

15  
24

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"ZARAGOZA"



ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE  
HEMAGLUTINACION PASIVA PARA DETEC-  
TAR LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS EN  
CONTRA DE TIROGLOBULINA Y EN CON-  
TRA DE MICROSOMAS DE TIROIDES

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
RITA GONZALEZ SANCHEZ



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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.

# INDICE

## 1 INTRODUCCION

1.1	Generalidades.....	1
1.2	Anatomía de la glándula tiroides.....	2
1.3	Biosíntesis, Secreción y Liberación de Hormonas Tiroideas.....	3
1.4	Microsomas Tiroideos: Descripción.....	6
1.4.1	Bioquímica de Microsomas Tiroideos.....	7
1.5	Tiroidopatías.....	7
1.6	Principales Pruebas Diagnósticas.....	11
1.7	Diagnóstico de las Enfermedades Tiroideas.....	13
1.8	Autoanticuerpos Tiroideos.....	16
1.9	Técnicas Inmunológicas para Anticuerpos anti-tiroides.....	17
1.10	Fundamento de la Técnica de Hemaglutinación Pasiva.....	19

## 2 FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA..... 22

3	OBJETIVO GENERAL.....	24
3.1	Objetivos Específicos.....	25

## 4 HIPOTESIS..... 26

## 5 MATERIAL Y EQUIPO..... 27

## 6 METODOS

6.1	Obtención de Tiroglobulina.....	31
6.2	Cromatografía por Exclusión de Peso Molecular. Ultrafiltración.....	31
6.3	Pruebas Inmunológicas para determinar presencia de Tiroglobulina.....	33
6.4	Pruebas Inmunológicas para determinar presencia de Tiroglobulina.....	34
6.4.1	Precipitación en Gel.....	34
6.4.2	Inmunoprecipitación en Capilar.....	35

6.5	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en - Presencia de Dodecil Sulfato de Sodio.....	36
6.5.1	Determinación de Concentración de Tiroglobulina por el Método de Azul de Coomasie.....	39
6.6	Obtención de Microsomas.....	40
6.6.1	Microscopía Electrónica de Microsomas.....	42
6.7	Estandarización del Método de Hemaglutinación Pasiva para Detectar anticuerpos anti-Tg y Anticuerpos Anti-M.....	43
6.7.1	Sensibilización de eritrocitos de carnero...	43
6.7.2	Realización de la Prueba de hemaglutinación.	44
<b>7</b>	<b>RESULTADOS</b>	
7.1	Obtención y purificación de Tiroglobulina...	46
7.1.1	Pruebas Inmunológicas para detectar Tg.....	50
7.1.2	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.....	52
7.1.3	Concentración de Tiroglobulina.....	53
7.2	Microscopía Electrónica de Microsomas.....	55
7.3	Determinación de anticuerpos anti-Tg-h y anticuerpos Anti-M-h.....	56
<b>8</b>	<b>ANALISIS DE RESULTADOS.....</b>	<b>69</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>74</b>
<b>10</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>76</b>
<b>11</b>	<b>APENDICE.....</b>	<b>85</b>

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

## 1.-INTRODUCCION

### 1.1 GENERALIDADES

La glándula tiroides, secreta tiroxina, triyodotironina, y cantidades mucho menores de otras hormonas yodadas; todas ellas tienen efecto muy intenso sobre el metabolismo basal, ya que funcionan como termostato metabólico, y regulan el grado de actividad bioquímica en la mayor parte de tejidos. La función defectuosa de la tiroides produce dos tipos de síntomas: los que guardan relación con los efectos locales de una masa en el cuello, y los efectos generalizados de exceso o deficiencia de la hormona. (3,4,)

El año de 1956 fué particularmente importante en el estudio de la enfermedad tiroidea autoinmune. En este año Roitt et al detectaron altos títulos de anticuerpo para la tiroglobulina en pacientes con tiroiditis de Hashimoto. Rose y Witebsky indujeron tiroiditis en conejos inmunizados con homogenado de glándula tiroides y encontraron una sustancia que más tarde denominaron LATS (estimulador tiroideo de larga duración). ( 2,3,4 )

El grupo de pruebas para la detección de anticuerpo anti tiroglobulina y antimicrosomas tienen interés para establecer el diagnóstico de algunas tiroidopatías de reconocida patogenicia autoinmune, como son la tiroiditis de Hashimoto el mixedema primario y la enfermedad de Graves-Basedow.

Con relación a la frecuencia con que se presentan las enfermedades tiroideas, la bibliografía nos dice solamente que si son muy frecuentes, y que se presentan en un 5% de la población abierta, ya que hasta ahora no se ha hecho ningún estudio encaminado a dilucidar qué porcentaje de la población padece cualesquiera de las enfermedades tiroideas. Solamente se podría hacer un estudio en cada una de las clínicas u hospitales que concentran a sujetos con tales enfermedades.

## 1.2 ANATOMIA DE LA GLANDULA TIROIDES

La glándula tiroides es un órgano impar situado en la región anterior del cuello. Consta de dos lóbulos simétricos adosados a los lados de la tráquea y la laringe, están unidos entre sí por una parte de la estructura glandular situada sobre la tráquea denominada istmo; tiene forma de mariposa, es dura, lisa y de color rojo pardo. ( 2,3,4 )

Desde el punto de vista microscópico la glándula tiroides está constituida por vesículas o folículos cerrados de tamaño muy variable (15 a 500 nm de diámetro) llenos de una sustancia secretoria llamada coloide, y revestidos de células epiteliales cuboides que secretan hacia el interior de los folículos. El constituyente principal del coloide es la tiroglobulina, forma prácticamente todo el coloide foliular (80%) y es, por tanto, el componente fundamental de -

la masa tiroidea normal. Es además el depósito de reserva - de casi todas las hormonas activas,  $T_4$  y  $T_3$  y de sus precursores MIT y DIT. ( 2,3,4 )

### **1.3 BIOSINTESIS, SECRECION Y LIBERACION DE HORMONAS TIROIDEAS**

Para la elaboración de las hormonas tiroideas es básica la captación del yodo de la sangre, una vez elaboradas son almacenadas en el coloide en la molécula de tiroglobulina y de ahí son vertidas a la sangre según sean las necesidades del organismo. ( 2,3,4 )

Las células tiroideas sintetizan y secretan al interior de los folículos una gran molécula de glucoproteína - llamada TIROGLOBULINA, de peso molecular 660,000 daltons. - Cada molécula de tiroglobulina contiene 25 aminoácidos de tirosina, y estos constituyen el substrato principal que se combina con el yodo para formar las hormonas tiroideas. Estas hormonas se forman dentro de la molécula de tiroglobulina durante todo el proceso de síntesis de las hormonas tiroideas. ( 2,3,4 )

El complejo mecanismo de la biosíntesis de las hormonas tiroideas puede ser esquematizado del siguiente modo:

- 1.- Captación del yodo plasmático mediante la "bomba" de yodo de la célula tiroidea.
- 2.- Oxidación del yodo por medio de las peroxidases.
- 3.- Yodación de los componentes tirosílicos de la tiroglobulina



lina, previamente formada por la célula tiroidea, para la elaboración de las tirosinas monoyodotirosina (MIT) y diyodotirosina (DIT).

4.- acoplamiento de la yodotirosina para formar triyodotironina ( $T_3$ ) y tetrayodotironina o tiroxina ( $T_4$ ).

5.- Captación de gotitas de coloide por parte de la célula tiroidea por un mecanismo denominado pinocitosis, y tras la rotura proteolítica de los enlaces tiroglobulina-hormonas-tiroideas liberación de estas últimas a la sangre. (Fig.1)

Diariamente se secretan aproximadamente 80  $\mu\text{g}$  de tiroxina que circula en concentraciones de 5-11  $\mu\text{g}/\text{dL}$  fuertemente unida a diversas proteínas. Dichas proteínas que vehiculan la tiroxina, son principalmente 3: una globulina (TBG)-globulina transportadora de tiroxina; una prealbúmina transportadora de tiroxina (TBPA) y una albúmina. La  $T_3$  circula en concentración aproximada a 70-180  $\text{ng}/\text{dL}$  unida débilmente a la TBG. ( 2,3,4 )

La tiroglobulina no pasa como tal a la sangre circulante; primero libera tiroxina y triyodotironina, después estas hormonas libres son vertidas a la circulación. Este proceso tiene lugar así: la superficie apical de la célula tiroidea emite extensiones a modo de pseudópodos, que encierran pequeñas porciones del coloide formando vesículas que contienen las enzimas digestivas de los lisosomas mezcladas con el coloide. Las proteinasas que hay entre estas enzimas digieren las moléculas de tiroglobulina y liberan tiroxina y triyodo-

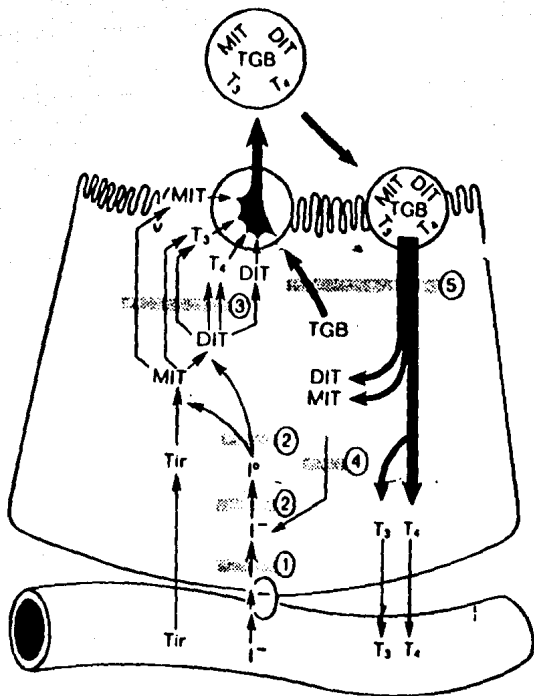


Fig. No. 1. Esquema de la biosíntesis de las hormonas tiroideas.

tironina, después estas se difunden a través de la base de la célula tiroidea, atraviesan la membrana basal y, finalmente pasan a los capilares que la rodean. En esta forma las hormonas tiroideas son liberadas hacia la sangre.

aproximadamente las dos terceras o las tres cuartas partes de la tirosina yodada que hay en la tiroglobulina nunca se transforma en hormona tiroidea sino que persiste como monoyodotirosina o diyodotirosina. Durante la digestión de la tiroglobulina para liberar tiroxina y triyodotironina, estas tirosinas yodadas también son liberadas por las células tiroideas. Sin embargo, no pasan a la sangre. Lo que ocurre es que se separa de ellas el yodo por acción de una enzima yodasa, que deja el yodo disponible para volver a penetrar en el ciclo de la formación de tiroglobulina y de la hormona tiroidea. ( 2,3,4 )

#### 1.4 MICROSOMAS TIROIDEOS; DESCRIPCION

Los microsomas provienen de la fragmentación del retículo endoplásmico rugoso obtenidos a grandes velocidades de centrifugación de homogenizados tiroideos; se aíslan del líquido sobrenadante. Son vesículas redondas de aproximadamente 0.3 a 1.5  $\mu$  de diámetro, limitados por una membrana sobre la que se encuentran adheridos gránulos de 150  $\text{Å}$  de diámetro. Algunas de las actividades de la fracción microsomica son:

- a.- Síntesis de proteínas
- b.- Oxidación del yoduro en la glándula tiroidea (tiene actividad de peroxidasa)
- c.- Síntesis de glicéridos
- d.- Síntesis de ácidos grasos y
- e.- Biosíntesis de esteroides, entre otras. ( 5,6,7,8 )

#### 1.4.1. BIOQUÍMICA DE MICROSOMAS TIROIDEOS

Existen evidencias de que el autoantígeno microsomal tiroideo está expresado a la vez en el citoplasma y sobre la superficie de células foliculares tiroideas. La caracterización bioquímica preliminar de los microsomas sugiere que es una glicoproteína con un peso molecular de alrededor de 100 a 110 kD. Estudios recientes empleando anticuerpos monoclonales proporcionaron la evidencia de que la estructura reconocida como antígeno microsomal está representada por la peroxidasa tiroidea (TPO). La identidad entre la TPO y los microsomas está más apoyada por la prueba de inmunofluorescencia demostrando un completo traslape de los antígenos en la superficie y en el citoplasma de las células tiroideas y - por la observación de que la función de los microsomas y la TPO está modulada similarmente por la TSH. (10,12,14)

#### 1.5 TIROIDOPATIAS ( 2,3,4 )

##### I.-BOCIO SIMPLE

Concepto: Es toda tumoración o hiperplasia de la glándula tiroidea que se traduce en un abultamiento de la región

anterior del cuello, producidos por un aumento de la secreción de TSH, por un defecto de secreción de hormonas.

Factores etiológicos

1.a Yodo

- Déficit o exceso de aporte
- Incremento de aclaramiento renal

1.b. Bociógenos

- Por alteración de la captación tiroidea del yodo
- aniones monovalentes (tiocianato, perclorato, nitrato, litio).

-Tioglucósidos

-Glucósidos cianogénicos

1.c. Por producción de un déficit en la organificación intratiroidea del yodo

-Tiouracilo

1.d. Por interferencia en la liberación de hormonas tiroideas

-vinplastina, colchicina

1.e. Por aumento en la excreción fecal de tiroxina

1.f. Defectos congénitos de la biosíntesis hormonal tiroidea

-Defecto en la captación

-Alteraciones en la oxidación

-Déficit de acoplamiento de las yodotirosinas

-Defecto de las deshalogenasas

-Déficit en la síntesis y secreción de la tiroglobulina.

## II.-HIPOTIROIDISMO

Concepto: Situación clínica caracterizada por un défi  
cit de secreción de hormonas tiroideas, ya sea por altera -  
ción orgánica o funcional o por déficit de estimulación de  
la TSH.

### Causas de hipotiroidismo

1.- Hipotiroidismo primario (Déficit estructural y funcional  
del tiroides

-Hipotiroidismo idiopático (tiroiditis autoinmune atrófica)

-Tiroidectomía

-Terapéutica con  $^{131}\text{I}$

-Radiaciones externas en la región cervical

Defectos en el desarrollo de la glándula tiroides

-Diversas alteraciones en la biosíntesis de las hormonas ti  
roides (defectos congénitos, déficit yódico, bociogénesis.

2.-Hipotiroidismo secundario (Déficit de TSH)

3.-Hipotiroidismo terciario (Déficit de TRH)

4.-Resistencia periférica a las hormonas tiroideas

## III.- HIPERTIROIDISMO

Concepto : Es un trastorno funcional del tiroides ca  
racterizado por la secreción y consiguiente paso a la san -  
gre de cantidades excesivas de hormonas tiroideas, en rela -  
ción con las necesidades del organismo.

### Clasificación

1.-Enfermedad de Graves-Basedow

2.-Bocios Nodulares Tóxicos

**3.- Excesiva secreción de TSH**

-Con tumor hipofisiario

-Sin tumor hipofisiario

4.-Tirotoxicosis inducida por yodo (Jod-Basedow)

5.-Carcinoma Folicular de tiroides

6.-Tiroiditis

-Subaguda de De Quervain

-De Hashimoto

7.-Displasia Fibrosa polioestótica (Síndrome de McCune Albrighth)

8.-Mola hidatiforme y coriocarcinoma

9.-Estruma ovárico

10.-Tirotoxicosis facticia

**IV.-TIROIDITIS**

Concepto: Las tiroiditis constituyen un amplio grupo de procesos caracterizados por lesiones inflamatorias en el seno de la glándula tiroidea. Este grupo de enfermedades es sumamente heterogéneo en cuanto a su etiología y a sus características clínico evolutivas.

**Clasificación**

1.-Tiroiditis agudas o supuradas

2.-Tiroiditis subaguda o de De Quervain

3.-Tiroiditis Crónicas

-Tiroiditis linfocitaria focal

-Tiroiditis autoinmune atrófica

Enfermedad de Hashimoto o tiroiditis crónica autoinmune

- Tiroiditis de Riedel
- Tiroiditis crónicas específicas

#### V.-CANCER DE TIROIDES

##### Clasificación

- 1.-Carcinoma papilar
- 2.-Carcinoma folicular
- 3.-Carcinoma anaplásico
- 4.-Carcinoma medular
- 5.-Linfoma maligno

#### 1.6. PRINCIPALES PRUEBAS DIAGNOSTICAS ( 2,3,4 )

##### I.-Pruebas Funcionales

A.-Determinación de las concentraciones plasmáticas de hormonas tiroideas, otros compuestos yodados y proteínas transportadoras.

-Métodos de determinación de los niveles de hormonas tiroideas a través de la yodometría (yodo total, PBI, BEI, Yodotiroxínico)

-Determinación de los niveles totales de tiroxina ( $T_4$ )

-Determinación plasmática de triyodotironina ( $T_3$ )

-Pruebas de captación in vitro de  $T_4$  y  $T_3$

-Determinación de la concentración sérica de TBG y TBPA

- $T_4$  y  $T_3$  libres por métodos de diálisis

-Índices de  $T_4$  y  $T_3$

-Determinación plasmática de reverse  $T_3$  ( $rT_3$ )

-Determinación de niveles séricos de tiroglobulina



B.- Pruebas de metabolismo tiroideo in vivo utilizando isó  
topos radiactivos

-Captación tiroidea de radioyodo

-Prueba de descarga de <sup>131</sup>I con perclorato o tiocianato

C.- Medida de los efectos periféricos producidos por las -  
hormonas tiroideas

-Reflexograma aquileo

-Medición de los intervalos QKs y QKd

D.-Exploración de la regulación hipotálamohipofisotiroidea

-Determinación de TSH plasmática

-Prueba de estimulación con TRH de la secreción hipofisaria  
de TSH

-Prueba de estimulación tiroidea con TSH

-Prueba de supresión tiroidea con triyodotironina

II.-Pruebas de los transtornos inmunológicos

A.-Anticuerpos antitiroideos

B.-Inmunoglobulinas estimulantes del tiroides

III.-Diagnóstico morfológico

A.-Gammagrafía tiroidea

B.-Radiología simple

C.-Ecografía

D.-Punción Biopsia y Punción Aspiración

## 1.7.-DIAGNOSTICO DE LAS ENFERMEDADES TIROIDEAS

Enfermedad	Pruebas funcionales	Pruebas inmunológicas	Morfología
Bocio	T <sub>4</sub> ↓, T <sub>3</sub> ↓ y TSH ↑ Prueba de descarga del <sup>131</sup> I con perclo <sub>2</sub> rato, identifica un defecto en la oxidación del yodo		Exploraciones radiológicas, cervicales o cervicotorácicas Gammagrafia
Hipotiroidismo	T <sub>4</sub> ↓, T <sub>3</sub> ↓ y TSH ↓ si la TSH es normal o baja entonces se hace una exploración hipotálamohipofisaria Prueba de estimulación de TSH con TRH o índice de tiroxina libre	anticuerpos anti tiroideos	Exploración radiológica de la silla turca
Enfermedad Graves- <u>ma</u> sedow	T <sub>4</sub> ↑, T <sub>3</sub> ↑ Índice de tiroxina libre Estimulación de TRH de la secreción adenohipofisaria de TSH, si hay hipertiroidismo la curva es plana	anticuerpos anti tiroideos	Ultrasonografía y tomografía computarizada

Enfermedad	Pruebas funcionales	Pruebas inmunológicas	Morfología
Adenoma - Tóxico (Estadio 1)	T <sub>4</sub> y T <sub>3</sub> normales Prueba de supresión con T <sub>3</sub> , supresión del tejido tiroideo excepto el nódulo	_____	gammagrafía nor- mal, nódulo isofi- fijante
Estadio 2	T <sub>4</sub> y T <sub>3</sub> normales	_____	gammagrafía Nódulo caliente. Dis- creta captación del resto del pa- rénquima
Estadio 3	T <sub>4</sub> y T <sub>3</sub> normales Prueba de estimu- lación con TSH, - recuperación de la actividad fun- cional de la zo- na inhibida.	_____	gammagrafía nódulo caliente. Anu- lación funcional del resto del pa- rénquima
Estadio 4	T <sub>4</sub> y T <sub>3</sub> algo ele- vadas Prueba de estimu- lación con TSH, i- gual a estadio 3.	_____	gammagrafía igual que en el estadio 3.

Enfermedad	Pruebas funcionales	Pruebas inmunológicas	Morfología
Bocio Multinodular Tóxico	T <sub>4</sub> y T <sub>3</sub> elevadas Prueba de estimulación con TRH Diagnóstico fácil - si la clínica de hipertiroidismo es evidente		gammagrafía, - comprueba la existencia de - heterogeneidad en la captación del isótopo con presencia de nódulos calientes
Enfermedad de Hashimoto Patogenia autoinmune) Variantes -Oxifilica  -Fibrosa	T <sub>4</sub> ↓, T <sub>3</sub> ↓, TSH es obligada, si hay hipotiroidismo es dato fundamental para la terapéutica	Determinación sérica de anticuerpos - antitiroideos -antitiroglobulina -antimicrosoma anticuerpos antitiroglobulina bajos, ó negativos. antimicrosomas positivos antitiroglobulina elevados, antimicrosomas moderados o altos.	Estudio histológico mediante punción-biopsia ó punción-aspiración, para estudio citológico.

### 1.8. AUTOANTICUERPOS TIROIDEOS ( 2,3,4,7,10,12,14)

Recientes trabajos de investigación han demostrado - por lo menos cuatro tipos diferentes de autoanticuerpos circulantes en enfermos tiroideos, y son:

#### 1.-Anticuerpo Antitiroglobulina (Anticuerpo anti-Tg-h)

Demostrable por los métodos de difusión-precipitación en gel de agar; aglutinación con eritrocitos tratados con ácido tánico y anticuerpos fluorescentes en cortes de tejido tiroideo

#### 2.-Anticuerpo antimicrosómico (Anticuerpo anti-M)

Demostrable por el método de fijación del complemento por el método de anticuerpo fluorescente en tejido no fijado o por su efecto citotóxico en las células tiroideas en cultivo histico, por radioinmunoensayo (RIA), y últimamente por un inmunoensayo en fase sólida (ELISA)

3.-Un anticuerpo que esta dirigido contra un antígeno del - coloide, distinto de la tiroglobulina y demostrable mediante el método de anticuerpos fluorescentes en tejido fijado.

4.-Un anticuerpo que reacciona con un componente nuclear de las células tiroideas demostrable por el método de anticuerpos fluorescentes en cortes no fijados de tejidos tiroideos.

Estos autoanticuerpos son globulinas gamma y, a ex -

cepción del anticuerpo antinuclear, son órgano específicos. Pero sólo los anticuerpos antitiroglobulina y antimicrosómicos han sido utilizados como medios de diagnóstico, debido al hecho de que las pruebas para su comprobación en el suero son más fáciles.

### **1.9. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS PARA ANTICUERPOS ANTITIROIDEOS**

(2,3,4,8,27,31)

#### **A.- Precipitación en agar**

Esta prueba es positiva en el 90% de los pacientes - con la variante fibrosa de Enfermedad de Hashimoto, pero en únicamente el 4% de las variedades de tiroiditis bociosa. - Las pruebas positivas de precipitación también son obtenidas en un 12% de casos de mixedema primario, en 1.5% de enfermedad de Graves. Los anticuerpos antitiroglobulina son - Producidos en tres formas de Ig, IgA, IgG e IgM y pueden detectarse a niveles de alrededor de alrededor de 19 mg/mL.

#### **B.- Hemaglutinación**

Esta prueba es 1000 veces más sensible que la precipitación en gel, y que la prueba de aglutinación en látex; - los pacientes con Enfermedad de Hashimoto con anticuerpos - positivos dan títulos de 650 a varios millones. La prueba - en combinación con inmunofluorescencia podría detectar prácticamente todos los bocios de Hashimoto, es decir un 100%, - 90% en el mixedema, 63% en tirototoxicosis, 33% en bocio no tóxico y 32% en cáncer tiroideo .

### C.-Radioinmunoensayo

Este es un radioensayo de unión competitiva en fase sólida, que fué desarrollado por Mori y Kriss (1971), con este método se pueden detectar 100 ng de anticuerpo IgG= 1 unidad. Por este método un 20% de los pacientes con mixedema presentaron más de 20 unidades de anticuerpo, y el 100% de pacientes con tiroiditis presentaron resultados positivos en niveles mayores de 10000 unidades. Este método es altamente sensible para la detección de anticuerpos antitiroideos, pero tiene la desventaja de emplear isótopos que por ser peligrosos requieren de cuidados, equipo, permiso y a diestramiento especiales, tienen vida media corta y un alto costo.

D.- Ensayo inmunoenzimático en fase sólida ELISA (Enzyme-Linked-Immunesorbent assay). Un método recientemente desarrollado, que es altamente sensible comparable al método de RIA, es específico pero resulta de alto costo porque los reactivos son de importación.

### E.-Inmunofluorescencia

Es el procedimiento general comunmente usado para la detección de la mayoría de estos anticuerpos. Aunque es sensitivo y específico, proporciona únicamente datos semicuantitativos, implica estimaciones subjetivas de los resultados y requiere equipo especializado.

**1.10. FUNDAMENTO DE LA TECNICA DE HEMAGLUTINACION PASIVA**  
(1,2,3,4,26)

Esta prueba se basa fundamentalmente en que cuando se añade un suero inmune a una suspensión de partículas antigénicas, estas últimas forman acúmulos más o menos rápidamente, quedando asociados en retículos por los anticuerpos divalentes al combinarse cada extremidad de la molécula con - un sitio antigénico distinto portado por dos partículas antigénicas distintas; en las reacciones fuertes no se encuentran prácticamente partículas libres en la preparación. La reacción de hemaglutinación pasiva no es más que un caso especial de la reacción de precipitación; difiere de ella por el hecho de que en la hemaglutinación el antígeno no es soluble sino que constituye una parte de la superficie de un elemento figurado, célula o partícula inerte.

La reacción de precipitación, que exige cantidades - importantes de antígeno y de anticuerpo, puede ser considerablemente sensibilizada fijando el antígeno a la superficie de partículas. Se transforma así la reacción de precipitación en reacción de aglutinación, lo que permite describir cantidades de anticuerpo mucho menores. La dificultad de esta reacción reside en la preparación de una suspensión estable de partículas susceptibles de fijar sólidamente el antígeno utilizado. Según la naturaleza del antígeno se utilizan partículas diferentes.

En el caso de los antígenos proteicos se utilizan he-



maties tratados previamente por un agente químico susceptible de asegurar una unión sólida entre las proteínas globulares y los antígenos proteicos a fijar; tales agentes químicos son ácido tánico, bencidina bis-diazotada, cloruro de cromo, glutaraldehído, etc.

Uno de los primeros métodos propuestos para tratar a los eritrocitos fué con ácido tánico, el cual hace que la membrana celular se modifique de tal modo que ahora sea capaz de absorber proteínas. El método ha ganado gran popularidad y sus únicas limitaciones son la disponibilidad de buenos antígenos solubles y las circunstancias de que sólo puedan reportarse títulos y no cantidades exactas de anticuerpos.

Ya se trate de hematíes frescos o formolados, es conveniente para disponer de una suspensión globular que dé reacciones específicas y sensibles, precisar para cada antígeno su concentración sensibilizante óptima.

La mayor parte de las proteínas antigénicas pueden ser fijadas igualmente sobre partículas de látex o poliestireno; la fijación, en este caso, es espontánea.

Para poner en evidencia un anticuerpo, las reacciones de hemaglutinación pasiva son de las reacciones inmunológicas más sensibles. Esta alta sensibilidad debe conducir a un control de especificidad muy riguroso, tanto más cuan-

to es indispensable la adición de protefna (albúmina, le -  
che) a la suspensión globular para conferirle estabilidad, -  
lo cual prueba que esta reacción es muy influenciada por -  
factores no específicos. Por ello es imperioso no utilizar  
más que suspensiones globulares perfectamente estables; por  
otra parte, es difícil extraer conclusiones válidas de la -  
titulación de sueros si se utilizan para cada suero lotes -  
de preparaciones globulares diferentes.

La reacción de hemaglutinación ofrece una serie de -  
ventajas sobre otros métodos para la determinación de anti-  
cuerpos: es muy sensible (hasta de 0.02  $\mu\text{g}$  de anticuerpo/ml)  
no requiere de gran habilidad técnica y es de realización -  
rápida. Por tal motivo se ha buscado la forma de utilizar a  
los eritrocitos como soporte para antígenos solubles y así-  
convertir a la prueba de hemaglutinación como indicadora de  
la reacción antígeno-anticuerpo.

## 2.-FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA

Es de suma importancia que los laboratorios de análisis clínicos produzcan resultados confiables, esto es precisos, exactos, específicos y oportunos. El que un resultado analítico sea reproducible en cualquier laboratorio, es la meta que algunos países han alcanzado y que en México ha tenido resultados positivos, ya que en los laboratorios clínicos se han visto obligados a revisar críticamente qué hacen cuanto hacen, qué pueden y qué deben suprimir; un segundo resultado positivo es que al ser difícil la situación y no permitir la compra de productos importados, se ha estimulado la elaboración de un número cada vez mayor de reactivos, instrumentos y equipo de laboratorio.

Por la cercanía con el mayor y más poderoso fabricante nos fué siempre fácil, barato y rápido importarlo todo. Hoy en la austeridad, estamos tratando de substituir importaciones. Falta decidir con juicio qué es lo que se puede - y qué es lo que no se debe importar para no detenerse y menos retroceder en la investigación biomédica, en los servicios de atención a la salud, y por supuesto en la búsqueda de la autosuficiencia tecnológica. Es por lo anterior que se ha considerado la posibilidad de estandarizar una técnica que sea específica, sensible y, reproducible para la detección de anticuerpos antitiroglobulina humana y anticuerpos antimicrosomias de tiroides en suero, que sea capaz de poder substituir a los kits comerciales de importación. La

técnica de hemaglutinación pasiva es un método barato, útil rápido y todos los reactivos podemos obtenerlos en el país. Además de que esta técnica resulta bastante ventajosa con relación a otras técnicas como son la técnica de Radioinmunoanálisis, que requiere de isótopos radiactivos difíciles de conseguir y de manejar o con relación a la técnica de doble difusión; ya que en el suero de tiroidópatas autoinmunes, existe una concentración de autoanticuerpos bastante fácil de detectar por hemaglutinación pasiva.

### **3.0 OBJETIVO**

#### **GENERAL**

Diseñar una técnica de hemaglutinación pasiva, que sea específica, sensible y, reproducible para la detección de anticuerpos antitiroglobulina humana y anticuerpos anti-microsomas de tiroides en suero humano.

### 3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Estandarizar la técnica de hemaglutinación pasiva para detectar la presencia de anticuerpos antitiroglobulina (Anti-Tg-h) y anticuerpos antimicrosomas (Anti-M-h).
- 2.- Determinar anticuerpos antitiroglobulina y anticuerpos antimicrosomas en sueros problema por método estandarizado.
- 3.- Obtener a partir de tiroides fresca los antígenos tiroglobulina ( Tg ) y microsomas ( M ).
- 4.- Purificar el antígeno tiroglobulina por cromatografía por exclusión de peso molecular en Sephadex G-200, y en Sepharosa 4B.
- 5.- Identificar o caracterizar los antígenos Tg y M ya obtenidos.

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

Si llevamos a cabo ensayos con la técnica de hemaglutinación pasiva ya estandarizada; probando sueros problema y sueros normales, entonces dicha técnica será capaz de - marcar la diferencia entre sueros positivos y negativos para anticuerpos antitiroglobulina y anticuerpos antimicrosommas de tiroides.

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



## **S. O M A T E R I A L**

### **5.1 MATERIAL BIOLÓGICO**

- Tiroides humana fresca (Hospital Regional 20 de Nov.) ISSSTE
- Eritrocitos de carnero en heparina (INER S.S.)
- Suero de conejo anti-Tg-h y anti-M-h (INER S.S.)
- Suero antiproteínas totales (INER S.S.)
- Antígenos: Tiroglobulina y Microsomos tiroideos (obtenidos)
- Suero control positivo conteniendo anticuerpos antitiroglobulina y anticuerpos antimicrosomos humanos (INER S.S.)
- Sueros problema (mujeres con posible tiroiditis post-parto (Hospital Regional 20 de Nov.) ISSSTE
- Sueros Normales (Sueros de pacientes cuyas enfermedades no interfieren con la patología de la glándula tiroides) (Hospital Regional 20 de Nov. ISSSTE

### **5.2 REACTIVOS**

- Solución amortiguadora de fosfatos (PBS); pH=7.2-7.3
- Sephadex G-200 (Pharmacia Fine Chemicals)
- Sepharosa 4B (Pharmacia Fine Chemicals)
- Agar noble 0.5% P/V (SIGMA)
- Solución salina fisiológica
- Solución de eritrocitos al 0.5% V/V
- Solución de PBS-Albúmina 1:1000
- Cloruro de Cromo 0.1% P/V (J T Baker)
- Acido Tánico 1:20 000 en PBS (Laboratorios LATS S.A.)

- Cloruro de sodio (MERCK)
- Cloruro de potasio (MERCK)
- Acrilamida (MERCK)
- Bis-Acrilamida (MERCK)
- Dodecil Sulfato de Sodio (MERCK)
- Fosfato Dibásico de Sodio (J T Baker)
- TRIS (MERCK)
- Glicina
- 2-Mercaptoetanol
- Persulfato de amonio

### 5.3 EQUIPO

- Congelador a -70°C (REVCO ULTRA LOW TEMPERATUR FREEZER)
- Columnas de vidrio de 60 X 2 cm y de 100 X 2 cm
- Colector de fracciones (7000 ULTRORAC FRACTION COLLECTOR)
- Bomba de vacío (manufactura casera)
- Espectrofotómetro (BECKMAN MODEL 25 Y SPECTRONIC 20)
- Microscopio Electrónico de Transmisión (JEOL 2000 E-X)
- Centrifuga refrigerada (BECKMAN MODELO TJ-6RS)
- Refrigerador (FRILATIC MOD.RF 400,SERIE 8607-530)
- Congelador (AMERICAN MOD.RC 270)
- Vórtex (TYPE 1000 STIRPLATE)
- Balanza analítica (SARTORIUS)
- Estufa (INCUBARIL)
- Centrifuga (MOD. J21C HASTA 25 000 R.P.M.)
- pH metro (41 pH METER BECKMAN)
- Equipo para electroforesis

- Homogenizador ( Polytron BRINKMANN INSTRUMENTS )
- Equipo de Ultrafiltración
  - a.-Tanque de Nitrógeno líquido (ALEAR AGA 85-1872)
  - b.-Portamembranas y membranas XM50 (AMICON 8050)
- Portaobjetos
- Cámara húmeda para Ouchterlouny
- Placas en fondo en V para hemaglutinación
- Ultracentífuga refrigerada BECKMAN Modelo L8-55 R
- Equipo para electroforesis
  - a.- Cámara (Ephortec Mini Vertical Slab)
  - b.- Fuente de poder (Hoffman-Pinther Bosworth S.A.)

## 6.0 METODOS

### OBTENCION DE TIROGLOBULINA Y MICROSOMAS

#### TEJIDO TIROIDEO

Homogenizado en PBS pH=7.3  
Filtrado en gasa  
Filtrado  
Cromatografiado en Sephadex G-200, eluido con PBS pH=7.3  
Concentración del primer pico por ultrafiltración (Amicon XM50)  
concentrado  
Recromatografiado en Sepharosa 4B eluyendo en PBS pH=7.3  
Concentrado del pico que contiene a la tiroglobulina por ultrafiltración, Amicon XM50  
PRUEBAS DE PUREZA  
TIROGLOBULINA PURA

Homogenizado en KCl 0.15 M  
Centrifugado a 15 000 r.p.m. por 30' a 4°C.  
El sobrenadante fué centrifugado a 4°C, 90' a 50 000 r.p.m.  
El botón fué resuspendido en PBS pH=7.3 y centrifugado a 50 000 r.p.m. 90' a 4°C dos veces  
Suspendiendo el botón en sacarosa 0.25 M

MICROSCOPIA ELECTRONICA

MICROSOMAS

## PROCESAMIENTO DE TIROIDES

Para poder extraer la molécula de tiroglobulina y microsomas localizados en el interior del tejido tiroideo, es necesario homogenizar la glándula para retirar los fragmentos de tejido y centrifugar el sobrenadante, para separar los componentes solubles de los restos celulares.

### 6.1 OBTENCION DE TIROGLOBULINA

Se cortó el tejido tiroideo, eliminando toda la grasa y membranas que lo protegen; y se homogenizó usando para ello PBS pH=7.3, obteniendo una suspensión que se filtró a través de una gasa para separar fragmentos de tejido; y el filtrado se centrifugó a 7 500 r.p.m. con el objeto de eliminar restos celulares. El sobrenadante, que contenía la tiroglobulina, continuo en el proceso, para su purificación.

### 6.2 CROMATOGRAFIA POR EXCLUSIÓN DE PESO MOLECULAR

El uso de geles porosos (como dextrán, agarosa o mezclas de agarosa y acrilamida) permite la separación de proteínas en base a su dimensión molecular. Estos geles funcionan como tamices moleculares de partículas esferoidales con diferente trama. Cuando una solución proteica acuosa atraviesa el gel filtrante, las moléculas de diámetro inferior al de la trama penetran las partículas del gel mientras que las que se encuentran sobre el límite de exclusión no lo ha

cen, por lo que éstas son las primeras que se obtienen al eluir.

El Sephadex es un polímero de dextrán, que se prepara por el entrecruzamiento de dextrán alcalino con epíclorhidrina, hidratándose para su uso con PBS o agua. Es el material más ampliamente empleado para filtración en gel.

La Sepharosa consiste en pequeñas esferas de agarosa, un polisacárido lineal de D-galactosa y 3,6-anhidro-1-galactosa. A diferencia del Sephadex y debido al tamaño de su poro, ésta puede usarse para separar moléculas muy grandes.

#### PROCEDIMIENTO

Se pesaron 3 g de Sephadex 3-200 y se hidrataron con agua destilada o PBS incubándose toda la noche a 37°C. Luego se procedió a desgasificar tanto el Sephadex hidratado como el PBS, adicionándose después el Sephadex a la columna cuidando que no se formaran burbujas, para lo cual se le dejó caer cuidadosamente por las paredes de la columna. En seguida se equilibró con PBS pH=7.3 desgasificado.

En el siguiente paso, se colocaron aproximadamente 4 ml del extracto de tiroides en la columna y se eluyeron con PBS, colectando fracciones de 4 ml. A estas fracciones se les determinaron proteínas leyendo a 280 nm y se trazó una curva de absorbancia contra número de fracción.

Las fracciones que contenían tiroglobulina se concentraron por ultrafiltración (empleando membranas de Amicon - XM50), hasta una cuarta parte de su volumen.

En el último paso, se preparó una columna de Sepharosa 4B en la misma forma que la anterior y se recromatograficó el concentrado, eluyendo con PBS pH=7.3. Finalmente se concentró la fracción que contenía la tiroglobulina empleando una membrana de Amicon XM 50.

### 6.3 ULTRAFILTRACION

Para separar mezclas de proteínas existen varios métodos, que se fundamentan en los tamaños de las partículas. Entre éstos, podemos citar: la cromatografía de exclusión de peso molecular, la electroforesis en gel de poliacrilamida, la ultracentrifugación, la ultrafiltración, etc.

La ultrafiltración emplea membranas de poro definido, las que retienen moléculas más pequeñas, para lo que se aplica una presión positiva utilizando nitrógeno gaseoso.

#### PROCEDIMIENTO

Se ensambla el portamembranas de acuerdo a las especificaciones del sistema ( Amicon Corporation), colocando la membrana previamente lavada con agua destilada. Sobre la membrana se colocó la muestra (fracciones eluidas de la columna, que contienen tiroglobulina) y se aplicó una presión de aproximadamente 3.7 atm., con nitrógeno gaseoso.

## **6.4 PRUEBAS INMUNOLOGICAS PARA DETERMINAR PRESENCIA DE TIRO GLOBULINA**

### **6.4.1 PRECIPITACION EN GEL**

Una de las manifestaciones de la reacción antígeno-anticuerpo es la precipitación. La formación del inmunoprecipitado depende de la relación antígeno-anticuerpo, en el medio donde los reactantes se combinan. Estos medios pueden ser líquidos o semisólidos. El agente gelificante usado más frecuentemente es el agar.

En la doble inmunodifusión, se permite al antígeno y al anticuerpo migrar uno hacia el otro en un gel, donde se formará una línea de precipitación cuando los reactantes se encuentren en equivalencia; su posición relativa estará determinada por la concentración del antígeno y del anticuerpo en el agar. Aparecerán varias líneas de precipitación si el antígeno y el anticuerpo contienen varias especies moleculares .

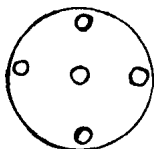
Esta técnica tiene la ventaja de que pueden compararse varios antígenos o antisueros alrededor de un pozo de antígeno o de anticuerpo.

### **PROCEDIMIENTO**

Se prepararon placas de 2 mm de espesor con agar al 2% en solución salina fisiológica. Se perforaron de acuerdo al siguiente esquema y se depositaron en cada pozo 50  $\mu$ l de



la muestra correspondiente.



Tg.-Tiroglobulina

1 a 6 .- Diluciones del antisuero

Anti-Tg-h

Se colocó la placa en cámara húmeda durante 24 horas para permitir la difusión de las muestras. La lectura de la prueba se realizó observando las bandas de precipitación que aparecieron.

#### 6.4.2 INMUNOPRECIPITACION EN CAPILAR

La presencia de antígeno o anticuerpo en una muestra puede manifestarse si se ponen en contacto ambos componentes en fase líquida, ya que se observará una reacción de precipitación al llevarse a cabo la unión antígeno-anticuerpo.

#### PROCEDIMIENTO

En un tubo capilar se colocó antígeno en solución h

ta un tercio de su volumen, y los dos tercios restantes se completaron con el suero del conejo inmunizado. Se mezcla - ron por inversión y el capilar se dejó en reposo en posi - ción vertical, a temperatura ambiente; la lectura se reali - zó al aparecer precipitado.

**6.5 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE  
DODECIL SULFATO DE SODIO EN UN SISTEMA DISCONTINUO  
(PRUEBA DE PUREZA)**

FUNDAMENTO

La electroforesis es un método que implica el movi - miento de partículas cargadas (iones) en un campo eléctrico es uno de los métodos electroforéticos más efectivos de se - paración y caracterización. Para su realización es necesa - rio que los componentes de la mezcla tengan forma iónica, o sean convertidos a ella; cada componente tiene que poseer - una carga neta distinta. La electroforesis ha sido muy va - liosa en el aislamiento y separación de proteínas y en la - determinación directa de la mezcla de proteínas. Hay dos ra - zones principales para esto: los métodos electroforéticos - se pueden realizar en condiciones muy suaves, protegiendo - así a las proteínas muy inestables de cualquier modifica - ción estructural severa; la electroforesis en gel de polia - crilamida tiene un alto poder de resolución, que resulta en una clara separación de moléculas proteicas similarmente - cargadas.

El sistema discontinuo consiste de dos geles con diferente concentración de poliacrilamida. La muestra se concentra después de pasar por gel superior - gel concentrador- y se separa en el gel inferior -separador- obteniéndose una mejor definición de bandas.

METODO

En un matraz kitazato se mezclaron con agitación constante y al vacío, las siguientes soluciones para preparar el gel separador:

Gel separador: Acrilamida 5%, TRIS 0.375 M Solución	volumen (ml)
Sol.madre de acrilamida	5.85
Sol.amortiguadora de TRIS-HCl 1.5 M pH=8.8	8.8
SDS al 10%	0.35
agua destilada	14.0
Persulfato de amonio (0.1 g/ml)	0.3
TEMED (N,N,N',N',-Tetrametilendiamina)	0.01

Con una pipeta se vertieron 31.5 ml de esta mezcla - entre las placas de vidrio de 16 X 20 cm ( con separadores) de 1.5 mm ) de una cámara para electroforesis evitando la - formación de burbújas. Se permitió la polimerización del -

gel por 30 min, se eliminó el exceso de agua de la superficie del gel, y se colocó un peine de teflón para diez carriles 1 cm por arriba del gel separador.

El gel concentrador (superior) se preparó mezclando - con agitación constante y al vacío en un matraz kitazato, - las siguientes soluciones:

Gel concentrador: Acrilamida 5%, TRIS 0.125 M Solución	volumen (ml)
Sol.madre de acrilamida	0.78
Sol.amortiguadora de TRIS-HCl 0.5 M pH=6.8	1.5
SDS AL 10%	0.06
Agua destilada	3.6
Persulfato de amonio ( 0.1 g/ml )	0.03
TEMED	0.003

La mezcla se vertió rápidamente sobre el gel separador, evitando la formación de burbújas, y se dejó polimerizar por 30 min. al cabo de este tiempo se eliminó el exceso de agua, dejando secos los carriles formados y quedando listos para la colocación de muestras

En los carriles se vertieron 25  $\mu$ l de cada una de las

siguientes muestras:

1. Tiroglobulina (+) en urea 8.0 M
2. Tiroglobulina (+) en 2 mercaptoetanol

Una vez que se montó el aparato, la electroforesis se llevó a cabo aplicando una corriente constante de 30 mA/gel durante 4-5 horas y manteniendo la temperatura constante; la solución amortiguadora utilizada en la electroforesis contiene TRIS 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS al 1% y el pH=8.3.

#### TINCIÓN CON AZUL DE COOMASIE

Después de la electroforesis los geles fueron separados de las placas de vidrio y se colocaron en un recipiente con una solución al 0.125 M de azul de Coomasie, metanol al 50% y ácido acético al 10%, y se dejaron en esta solución toda la noche. al día siguiente el exceso de colorante fue eliminado efectuando cambios sucesivos de una solución decoloradora que contiene metanol al 50%, ácido acético al 10% y agua destilada al 40%, hasta que las bandas de proteínas fueron visibles.

#### 6.5.1. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE TIROGLOBULINA POR EL MÉTODO DE AZUL DE COOMASIE.

De la solución de tiroglobulina pura tomar 0.1 ml (100 µl) y adicionar 5 ml del reactivo anterior, mezclar -

por inversión o por golpeo. Se midió a una absorbancia de - 595 nm después de 2 minutos y antes de una hora. Se leyó - contra un tubo que contenía 100  $\mu$ l de buffer de fosfatos, o en lo que se tengan disueltas las proteínas y se adiciona - ron 5 ml del reactivo de Coomasie.

## 6.6 OBTENCION DE MICROSOMAS

FUNDAMENTO: El fraccionamiento de las células es una técnica importante llena de posibilidades para el estudio - de la química celular. Las diferentes estructuras subcelula - res se separan por centrifugación de homogenizados. Estos - se preparan rompiendo las células de los órganos, en medios que preservan los organelos. Generalmente se emplean solu - ciones de sacarosa y otros azúcares, que pueden ajustarse - fácilmente para conservar la integridad de los organelos y contrarrestar la tendencia de éstos a volverse a agrupar - después de sacarlos de la célula.

El comportamiento de una partícula en un campo gravi - tacional dependerá de su tamaño, densidad y forma. El méto - do más empleado para separar los organelos celulares es la centrifugación diferencial. No todos los organelos sedimen - tan ( viajan hacia el fondo del tubo de centrifuga ) con la misma velocidad. Para una cierta fuerza centrífuga, los or - ganelos relativamente grandes, densos y pesados, sedimentan más pronto. Por lo tanto, con fuerzas comparativamente meno - res ( velocidad baja de la centrifuga ), es posible obtener

en forma de sedimento compacto, núcleos, grandes fragmentos de membrana plasmática y algunas mitocondrias, en tanto que el resto de los elementos de la célula permanece suspendida con fuerza centrífuga algo mayor, se obtiene una segunda fracción, que contiene casi todas las mitocondrias; la mayor parte de lisosomas y peroxisomas sedimentan en la fracción siguiente; los microsomas, formados principalmente de fragmentos de retículo endoplásmico, pero también algunos fragmentos pequeños de membrana plasmática, requieren una fuerza todavía mayor para sedimentar (nótese que no existen microsomas como tales en la célula). En general no sedimentan los ribosomas libres (los que no están unidos a membranas) ni otras formaciones pequeñas, y moléculas solubles. Generalmente para obtener esta fracción microsomal se utilizan de 25 000 a 100 000 X g durante 60 a 120 minutos (Siekevitz 1965)

#### PROCEDIMIENTO

El tejido tiroideo fué cortado en pequeñas piezas (alrededor de 200 mg), rápidamente congelado en hexano a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Cuando se requirió, el tejido fué finamente cortado en piezas con tijeras y homogenizado en aproximadamente 5 volúmenes de KCl 0.15 M en hielo usando un politron (homogenizando 3 veces rápidamente). Después se centrifugó a 15 000 r.p.m. por 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , el sobrenadante fué centrifugado a  $4^{\circ}\text{C}$  por 90 minutos a 78 000 X g. Después el botón fué resuspendido en buffer salina de fosfatos,  $\text{pH} = 7.3$  (PBS), usando

alrededor de 1 ml de PBS por cada gramo de tejido original. El botón se resuspendió en solución amortiguadora de fosfatos, y centrifugado de nuevo dos veces más a 78 000 X g 90 minutos a 4°C. Finalmente fue suspendido en sacarosa 0.25 M ( 2 ml por cada gramo de tejido original ).

#### **6.6.1.MICROSCOPIA ELECTRONICA DE MICROSOMAS**

PROCEDIMIENTO: Se hicieron diluciones de microsomas 1:10, 1:100 y 1:500 en PBS. Se depositó una gota en rejillas para microscopio electrónico con formovar. Sobre una película de plástico con rejilla de cobre, se dejó sedimentar durante 20 minutos aproximadamente y el exceso se eliminó con papel filtro .

En una caja petri se colocó acetato de uranilo al 5% y se dejó reposar cada rejilla con los microsomas durante 20 minutos y todas se ven al microscopio electrónico.



**6.7 ESTANDARIZACION DEL METODO DE HEMAGLUTINACION PASIVA -  
PARA DETECTAR ANTICUERPOS ANTI-TIROGLOBULINA Y ANTICUER  
POS ANTI-MICROSOMAS.**

**6.7.1 SENSIBILIZACION DE ERITROCITOS DE CARNERO**

- 1.-Se dispusieron dos tubos de ensayo y se marcaron como I y II.
- 2.-Al tubo marcado como I se le agregaron 200  $\mu$ l del paquete de eritrocitos lavados
- 3.-Se adicionaron 40  $\mu$ l de la solución de tiroglobulina y/o microsomas, según el caso
- 4.-Se mezclaron bien con agitación fuerte
- 5.-Se agregaron 40  $\mu$ l de la solución fresca de cloruro de cromo sin dejar de agitar el tubo ( con vórtex ).
- 6.-Se incubaron a temperatura ambiente durante 5 ó 6 minutos
- 7.-Se lavaron 4 veces con solución salina o PBS pH=7.2
- 8.- Se suspendieron en 600  $\mu$ l de la solución de PBS-Albúmina y se llevaron a una concentración final de 0.5%.

Este tubo correspondió a eritrocitos sensibilizados - que se usaron en la prueba.

Al tubo marcado como II se le agregó todo menos tiroglobulina ni microsomas, ya que este tubo correspondió a - eritrocitos no sensibilizados.

### 6.7.2 REALIZACION DE LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACION

A. En los pozos de la placa de hemaglutinación se hicieron diluciones al doble de cada uno de los sueros problema con un volumen de 25  $\mu$ l utilizando PBS pH=7.2 como diluyente.

B. Una vez completadas las diluciones se añadió a cada pozo 25  $\mu$ l de la suspensión de eritrocitos sensibilizados (tubo I) con ayuda de una pipeta automática.

C. Para cada suero se incluyeron tres testigos que se prepararon en la forma siguiente:

a.- Testigo del suero: 25  $\mu$ l del suero sin diluir y 25  $\mu$ l de la suspensión de eritrocitos no sensibilizados (tubo II)

b.- Testigo de los eritrocitos sensibilizados: 25  $\mu$ l de PBS o PBS-Albúmina, y 25  $\mu$ l de la suspensión de eritrocitos sensibilizados (tubo I)

c.- Testigo positivo de la prueba: 25  $\mu$ l de un suero conocido que contenga anticuerpos específicos y 25  $\mu$ l de la suspensión de eritrocitos sensibilizados (tubo I).

d.- La placa ya lista, se agitó, se cubrió con una hoja de plástico o de parafilm y se incubó a temperatura ambiente - durante dos horas o en refrigeración hasta el día siguiente.

E. Se buscó la presencia de hemaglutinación en cada uno de los pozos. En los correspondientes al testigo del suero y al testigo de los eritrocitos sensibilizados no debe haber reacción. En el pozo del testigo positivo debe presentarse

una hemaglutinación fuerte. En los pozos que corresponden a las diluciones del suero problema, el título de anticuerpos es igual a la dilución mayor en la que aún se presenta hemaglutinación.

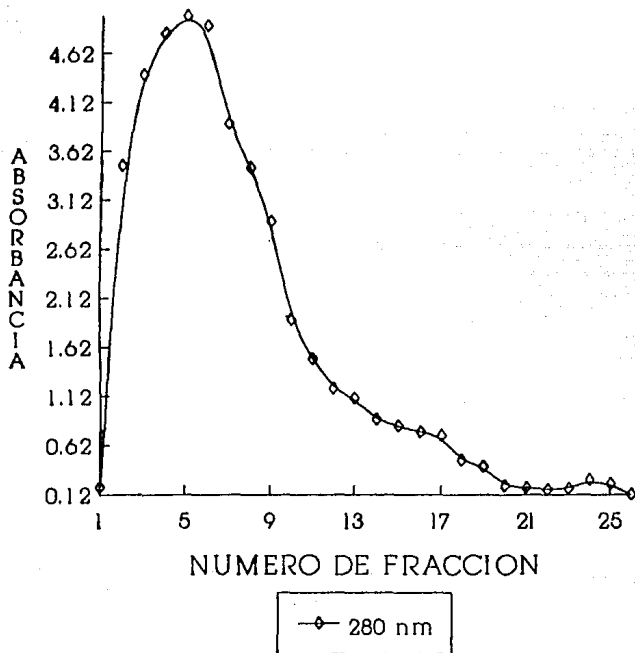
## R E S U L T A D O S

TABLA No.1

CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-200  
DE UN EXTRACTO DE TIROGLOBULINA CRUDA

No. de Fracción	Absorbancia (280 nm)
1	0.197
2	3.47
3	4.4
4	4.82
5	5.0
6	4.9
7	3.9
8	3.45
9	2.9
10	1.9
11	1.5
12	1.2
13	1.1
14	0.882
15	0.818
16	0.754
17	0.718
18	0.469
19	0.402
20	0.210
21	0.190
22	0.170
23	0.180
24	0.270
25	0.230
26	0.120

FIG. 2 ABSORBANCIA QUE PRESENTAN DIFERENTES FRACCIONES DE UNA CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-200



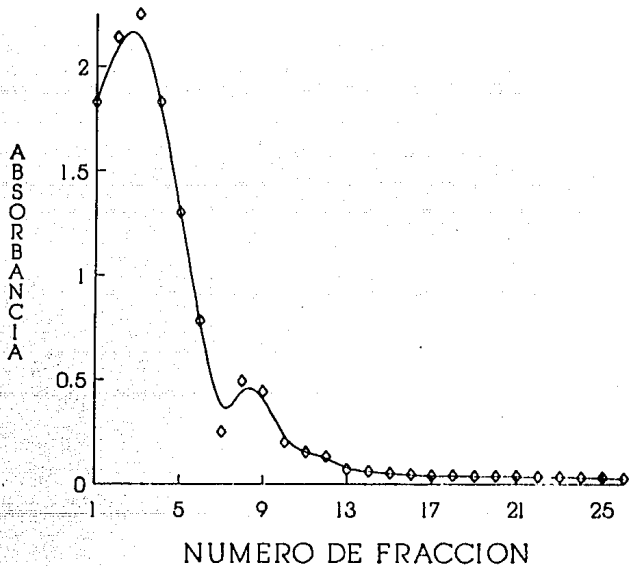
GONZALEZ 90

TABLA No.2

CROMATOGRAFIA EN SEPHAROSA 4B  
DEL CONCENTRADO DE TIROGLOBULINA

No. de Fracción	Absorbancia (280 nm)
1	1.83
2	2.14
3	2.25
4	1.83
5	1.3
6	0.78
7	0.25
8	0.49
9	0.44
10	0.20
11	0.15
12	0.13
13	0.07
14	0.06
15	0.05
16	0.045
17	0.040
18	0.039
19	0.038
20	0.037
21	0.036
22	0.033
23	0.033
24	0.030
25	0.029
26	0.025

FIG. No. 3 ABSORBANCIA QUE PRESENTAN DIFERENTES FRACCIONES DE UNA CROMATOGRAFIA EN SEPHAROSA 4B



—◇— 280 nm



### 7.1.1 PRUEBAS INMUNOLOGICAS PARA DETECTAR PRESENCIA DE TIROGLOBULINA

El concentrado de la cromatografía en Sepharosa 4B contiene la tiroglobulina pura; para comprobarlo se realizaron las siguientes determinaciones:

#### A.-PRECIPITACION EN GEL

Se colocaron las muestras de acuerdo al siguiente esquema:

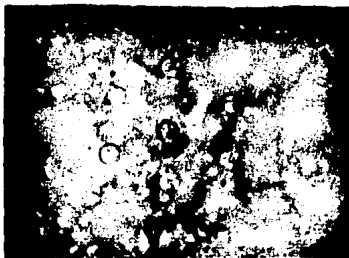


FIGURA No.4  
PRECIPITACION EN GEL DE TIROGLOBULINA HUMANA

- 1.-Tiroglobulina humana purificada en sepharosa 4B
- 2.-Suero anti tiroglobulina humana de conejo
- 3.-Suero humano antitiroglobulina
- 4.-Suero anti-Proteínas Totales
- 5.-Suero normal de conejo

Los resultados obtenidos se observan en la figura No. 4, y en ellos se puede observar que el concentrado de tiroglobulina esta exento de proteínas séricas contaminantes - y que reacciona de manera específica contra un suero antitiroglobulina humana de conejo y con el suero humano antitiroglobulina; pero no reaccionó con el suero antiproteínas totales, ni con el suero normal de conejo.

#### B.- INMUNOPRECIPITACION EN CAPILAR

Al poner en contacto la tiroglobulina purificada con un antisuero humano anti-tiroglobulina, se observó una fuerte precipitación al reaccionar los reactivos biológicos mencionados, lo cual comprueba la presencia de tiroglobulina.

#### 7.1.4 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Obtenida la tiroglobulina concentrada, se separó por SDS-PAGE, resultando el patrón electroforético de la figura No.5



FIGURA No.5 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA  
Gel de poliacrilamida al 5% en presencia de SDS, de tiro -  
globulina purificada en Sephadex G-200 y Sepharosa 4B. Tin-  
ción con Azul de Coomasie.  
A.-Tratada con UREA 8.0 M  
B.-Tratada con 2-mercaptoetanol

### 7.1.3 DETERMINACION DE CONCENTRACION DE TIROGLOBULINA POR EL METODO DE COOMASIE

Cuando se comprobó la pureza de la tiroglobulina obtenida, se procedió a determinar la concentración de protefina (tiroglobulina), existente; para esto se trazó una curva patrón con albúmina sérica bovina, por el método de azul de Coomasie, cuyo resultado se observa en la figura No.6

#### CURVA PATRON DE PROTEINAS POR EL METODO DE COOMASIE

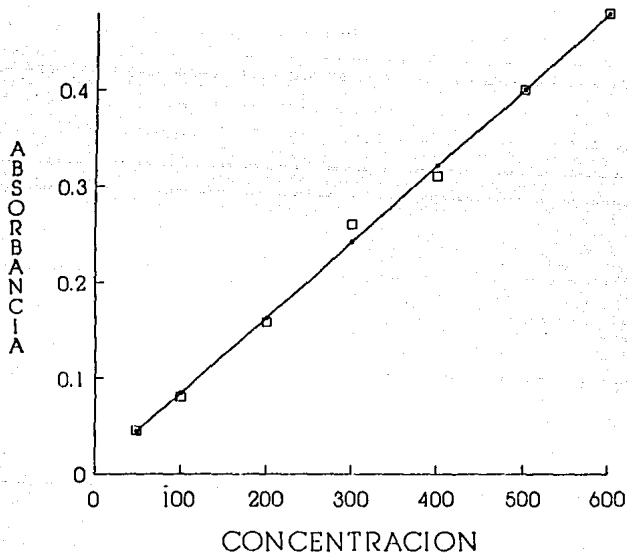
Absorción	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )
0.045	50
0.080	100
0.158	200
0.260	300
0.310	400
0.400	500
0.480	600

#### CONCENTRACION DE TIROGLOBULINA

Se obtuvo una concentración total de 0.701 g de tiroglobulina pura. La cual es una concentración muy buena para propósitos del presente trabajo.

Finalmente se procedió a diluir la protefina tiroglobulina obtenida a una concentración de 25 mg/l, que fué la concentración a la que se trabajó para la estandarización del método.

FIG. No. 6 CURVA ESTANDAR PARA PROTEINAS  
POR EL METODO DE COMASIE,  
a 595 nm



□ OBSERVADOS    —•— CALCULADOS

$r = 0.99846$ ;  $m = 7.915 \text{ E-}04$ ;  $b = 4.467 \text{ E-}03$   
GONZALEZ 90

## 7.2 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE MICROSOMAS DE TIROIDES

Se observaron al microscopio electrónico muestras de microsomas en diluciones de 1:10, 1:100, y 1:500 en PBS, obteniéndose fotografías de la solución más limpia. Estas fotografías muestran poca contaminación por lo que se procedió a utilizar a la solución de microsomas tal como se obtuvo después de que se suspendió en sacarosa 0.25 M.

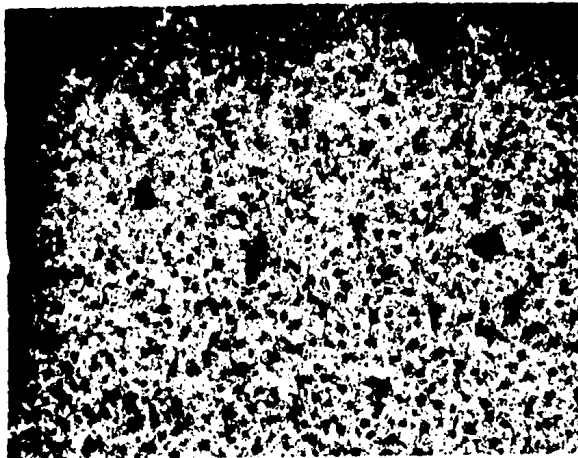


FIGURA No.7. Micrografia de Microscopio Electrónico de Transmisión mediante la técnica de tinción negativa con acetato de uranilo, foto: aumentada 1:66 veces

### 7.3 ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE HEMAGLUTINACION PASIVA

Se llevó a cabo el ensayo de muestras problema y muestras normales (mujeres después del parto con posible tiroiditis post-parto), y muestras normales por la técnica de hemaglutinación pasiva, según el método ya descrito, obteniéndose los resultados presentados en la tabla No.3. Estas muestras fueron probadas anteriormente por el método de ELISA para determinar anticuerpos anti-tiroglobulina\* y por el método de Inmunofluorescencia (IF) para determinar anticuerpos antimicrosomas humanos\*\*

Se probaron así mismo 80 muestras de pacientes cuya enfermedad no cursaba ni interfería con la glándula tiroidea (sólo se reportan 50 resultados), de esta manera se pudo observar la diferencia existente entre los títulos de anticuerpos antitiroglobulina y anticuerpos antimicrosomas, entre pacientes sin afección de la glándula tiroidea y pacientes que fueron susceptibles de presentar tiroiditis post-parto; estos resultados se muestran en la tabla No.4. En las figuras 8 y 9 se hace unacomparación gráfica de ambos resultados por medio de histogramas. En la tabla No.5 se muestran los resultados de la determinación de anticuerpos antitiroglobulina en muestras problema por el método de ELISA; y en la figura 10 se muestra la curva de correlación entre ambos métodos (hemaglutinación pasiva y ELISA).

En la tabla No. 6 se muestran los resultados de la determinación de anticuerpos antimicrosomias en las mismas muestras problema por el método de inmunofluorescencia; en la figura No. 11 se muestra la curva de correlación entre ambos métodos Hemaglutinación Pasiva e Inmunofluorescencia)

\*Resultados proporcionados por Q.F.B. Isaias Sanchez González

\*\*Resultados proporcionados por (Hospital Regional 20 de -  
Noviembre)



TABLA No.3

MUESTRAS PROBLEMA POR EL METODO  
DE HEMAGLUTINACION PASIVA

No.	TITULO	
	ANTICUERPOS Anti-Tg	ANTICUERPOS Anti-M
1	1:4	1:32
2	1:8	1:32
3	1:2	1:64
4	1:16	1:128
5	1:4	1:64
6	1:1024	1:512
7	1:32	1:32
8	1:64	1:64
9	1:128	1:512
10	1:128	1:2
11	1:512	1:128
12	1:32	1:512
13	1:1024	1:128
14	1:1024	1:64
15	1:512	1:64
16	1:4	1:128
17	1:8	1:512
18	1:512	1:512
19	1:16	1:1024
20	1:8	1:128
21	1:32	1:512
22	1:4	1:128
23	1:128	1:8
24	1:32	1:64
25	1:4	1:512
26	1:2	1:512
27	1:2	1:128

TABLA No.3  
MUESTRAS PROBLEMA POR EL METODO  
DE HEMAGLUTINACION PASIVA

No.	ANTICUERPOS Anti-Tg	TITULO	ANTICUERPOS Anti-M
28	NEGATIVO		1:32
29	NEGATIVO		NEGATIVO
30	NEGATIVO		NEGATIVO
31	1:32		1:32
32	NEGATIVO		NEGATIVO
33	1:8		1:2
34	1:8		1:16
35	1:16		1:64
36	1:128		1:256
37	1:8		1:64
38	1:8		1:8
39	1:32		1:128
40	1:16		1:64
41	1:4		1:64
42	1:4		1:128
43	1:128		1:512
44	NEGATIVO		1:128
45	NEGATIVO		1:128
46	1:16		1:64
47	1:16		1:256
48	1:64		1:128
49	1:64		1:128
50	NEGATIVO		1:2
51	NEGATIVO		1:16
52	1:16		1:64
53	1:256		1:1024
54	1:2		1:32
55	1:1024		1:1024

TABLA No.4

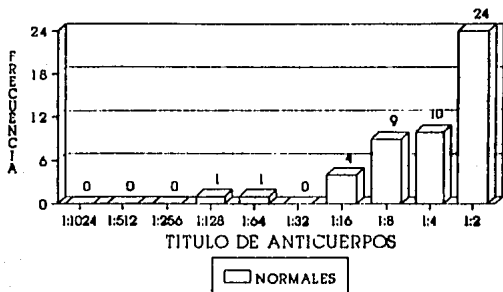
MUESTRAS NORMALES POR EL METODO  
DE HEMAGLUTINACION PASIVA

No.	TITULO	
	ANTICUERPOS Anti-M	ANTICUERPOS Anti-Tg
26	NEGATIVO	NEGATIVO
27	NEGATIVO	NEGATIVO
28	1:16	NEGATIVO
29	1:4	NEGATIVO
30	1:2	NEGATIVO
31	1:4	NEGATIVO
32	1:128	1:8
33	1:4	NEGATIVO
34	1:16	1:8
35	1:8	1:8
36	1:4	1:8
37	1:16	1:16
38	1:2	1:8
39	1:8	1:8
40	1:8	1:16
41	1:16	1:16
42	1:8	1:8
43	1:64	1:32
44	NEGATIVO	1:4
45	1:8	1:16
46	NEGATIVO	1:4
47	1:8	1:64
48	NEGATIVO	NEGATIVO
49	NEGATIVO	NEGATIVO
50	NEGATIVO	NEGATIVO

TABLA No. 4  
MUESTRAS NORMALES POR EL METODO  
DE HEMA GLUTINACION PASIVA

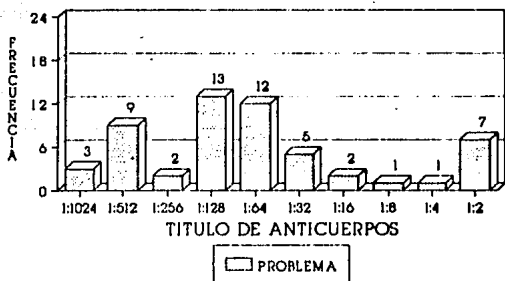
No.	TITULO	
	ANTICUERPOS Anti-M	ANTICUERPOS Anti-Tg
1	1:4	1:4
2	NEGATIVO	NEGATIVO
3	NEGATIVO	NEGATIVO
4	1:4	1:4
5	1:4	NEGATIVO
6	1:4	1:2
7	1:2	1:2
8	1:2	1:2
9	NEGATIVO	NEGATIVO
10	NEGATIVO	NEGATIVO
11	NEGATIVO	NEGATIVO
12	NEGATIVO	1:4
13	1:4	1:4
14	1:4	NEGATIVO
15	NEGATIVO	NEGATIVO
16	1:8	1:16
17	1:8	1:16
18	NEGATIVO	NEGATIVO
19	1:8	1:8
20	NEGATIVO	NEGATIVO
21	NEGATIVO	NEGATIVO
22	NEGATIVO	NEGATIVO
23	NEGATIVO	NEGATIVO
24	NEGATIVO	NEGATIVO
25	NEGATIVO	NEGATIVO

FIG. No 8 MUESTRAS NORMALES PARA ANTICUERPOS ANTITIROGLOBULINA POR HEMAGLUTININACION PASIVA



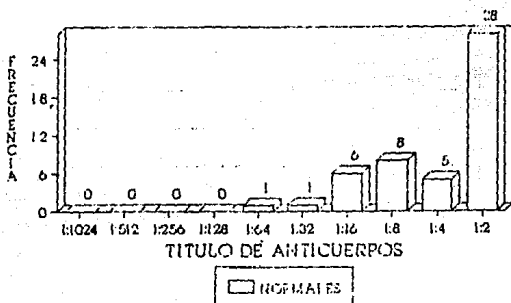
GONZALEZ 90

MUESTRAS PROBLEMA PARA ANTICUERPOS ANTITIROGLOBULINA POR HEMAGLUTININACION PASIVA



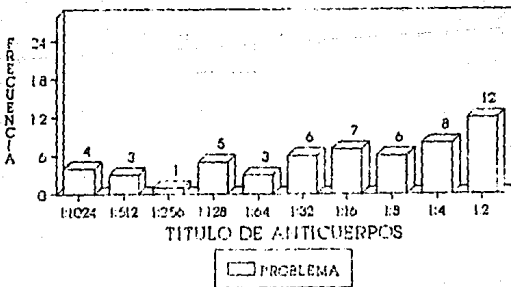
GONZALEZ 90

FIG. No. 9 MUESTRAS NORMALES PARA ANTICUERPOS  
ANTIMICROSOMAS POR  
HEMAGLUTINACION PASIVA



GONZALEZ 90

MUESTRAS PROBLEMA PARA ANTICUERPOS  
ANTIMICROSOMAS POR  
HEMAGLUTINACION PASIVA



GONZALEZ 90

TABLA No.5

DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-TIROGLOBULINA  
EN MUESTRAS PROBLEMA POR EL METODO  
DE ELISA

No.	I.E.	Resultado
1	1.0	-
2	1.66	-
3	1.0	-
4	1.0	-
5	1.0	-
6	5.6	+
7	2.0	+
8	2.0	+
9	2.3	+
10	3.0	+
11	6.3	+
12	2.0	+
13	5.6	+
14	2.66	+
15	2.3	+
16	1.0	-
17	1.0	-
18	4.0	+
19	0.33	-
20	1.0	-
21	1.3	-
22	2.0	+
23	1.66	-
24	0.66	-
25	2.0	-

TABLA No.5

DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-TIROGLOBULINA  
EN MUESTRAS PROBLEMA POR EL METODO  
DE ELISA

No.	I. E.	Resultado
26	3.33	+
27	3.33	+
28	0.50	-
29	0.0	-
30	0.87	-
31	0.0	-
32	0.50	-
33	0.66	-
34	1.66	-
35	1.0	-
36	3.33	+
37	1.37	+
38	1.0	-
39	6.95	+
40	1.73	-
41	1.5	-
42	1.83	-
43	3.04	+
44	0.43	-
45	0.5	-
46	2.83	+
47	2.66	+
48	0.66	-
49	0.66	-
50	0.33	-
51	0.5	-
52	3.5	+
53	3.91	+
54	2.5	+
55	2.83	+

I.E.Indice de ELISA



TABLA No.6

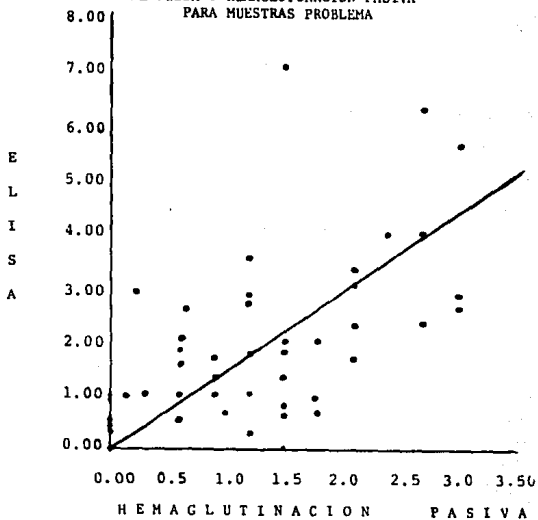
TABLA DE CORRELACION DE LOS METODOS  
DE ELISA Y DE HEMAGLUTINACION PASIVA  
PARA MUESTRAS PROBLEMA

No.	METODO ELISA	METODO HA	No.	METODO ELISA	METODO HA
1	1	0.6	29	0.0	0.0
2	1.66	0.9	30	0.87	0.0
3	1.0	0.3	31	0.0	1.5
4	1.0	1.2	32	0.5	0.0
5	1.0	0.6	33	0.66	0.9
6	5.6	3.01	34	1.66	0.9
7	2.0	1.5	35	1.0	1.2
8	2.0	1.8	36	3.33	2.1
9	2.3	2.1	37	1.3	0.9
10	3.0	2.1	38	1.0	0.6
11	6.3	2.7	39	6.95	1.5
12	2.0	1.5	40	1.73	1.2
13	5.6	3.01	41	1.5	0.6
14	2.66	3.01	42	1.83	0.6
15	2.3	2.7	43	3.04	2.1
16	1.0	0.6	44	0.43	0.0
17	1.0	0.125	45	0.5	0.0
18	4.0	2.7	46	2.83	1.2
19	0.33	1.2	47	2.66	1.2
20	1.0	0.9	48	0.66	1.8
21	1.3	1.5	49	0.66	1.8
22	2.0	0.6	50	0.33	0.0
23	1.66	2.1	51	0.5	0.0
24	0.66	1.5	52	3.5	1.2
25	2.0	0.66	53	3.91	2.4
26	3.33	0.3	54	2.5	0.6
27	3.33	0.3	55	2.83	3.01
28	0.5	0.0			

n=55  
X=1.967455  
DS=1.569385

n=55  
X=1.213909  
DS=0.920441

FIGURA No.10  
CURVA DE CORRELACION DE LOS METODOS  
DE ELISA Y HEMAGLUTINACION PASIVA  
PARA MUESTRAS PROBLEMA



$r = 0.6108738$

$T = 5.617117$

$p < 10^{-6}$

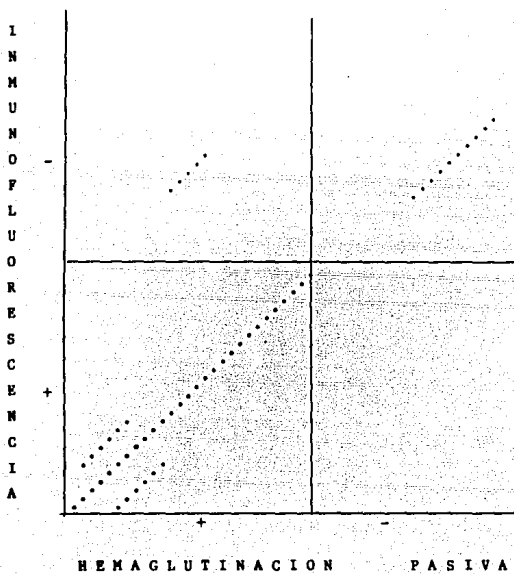
Este coeficiente de correlación es significativamente diferente a 0

TABLA No. 7

DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-MICROSOMAS  
EN MUESTRAS PROBLEMA POR EL METODO  
DE INMUNOFUORESCENCIA

No.	IF	HP	No.	IF	HP
1	+	+	29	-	-
2	+	+	30	-	-
3	-	+	31	-	-
4	+	+	32	-	-
5	+	+	33	-	-
6	+	+	34	+	+
7	+	+	35	+	+
8	+	+	36	+	+
9	+	+	37	+	+
10	-	-	38	-	-
11	+	+	39	+	+
12	+	+	40	-	+
13	+	+	41	-	+
14	+	+	42	+	+
15	-	-	43	+	+
16	+	+	44	+	+
17	+	+	45	+	+
18	+	+	46	+	+
19	+	+	47	+	+
20	+	+	48	+	+
21	+	+	49	+	+
22	+	+	50	+	+
23	-	+	51	+	+
24	-	+	52	-	+
25	+	+	53	+	+
26	+	+	54	-	-
27	+	+	55	+	+
28	-	-			

FIGURA No. 11  
CORRELACION DE LOS METODOS DE HEMA GLUTINACION  
PASIVA E INMUNOFLUORESCENCIA PARA  
MUESTRAS PROBLEMA CON ANTICUERPOS ANTIMICROSOMAS



**ANALISIS DE RESULTADOS**

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

-69-

## 8.0 ANALISIS DE RESULTADOS

1.- Como se puede observar en los resultados obtenidos, en el procesamiento de la tiroides se obtuvo una buena concentración de tiroglobulina cruda, la cual se purificó por cromatografía en Sephadex G-200 y Sepharosa 4B. Observando las gráficas de dichas cromatografías se puede decir que la tiroglobulina fue obtenida fácilmente, ya que es la primera proteína que se obtuvo, puesto que es la más voluminosa y la que se encuentra en mayor proporción en la glándula tiroides.

2.- Posteriormente, se llevaron a cabo las pruebas inmunológicas para detectar la reacción antígeno-anticuerpo de la Tiroglobulina con un inmunosuero antitiroglobulina; con esto pudimos verificar la presencia de nuestra proteína obtenida, estas pruebas fueron precipitación en gel en donde se observaron bandas específicas entre la tiroglobulina obtenida y un inmunosuero antitiroglobulina humana de conejo, y un suero humano antitiroglobulina, así como una banda de reacción con un suero antiproteínas totales. En la prueba de precipitación en capilar también se observó una fuerte precipitación entre el inmunosuero antitiroglobulina y la tiroglobulina; pero la técnica que dió la pauta a concluir que realmente la proteína obtenida fue tiroglobulina y que resultó satisfactoriamente pura fué la electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS, dado que no se contaba con -

marcador de peso molecular para determinar el peso de nuestra proteína, no se determinó este, pero sí se obtuvo bastante pura ya que se observó una banda bastante ancha en un gel al 5% después de tratamiento con urea 8.0 M. (Concuerda bastante con lo obtenido en la bibliografía).

3.- Posteriormente se pudo determinar la cantidad de tiroglobulina obtenida que fué de 0.701 g, con lo cual se puede decir que se obtuvo una cantidad bastante aceptable para trabajar puesto que para la estandarización del método y para el ensayo de las muestras normales y problema se usó una concentración de 25 mg%.

4.- En cuanto a microsomas podemos decir que se obtuvieron puros para fines del presente ensayo, ya que se utilizaron tal como se obtuvieron después de centrifugar y suspender en sacarosa 0.25 M, siendo este procedimiento, suficiente para el ensayo de anticuerpos antimicrosomas humanos, estos microsomas se observaron por microscopía electrónica y se muestran en la figura 7.

5.- Al estandarizar la técnica de hemaglutinación pasiva se empezó por utilizar eritrocitos de carnero tratados con ácido tánico, lo cual no resultó satisfactorio, ya que se obtenían falsos positivos y negativos, así pues se optó por probar simultáneamente otros compuestos para tratar a los eritrocitos; tales compuestos fueron bis diamino bencidina,

glutaraldehído y cloruro de cromo, siendo este último el - que dió un mejor resultado, ya que se distinguió claramente los sueros positivos de los sueron negativos.

6.-Finalmente al determinar anticuerpos anti-Tg-h y anti - cuerpos antimicrosomas en sueros problema por el método de hemaglutinación pasiva ya estandarizado, se pudieron comparar los resultados de tales muestras problema con las muestras normales y se pudo observar una diferencia bastante no table, ya que la mayoría de muestras normales no rebasan ti tulos de 1:16 para anticuerpos antitiroglobulina y anticuerpos antimicrosomas; mientras que las muestras problema resultaron con títulos bastante grandes hasta de 1:1024, y al comparar ambos resultados se puede decir que títulos desde 1:32 ya serían positivos.



Las muestras problema fueron probadas anteriormente, por el método de ensayo inmunoenzimático (ELISA), para detectar anticuerpos antitiroglobulina en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (Tesis de Isaías Sánchez González), y se compararon los resultados obtenidos por los métodos de ELISA y hemaglutinación pasiva mediante una curva de correlación (Fig.10), en la que se observa que el coeficiente de correlación es de 0.6 ; es decir, que es significativamente diferente de 0 esto nos sugiere que ambos ensayos son bastante sensibles y reproducibles en este caso para la detección de anticuerpos antitiroglobulina humana.

Por otro lado, también se probaron las mismas muestras problema por el método de inmunofluorescencia para anticuerpos antimicrosomales (en el Hospital Regional 20 de Noviembre) y también pudimos comparar la relación de ambos métodos mediante una curva en la cual se observa claramente como las muestras que dieron positivas por inmunofluorescencia dieron positivas por Hemaglutinación Pasiva, siendo la mayoría de las pruebas las que correlacionaron (40 muestras de 55 resultaron positivas) mientras que 10 de las que resultaron negativas por inmunofluorescencia resultaron también negativas por Hemaglutinación Pasiva.

Finalmente de lo anterior se puede decir que el método de Hemaglutinación Pasiva resultó ser bastante sensible y reproducible para la detección de anticuerpos antitiroglobulina y anticuerpos antimicrosomales.

## 9.0 CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos podemos decir - que los objetivos propuestos se cumplieron satisfactoriamente ya que:

- 1.- Se logró estandarizar la técnica de hemaglutinación pasiva para detectar la presencia de anticuerpos antitiroglobulina (Anti-Tg-H) y anticuerpos antimicrosomales - (anti-M-h).
- 2.- Se logró determinar la presencia de anticuerpos antitiroglobulina y anticuerpos antimicrosomales en sueros - problema por el método estandarizado.
- 3.- Se logró obtener a partir de tiroides los antígenos tiroglobulina (Tg) y microsomas (M).
- 4.- Se logró purificar el antígeno tiroglobulina por cromatografía por exclusión de peso molecular en Sephadex G-200 y en Sepharosa 4B.
- 5.- Se logró identificar a los antígenos Tg y M.

6.- Finalmente con relación al objetivo general, se puede concluir que se llevó a cabo el diseño de la técnica de hemaglutinación pasiva, está resultó ser reproducible - rápida, y barata; puesto que se logró detectar anticuerpos antitiroglobulina humana y anticuerpos antimicrosommas humanos en suero, siendo esta técnica capaz de sustituir a los equipos comerciales de importación.

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

## 10.0 BIBLIOGRAFIA

- 1.- Pillot, J y Peltier, A.P., Técnicas en Inmunología. Editorial JIMS, Barcelona, España 1976. pags. 35, 42-45.
- 2.- Guyton, A.C. Tratado de Fisiología Médica. 5a. Edición. Editorial Interamericana, México 1983, pags.999-1012.
- 3.- Williams, H.R. Tratado de Endocrinología. 3a. Edición - Salvat Editores S.A., Barcelona, España. 1979 pags.104-244.
- 4.- Salas M.F., Rey J., Sanmartí A.M. Atlas Práctico para el Médico General. Endocrinología. Salvat Editores, S.A. - 1984, Barcelona, España. pags. 31-87.
- 5.- Schardt, C.W. and Mc. Lachlan S.M. An Enzyme-Linked - Immunoassay for Thyroid Microsomal Antibodies. Journal - of Immunological Methods, 55, 1982 pags 155-168.
- 6.- De Robertis, R. Biología Celular y Molecular. 11a. Edición. Editorial El Ateneo 1986. pags. 197-201 y 247-250
- 7.- Sheila H. Roman, Felice Korn, and Terry. Enzyme-Linked Immunosorbent Microassay, and Hemagglutination Compared for Detection of Thyroglobulin and Thyroid Microsomal - autoantibodies. Clin.Chem.30 (2) 246-251 1984

- 8.- D.M. Weir. Hanbook of Experimental Immunology V.1 , -  
Blackwell Scientific Publications 3a. Edición. Cap.20.0
- 9.- Arthur B. Schneider and Richard Pervos. Radioimmunoassay  
of Human Thyroglobulin: Effect of antithyroglobulin auto  
antibodies. Vol. 47, No.1, 1978. Journal of Clinical -  
Endocrinology and Metabolism. pags. 126-133.
- 10.- W.A. Scherbaum. On the Clinical Importance of Thyroid-  
Microsomal and Thyroglobulin antibody Determination -  
Acta Endocrinol (Copen) 1987. Suppl.281 pags. 325-329
- 11.- A. Pinchera, S. Mariotti, L. Chiovato., Cellular Loca-  
lization of the Microsomal antigen and The Thyroid Pe-  
roxidase Antigen. Acta Endocrinol (Copen) 1987 pags.  
57-62
- 12.- Jean Ruf, Barbara C. Thyroid Peroxidase is the Organ -  
Specific "Microsomal" Autoantigen Involved In Thyroid  
autoimmunity. Acta Endocrinol (Copen) 1987 Suppl. 281  
pags.49-56
- 13.- S. Mariotti, A. Russova. A New Solid Phase Immunoradio  
metric Assay for Antithyroid Microsomal Antibody. Jour  
nal of Clinical Endocrinology and Metabolism. Vol.56,-  
No.3 pags. 467-473 1983.
- 14.- S. Mariotti, A. Pinchera. Solubilization of Human Thy-  
roid Microsomal antigen. Journal of Clinical Endocrinol  
ogy and Metabolism.1979 Vol.48 No.2 pags.207-212.

- 15.- Antony P. Weetman. Enzyme-Linked Immunoassay of Mono - clonal and Serum Microsomal Autoantibodies. Clinica - Chimica Acta, 138 (1983) 237-244.
- 16.- Toru Mori, J. Fisher. Studies of an in Vitro Bindin - Reaction Between Thyroid Microsomes and Long acting - Thyroid Stimulator Globulin (LATS): I. Development of Solid-State Competitive Binding Radioassay Methods for Measurement of Antimicrosomal and Antitiroglobulin an - tibodies. Journal Clin. Endocr. 31: 119. 1970 .
- 17.- Marion M. Bradfor A Râpid and Sensitive Method for - the Quantitation of Microgram Quantities of Protein U - tilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analyti - cal Biochemistry 72, 248-254 (1976)
- 18.- Novikoff Alex,. Estructura y Dinámica Celular. Edito - rial Interamericana México, 1972 pags.25-28, 77-86 y 131-134.
- 19.- H. Koffler, R. Kofler, H. Wolf. Development of an Enzy - me-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Au - toantibodies Against Thyroglobulin in Chickens. Jour - nal of Immunological Methods, 69 (1984) 243-252.
- 20.-By James, B.Peter, M.D.,Ph.D. Thyroid autoimmunity Diag - nostic Medicine. July, August. 1981 pag.1-7.

- 21.- Walter V. Brown Citología, Ediciones Omega S.A. México 1979, 145-148 y 260-264.
- 22.- Volpe, R. M.D., The Role Of Autoimmunity in Hypoendocrine and Hyperendocrine Function. Annals of Internal Medicine 87: 86-99. 1977.
- 23.- Ma.Luisa Castillo. Fabricación Local o Importación de Reactivos y Equipo de Laboratorio; Ser Autosuficientes o Ser Dependientes. Bioquímica Vol.13, No.2, 1988 27-29
- 24.- P.M. Thompson, S.M. Mc.Lachlan A.Parkes, The IgG Sub-class Distribution of Thyroglobulin Antibody Synthesized in Culture Scand. J. Immunol. 18, 123-129, 1983.
- 25.- Christopher R. Strakosch, M.D., Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston .Vol.37 No.24 1499-1507.
- 26.- T.J.Wilkin, J. Swanson Beck, A Passive Haemagglutination (TRC) Inhibitor in Thyrotoxic Serum. Clinical Endocrinology (1979) 10, 507-514.
- 27.- J. Cayzer, S.R. Chalmers, D. Doniach. An Evaluation of Two New Haemagglutination Test for the Rapid Diagnosis of Autoimmune Thyroid Diseases. Journal of Clinical Pathology 1978, 31, 1147-1151.



- 28.- Robert S. Zimmerman, M.D.; Michael D. Hashimoto's Thyroiditis annals of Internal Medicine, 1986; 104: 355-357.
- 29.- Barbara Czarnocka, Jean Ruf. Purification of the Human Thyroid Peroxidase and its Identification as the Microsomal Antigen Involved in Autoimmune Thyroid Diseases. Federation of European Biochemical Societies Vol.190. No.1, October 1985 147.
- 30.-Toru M. and Joseph P.Kriss. Measurements By Competitive Binding Radioassay of Serum Anti-Microsomal and Anti-Thyroglobulin Antibodies in Grave's Disease and Other Thyroid Disorders. Journal Clinical Endocrinology 33: 688-698; 1971.
- 31.- T. Bird and J. Stephenson. Evaluation of a Tanned Red Cell Technique for Thyroid Microsomal Antibodies. Journal Clinical Pathology, 1973, 26, 623-627.
- 32.- Nobumitsu O. Arthur K, Robert V. Sensitization of T-Lymphocytes in Grave's and Hashimoto's Diseases. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism Vol.51, No.2, 1980 pags 316-320.
- 33.- M.A. Hayat. Principles and Techniques of Electron Microscopy (Biological Applications) Vol.1 Reinhold Company New York. Pags 264-274.

- 28.- Robert S. Zimmerman, M.D.; Michael D. Hashimoto's Thyroiditis annals of Internal Medicine, 1986; 104: 355-357.
- 29.- Barbara Czarnocka, Jean Ruf. Purification of the Human Thyroid Peroxidase and its Identification as the Microsomal Antigen Involved in Autoimmune Thyroid Diseases. Federation of European Biochemical Societies Vol.190. No.1, October 1985 147.
- 30.- Toru M. and Joseph P. Kriss. Measurements By Competitive Binding Radioassay of Serum Anti-Microsomal and Anti-Thyroglobulin Antibodies in Grave's Disease and Other Thyroid Disorders. Journal Clinical Endocrinology 33: 688-698; 1971.
- 31.- T. Bird and J. Stephenson. Evaluation of a Tanned Red Cell Technique for Thyroid Microsomal Antibodies. Journal Clinical Pathology, 1973, 26, 623-627.
- 32.- Nobumitsu O. Arthur K, Robert V. Sensitization of T-Lymphocytes in Grave's and Hashimoto's Diseases. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism Vol.51, No.2, 1980 pags 316-320.
- 33.- M.A. Hayat. Principles and Techniques of Electron Microscopy (Biological Applications) Vol.1 Reinhold Company New York. Pags 264-274.

- 34.-Yocoyama N, Taurog A. Studies With Purified Human Thyroid Peroxidase and Thyroid Microsomal Autoantibodies - J. Clin Endocr. and Metabolism, Vol.70, No.3, 1990 p.p. 758-765.
- 35.- Uek Y, Katsumi E, Otsubo T. Abnormal B Lymphocyte Function in Thyroid Glands From Patients With Grave's Disease. J. Clin. Endocr. and Metabolism. 1989 Vol.69, No.5 P.P.
- 36.- Yocoyama N, Taurog A. Thyroid Peroxidase and Thyroid - Microsomal Autoantibodies. J.Clin. Endocr. and Metabolism. 1989 Vol.68 No.4 Pags.
- 37.- Portman L, Hamada N, Heinrich G. Anti-Thyroid Peroxidase Antibody in Patients With Autoimmune Thyroid Disease: Possible Identity With Anti-Microsomal Antibody. J. Clin. Endocrinol. Metabolism 61: 1001-1003. 1985.
- 38.- Doniach D. Bottajo G. Russell R. Goitrus Autoimmune - Thyroiditis ( Hashimoto Disease ) Clin. Endocr. Metabolism 8: 63-80 . 1979.
- 39.- Jansson R, Bernarder S, Karlsson A, Autoimmune Thyroid Dysfunction in the Postpartum Period. J. Clin Endocr. and Metab. 58: 681-687.
- 40.- Knox AJ, Von Westarp C, Row V.V, et al: Thyroid Antigen Stimulates Lymphocytes From Patients With Graves Disease to Produce Thyroid-Stimulating Immunoglobulin TSI. J.Clin Endocr. Metab 43: 330-337, 1976

- 41.- Lamki L, Row V V, Volpé R: Cell-Mediated immunity in Graves' Disease and Hashimoto's Thyroiditis as Shown by the Demonstration of Migration Inhibition Factor - (MIF). J. Clin Endocrinol Metab 36: 358-364, 1973.
- 42.- Grumet F C, Payne RO, Konishi J., et al: HLA antigens as Markers For Disease Susceptibility and Autoimmunity in Graves' Disease. J Clin Endocrinol 39: 1115, 1974.
- 43.- Salabé, G, B, Salabé H., Dominici, R., Radioimmunoassay For Human antithyroglobulin Antibodies. II. Determination of Antigen-Binding Capacity. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 39, 1125-1132.
- 44.- amino, N., and L. J. DeGroot, Insoluble Particulate Antigen in Cell-Mediated Immunity of Autoimmune Thyroid Disease, Metabolism 24: 45, 1975.
- 45.- Philip JR, Weir DM, Stuart AE, Irvine WJ. A Latex - Particle Precipitation Test in the Diagnosis of Thyroid Disease. J Clin Pathol 31, 147- 151 (1962)
- 46.- Harold Edelhoeh. I. Recent Advances in Thyroid Chemistry and Physiology. The Structure of Thyroglobulin - and Its Role in Iodination. Clinical Endocrinology - Branch, National Institute of Arthritis and Metabolic diseases. pags 1-23 (1965).

- 47.- Goodburn R, Williams DL, Marks V. A Simple Micro-ELISA Method for the Assay of Antithyroglobulin Autoantibodies in Human Serum. *J. Clin Pathol* 1981; 34:1026-1031
- 48.- Voller A, Bidwell DE, Burek CL. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Antibodies to Thyroglobulin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1980; 163: 402-405.
- 49.- Goodburn R, Williams DL, Marks V. The Preparation of - Thyroid Microsomal Antigen for Use in the Indirect Micro-ELISA method for the Detection of Anti-Thyroid Microsomal Autoantibody. *Clin Chim Acta* 1982;119:291-308
- 50.- Kalderon AE, Bogaars HA, Diamond I. Ultrastructural - Alterations of the Follicular Basement Membrane in Hashimoto's Thyroiditis. *Am J Med* 1973; 55:485-491.
- 51.- Fulthorp, A.J., I.M. Roitt, D. Doniach, and K. Couchman A Stable Sheep-Cell Preparation for Detecting Thyroglobulin Autoantibodies and its Clinical Application, *J Clin Pathol* 14: 654,1961.
- 52.- Pinchera, A., S. Mariotti, P. Vitti, M. Tosi, L. Grasso, F. Interference of Serum Thyroglobulin in the Radioassay for Serum Antithyroglobulin Antibodies, *J Clin Endocrinol Metab* 45: 1077, 1979.
- 53.- Cuatrecasas, P., Protein Purification by Affinity Chromatography, *J Biol Chem* 245: 3059, 1970.

- 54.- Shulman S, Armenia JP, studies On Thyroid Protein Components of Hog Thyroid Tissue and the preparation of the Thyroglobulin by Column Chromatography. J Biol chem - 238: 2723, 1963.
- 55.- Salvatore G, Salvatore M, Cahnmann HJ and Robinns J Separation of Thyroidal Proteins And purification of - Thyroglobulin by Gel Filtration and Density Gradient - Centrifugation. J Biol Chem 239: 3267, 1964.
- 56.- Khoury EL, Hammond L, Bottazzo GF, Doniach D. presence Organ-Specific "Microsomal" Autoantigen on the Surface of Human Thyroid Cell in Culture: Its Involvement - in Complement-Mediated Cytotoxicity. Clin Exp Immunol 45:316, 1981.
- 57.- Konno N, Murthy PVN, McKenzie JM 1970 Thyroglobulin in Fractions of Thyroid Homogenate. Endocrinology 87:1069
- 58.- McGregor A, McLachlan S, Clark F, Smith BR, Hall R. Thyroglobulin and Microsomal Autoantibody Production - by Cultures of Hashimoto Peripheral Blood Lymphocytes. Immunology 36: 81, 1979.
- 59.- Bayer MF, Kriss JP A Solid-Phase, Sandwich-Type Radioimmunoassay for Antithyroglobulin : elimination of False Positive Results and Semicuantitative Measurement of - Antithyroglobulin Antibody in the Presence of Elevated Thyroglobulin. J Clin Endocrinol Metab 49:565, 1979.

**A P P E N D I C E**

## 11.0 A P E N D I C E

Preparación de las soluciones utilizadas en este trabajo.

### 1.- Solución Salina Amortiguador de Fosfatos (PBS) 0.01 M

pH=7.2

Solución A

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.2 M

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .....27.2 g

Aforar a 1 Lt con agua destilada

Solución B

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2 M

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhidro.....28.4 g

Aforar a 1 Lt con agua destilada

Mezclar 140 ml de Solución A + 360 ml de Solución B + 74 g de NaCl. Ajustar el pH a 7.2 y aforar a 1 Lt con agua destilada.

Tomar 100 ml de la Solución anterior y aforar a 1 Lt con agua destilada

### 2.- Solución PBS-Albúmina 1:1000

Pesar 0.1 g de albúmina o leche descremada en polvo y se disuelven en 100 ml de solución de PBS pH=7.2; guardar en refrigeración, se prepara en el momento de utilizarse.



3.- Agar Noble al 0.5%

Pesar 0.5 g de agar noble y disolver en 100 ml de solución salina fisiológica muy caliente.

4.- Solución de Cloruro de Cromo 0.1%

Pesar 0.5 g de Cloruro de Cromo y disolver en 5 ml de Solución de PBS pH=7.2; preparar en el momento de utilizarse.

5.- Monómero de Acrilamida. Solución Madre: 30% de acrilamida 0.8% Bis-Acrilamida

Acrilamida.....30 g  
Bis-Acrilamida.....0.8 g

Llevar hasta cerca de los 100 ml con agua destilada, aforar hasta que la solución esté a temperatura ambiente  
Filtrar usando membrana millipore de 0.45  $\mu$ m. Conservar a 4°C.

6.- Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 10%

SDS.....10 g

Llevar a 1000 ml con agua destilada, filtrar y guardar a temperatura ambiente.

7.-Solución de Tinción con Azul de Coomasie

Azul de Coomasie 0.125%, Metanol 50%, Acido Acético 10%

8.- Solución Amortiguadora de TRIS-HCl 1.5 M pH=8.8

TRIS.....18.17 g

Disolver el TRIS en agua destilada (menos de 80 ml).  
ajustar el pH a 8.8 con HCl concentrado. Aforar a 100 -  
ml, filtrar con membrana millipore de 0.45 um y guardar  
a 4°C.

9.- Solución amortiguadora de TRIS-HCl 0.5 M pH=6.8

TRIS.....6.07 g

Disolver el TRIS en un volumen menor a 80 ml de agua -  
destilada. ajustar el pH a 6.8 con HCl concentrado. Afo  
rar a 100 ml con agua destilada, filtrar por membrana -  
Millipore de 0.45 um y guardar a 4°C.

10.- Solución Amortiguadora para Electroforesis TRIS 0.025  
Glicina 0.19 M, SDS 0.1%

TRIS.....12 g

Glicina.....57.6 g

SDS.....40.0 ml al 10%

Disolver los reactivos en un volumen mayor de 3 litros  
de agua destilada. Ajustar el pH a 8.3, aforar a 4 li-  
tros filtrar y conservar a 4°C.

- 11.- Mezcla Digestora para Electroforesis: TRIS 0.125 M, - SDS 4%, Glicerol 20%, 2-Mercaptoetanol 1%, Azul de Bromofenol 0.1%

Glicerol.....2ml  
TRIS.....2 ml (0.5 M, pH=6.8)  
SDS.....2 ml al 10%  
2-Mercaptoetanol.....100 ul  
Azul de Bromofenol.....1 ml al 1%

Mezclar estos reactivos en una probeta y aforar a 10 ml con agua destilada. Hacer alícuotas de 1 ml y conservar a -20°C. Centrifugar antes de usar.

- 12.- Tinción con Azul de Coomasie.

Solución I

Azul de Coomasie R-250.....2 g  
Agua destilada.....800 ml

Solución II

Azul de Coomasie.....62.5 ml de solución  
Metanol.....250 ml  
Acido Acético.....50 ml

Aforar con agua destilada a 500 ml. Guardar a temperatura ambiente.

13.- Solución Decoloradora para Geles: Metanol 50%, Acido - Acético al 10%

Metanol.....500 ml  
Acido Acético .....100 ml

Aforar a 1 litro con agua destilada. Guardar a temperatura ambiente.

14.- Determinación de P.rotefnas con Azul de Coomasie.

Pesar 100 mg de azul de Coomasie y disolverlo en 50 ml de etanol al 50%. Adicionar a esta solución ácido fosfórico 100 ml añ 85% (P/V). Llevar esta solución a 100 ml con agua destilada. Se recomienda filtrar en papel Watman No.1, las concentraciones finales son 0.01% (P/V) de Coomasie; 4.7% (P/V) de etanol y 8.5%(P/V) de Acido Fosfórico.

15.- Preparación de la Muestra para Electroforesis

Conocer la concentración de proteína de la muestra, - de tal manera que en cada carril se coloque el volu - men necesario para adicionar (30-60 ug) de proteína - que sea la cantidad ideal para la electroforesis. Se mezcla la muestra con solución de Cocktail. Puede ser a volúmenes iguales o bien por cada 100 ul de muestra 30 ul de Cocktail. Es importante tener en cuenta este

paso para el momento de colocar la muestra en el carril.

Hervir la mezcla (Muestra + Cocktail) por 5' en baño maría ( a temperatura de ebullición)

Condiciones de corrida.

Gel concentrador .....25 miliampers/ Gel

Gel Separador.....40 miliampers/Gel

El amperaje debe ser constante.