el acoplamiento de cada una de ellas al anticuerpo obtenido y al CH:1.

C) Caracterización de la región de la molécula que reconoce -

PREPARACION DEL RADIOLIGANDO *

2 mCi DE I-125 +

35 ml. DE Na_2HPO_4 al 0.5 M, pH 7.4 +

2 mcg. DE PTH 1-84 +

5 mcg. DE CLORAMINA-T

↓
Incubar por 5 minutos a
temperatura ambiente

240 mcg. DE Na_2SO_3 +

1.0 ml. DE SUERO HIPOPARATIROIDEO +

10 mcg. DE QUSO G-32(microfina)

↓
Lavar cuatro veces con
agua desionizada, centrifugando
a 900 x g. 5 minutos

ELUIR CON 1.0 ml. DE AGUA-ACIDA Y

ACETONA AL 30% (v/v).

↓
SEPARAR ALICUOTAS DE 200 mcI. PARA LA

CROMATOGRAFIA EN BIOGEL p-60.

* Mallette, L.E. & Bradley, W.A.
Bovine parathyroid hormone-(41-84), a hormone-fragment with
white desairable properties for use as radioligand.
J. Lab. Clin. Med.:98, 886. (1981).

el anticuerpo.

Se estudió la inmunoreactividad del RB-INN utilizando las principales regiones de PTH con fragmentos sintéticos: aminoterminal 1-34, región media 44-68 y hormona íntegra, para determinar el desplazamiento del radioligando PTH 1-84(I-125), con cantidades conocidas de PTH-h 1-34, 44-68 y 1-84. Estos desplazamientos se determinaron simultáneamente con el anticuerpo CH:1.

D) Radioinmunoanálisis.

El desplazamiento del radioligando PTH-h(I-125) en el RIA se determinó de acuerdo al siguiente protocolo: 1) Pre incubación de 60 minutos a temperatura ambiente con 100 mc ℓ . de anticuerpo y 200 mc ℓ . de estandar de PTH, en buffer de -- barbitál sódico 0.2 M y barbitál ácido 0.025 M, con 0.18 M de EDTA-Na₂ y 10% de suero hipoparatiroideo. 2) Incubación durante 20 hrs. a 4⁰C, en agitación constante, después de la a dición de 10,000 cpm de radioligando, para un volúmen final de 400 mc ℓ . 3) Adición de 1.0 ml. del segundo anticuerpo diluido 1:200 con polietilenglicol (P.M. 8,000) al 3%(p/v); incubación durante 60 minutos a 4⁰C en agitación constante, para proceder a la precipitación del complejo formado por centrifugación a 1,500 x g. durante 60 minutos a 4⁰C. Se elimina el sobrenadante por decantación y se efectúa el conteo del precipitado en un contador para emisiones gamma.

E) Determinación de PTH en muestras problema.

La concentración de PTH, se midió en el suero de sujetos voluntarios aparentemente normales y en el sobrenadante de la incubación de células paratiroideas caninas, que fueron expuestas a diferentes concentraciones de calcio y obtenidas de acuerdo a métodos previamente desarrollados en el laboratorio(27), tanto con el anticuerpo RB-INN como con el CH:1 y el anti-PTH MM. En el sobrenadante de la incubación de células, se elimina el factor de heterogenicidad presente en el suero, ya que la PTH presente es solo producto de la secreción celular.

F) Análisis estadístico.

Para la validación del radioinmunoanálisis se realizaron experiencias sucesivas para $n=8$, con desplazamiento del radioligando por concentraciones conocidas de PTH 1-84; aceptandose dentro de una curva semi-logarítmica como valores adecuados: pendiente inferior a -15 y correlación al cuadrado de los valores mayor a 0.85; para el cálculo de resultados se utiliza la media de los valores y la desviación estándar de los mismos como medidas de tendencia central(28).

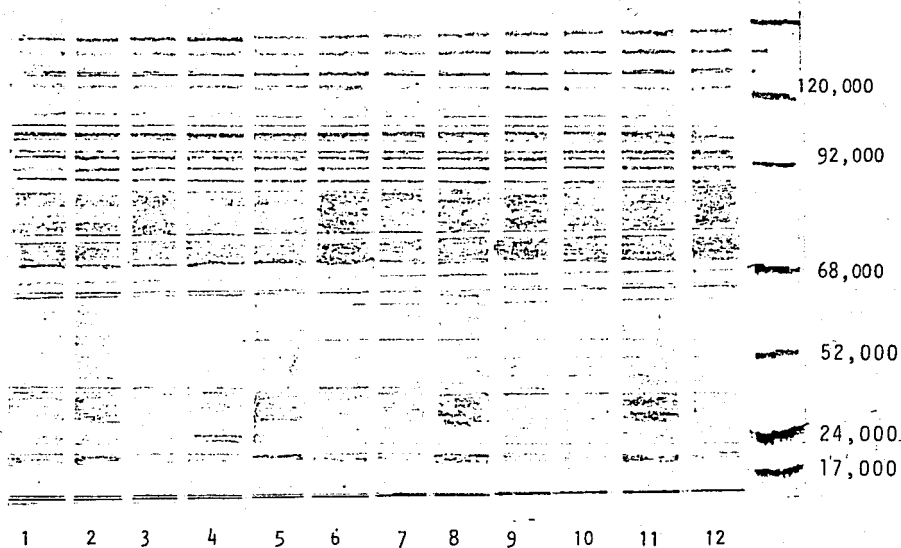
R E S U L T A D O S

El incremento porcentual de las IgG del suero de pollo se identificó por medio de la realización de electroforesis en PAGE-SDS al 10% (29), con tinción argéntica, utilizando 10 mcg. de proteína de las sucesivas sangrías como se aprecia en la figura 3. A partir del segundo carril se aprecia un aumento en la densidad de las bandas proteicas de 75 y 25 Kd, correspondientes a las cadenas ligeras y pesadas de las IgG. La titulación del anticuerpo RB-INN se realizó con diluciones crecientes del suero desde 1:400 hasta 1:3,000; la dilución óptima obtenida fué de 1:2,400, ver figura 4.

El perfil de elución radioactiva obtenido en la purificación del radioligando PTH-b 1-84(I-125), en la columna de Bio-gel P-60 se muestra en la figura 5; el 40% de la radioactividad total aplicada a la columna eluyó en el frente del primer volumen (V_1). Después de cada purificación la columna es lavada con 10 veces el V_0 utilizando buffer de barbital sódico al 0.05 M y pH 8.6.

La figura 6 muestra los resultados obtenidos después de la purificación en el Bio-gel del acoplamiento de la PTH-b 1-84(I-125) a los anticuerpos RB-INN y CH:1, con porcentajes que van desde el 22% para la fracción 5, hasta el

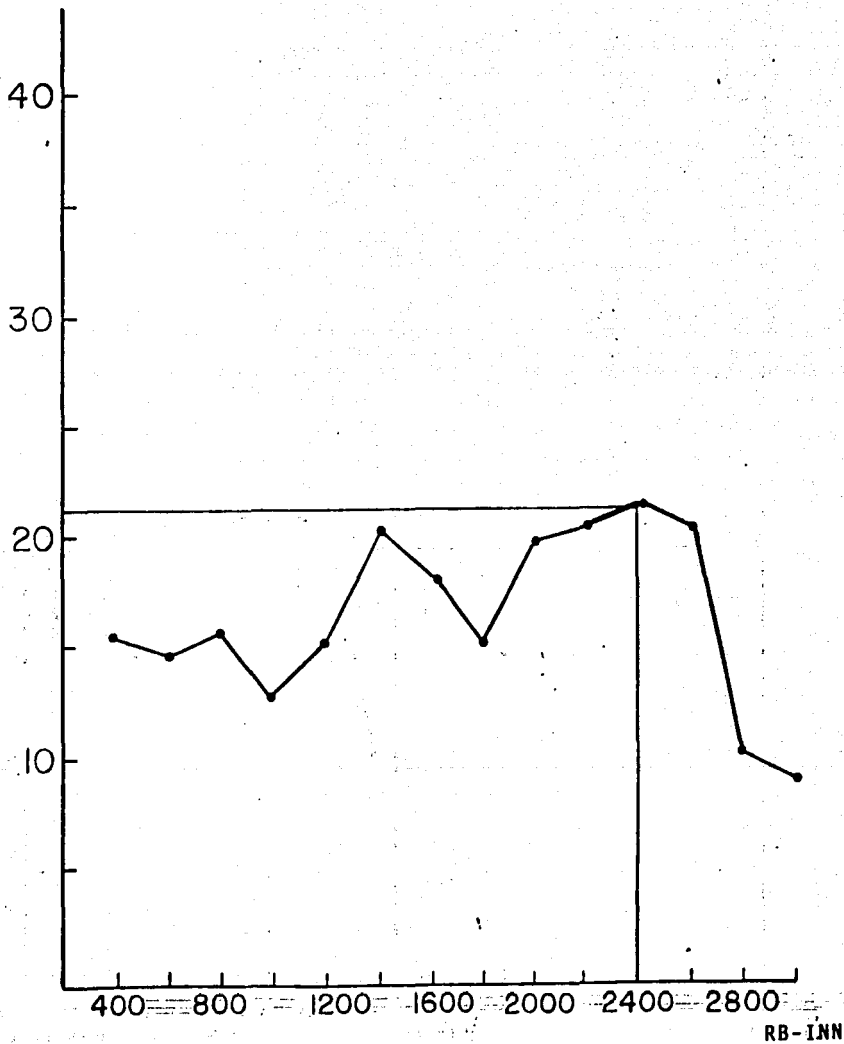
FIGURA 3



ELECTROFORESIS EN SDS AL 10% DE 10 Ug DE PROTEINA DE LOS SUEROS RB-INN
SIN ALBUMINA, CADA DOS CARRILES SE REALIZO UNA REINMUNIZACION, EL ULTIMO
CARRIL CONTIENE LOS ESTANDARES

F I G U R A 4

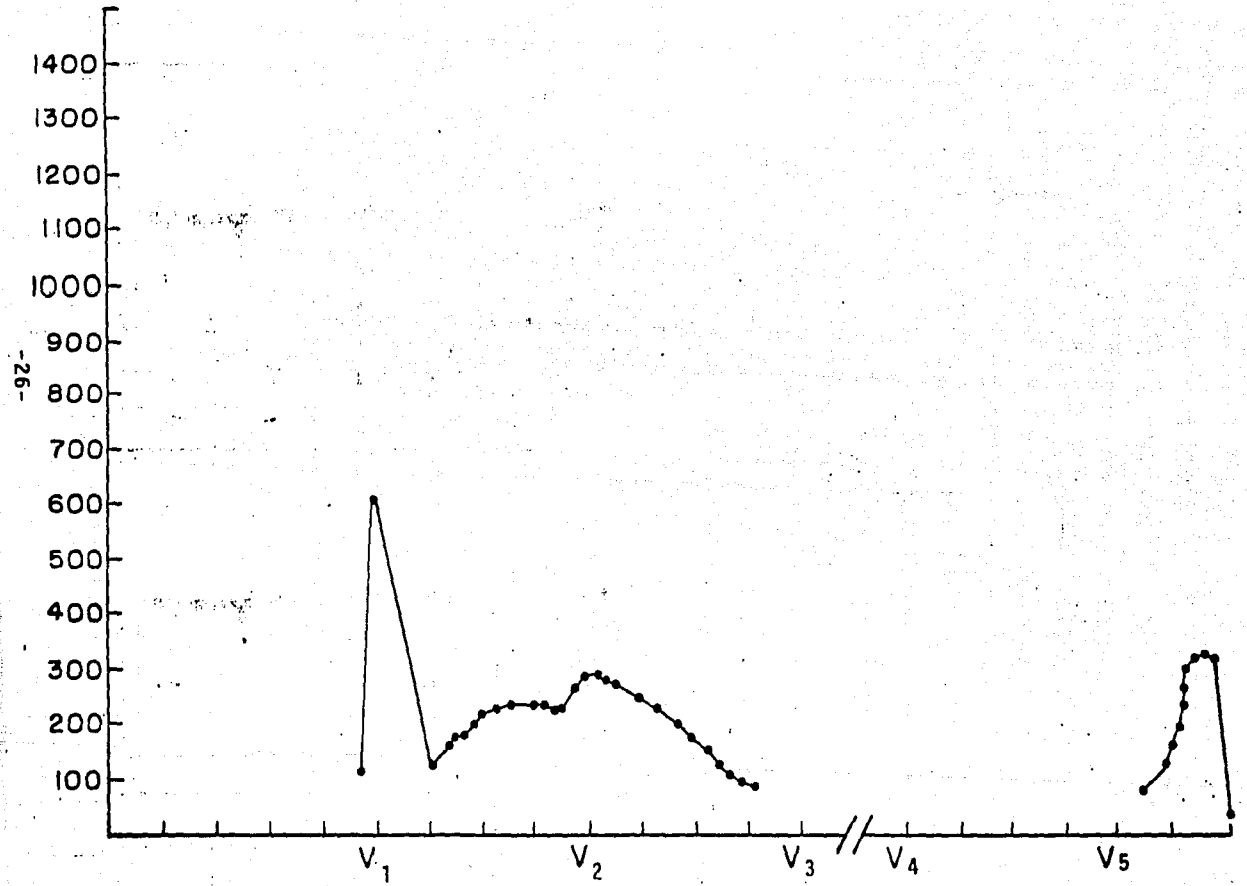
PORCIENTO
UNIDO / TOTAL



D I L U C I O N E S

F I G U R A 5

cpm x 10³



-26-

VOLUMENES DE EXCLUSION

34% para la fracción 2, seleccionada para realizar los RIAs.

La caracterización de la inmunoreactividad se realizó con curvas de desplazamiento para el radioligando y los diferentes fragmentos de PTH: región media 44-68, región aminoterminal 1-34 y hormona íntegra 1-84; en la figura 7 se muestran las evidencias experimentales del desplazamiento, en donde se hace evidente que los anticuerpos RB-INN y CH:1 no reconocen la fracción 1-34, mostrando alta especificidad en su desplazamiento para la otra fracción y para la hormona íntegra.

La determinación de PTH en sueros problema se muestra en el cuadro 5, en donde se comparan los resultados obtenidos en pacientes normales de ambos sexos

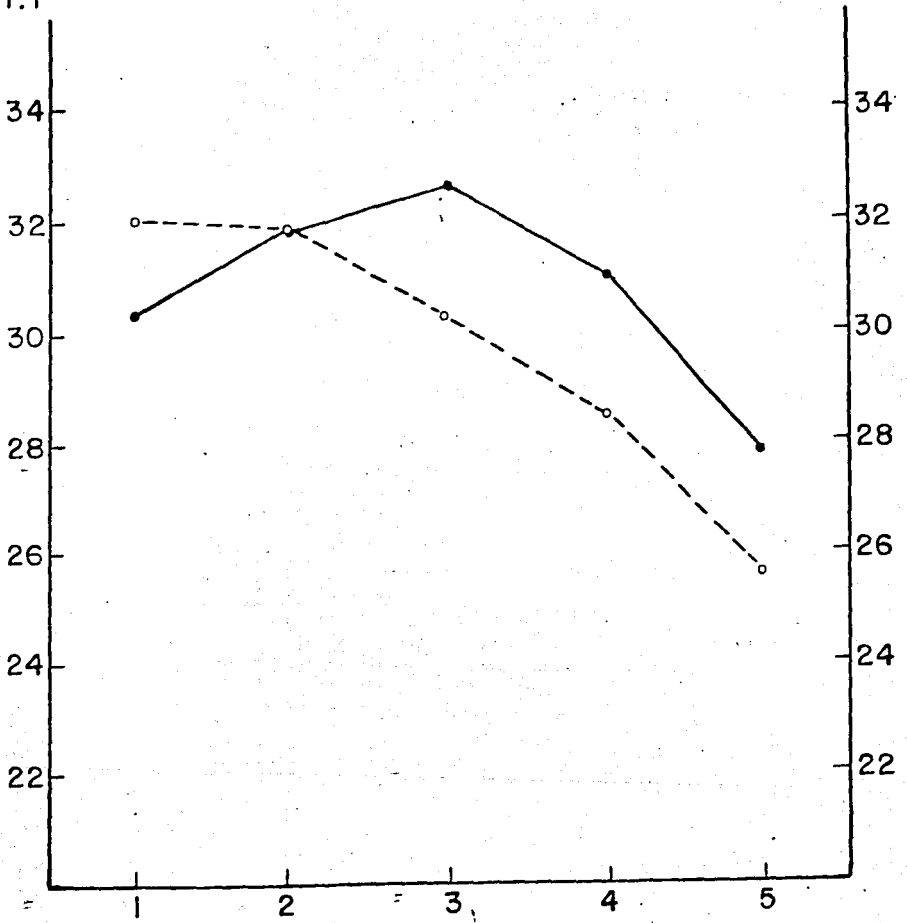
Se aprecia la gran similitud de las concentraciones, con los resultados del RB-INN y el CH:1.

La determinación de PTH en el sobrenadante de la incubación de células paratiroides caninas, se muestran en la figura 8, apreciándose que no existen diferencias significativas entre lo encontrado con los anticuerpos CH:1 y anti-PTH MM ($p < 0.05$).

F I G U R A 6

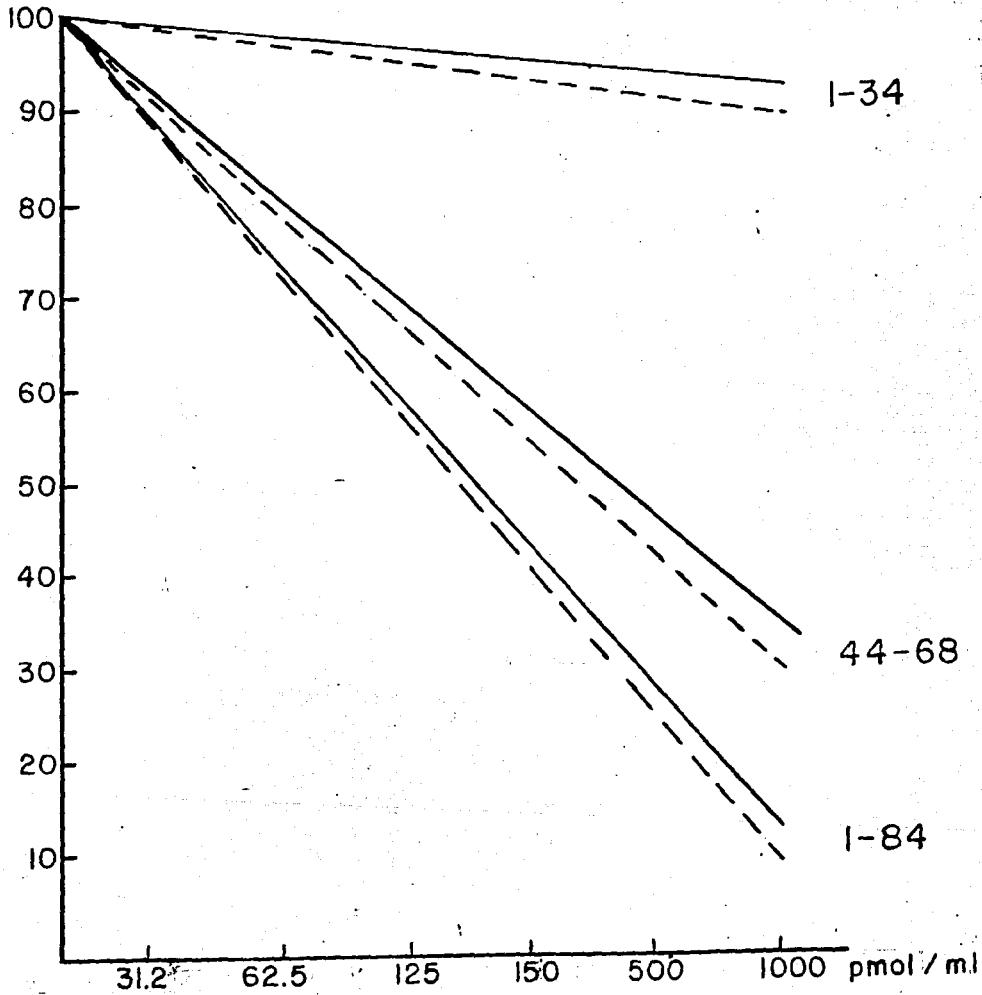
PORCIENTO DE UNIDO / LIBRE
CH:1 ---

PORCIENTO DE UNIDO / LIBRE
— RB-INN

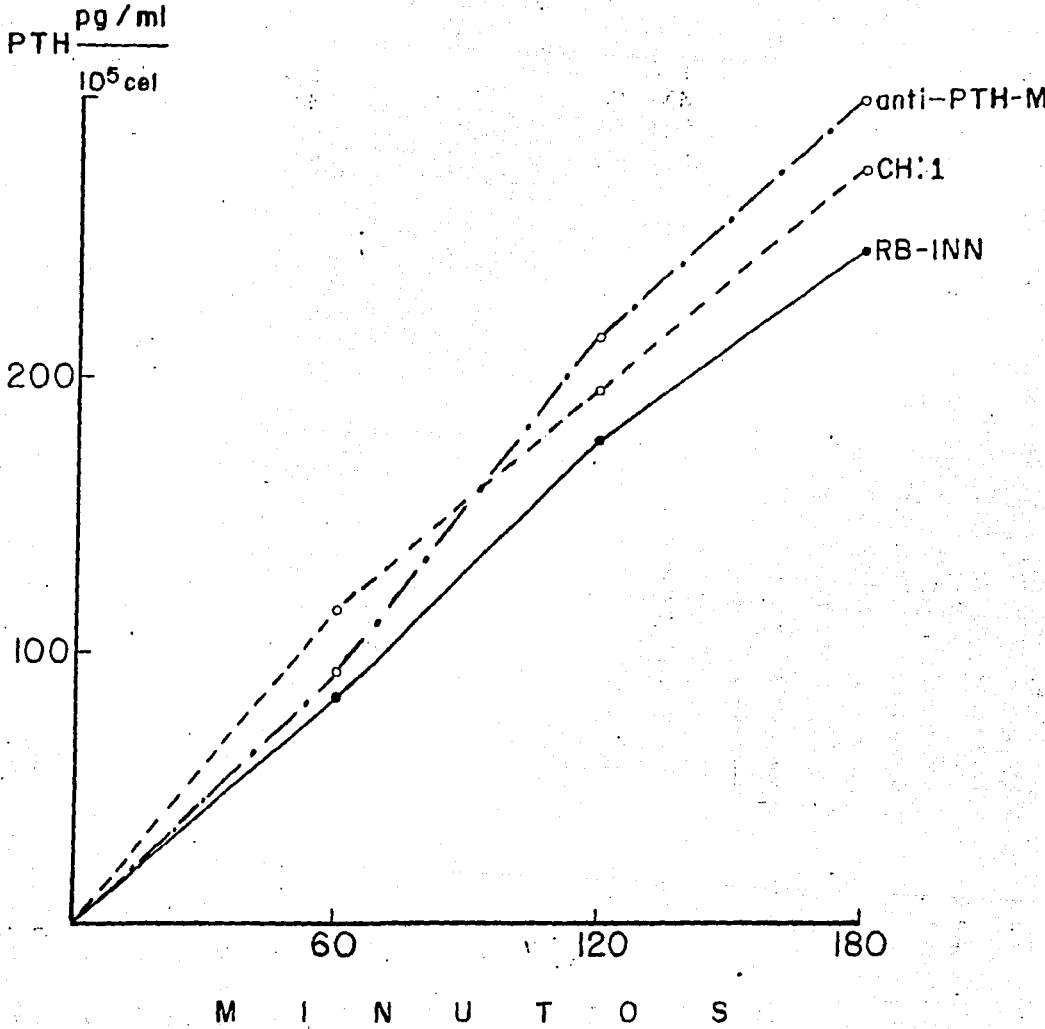


F R A C C I O N

PORCIENTO DE UNIDO / LIBRE



F I G U R A 8



C U A D R O 5

		EDAD	CaS	RB-INN	CH:1
Mujeres	\bar{X}	35.26	9.31	8.81	8.22
n=19	d.e.	12.11	0.53	6.05	4.20
Hombres	\bar{X}	34.13	9.57	9.05	4.20
n=8	d.e.	9.11	0.50	4.39	6.29

Concentraciones en suero de: calcio sérico (CaS), mgs/dl.
 Hormona paratiroidea, determinada con dos anticuerpos en
 ng/ml. En hombres y mujeres; los primeros con edades en-
 tre 18-60 años; y de 19 a 65 años para las últimas.

D I S C U S I O N

El anticuerpo RB-INN, reconoce región media y extremo carboxiloterminial, tal como lo demuestran las curvas de desplazamiento con los diferentes fragmentos de la molécula de PTH, además de la estrecha correlación entre estas curvas y las registradas comparativamente con los anticuerpos CH:1 y anti-PTH bien caracterizados. La determinación de PTH en sueros de sujetos normales y en sobrenadante de células paratiroides incubadas "in vitro", correlacionó significativamente con los valores obtenidos con el RB-INN en las mismas muestras que cuando se utilizaron otros anticuerpos como el anti-PTH MM y el CH:1.

El esquema de inmunización utilizado obtuvo títulos crecientes de IgG; globulina que es cuantitativamente la más importante de las inmunoglobulinas séricas y posee la actividad más alta para unirse a antígenos. Las demás inmunoglobulinas no sufrieron cambios cuantitativos aparentes en el SDS, aún con las reinmunizaciones, lo cual es afortunado puesto que no es extraño que en las fases tempranas de inmunización, los anticuerpos predominantes sean IgM, inmunoglobulinas que son poco reactivas en el RIA y por lo tanto insensibles a cambios sutiles de la concentración del an

tígeno. Actualmente, en nuestro RIA, el anticuerpo RB-INN -- tiene una dilución óptima de 1:2,000, con la que se logra - el 24% de unión máxima a la PTH-b 1-84(I-125), lo cual nos permite ser autosuficientes en ésta area. En el RIA se utiliza un segundo anticuerpo obtenido en nuestro laboratorio (Cl-INN), para precipitar la PTH radioactiva unida al anticuerpo, lo que nos permite tener un sistema de separación - más confiable.

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

- 1.- LA REALIZACION DE UN RIA, PARA DETERMINAR PTH ELABORADO EN NUESTRO LABORATORIO, NOS PERMITE ABATIR IMPORTANTEMENTE LOS COSTOS, EVITANDO HACER USO DE ESTUCHES COMERCIALES QUE LIMITAN EN GRAN MEDIDA LA REALIZACION DE PROTOCULOS EXPERIMENTALES.
- 2.- EN EL ESTUDIO DE LA BIOLOGIA DE LOS SISTEMAS HUMANOS, -- CONTAR CON UN RIA PARA MEDIR LA PTH, FACILITA LA IMPLEMENTACION DE PROTOCOLOS EXPERIMENTALES Y EL MONITOREO DE PACIENTES CON ALTERACIONES DEL METABOLISMO MINERAL.

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

- 1.- Arnaud, Claude D.
Hormonal regulation of calcium homeostasis in: Assay of calcium regulation hormones, ed. by Daniel D. Bikle by Springer Verlag, New York, pp.1; 1983.
- 2.- Tamayo y Orozco, J.A.
Homeostasis del calcio y fósforo. Nuevos conceptos, implicaciones y perspectivas clinicas (1ª parte).
Rev. Invest. Clin.(mex), 35, 327-342; 1983.
- 3.- Slatopolsky, Eduardo., Kevin, Martin and Hruska, Keith.
Parathyroid hormone metabolism and its potential as uremic toxin.
Am. J. Physiol. 239, F1-F12; 1980.
- 4.- Sandström, I.
Fisiología de las paratiroides. VII reunión de los endocrinólogos de lengua francesa. Beyrouth, 1963. Upa le -- Läk Fören. Förh. 15, 441-471. 1880.
- 5.- Gley, E.
Sobre la función de las paratiroides en el conejo y el perro.
C.R. Soc. Biol. Ser., 9, 843-847. 1881.
- 6.- Tremblay, G. and Pearse, A.G.E.
Histochemical study of the enzymes oxidatives in oxifilic cells of parathyroid and normal significance.
Brit. J. exp. Path., 40, 13-21. 1959.
- 7.- Munger, B.L.
The cytology of the normal parathyroid glands of man and Virginia deer.
J. Cell. Biol., 16, 379-385. 1963.

- 8.- Collip, J.B.
The extraction of a parathyroid hormone which will prevent or control parathyroid tetany and which regulates the level of blood calcium.
J. Interdisciplin. Cycle Res. 20, 135-142. 1929.
- 9.- Keutman, H.T., Sauer, M.M., Hendy, G.N., O'Riordan, J.H.L. -- and Potts, J.T. Jr.
Complete amino acid sequence of human parathyroid hormone.
Biochemistry. 17, 5723-5729. 1978.
- 10.- Hendy, G.N., Kronenberg, H.A., Potts, J.T.J. and Alexander Rich.
Nucleotide sequence of cloned cDNA, encoding human -- pre-proparathyroid hormone.
Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 7365-7369. 1981.
- 11.- Kimura, T., Takai, M., Yoshizawa, K., S. Kakibura, J.
Solution synthesis of (ASN-76)-human parathyroid hormone(1-84).
Biochem. Biophys. res. Commun. 114, 493-499. 1983.
- 12.- Fiskin, A.M., Cohn, D.V., and Peterson, G.S.
A model for the structure of bovine parathormone derived by dark field electron microscopy.
J. Biol. Chem. 252, 8261-8267. 1977.
- 13.- Chou, P.Y. and Fasman, G.D.
Beta-turns in proteins.
J. Mol. Biol. 115, 135-146. 1977.

- 14.- Morrisey, J.J., Shofstall, R.E., Hamilton, J.W. and Cohn, D.V.
Synthesis, intracellular distribution and secretion of -
multiple forms of parathyroid secretory protein I.
Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77. 6406-6413. 1980.
- 15.- Rosenblatt, M.
Pre-proparathyroid hormone: Intracellular transport and
processing.
Min. Elect. Metab. 8. 118-132. 1982.
- 16.- Mac Gregor, R.R. and Cohn, D.V.
The intracellular pathway for parathormone biosynthesis
and secretion.
Clin. Ortho. 137. 244-249. 1981.
- 17.- Meyer, G.P., Habener, J.F. and Potts, J.T. Jr.
Parathyroid hormone secretion in vivo. Demonstration of
a calcium-independent non-supresible component of secre-
tion.
J. Clin. Invest. 57. 678-681. 1976.
- 18.- Martin, K., Hruska, K. and Greenwolt, A.
Selective uptake of intact parathyroid hormone in the --
liver: Differences between hepatic and renal uptake.
J. Clin. Invest. 58. 781-789. 1976.
- 19.- Martin, K.J., Hruska, K., Freitag, J., Bellorin-Font, E., ---
Klahr and Slatopolsky, E.
Selective uptake of the syntetic aminoterminal fragment
of bovine parathyroid hormone by isolated perfused bone.
J. Clin. Invest. 52. 256-273. 1978.
- 20.- Hruska, K.A., Karker, A., Martin, K. and Slatopolsky, E.
Peripheral metabolism of intact parathyroid hormone - role
of liver and kidney and the effect of chronic renal fail-
ure.
J. Clin. Invest. 67. 885-871. 1981.

- 21.- Newman, W.E., Neyman, M.W., Lane, K., Miller, L. and Seman, P.J.
the metabolism of labeled parathyroid hormone. In V Collected Biological Studies.
Calci. Tissue. Res. 18. 271-279. 1975.
- 22.- Habener, J.F., Segre, G.V., Powell, D., Murray, T.M., Potts J.T.Jr.
Immunoreactive parathyroid hormone in circulation of man Nature 238. 152-154. 1972.
- 23.- Martin, K.J., Hurska, K., Freitag, J.
Clinical utility of radioimmunoassay for parathyroid hormone.
Min. Elect. Metab. 3. 283-287. 1980.
- 24.- Znelli, J.M.
Measurement of parathyroid hormone. in Media Medica ed. - by Holbrook & Son Ltd., Norway Road. Hilsa, Portsmouth. 1988.
- 25.- Production of antibodies. In Immunochemistry in practice ed. by Blackwell Scientific Publications Osney Mead, London pp. 27-31. 1985.
- 26.- Stone, M.J. and Metzger, H.
The kinetics of the antibody-antigen reactions. In Antibodies: Their structure and function, ed. by Chapman and Hall, London pp. 53-55. 1984.
- 27.- Tamayo, J.A., Hernandez, J., Sierra-Amor, R.I., Nicolai, J. y Peña, J.C.
Preparación de células paratiroides caninas vivas mediante digestión enzimática.
Rev. de Invest. Clin. (mex). 39. 319-322. 1987.

28.- Strike, P.W.

Multivariate analysis. In Medical laboratory statistics. ed
by Jhon Wright & Sons Ltd. Press. Great Britain. pp.169
1981.

29.- Jhonstone, A. & Thorpe, R.

Preparative gel Techniques. In Immunochemistry in practice
ed by Blackwell Scientific Publications, Osney Mead. Lon-
don pp.148. 1985.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA