

302827

N=10
2Ej.



UNIVERSIDAD MOTOLINIA A. C.

**ESCUELA DE QUIMICA
CON ESTUDIOS INCORPORADOS
A LA U.N.A.M.**

**IMPLEMENTACION DE LA TECNICA DE
RADIOINMUNOANALISIS PARA LA
DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-
TIROGLOBULINA.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

TERESA GONZALEZ PICHARDO

México, D. F.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL INSTITUTO NACIONAL DE NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN, EN EL DEPARTAMENTO DE MEDICINA NUCLEAR Y CLINICA DE TIROIDES, BAJO LA DIRECCION DE LA Q.F.B. MA. GUADALUPE LOPEZ CARRASCO.

A Dios, por el milagro de la Vida.

A mi madre, Teresa, por ese inmenso amor y apoyo incondicional que siempre me ha brindado.

A mi tía, Caty, por sus consejos y cariño que me han acompañado todo este tiempo.

Gracias a la Q.F.B. Ma. Guadalupe López Carrasco por esa confianza y ayuda inapreciable; así como su apoyo para la realización de esta Tesis.

A la memoria del Dr. Jorge Maisterrena Fernandez, quien fue jefe del Departamento de Medicina Nuclear y Clínica de Tiroides, por las facilidades otorgadas durante la realización de este trabajo.

Al personal de los diferentes departamentos del I.N.N.S.Z. quienes intervinieron con su ayuda y apoyo:

Departamento de Patología

Departamento de Infectología

Departamento de Gastroenterología.

A todo el personal del Laboratorio de Radioinmunoanálisis del Depto. de Medicina Nuclear y Clínica de Tiroides por su gran ayuda y apoyo.

A la Q.F.B. Laura I. Estrada Joe, por su amistad y gran colaboración durante todo la realización de esta Tesis.

A mis Amigos, por su valiosa presencia
en los momentos más decisivos de mi
vida.

A todas aquellas personas que intervi-
nieron con su ayuda y apoyo para ver
terminada esta Tesis.

I N D I C E.

CAPITULO I.

INTRODUCCION

1.1. Planteamiento del problema.....	1
1.2. Objetivo.....	2
1.3. Hipótesis.....	3

CAPITULO II.

ANTECEDENTES

2.1. Fisiología de la glándula tiroides.....	4
2.1.1. Biosíntesis de hormonas tiroideas.....	5
2.2. Tiroglobulina.....	8
2.2.1. Propiedades moleculares.....	8
2.2.2. Propiedades fisicoquímicas.....	8
2.2.3. Estructura y estabilidad.....	9
2.2.4. Composición química.....	10
2.2.5. Metabolismo.....	12
2.2.6. Propiedades inmunológicas.....	16
2.3. Aplicación clínica de la cuantificación de anticuerpos anti-tiroglobulina.....	19
2.4. Métodos existentes para de detección de anticuerpos anti-tiroglobulina.....	19
2.5. Radioinmunoanálisis.....	21

CAPITULO III.

PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Diagrama.....	28
3.2. Material, reactivos y equipo.....	29
3.2.1. Material biológico.....	29
3.2.2. Material de laboratorio.....	29
3.2.2.1. Material diverso.....	29
3.2.2.2. Equipo.....	30
3.2.2.3. Reactivos.....	31
3.2.2.3.1. Preparación soluciones	33
3.3. Metodología.....	36
3.3.1. Obtención del antígeno tiroglobulina.....	36
3.3.2. Radiomarcación del antígeno con ^{125}I	37
3.3.3. Estandarización del sistema analítico.....	38

CAPITULO IV.

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Resultados.....	41
4.2. Discusión.....	53

CAPITULO V.

CONCLUSIONES.....	56
BIBLIOGRAFIA.....	58

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años ha podido observarse que en la sangre de pacientes con enfermedad tiroidea autoinmune, existe una gran variedad de anticuerpos dirigidos contra diferentes componentes del tejido tiroideo. Sin embargo, debido a las limitaciones tecnológicas en nuestro medio, las mediciones empleadas comunmente con utilidad clínica sólo son aquéllas que identifican la presencia de anticuerpos anti-tiroglobulina (AcTg) y anti-microsoma o peroxidasa tiroidea (AcTPO). (1,24,26,42)

Dichas determinaciones han sido de gran utilidad para diferenciar entre diversas patologías tiroideas, cuando la sintomatología denota la presencia de tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, mixedema idiopático, bocio adenomatoso, cáncer de tiroides, tiroiditis subagudas, tiroiditis post-parto y enfermedad subclínica de origen autoinmune. (13,19,26,42)

La detección y cuantificación de AcTg, además de ser empleada como parte integrante de un perfil de diagnóstico, sirve como marcador en el monitoreo del tratamiento de estas patologías. (1,32,42)

Por esta razón, se han desarrollado varios sistemas comerciales para la detección de Actg, que utilizan diversas modalidades en su identificación. (5, 15, 19, 42)

Sin embargo, diversas circunstancias impiden el acceso a ellos en los laboratorios ordinarios de análisis clínicos (razones económicas, administrativas, técnicas, etc...). Situación que vuelve prioritaria la implementación de un sistema analítico sencillo, que cumpliendo con los parámetros de control de calidad (sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y estabilidad de los reactivos) permita la autosuficiencia y disponibilidad de la prueba a un costo razonable.

1.2. OBJETIVO

Implementar y estandarizar una técnica de radioinmunoanálisis (RIA) que permita la detección de anticuerpos anti-Tiroglobulina humana, con especificidad, sensibilidad y reproducibilidad comparable a las de un sistema comercial (inmunoaglutinación).

1.3. HIPOTESIS

Si la técnica de Radioinmunoanálisis ha demostrado ser una metodología con gran sensibilidad y especificidad para la detección de analitos que se encuentran en bajas concentraciones, entonces será posible, a través de una técnica de Radioinmunoanálisis implementada, detectar y cuantificar anticuerpos anti-Tiroglobulina en fluidos biológicos.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1. FISILOGIA DE LA GLANDULA TIROIDES

La tiroides es una glándula endócrina impar y simétrica, situada en la parte anterior del conducto laringo-traqueal; está formada por dos lóbulos laterales y unidos por un puente transversal; en ella se distribuyen fibras tanto simpáticas como neumogástricas que influyen en su irrigación sanguínea. El peso promedio de esta glándula en el adulto es de 25 a 30 g .

Desde el punto de vista embriológico, proviene de una proliferación del suelo de la faringe que empieza a observarse en la tercera semana de gestación. La formación va descendiendo hasta alcanzar su sitio definitivo conforme el desarrollo embrionario avanza.

Histologicamente, la glándula tiroides está constituida por vesículas de tamaño variable (10-500 nm de diámetro), rodeadas de una membrana basal y revestidas de células epiteliales cilíndricas que están llenas, en su mayor parte, de una sustancia coloidal.

La unidad funcional de la glándula está representada por lobulillos que contienen de 20-40 vesículas unidas por tejido conjuntivo.

Las células descritas son de dos tipos:

a) foliculares: secretan a la luz de la vesícula una sustancia coloide que es un depósito de almacenamiento de hormonas tiroideas y tiroglobulina y que constituye el 75% del coloide.

b) parafooliculares o células C: secretan también al lumen de la vesícula una hormona llamada calcitonina, que ejerce acción sobre el metabolismo del calcio. Existe menor abundancia de estas células en el parénquima tiroideo, en relación a la células foliculares. (12, 13, 20)

La glándula, además de controlar el metabolismo corporal a través de la producción y secreción de las hormonas tiroideas (T3 y T4), se encarga también de la síntesis de tiroglobulina, protefna que sirve como sustrato para la yodación y hormonogénesis de T3 y T4. (37,38,42,43)

2.1.1. BIOSINTESIS DE HORMONAS TIROIDEAS

Para la elaboración de las hormonas tiroideas en la glándula tiroides, es fundamental que ésta capte al yodo de la sangre. El complejo mecanismo que implica esta operación puede describirse de la siguiente manera:

a) captación de yodo plasmático mediante la "bomba" de yoduro de la célula tiroidea.

b) oxidación del yodo mediante las peroxidadas y yodación de los componentes tirosílicos de la tiroglobulina

previamente formada por el tirocito, para elaborar tiroquinas (DIT y MIT).

c) acoplamiento de las yodotiroquinas para formar T3 y T4.

d) captación de gotitas del coloide por parte de la célula tiroidea mediante pinocitosis y la posterior ruptura proteolítica de los enlaces Tg-hormonas tiroideas, dando lugar a la liberación de las últimas a la circulación sanguínea.

e) reutilización del yodo remanente o desyodación intratiroidea de las yodotiroquinas.

Todos estos pasos son estimulados y/o regulados por la tirotrófina (TSH). Fig. No. 1

Diariamente, la glándula secreta aproximadamente 80 μg de T4, que circulan en el organismo en concentraciones que oscilan entre 6 y 12 $\mu\text{g}/\text{dl}$, unida fuertemente a diversas proteínas de transporte: globulina transportadora de T4 (TBG), prealbúmina transportadora de T4 (TBPA) y albúmina. La otra hormona secretada es T3, la cual circula en concentraciones de 75 a 250 ng/dl , unida debilmente a la TBG. (12,37,43)

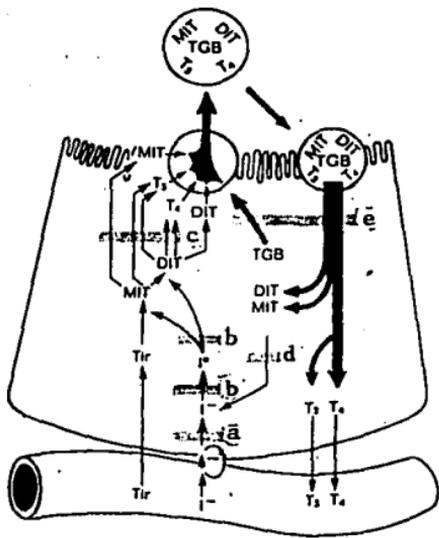


FIGURA No. 1. ESQUEMA DE LA BIOSINTESIS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS

2.2. TIROGLOBULINA

2.2.1. PROPIEDADES MOLECULARES

Inicialmente se pensó que el coloide tiroideo estaba constituido por una sola clase de tiroglobulina; sin embargo, estudios posteriores, en extractos salinos de glándulas tiroideas de mamíferos a pH neutro, demostraron la existencia de 4 proteínas estrechamente relacionadas, cuyo coeficiente de sedimentación (S) es de : 12S, 19S, 27S y 37S y que presentan una abundancia de 0-5%, 85-100%, 0-15% y 0-2% respectivamente. La proteína 19S ha sido considerada como tiroglobulina nativa por ser sintetizada en mayor cantidad en relación a las otras. (5,27,42)

Actualmente, el término tiroglobulina se aplica a un grupo heterogéneo de glicoproteínas yodadas, solubles en disolventes acuosos, localizadas extracelularmente y en el coloide de los folículos tiroideos, en donde la proteína 19S que presenta un PM promedio de 660 kDa, constituye el 75% .(5,9,21,22,37,38,42)

2.2.2. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

Las propiedades fisicoquímicas de la tiroglobulina se muestran a continuación:

- a) coeficiente de sedimentación de 19 S.

b) PM aproximado de 660 kDa.

c) intervalo definido de insolubilidad tanto en soluciones de sulfato de amonio (38-42% de saturación), como en soluciones de fosfatos mono y di-potásicos (43-48% de saturación).

d) punto isoeléctrico de 4.58

e) movilidad electroforética (amortiguador de veronal pH 8.6) de -5×10^{-5} cm² /volt/seg.

Estas características son independientes del grado de yodación de la molécula. (5, 6, 7, 36, 42)

2.2.3. ESTRUCTURA Y ESTABILIDAD

La heterogeneidad de la tiroglobulina es consecuencia de la variabilidad en el contenido de yodo de la proteína, el cual oscila entre 0.07% y 0.80%. Las tiroglobulinas altamente yodadas son más resistentes a la acción de agentes disociantes que aquéllas que presentan menor contenido de yodo; la composición de aminoácidos, así como la antigenicidad y el coeficiente de sedimentación de la proteína son independientes del grado de yodación de la molécula. (5,7,21,22,31,36)

La tiroglobulina es estable en un amplio rango de pH (5 a 11). A pH entre 4 y 5, la proteína sufre desnaturalización irreversible y a pH 12 se disocia en dos subunidades, cada una con un PM de 330 kDa y con coeficiente

de sedimentación de 12S. A pH mayor de 12, éstas últimas se disocian en dos unidades más, una de 3S y otra de 8S.

Este fenómeno también ocurre en medios con fuerza iónica baja, en urea 2M, en dodecilsulfato de sodio (SDS) 1mM y a temperaturas mayores de 40° C. (5,6,7,8,28,29,36)

Estudios de incorporación de aminoácidos radiomarcados han permitido identificar la aparición temprana de subunidades de coeficiente de sedimentación de 3S a 8S y de 12S, inmunológicamente relacionadas a la tiroglobulina. Esta situación ha llevado a proponer que la proteína 19S es el producto de unión de dos subunidades 12S, con un PM de 330 kDa, que son sintetizadas individualmente mediante la traducción de un RNAm de 33S y no por la unión de protómeros más pequeños con estructura primaria diferente. (7,28,31,37,39,42)

2.2.4. COMPOSICION QUIMICA

Varios estudios realizados tanto en especies animales como en humanos en condiciones normales y con atrofia glandular, demuestran una estrecha similitud en la composición química de la tiroglobulina.

Ha sido posible identificar una secuencia de 6200 aminoácidos de los cuales 110 son residuos tirosínicos y de ellos, 25 se encuentran normalmente yodados en forma de

MIT, DIT, T3, T4. La proteína contiene también cerca de 200 medios residuos de cisteína, la mayoría de los cuales forma puentes intramoleculares, pero también es posible encontrar grupos sulfhidrilo libres con bajo contenido de yodo.

No ha sido posible concluir todos los estudios sobre su estructura primaria, debido al gran tamaño de la molécula, pero como puede observarse en la Fig. No. 2, sí ha logrado identificarse la secuencia de aminoácidos que parece ser necesaria para la formación de tiroxina (T4).

-Ala-Ser-T4-Glu(Gln)-Asp(Asn)-

Fig. No. 2 Secuencia de aa. requerida para sintetizar T4.

La tiroglobulina presenta además en su estructura cinco clases de carbohidratos: galactosa, manosa, fucosa, ácido siálico y N-acetilglucosamina, constituyendo el 10% de la molécula agrupados en dos tipos de polisacáridos. Uno de constitución simple (9 residuos de manosa y 2 de N-acetilglucosamina), unido a la proteína en forma de glucopéptido y el otro, de constitución más compleja, conteniendo los 5 carbohidratos y que está unido por lo

menos en dos sitios diferentes a la molécula de tiroglobulina. (18, 37, 42)

2.2.5. METABOLISMO

En el metabolismo de la tiroglobulina se han identificado cuatro fases distintas; tres de ellas integran la biosíntesis de la proteína y una última fase conduce a la degradación de la hormona fisiológicamente activa. Fig. No. 3

La primera fase involucra la síntesis y ensamble de las cadenas polipeptídicas, con la participación de la maquinaria de síntesis proteica presente tanto en el núcleo como en el citoplasma celular. La tiroglobulina es sintetizada en los polisomas unidos a la membrana celular de los folículos, por medio de un RNAm, que codifica proteínas para la síntesis de la tiroglobulina 19S; así se forma una pre-pro-hormona no yodada que pasa al retículo endoplásmico rugoso, en donde como pro-hormona es transportada hacia el aparato de Golgi para ser glicosilada. (18,37)

La segunda fase o glicosilación, consiste en la incorporación de carbohidratos al esqueleto polipeptídico. Esta se inicia en el retículo endoplásmico y termina en el aparato de Golgi, en un proceso de transferencia enzimática.

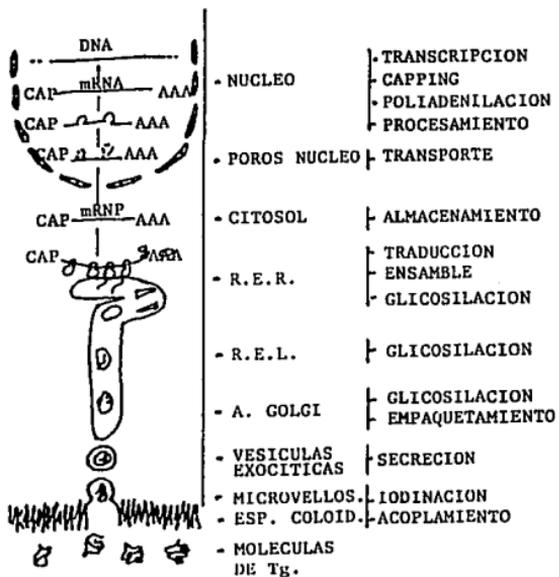


FIGURA No. 3. BIOSINTESIS DE LA TIROGLOBULINA

Se han identificado dos cadenas de oligosacáridos que están unidas al esqueleto por una cadena de asparagina:

a) cadena A (simple), con PM de 1.8 kDa, que contiene manosa y N-acetilglucosamina.

b) cadena B (compleja), con PM de 3kDa, es una estructura ramificada que contiene ácido siálico, fucosa y galactosa unidas a manosa y N-acetilglucosamina.

La proporción de una y otra cadena varía de acuerdo a la especie; en el ser humano es de 7-8 cadenas A por cada 22 cadenas B. (18, 37, 42) Fig. No. 4

La tercera fase comprende la yodación y maduración de la molécula y se lleva acabo en el lumen del folículo, mediante un proceso de exocitosis, con la intervención de enzimas específicas, entre las que destaca la peroxidasa tiroidea (TPO).

Este proceso continúa hasta que la proteína adquiere un grado de yodación óptimo fisiológicamente, limitado sólo por la estructura de la misma. (18,21,37)

En la cuarta y última fase del metabolismo de la tiroglobulina, o tiroxigénesis, las hormonas tiroideas pasan a la circulación sanguínea para ser transportadas a los órganos blanco. En términos generales, la tiroglobulina almacenada en el coloide, es recapturada por las células tiroideas mediante endocitosis, como respuesta a un estímulo de TSH, la invaginación producida en la membrana apical se fusiona con la vesícula endocítica, que es transferida al lisosoma, formando un fagolisosoma que migra hacia la

membrana basal. Durante dicha migración ocurre la degradación de la tiroglobulina por las proteasas y el producto (T3, T4, aminoácidos y tiroglobulina) es liberado a los vasos linfáticos que rodean el folículo, mediante un proceso de difusión simple contra gradiente de concentración.

Los principales productos de liberación son T3, T4 y tiroglobulina y en menor cantidad, MIT y DIT, mientras que algunos residuos de yodotirosinas son desyodados para reutilizar el yodo remanente. (37,39,42)

2.2.6. PROPIEDADES INMUNOLOGICAS

Desde el punto de vista inmunológico, la tiroglobulina es considerada como un autoantígeno órgano específico, capaz de inducir la respuesta inmune contra ella por el organismo. Este hecho fue demostrado por Rose y Witebsky, quienes encontraron en glándulas tiroideas de conejo una similitud de cambios histológicos con las lesiones observadas en pacientes con enfermedad de Hashimoto (infiltración linfocitaria extensa, atrofia y destrucción folicular). (19,23,30,44)

En varias especies animales estudiadas se ha visto que la tiroglobulina no es un antígeno aislado del sistema sanguíneo, sino que entra en circulación después de ser digerido por las proteasas; también existen en circulación, a concentraciones bajas, formas completas de la proteína,

postulándose por éllo, la presencia de un estado de tolerancia inmunológica a la misma. Dicha tolerancia se presenta principalmente a nivel de los linfocitos timo dependientes. (4,23,25,26,42,44)

Numerosos estudios sobre autoinmunidad tiroidea han demostrado que la molécula de tiroglobulina presenta cerca de 40 determinantes antigénicas que son reconocidas por anticuerpos heterólogos. En el ser humano sólo se han identificado 3 epítopes con capacidad de provocar respuesta inmunológica. Un epítope de la molécula de tiroglobulina es compartido con una determinante antigénica del tejido conectivo orbital, lo cual conduce a daño a nivel del músculo ocular, como consecuencia de una reacción cruzada. (1,25,26)

Como resultado de las propiedades inmunológicas de esta proteína, se ha evidenciado la presencia de Actg circulantes a títulos altos en el suero de pacientes con enfermedad de Hashimoto y con enfermedad de Graves, así como también en sueros de pacientes hipotiroideos (mixedema primario); cáncer tiroideo, bocio adenomatoso con y sin hipertiroidismo (títulos menores). Estos anticuerpos participan como marcadores de inmunidad tiroidea y su frecuencia es mayor en el sexo femenino que en el masculino, independientemente de la edad. Un hecho curioso es que la incidencia de positividad decrece en las mujeres mayores de 70 años, sin embargo, en el sexo masculino se presenta el

fenómeno inverso. En sujetos normales, también se ha identificado la presencia de Actg. (1,19,25,26,41,42)

La mayor parte de los anticuerpos así producidos, pertenecen a las inmunoglobulinas de tipo IgG (70%), aunque los hay en menor cantidad del tipo IgA (20%) y todavía menos, del tipo IgM (<10%).

La participación de los anticuerpos en el daño tisular, es el resultado del depósito de complejos inmunes sobre los folículos tiroideos. (26,42)

Además de la tiroglobulina, se encuentran en la glándula tiroidea otros antígenos que desencadenan la producción de autoanticuerpos, los más importantes son:

- a) antígeno coloidal distinto de la tiroglobulina
- b) antígeno microsomal (peroxidasa tiroidea)
- c) antígeno de superficie celular
- d) receptores para la TSH
- e) antígeno nuclear de los tirocitos
- f) hormonas tiroideas propiamente

Existe otro antígeno fuera de la glándula tiroides que está asociado a la enfermedad autoinmune, el antígeno del músculo ocular. (19,26,42)

2.3. APLICACION CLINICA DE LA CUANTIFICACION DE ANTICUERPOS ANTI-TIROGLOBULINA (Actg).

La medición de Actg es empleada principalmente para el monitoreo de la evolución de enfermedades tiroideas de origen autoinmune, siempre y cuando vaya acompañada de otras pruebas como el perfil hormonal tiroideo y ActPO, además de un examen de los síntomas y signos presentados por el paciente, pues todo el conjunto permitirá la elaboración de un diagnóstico más certero.

De esta manera, es posible distinguir las siguientes condiciones clínicas:

a) enfermedad de Hashimoto, de otras causas de bocio no tóxico y cáncer tiroideo

b) enfermedad de Graves, de otros tipos de tirotoxicosis

c) hipotiroidismo autotrófico autoinmune, de obesidad o depresión

d) exoftalmos endócrino, de otras enfermedades oculares. (1,19,26,42)

2.4. METODOS PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-TIROGLOBULINA (Actg).

Además de la fijación del complemento y hemaglutinación pasiva, se han desarrollado otros métodos

analíticos para la detección de los AcTg; entre ellos pueden citarse:

a) Precipitación en agar: basada en la difusión y precipitación, en agarosa, de los complejos inmunes colocados en dicho soporte. Esta prueba es positiva en el 96% de los pacientes con la variante fibrosa de la enfermedad de Hashimoto, pero es frecuentemente negativa para la fase primaria de tiroiditis linfocítica y en la variante de Hürtle de enfermedad de Hashimoto. Esta técnica detecta niveles de alrededor de 1 g/l.

b) Inmunofluorescencia indirecta: se realiza sobre cortes de tejido tiroideo, empleando para la evidenciación de los Ac una antigammaglobulina humana marcada con fluoresceína. Aunque esta técnica es sensible y específica, proporciona únicamente datos semicuantitativos, además de requerir equipo especializado para su aplicación.

c) Hemaglutinación indirecta: emplea para su desarrollo glóbulos rojos sensibilizados y con tiroglobulina adherida a su superficie. Es la metodología más utilizada y presenta una sensibilidad del orden de 10^{-3} g/l.

d) Aglutinación con látex: su principio es similar al de la hemaglutinación indirecta, con la modalidad de que el antígeno es adsorbido a partículas de látex.

e) Radioinmunoanálisis: emplea radioisótopos para evidenciar la presencia de los Ac. Las diferentes modalidades de la técnica se caracterizan por poseer un alto grado de sensibilidad y especificidad, de modo que

algunos especímenes que dan resultados negativos por hemaglutinación, proporcionan resultados positivos por esta técnica. Su sensibilidad es del orden de 10^{-9} g/l.

f) Análisis Inmunoenzimático: es un método recientemente desarrollado, con sensibilidad y especificidad similares al RIA, pero con los inconvenientes de las pruebas colorimétricas, además de la labilidad del trazador enzimático. (1,19,42)

g) Análisis Inmunorradiométrico (IRMA): es una metodología alternativa al RIA, en la cual el analito se combina directamente con un Ac radiomarcado; ofrece mayor sensibilidad y especificidad que el RIA, pero está condicionado a la obtención de Ac con un alto grado de pureza. Por su alto grado de sensibilidad, el sistema se bloquea frente a concentraciones elevadas del Ag, presentando una respuesta bifásica, responsable de resultados erróneos. (10,14)

2.5. RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA).

Es un método inmunológico que permite la medición de sustancias como hormonas, drogas y proteínas presentes en fluidos biológicos en concentraciones hasta de 10^{-9} g/l, con gran especificidad y reproducibilidad. Su desarrollo, debido a las investigaciones de Berson y Yallow (1954), se basa en la reacción inmunológica Ag-Ac, cuyas características

se ajustan a la descripción de la Ley de Acción de Masas, representada como sigue:

$$\frac{[\text{Ag-Ac}]}{[\text{Ag}][\text{Ac}]} = K_e$$

donde el valor absoluto de K es dependiente de las concentraciones en el equilibrio y está en función con la temperatura a la que se lleva a cabo la reacción. (3,11,14)

En el sistema intervienen los siguientes elementos:

a) Estándares: constituyen la sustancia con la que se compara el analito a cuantificar, con la cual es semejante; requiere de características como alto grado de pureza, homogeneidad y estabilidad tanto en condiciones normales de trabajo, como de almacenamiento.

b) Antisueros: provenientes de inmunizaciones en animales, con preparaciones del antígeno de interés, para su empleo en el RIA deben presentar una gran especificidad y afinidad hacia el analito en cuestión. Su concentración de trabajo es tal, que permita alcanzar el equilibrio del sistema.

c) Trazador radiomarcado: sustancia homóloga o de igual composición que el antígeno, que presenta en su estructura isótopos radioactivos, por lo cual se emplea para la detección del complejo formado, permitiendo la cuantificación del analito. Además de presentar una gran pureza radioquímica, alto grado de inmunorreactividad,

estabilidad y actividad específica de media a alta, su comportamiento debe ser lo más semejante al del analito. (11,14)

Existen varios radioisótopos que pueden ser empleados para la radiomarcación de una proteína, como se observa en la Tabla No.1. Su elección radica principalmente en las características nucleares que condicionan la energía de emisión y vida media ($T_{1/2}$) del radioisótopo. Sin embargo, el ^{125}I es el radionúclido más comunmente utilizado para este procedimiento; sus características más importantes se muestran en la Tabla No. 2.

La radiomarcación de una proteína con ^{125}I involucra generalmente una reacción de oxidación para sustituir en su estructura química átomos de ^{130}I (estable) por ^{125}I (radioactivo). Se han descrito diferentes métodos para lograrlo y por sus características, los más comunmente empleados son el de Lactoperoxidasa y el de Yodogen. (10,11,14,17,33,34)

Cualquiera que sea la técnica de radiomarcación empleada, el antígeno marcado debe someterse a un proceso de purificación para su utilización en el sistema analítico. Para este fin se han empleado una gran variedad de procedimientos fisicoquímicos, entre los que pueden citarse: cromatografía en capa fina, diálisis, cromatografía en papel, cromatografía de exclusión molecular, electroforesis, cromatografía de intercambio iónico, adsorción, cromatografía líquida de alta presión e inmunopurificación.

RADIONUCLIDO	VIDA MEDIA	ENERGIA	DETECCION
3H	12.26a	B	CENTELLEO LIQUIDO
14C	5730 a	B	CENTELLEO LIQUIDO
57Co	270 a	γ	CENTELLEO SOLIDO
75Se	120.4 d	γ	CENTELLEO SOLIDO
125I	60 d	γ	CENTELLEO SOLIDO
131I	8 d	B γ	CENTELLEO SOLIDO

TABLA No. 1. RADIONUCLIDOS EMPLEADOS PARA
RADIOMARCACION DE PROTEINAS

- VIDA MEDIA	60.14 días
- PRINCIPALES FOTONES Y ABUNDANCIA	27 - 35 Kev (144%)
- VENTANA DE CONTEO	20 - 80 Kev
- EFICIENCIA DE CONTEO (detector t. pozo NaI(Tl))	90%
- ABUNDANCIA ISOTOPICA EN FUENTES COMERCIALES	95%

TABLA No. 2. CARACTERISTICAS DEL ¹²⁵I.

De todos ellos, se emplean más comunmente la cromatografía de exclusión molecular (Sephadex) y cromatografía líquida de alta presión (HPLC), por su eficiencia, sencillez, rapidez y capacidad de utilización para la producción de moléculas marcadas a gran escala. (10,11,14,34)

El RIA agrupa principalmente dos tipos de sistemas analíticos:

a) Sistema competitivo: es el más comunmente empleado. En él, el receptor específico es un Ac dirigido contra el ligando (Ag) a ser medido, cuya concentración se valora indirectamente al establecerse la competencia con un trazador radiactivo (Ag^*). Durante la reacción hay formación de complejos fríos (Ag-Ac) y calientes (Ag^*-Ac); cuando el sistema ha alcanzado el estado de equilibrio, se separan las fracciones libre y unida para estimar la cantidad de Ag natural que existe en el problema, empleando para éllo una gran variedad de procedimientos inespecíficos (electroforesis, adsorción, intercambio iónico, filtración por peso molecular o precipitación) o bien aquéllos que involucran la adición de un segundo Ac o el empleo de una fase sólida, en los cuales la especificidad para separar las fracciones se encuentra incrementada. (3,10,14)

b) Sistema no competitivo: esta modificación es utilizada cuando el antígeno no es de fácil radiomarcación. En este tipo de sistemas, se emplean Ac contra diferentes

epítopes del Ag; uno de ellos se encuentra marcado y el otro fijado a una fase sólida. (3,14)

El análisis involucra dos pasos: en un primer tiempo, el Ac fijado se incuba con la muestra, hasta que todo el Ag se una al receptor (Ac); en un segundo paso, se adiciona el trazador (Ac*) que se adhiere a los complejos formados. Al término de la reacción, las fracciones libres se eliminan por lavado. El IRMA puede ser considerado como una variante de esta metodología.

En ambos sistemas, la concentración del analito presente en la muestra puede ser cuantificada por interpolación en la curva dosis-respuesta construida en base al comportamiento de los estándares de concentración conocida. (10,11,14) Fig. No. 5

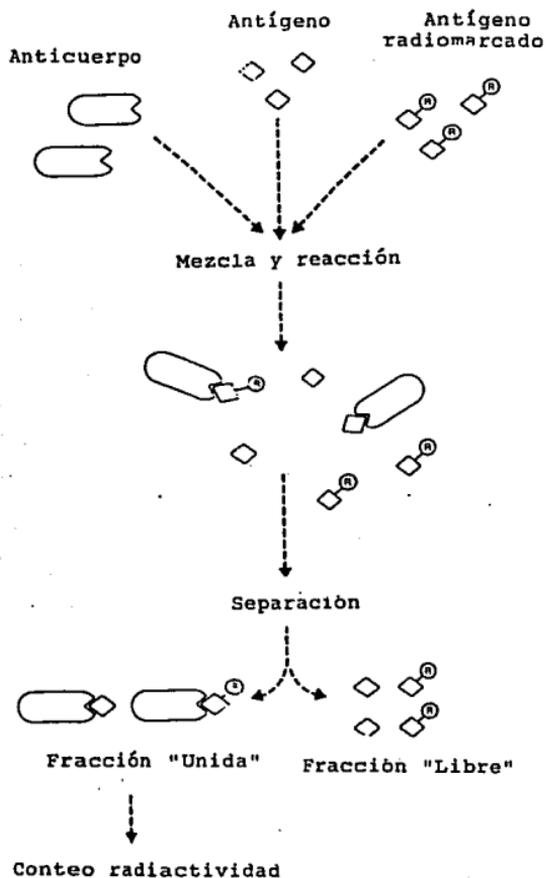
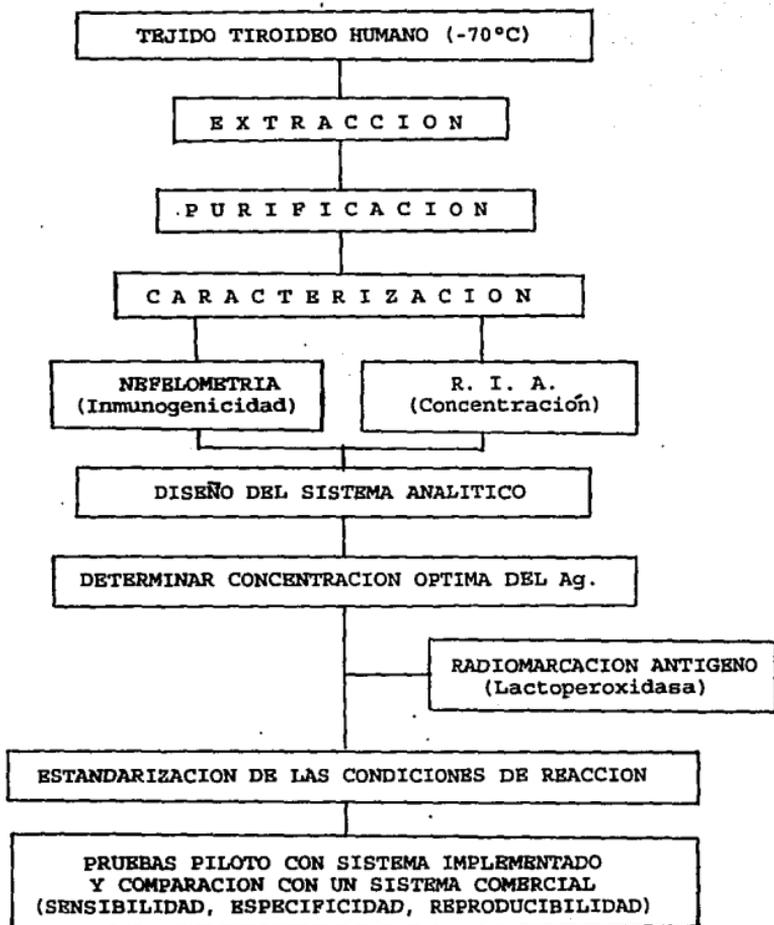


FIGURA No. 5. COMPONENTES ESENCIALES DE UN RADIOINMUNOANÁLISIS

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL.

3.1 DIAGRAMA.



3.2. MATERIAL.

3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

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

3.2.2. MATERIAL DE LABORATORIO.

3.2.2.1. MATERIAL DIVERSO.

1. Probetas Graduadas Pyrex (50, 100 ml)
2. Tubos de ensaye de vidrio, Pyrex (13x100mm, 16x100mm y 12x75mm)
3. Vasos de precipitado Pyrex (25, 80, 100, 150 ml)
4. Matraces aforados Pyrex (25, 50, 100, 1000 ml)
5. Pipetas serológicas graduadas Pyrex (1, 5, 10 ml)
6. Pipetas automáticas de volumen variable Oxford (2 a 1000 μ l)
7. Puntas para pipetas automáticas Oxford
8. Pipetas Pasteur de punta larga

9. Pinzas para soporte
10. Soporte universal
11. Gradillas de alambre para 90 tubos
12. Microviales Eppendorf para 1 ml.
13. Tijeras de acero inoxidable
14. Bisturí con hojas No. 10
15. Pinzas de disección
16. Celdillas para Nefelómetro Laser Behring, cat.OVI-04/05 (Behring, Corp.)
17. Celdillas para espectrofotómetro Beckman DU-65 (Beckman Instr.)

3.2.2.2. EQUIPO.

1. Balanza analítica Mettler H-35.
2. Balanza gravimétrica Harvard Trip Balance (Ohaus Scale Corp.)
3. Ultracongelador (-70°C) Revco Ultra low Temperature Freeze.
4. Homogeneizador Polytron 111118 Williems (Brinkmann Instr.)
5. Centrifuga refrigerada Beckman TJ-6 (Beckman Instr.)
6. Centrifuga refrigerada Sorvall RC-5B
7. Ultracentrifuga Combi Kinematica OMBH
8. Nefelómetro Laser Behring (Behring Corp.)
9. Espectrofotómetro UV/Vis DU-65 (Beckman Instr.)

10. Columnas de vidrio para cromatografía: 24.0 x 1.7 cm y 30.0 x 1.7 cm (L.K.B.) y 10.0 x 1.0 cm (Pyrex)
11. Potenciómetro Corning Weston 1277 (Corning)
12. Equipo de ultrafiltración AMICON 8200 P.M. 10X (Amicon Corp.)
13. Contador de radiación gamma tipo pozo 1277 Gammamaster-LKB (LKB Wallac)

3.2.2.3. REACTIVOS.

- | | | |
|--|----------------------------|-------------|
| 1. NaCl | Q.P. | (J.T.Baker) |
| 2. KH ₂ PO ₄ | A.C.S. | (J.T.Baker) |
| 3. K ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O | A.C.S. | (J.T.Baker) |
| 4. KCl | Q.P. | (J.T.Baker) |
| 5. NaOH | A.C.S. | (J.T.Baker) |
| 6. HCl | Q.P. | (J.T.Baker) |
| 7. Na ₂ CO ₃ | A.C.S. | (J.T.Baker) |
| 8. CuSO ₄ | Q.P. | (J.T.Baker) |
| 9. H ₂ O ₂ | A.G. | (Merck) |
| 10. Tartrato doble de sodio y potasio | A.C.S. | (J.T.Baker) |
| 11. Polietilenglicol E-6000 | A.G. | (Sigma) |
| 12. Solución amortiguadora de Barbituratos-EDTA pH 8.6,
0.05M | A.G. | (Sigma) |
| 13. Reactivo de Folin-Ciocalteu | A.G. | (Sigma) |
| 14. Sephadex G-200 | (Pharmacia Fine Chemicals) | |

- | | |
|--|------------------------------|
| 15. Sepharosa 4B | (Pharmacia Fine Chemicals) |
| 16. Sephadex G-100 | (Pharmacia Fine Chemicals) |
| 17. Lactoperoxidasa, 60-80 U. | (I.C.N. Biochemicals) |
| 18. ^{125}I Na en NaOH, pH 7-11, 100 mCi/ml | (Amersham Co) |
| 19. Tween-20 | A.G. (CIS Bio International) |
| 20. Albúmina bovina, Fracción V | Q.P. (Sigma) |
| 21. Azida de sodio | A.G. (Sigma) |
| 22. Solución salina fisiológica | (PISA) |
| 23. Tiroglobulina RIA-Kit | (D.P.C.) |
| 24. Sera Tek, Thyroglobulin Antibody Test | (Fujirebio Inc.) |
| 25. Anti-gamma globulina | G.N. (DAKO) |

NOTA: Q.P. = Químicamente puro
 A.C.S. = Reactivo que cumple con las especificaciones de la Reagent Chemicals
 A.G. = Grado analítico
 G.N. = Grado nefelométrico

3.2.2.3.1. PREPARACION SOLUCIONES.

a) Soluciones de uso general

1) Solución Amortiguadora de Fosfatos pH 7.4, 0.02 M (PBS)

NaCl 8.77 g

$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.096 g

KH_2PO_4 2.04 g

KCl 0.22 g

Ajustar pH con NaOH 1 N y aforar a 1 l con agua destilada.

2) Solución de Hidróxido de Sodio 1 N.

NaOH 4.0 g

Aforar a 1 l con agua destilada.

3) Solución de albúmina, 100mg/ml en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, 0.02M (PBS)

Albúmina 500 mg

PBS 5 ml

4) Soluciones para la cuantificación de proteínas (Lowry)

Solución A Carbonato de sodio al 2% en NaOH 0.1N,

Tartrato de sodio y potasio al 2%, sulfato cúprico 1%.

Na_2CO_3 2.0 g

NaOH 0.4 g

Aforar a 100ml con agua destilada.

CuSO₄ 1 g
Llevar a 100ml, adicionar un ml a la primera solución.
Tartrato de Na y K 2 g
Llevar a 100ml, adicionar un ml a la primera solución.

5) Solución B

Reactivo de Folin 1:1 en agua destilada.

b) Solución Amortiguadora para Nefelometría, pH 7.4, 0.01M

KH₂PO₄ 0.47 g
K₂HPO₄ . 3H₂O 2.12 g
NaCl 7.43 g
PEG-E 6000 40.0 g
Tween 20 5.0 ml
NaN₃ 1.0 g
Aforar a 1 l con agua destilada y conservar a 4°C.

c) Soluciones para Radiomarcación:

1) Solución Amortiguadora de Barbituratos pH 8.6, 0.05M

Barbiturato de Na ... 8 g
Ac. Barbitúrico 8.5 g
EDTA 3.5 g
Aforar a 1 l con agua destilada y ajustar pH.

2) Solución Amortiguadora de Fosfatos pH 7.4, 0.05M

K₂HPO₄ . 7H₂O 13.1 g

KH_2PO_4 13.6 g

KCl 3.7 g

NaCl 2.9 g

Aforar a 1 l con H₂O dest. y conservar a 4°C.

3) Solución de H₂O₂

H₂O₂ 30% 5 μl

Aforar a 1 ml con H₂O dest. y conservar a 4°C.

d) Soluciones para el R.I.A.:

1) Solución Amortiguadora de TRIS-HCl pH 7.5, 0.01M -NaCl
0.15M - BSA - Tween 20

TRIS-HCl 1000 ml

NaCl 8.8 g

BSA 5.0 g

Tween 20 1.0 ml

Mezclar los reactivos y conservar a 4°C.

2) Solución de PEG-E 6000 salino 4%

PEG-E 6000 40.0 g

NaCl 9.0 g

Aforar a 1 l con H₂O dest. y conservar a 4°C.

3.3. METODOLOGIA.

3.3.1. OBTENCION DEL ANTIGENO

a) Extracción del Antígeno:

1. Descongelar y pesar el tejido.
2. Cortar el tejido finamente, con la ayuda de pinzas, bisturí y tijeras. Homogeneizar en PBS pH 7.4, 0.02 M.
3. Centrifugar la suspensión tisular a 1100 x g durante 30 min. en frío (4°C).
4. Centrifugar el líquido sobrenadante del paso anterior a 9000 x g durante 20 min. en frío (4°C).
5. Centrifugar nuevamente el sobrenadante a 105,000 x g durante 60 min. en frío (4°C). Desechar el precipitado y conservar el sobrenadante, que contiene a la Tiroglobulina, para continuar el proceso de purificación.

b) Purificación del Antígeno:

1. Preparar una columna de vidrio de 24.0 x 1.7 cm con Sephadex G-200. Equilibrarla con PBS pH 7.4, 0.02 M desgasificado.
2. Cromatografiar 1 ml del sobrenadante obtenido en el paso 5 de la extracción, eluyendo con PBS pH 7.4, 0.02 M. Colectar aproximadamente 26 fracciones de 2 ml cada una y determinar en ellas la concentración de proteínas mediante su lectura a una D.O. de 280 nm.

3. Concentrar, por ultrafiltración, aquellas fracciones que contengan mayor concentración proteica (aproximadamente a 1/4 del volumen inicial).
4. Preparar una columna de vidrio de 30.0 x 1.7 cm con Sepharosa 4B y recromatografiar el concentrado, eluyendo con PBS pH 7.4, 0.02 M. Colectar aproximadamente 40 fracciones de 2 ml cada una y determinar en ellas la concentración de proteínas, como en el punto 2. Realizar además la cuantificación de Tg por R.I.A. en aquellas fracciones que presenten mayor concentración proteica.
5. Concentrar, por separado, las fracciones que contengan Tg, hasta 1/4 del volumen inicial.
6. Adicionar azida de sodio (0.01%), a las fracciones, para evitar crecimiento bacteriano. Alicuotar el material y conservarlo a -20°C hasta su caracterización

c) Caracterización del Antígeno:

1. Determinar la actividad inmunogénica, por Nefelometría.
2. Determinar la concentración del antígeno, por R.I.A. (35)

3.3.2. RADIOMARCACION DEL ANTIGENO CON ^{125}I

1. En un microvial Eppendorf, adicionar 35 μg (25 μl) de Tg, 0.5 mCi (18.5 MBq) de ^{125}I -Na, 4 μg (2 μl) de LPO y 0.03 μg (2 μl) de H_2O_2 .
2. Agitar en vortex durante 30 segundos exactamente.

3. Adicionar 500 μ l de PBS pH 7.4, 0.05M para parar la reacción.
4. Someter a purificación el producto de la radiomarcación, utilizando para éllo una columna de vidrio de 10.0 x 1.0 cm, empacada con Sephadex G-100 equilibrada con solución amortiguadora de barbituratos pH 8.6, 0.05M y eluir con el mismo amortiguador.
5. Colectar fracciones de 0.5 ml y monitorear la actividad presente.
6. Seleccionar la fracción de interés y desechar las otras alícuotas.

3.3.3. ESTANDARIZACION DEL SISTEMA ANALITICO.

1. Diluir las muestras séricas 20X con solución amortiguadora de TRIS-HCl-NaCl-BSA-Tween 20 (Solución diluyente).
2. Preparar una solución del Ag radiomarcado (^{125}I -Tg) con una actividad de aproximadamente 40,000 - 50,000 cpm en 50 μ l, utilizando para éllo solución diluyente.
3. En tubos de vidrio (12 x 75 mm) adicionar 50 μ l de las muestras previamente diluídas y 50 μ l de la solución de ^{125}I -Tg.
4. Incubar a 37°C durante 16 horas.
5. Adicionar 2 μ l de anti-gamma globulina e incubar a 37°C durante 1 hora.

6. Adicionar 500 μ l de PEG-E 6000 salino 4%. Mezclar con la ayuda de vortex.
7. Centrifugar a 3000 rpm, a 4°C, durante 30 minutos.
8. Decantar cuidadosamente y dejar escurrir sobre papel absorbente. Monitorear la radiactividad presente.
9. Interpolar los problemas en una curva estándar construída con muestras de concentración conocida.
10. Comparar los resultados obtenidos con los proporcionados con un equipo comercial para la detección de AcTg.

CAPITULO IV

RESULTADOS.

4.1. RESULTADOS.

Los resultados obtenidos al purificar el extracto tiroideo en Sephadex G-200, se muestran en la Figura I. A las fracciones colectadas se les determinó concentración proteica primero mediante su lectura a una longitud de onda de 280 nm y posteriormente, por el método de Lowry, obteniéndose en ambos casos un patrón semejante. Aunque no estaba previsto inicialmente, se sometieron las fracciones a la cuantificación de Tg por RIA. El patrón obtenido permitió definir con mayor exactitud las fracciones de interés para los siguientes pasos (fracción 6 a 8). Tabla I.

Las alícuotas de la fracción seleccionada se concentraron por ultrafiltración, a fin de recromatografiar en Sepharosa 4B aproximadamente 3.42 mg de Tg. Los resultados del procedimiento se muestran en la Figura II. A las fracciones obtenidas, como en la purificación anterior, se les determinó concentración proteica por D.O. y Lowry, definiéndose de esta manera 3 áreas diferentes (fracción 6 a 11, 12 a 15 y 16 a 18), de entre las cuales, con el empleo de un antisuero específico y Nefelometría, fue posible identificar el área con actividad inmunogénica significativa, misma que posteriormente se sometió a RIA con el fin de conocer la concentración de Tg

Las fracciones constituyentes del área de interés (12 a 15), se mezclaron y se concentraron por ultrafiltración, procediendo posteriormente a cuantificar la proteína (aproximadamente 1.57 mg/ml). Tabla II.

El rendimiento obtenido en el procedimiento, considerando que se partió de 1 g de tejido, fue de 0.30%.

Los resultados de la radiomarcación pueden observarse en la Figura III, en donde también se muestran los resultados de la inmunorreactividad de la proteína radiomarcada que fue del orden del 90%, como puede observarse en la Tabla III que acompaña a la gráfica. La eficiencia del marcaje fue de alrededor del 27%, obteniéndose una actividad específica de 7 Ci/g (25.9×10^{10} Bq / g).

En lo que respecta a la estandarización del sistema, la interacción entre el Ag* ($^{125}\text{I-Tg}$) y la muestra (Ac) fue incompleta al incubar el sistema a temperatura ambiente durante 16 h, mientras que al modificar las condiciones de temperatura (37°C), el desplazamiento obtenido permitió el establecimiento de una curva de calibración con mejor respuesta, como puede observarse en la Tabla y Figura IV. Por éello, se seleccionó esta segunda opción como condición ideal para el sistema.

El coeficiente de variación intra-análisis encontrado fue del orden del 3.5%, mientras que el inter-análisis fue del 6.0% al valorar 5 ensayos consecutivos. El límite de sensibilidad del sistema fue de 0.3 Unidades/ml.

Con objeto de corroborar que el desplazamiento observado con los estándares de concentración conocida fuese el adecuado, se procedió al análisis de diluciones seriadas de una muestra sérica con un título elevado de Actg. Los resultados obtenidos se indican también en la Tabla y Figura IV.

Al comparar los resultados obtenidos (Unidades/ml) en el sistema implementado, con los proporcionados por el sistema comercial (dilución), se obtuvo una correlación adecuada, como se muestra en la Figura V.

TABLA I. PURIFICACION DE Tg EN SEPHADEX G-200.

No. fracc.	Concentración proteica		Conc. Tg µg/ml
	D.O.	Lowry (mg/ml)	
1	0.06	0.0	0
2	0.06	0.0	0
3	0.06	20.0	0
4	0.06	41.5	0
5	0.05	92.4	0
6	1.86	154.1	260
7	3.04	214.0	880
8	3.04	201.0	380
9	0.56	81.0	52
10	0.46	71.0	22
11	0.71	100.1	28
12	1.14	154.1	14
13	0.70	140.7	6
14	0.30	100.5	14
15	0.25	76.3	14
16	0.25	91.1	22
17	0.22	88.9	6
18	0.24	52.9	12
19	0.52	40.0	0
20	0.62	100.1	0
21	0.62	81.7	0
22	0.13	64.3	0
23	0.02	64.3	0
24	0.01	70.1	0
25	0.00	41.5	0
26	0.00	0.0	0
27	0.00	0.0	0
28	0.00	0.0	0
29	0.00	0.0	0
30	0.00	0.0	0

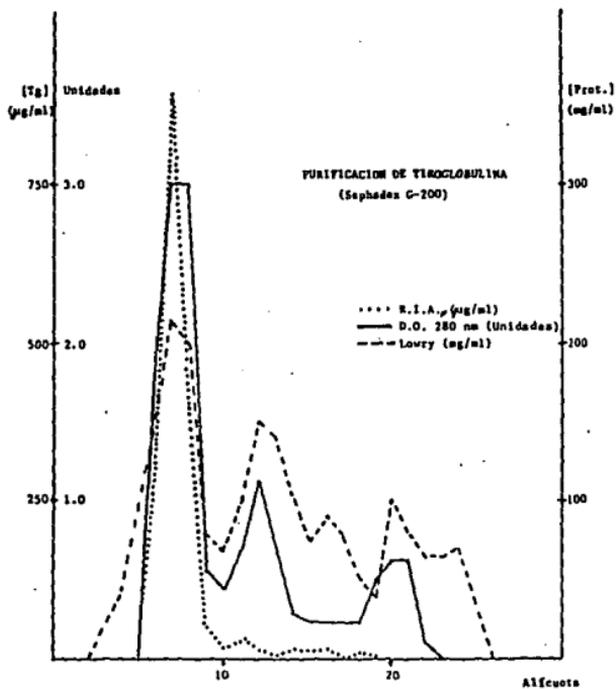


FIGURA I. PURIFICACION DE Tg EN SEPHADEX G-200

TABLA II. PURIFICACION DE T₉ EN SEPHAROSA 4B.

No. fracc.	Concentración proteica		Conc. T ₉ (μg/ml)	Nefelometría
	D.O.	Lowry (mg/ml)		
1	0.01	30.8	0	0.6
2	0.01	52.2	0	1.5
3	0.01	53.0	0	2.7
4	0.00	32.1	0	3.2
5	0.60	80.4	0	4.6
6	0.97	97.8	20	5.7
7	0.26	84.4	32	6.2
8	0.22	45.5	44	7.0
9	0.33	56.2	88	7.0
10	0.60	88.4	200	7.7
11	1.25	99.0	220	8.9
12	2.16	108.5	440	11.4
13	2.42	180.9	720	12.4
14	1.67	99.0	320	9.9
15	0.78	84.4	240	7.4
16	0.27	73.7	116	7.0
17	0.12	76.3	48	6.2
18	0.39	58.9	14	5.7
19	0.39	73.7	0	4.4
20	0.06	42.8	0	3.7
21	0.00	50.9	0	3.0
22	0.00	50.9	0	2.2
23	0.00	53.6	6	3.7
24	0.01	26.8	0	3.3
25	0.01	24.1	0	2.0
26	0.01	26.8	0	1.9
27	0.01	25.4	0	1.2
28	0.01	20.1	0	1.0
29	0.01	17.4	12	1.8
30	0.00	13.4	0	1.9
31	0.00	4.0	0	2.0
32	0.00	0.0	12	1.2
33	0.00	0.0	0	1.8
34	0.01	0.0	6	1.7
35	0.01	0.0	12	2.5
36	0.01	0.0	0	1.0
37	0.01	0.0	6	0.7
38	0.01	0.0	12	1.6
39	0.00	0.0	0	1.4
40	0.00	0.0	0	1.0

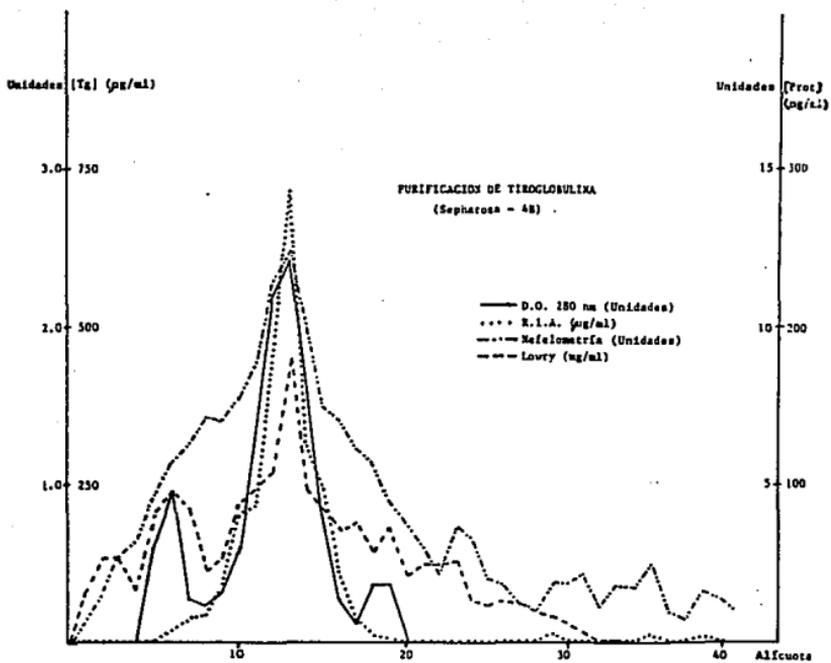


FIGURA II. PURIFICACION DE Tg EN SEPHAROSA 4B

TABLA III. RADIOMARCACION DE Tg .

No. tubo	Yodación (cpm)	Immunorreactividad (cpm)	(%U)
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	138	0	0
9	7774	7095	91
10	61699	55845	90
11	83373	81015	97
12	30578	17505	57
13	4406	3195	72
14	906	0	0
15	254	0	0
16	150	0	0
17	86	0	0
18 - 30	0	0	0

Actividad Específica = 7 Ci/g (25.9 x 10¹⁰ Bq / g)

Eficiencia de Marcación = 27%

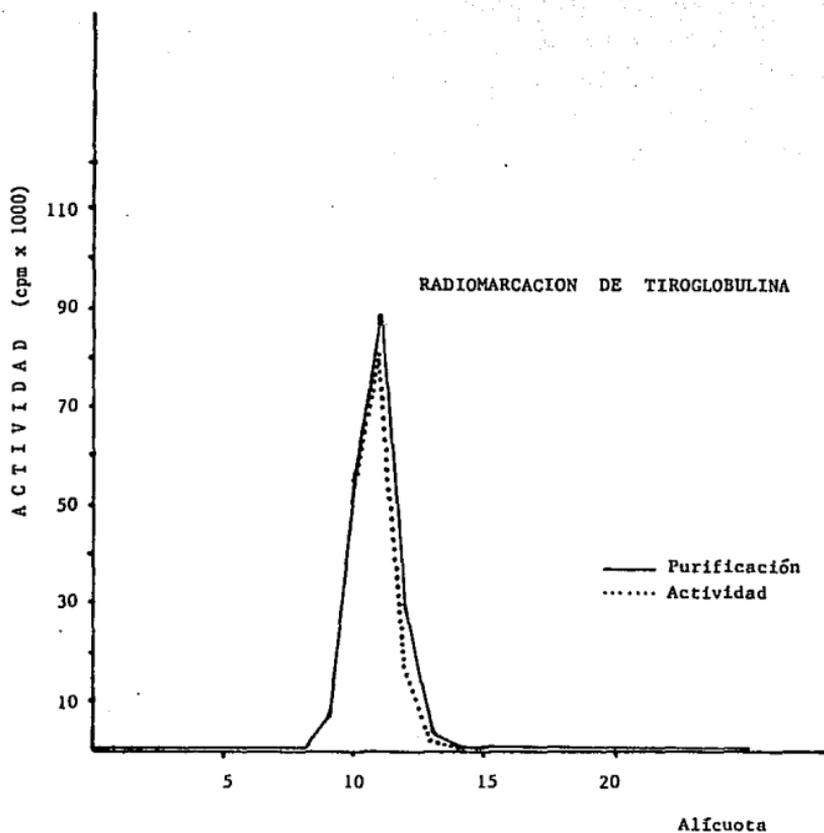


FIGURA III. RADIOMARCACION DE TIROGLOBULINA
(Lactoperoxidasa)

TABLA IV. ESTANDARIZACION DEL SISTEMA DE RIA.

AcTg (U/ml)	Unión	
	20°C	37°C
0.0	1.6	1.5
0.5	5.0	11.6
1.0	10.5	27.4
3.0	16.8	44.4
10.0	24.7	84.2
100.0	30.0	91.0
M. Sérica (+)		
	Unión (37°C)	
1:16	8.8	
1:8	23.2	
1:4	43.0	
1:2	70.6	
S/dil	49.0	

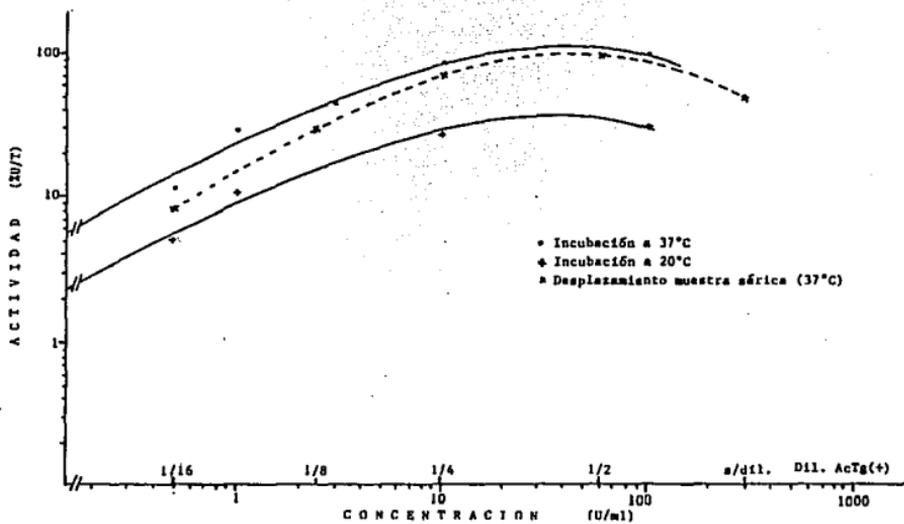


FIGURA IV. ESTANDARIZACION DEL SISTEMA

TABLA V. COMPARACION DE LOS DOS SISTEMAS (IA y RIA)

INMUNOAGLUTINACION (TITULO)	R. I. A. (U/ml)
Negativo	0.2
Negativo	0.3
Negativo	0.3
Negativo	0.4
Negativo	0.8
Negativo	1.2
1/800	0.4
1/800	0.6
1/1600	0.7
1/1600	0.7
1/3200	0.9
1/3200	1.0
1/6400	1.8
1/6400	2.3
1/6400	2.5
1/12800	3.8
1/12800	4.0
1/12800	4.2
1/12800	4.7
1/12800	8.0
1/25600	6.6
1/25600	6.9
1/25600	8.4
1/25600	9.0
1/25600	12.9
1/51200	18.9
1/51200	25.0
1/51200	28.5
1/51200	30.0
1/51200	32.9
1/102400	27.4
1/102400	25.9
1/102400	35.7
1/102400	>40.0
1/102400	>40.0

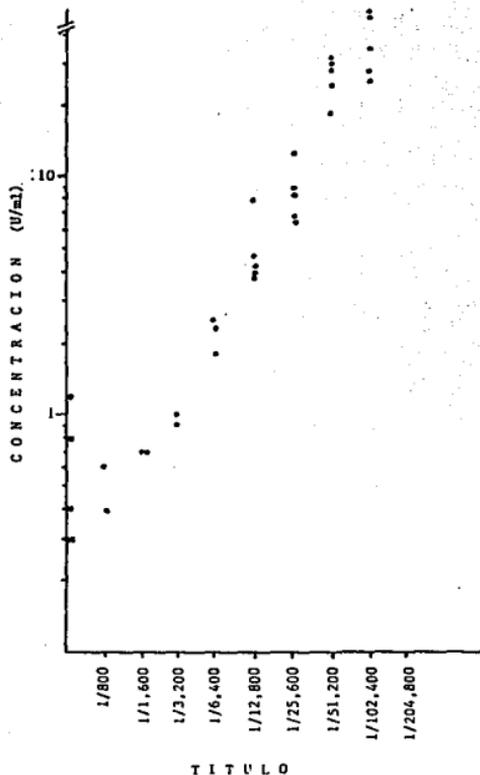


FIGURA V. COMPARACION DE LOS DOS SISTEMAS

4.2. DISCUSION.

El objetivo de este trabajo de tesis fue el implementar un sistema analítico que permitiese la detección de AcTg debido a la importancia de la medición de los mismos en el diagnóstico y seguimiento de los padecimientos tiroideos de origen autoinmune. Para éello, fue necesario extraer la protefna partiendo de tejido tiroideo humano utilizando una metodología que conjunta a varias técnicas descritas en la literatura y se apoya tanto en las propiedades fisicoquímicas de la protefna, como en las facilidades de laboratorio.

La homogeneización de 1 g de tejido humano proporcionó 3 mg de Tg ; lo que representa un rendimiento de 0.30%, cifra bastante aceptable si se consideran las manipulaciones metodológicas que permitieron la obtención de esta protefna con un alto grado de pureza.

El perfil de elución de la purificación en Sephadex G-200 (Figura I) muestra claramente las fracciones en las cuales la Tg pudiera estar presente. Tanto la posterior cuantificación de proteínas totales por Lowry, como la medición específica de Tg, por RIA, definieron con mayor exactitud las fracciones de interés, coincidiendo esta información con la preliminar obtenida a D.O. de 280 nm.

El perfil de elución de la segunda purificación, en Sepharosa 4B (Figura II), mostró tres áreas diferentes que al someterse a cuantificación de proteínas totales y de

Tg específicamente, evidenciaron la presencia de isoformas de ésta, producidas en menor cantidad como consecuencia del proceso de purificación a que se sometió. Los resultados obtenidos con la Nefelometría indicaron actividad inmunogénica en las tres áreas.

La abundancia de Tg en las fracciones que constituyen el pico central del perfil y la mayor respuesta inmunogénica de esta fracción, la señalan como la Tg nativa o 19 S. Los resultados anteriores concuerdan con lo descrito en la literatura, por lo que esta fracción fue seleccionada para la implementación del sistema analítico.

En lo que respecta a la radiomarcación de la proteína, a pesar de que la actividad específica del producto radiomarcado fue de 7 Ci/g (25.9×10^{10} Bq/g), la eficiencia del procedimiento es bastante aceptable (27%) y el daño proteico ocasionado fue prácticamente despreciable, pues la inmunogenicidad se conservó en aproximadamente el 90%, por lo que el producto de la radiomarcación es bastante aceptable (Figura III).

Referente a la implementación del sistema de RIA, en base a la información bibliográfica se seleccionó la dilución de la muestra (1:20), de manera que solamente se probaron variaciones en la temperatura del sistema.

La curva obtenida a temperatura ambiente (20°C - 16 h) mostró un desplazamiento muy pobre, indicando la necesidad de prolongar el tiempo de reacción o incrementar la temperatura del sistema, con el fin de favorecer la

interacción entre las moléculas de Ag y Ac de la muestra. Al incrementar la temperatura del sistema (37°C), manteniendo constante el tiempo de reacción, se obtuvo una mejor respuesta en la curva de calibración, situación que fue reproducida al someter al mismo procedimiento y bajo las mismas condiciones diluciones seriadas de una muestra sérica con un título elevado de AcTg (Figura IV).

La reproducibilidad del sistema, bajo las condiciones seleccionadas (37°C - 16 h), quedó de manifiesto al obtenerse un coeficiente de variación (CV) intra-análisis de 3.5% e inter-análisis de 6.0%; sobre todo, si se considera que en este tipo de sistemas el CV aceptado es de 15.0%.

La sensibilidad de 0.3 Unidades/ml es otro de los parámetros de control de calidad que pone de manifiesto la bonanza del sistema implementado.

La correlación observada, al comparar los resultados de muestras séricas procesadas por este sistema de RIA y por un sistema comercial de inmunoaglutinación, muestra, como se observa en la Figura V, un coeficiente de correlación aceptable ($r = 0.87$).

La especificidad del sistema quedó demostrada al obtener resultados negativos (<1.5 Unidades/ml) en muestras séricas procedentes de sujetos con tiroiditis de Hashimoto, que presentaban títulos elevados para AcTPO.

CAPITULO V

CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

1. Se describe un procedimiento que permite la extracción y purificación de la Tg con un rendimiento adecuado de la proteína y un alto grado de pureza de la misma.

2. Fue posible establecer condiciones de radiomarcaje de la proteína, manteniendo íntegra la actividad inmunogénica de la molécula, es decir, produciendo un daño mínimo en la estructura de la misma.

3. Se logró implementar un sistema de RIA sensible y específico que permite la detección de AcTg que a pesar de que únicamente fue valorado en muestras séricas, no se descarta la posibilidad de utilizarlo satisfactoriamente en la cuantificación de AcTg presentes en otros fluidos biológicos.

4. La información obtenida al comparar ambos sistemas, pone de manifiesto la mayor sensibilidad del RIA para la detección de AcTg, situación que concuerda con los resultados reportados por otros autores.

Si bien es cierto que el trabajo desarrollado implica el conocimiento de diversas áreas del laboratorio químico, muchas veces de alto grado de especialización, los logros alcanzados se traducen en la disponibilidad de material analítico para su empleo rutinario en el laboratorio clínico.

BIBLIOGRAFIA.

1. Anderson, J.W., Mc. Conahey W.M., Diagnostic value of thyroid antibodies. J. Clin. Endocr. 27:937, 1967.
2. Beever K., Bradbury J.. Highly sensitive assays of autoantibodies to thyroglobulin and thyroid peroxidase. Clin. Chem. 35:1949, 1989.
3. Berson, S.A.; Yallow, R.S.. Assay of plasma insulin in human subjects by immunologic methods. Nature 184:1648, 1954.
4. Cloget, A.J. and Weigle, W.O. Roles of T and B lymphocytes in the termination of unresponsiveness to autologous thyroglobulin in mice. J. Exp. Med. 139:643, 1974.
5. Derrien, Y.R.; Michel, J. Recherches sur la preparation et les propriétés de la thyroglobulina pure I. Biochem. Biophys. Acta 2:454, 1948.
6. Derrien, Y.R.; Michel, J. Recherches sur, la preparation et les propriétés de la thyroglobulina pure II. Biochem. Biophys. Acta 3:436, 1949.
7. Edelhoch, M. The properties of thyroglobulin I. The effects of alkali. J. Biol. Chem. 235:1326, 1960.

8. Edelhoeh, M. and Lippoid, R.E. The properties of thyroglobulin II. The effects of sodium dodecylsulfate. J. Biol. Chem. 235:1335, 1960.
9. Edelhoeh, M.; Carlomagno S.; Salvatore G. Iodine and structure of thyroglobuline. Arch. Biochem. Biophys. 134:264, 1969.
10. Edwards R., Immunoassay, Ed. William Heinemann Medical Books., London, 1985.
11. Freeman, M.L.; Blaurock, M.D: Radioimmunoassay. Ed. Giune and Stratton, Inc. ,U.S.A., 1975.
12. Guyton, A.C.. Medical Physiology. W. B. Saunders, 6a. ed., London, 1981.
13. Hamilton, H.K. Diagnóstico clínico. Interamericana, México, D.F., 1985.
14. Jan I.; Thorell S., Larson M. Radioimmunoassay and related techniques methodology and clinical application. Mosby Co., St. Louis, 1978.

15. Mariotti, S.; De Groot L.J. Study of circulating immune complexes in thyroid disease: comparison of Raji cell radioimmunoassay and specific thyroglobulin-antithyroglobulin radioassay. J. Clin. Endoc. & Metab. 49:5:679, 1979.
16. Lowry O.H., Rosebrough N.S., Farr, A.L., Randall, R.J., Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265, 1951.
17. Marchalonis, J.J. An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins. Biochem. J. 113:299, 1969.
18. Oppenheimer J.H., Burrow G.N., Volpé R., Thyroid function and disease . Ed. Saunders Co., PA. U.S.A., 1989.
19. Peter, J.B., Thyroid autoimmunity. In search of antibodies. Diagnostic Medicine. Jul-Ago, 1981.
20. Quiroz, G.F. Anatomía humana. Porrúa, 18a. ed., México, D.F., 1978.
21. Robbins, J.J.; Rail E. Proteins associated with the thyroid hormones. Phys. Rev. 40:415, 1960.

22. Robbins, J.J.. Fractionation of thyroglobulin on diethylamino-ethyl cellulose columns. J. Biol. Chem. 238:182, 1963.

23. Roitt I.M.; Doniach, D.; Campell P.N. and Vaughan H.R. Autoantibodies in Hashimoto's disease. (Lymphadenoid goitre)Lancet 2:820, 1956.

24. Roitt I.M.; Doniach D. Human autoimmune thyroiditis serological studies. Lancet 2:1027, 1958.

25. Roitt I.M. and Torriglioni G. Identification and estimation of undegraded thyroglobulin in human serum. Endocrinol. 81:421, 1967.

26. Salvi, M., Fukasawa H., Bernard N., Hromatsy Y., How J., Wall J.R., Role of autoantibodies in the pathogenesis and association of endocrine autoimmune disorders. Endoc. Rev. 9:4:450, 1988.

27. Salvatore G.; Sena L.; Visali E.; Salvatore M. The thyroid iodoproteins 12S, 19S, 27S in various animal species and their physiological significance. In: Cassano C., Andreoli M. eds. Comment Topics in Thyroid Research. pp. 193, N.Y. Acad. Press, 1965.

28. Seed, R.W. and Goldberg J.H. Biosynthesis of thyroglobulin II. Role of subunits. Iodination and ribonucleic acids synthesis. J. Biol. Chem. 240:764, 1965.
29. Shulman S., Armenia J.P., Studies of thyroid proteins. J. Biol. Chem. 238:8:2723, 1963.
30. Shulman S. Thyroid antigens and autoimmunity. Adv. in Immunol. 14:85, 1971.
31. Spiro J.M., Subunit heterogeneity of thyroglobulin. J. Immunol. 12:4446, 1973.
32. Tao T., Cheng P., Pham H., Leu S., Kriss J., Monoclonal antithyroglobulin antibodies derived from immunizations of mice with human eye muscle and thyroid membranes. J. Clin. Endoc. & Metab. 63:3:577, 1986.
33. Thorell J.L. and Johansson B.G. Enzymatic iodination of polypeptides with ¹²⁵I to high specific activity. Biochem. Biophys. Acta 251:363, 1971.
34. Tuskynski G.P., Knight L.C., Labeling of platelet surface proteins with ¹²⁵I by the iodogen method. Anal. Biochem. 130:166, 1983.

35. Thyroglobulin Double Antibody R.I.A. Kit, D.P.C., 1992. (instructivo)
36. Valenta L., Roques M., Torresani J., Rolland M., Lissitzky P. Human thyroglobulin physicochemical properties in relation to iodine content. Biochem. & Biophys Acta 168:507, 1968.
37. Van Herle A. J., Vassart G., Control of thyroglobulin synthesis and secretion I. Engl. J. Med. 301:5:239, 1979.
38. Van Herle A. J., Vassart G., Control of thyroglobulin synthesis and secretion II. Engl. J. Med. 301:6:307, 1979.
39. Vassart G., Refetof S., Brocas H., Dinsart C., Dumont J.E Translation of thyroglobulin 33S messenger RNA as a means of determining thyroglobulin quaternary structure. Biochem. 72:3839-3943, 1975.
40. Voller A.; Bidwell, D.E. and Bortlett A. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate application. Dynatech lab. Inc., 1979.

41. Weigle, W.O. **Experimental autoimmune thyroiditis.**
In: **Endocrino Decennial Pathology. 1966-1976.** pp. 229- Summers
C.S. ed. N.Y., U.S.A., 1975.

42. Wener S.; Ingbar H.; Baverman E.L. **The thyroid. A
fundamental and clinical text.** J.B. Lippincot, 5th., ed. Pha,
1986.

43. William H.R. **Tratado de Endocrinología.** Salvat ed., 5a.
ed., Barcelona, España, 1979.

44. Witebsky E.R.; Terplan R.N.; Paine K. and Egan R.W.
Chronic thyroiditis and autoimmunization. J. Am. Med. Assoc.
169:1439, 1957.