

Medida de la triiodo-L-tironina total en suero de rata mediante radioinmunoanálisis homólogo

M. Morell * y V. J. Fernández-Pastor

Departamentos de Fisiología y de Bioquímica
Facultad de Medicina
29080 Málaga (Spain)

(Recibido el 24 de octubre de 1985)

M. MORELL and V. J. FERNANDEZ-PASTOR. *A Homologous Radio-immunoassay for Total Tri-iodo-L-thyronine in Rat Serum*. Rev. esp. Fisiol., 42 (3), 383-388, 1986.

A radioimmunoanalytical comparative study of total tri-iodo-L-thyronine patterns in human and rat sera revealed a quantitative difference between the amounts of labelled antigen which associated with the specific antibody in each case. At the same time, in another experiment, three different protein concentrations were dissolved in rat serum standards producing the results that, at lower protein concentrations a larger quantity of antigen/antibody complex was formed. These changes must be kept in mind for the L-T₃ measurement in rat serum.

Key words: Homologous radio-immunoassay, Tri-iodo-L-thyronine, Rat.

Existe una gran discordancia entre los datos de concentración de hormonas tiroideas en suero de rata, que se publican, que puede deberse tanto a los diversos procedimientos empleados en las técnicas experimentales, que alteran la función tiroidea (14), como a los métodos analíticos. Aunque algunos investigadores han ido desarrollando sus propios métodos específicos para la valoración de hormonas tiroideas (10, 12), existe aún una tendencia, impuesta por la economía y la simplicidad, a emplear, en la determinación de hormonas tiroideas de animales de experimentación, procedimientos co-

mercializados para estudios en humanos (6,9).

Algunos autores insisten en la necesidad de evitar la heterogeneidad de especies y de mantener la concentración de proteínas en muestras y estándares (4, 17), y se ha propuesto una serie de modificaciones necesarias, para la aplicación de procedimientos comerciales, en la determinación por radioinmunoanálisis de hormonas tiroideas totales, en animales de experimentación (15).

En este trabajo se comparan, en igualdad de condiciones experimentales, la variable «sérica» (suero humano y de rata) en curvas patrones; y la variable «concentración proteica», por radioinmunoanálisis homólogo de triiodo-L-tironina total en suero de rata.

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

Material y Métodos

Experimento A: Comparación de curvas patrones de triiodo-L-tironina realizadas en suero (humano y de rata) por RIA.

Se procedió a la obtención de un conjunto de sueros de rata macho, Wistar, de 70 días de edad, bajo anestesia con éter etílico, y a dejarlo libre de hormonas tiroideas, con un estudio paralelo de recuperación de la resina (Dower, 2×8) (15), determinándose la concentración de proteínas totales del suero, por el método de Lowry (8) y ajustada mediante la adición de suero fisiológico, a la concentración proteica de los estándares humanos.

A continuación se elaboraron las soluciones patrones, donde la disolución empleada de triiodo-L-tironina (Sigma, L-T₃ sódica), se estableció a una concentración de 20 µg/l y se efectuó en solución tampón de fosfato 0,01 M, bajo control de termoagitación a 20 °C, ajustándose el pH con NaOH 0,1 N a 7,5. Se hicieron 7 diluciones correspondientes a cada uno de los puntos del ensayo a 0, 0,2, 0,4, 1, 2, 4 y 8 ng de L-T₃/ml. Cada solución patrón presentó, dos volúmenes: (a) 250 µl de la solución de L-T₃ más tampón fosfato, y (b) 250 µl del suero de rata anteriormente obtenido (dilución 2:1). Las soluciones patrones de suero humano fueron reconstituidas según protocolo (Amersham) y determinada su concentración proteica (8).

Establecidas las diluciones de los patrones séricos (humano y de rata), se efectuó el análisis con 25 µl de cada punto de los estándares, 500 µl de trazador y otros 500 µl de anticuerpo (facilitados por Amersham). El tiempo de incubación fue de 60 minutos, a 37 °C. La centrifugación se realizó a 2.100 g, a 4 °C. Tras la decantación se procedió a la lectura en contador gamma de centelleo sólido.

Experimento B: Comparación de los estándares en suero de rata, a las siguientes

concentraciones proteicas totales: 6,6, 3,3 y 0,02 g/100 ml.

La obtención de los sueros de rata desprovistos de hormonas tiroideas y el estudio paralelo de recuperación se realizó como en el caso anterior (15). Asimismo, se determinó la concentración de proteínas siguiendo el método de Lowry (8).

Para la elaboración de las soluciones patrones se siguió, para el volumen (a), las mismas consideraciones antes indicadas. Para el volumen (b) se establecieron 250 µl de suero de rata desprovisto de hormonas tiroideas (15) y una dilución (1:165) para el estándar (3), realizado a una concentración proteica de 0,02 g/100 ml; a dilución (1:1) para el estándar (4), realizado a una concentración proteica de 3,3 g/100 ml; y a dilución (2:1) para el estándar (5), que tenía una concentración proteica de 6,6 g/100 ml, estableciéndose el procedimiento de determinación por RIA anteriormente indicado.

En todos los análisis se han efectuado estudios de reproducibilidad, tanto intraanálisis como interanálisis (con 7 y 6 experimentos respectivamente), análisis estadístico de las pendientes y de las ordenadas en origen, así como estudios de la sensibilidad, de la precisión según los criterios de BROWN (1), junto a los coeficientes de variación de cada punto de los estándares y de la exactitud de los resultados, según los criterios de KRAUSE (7).

Resultados y Discusión

Experimento A: comparación de radioinmunoanálisis no homólogos (humano y de rata) (fig. 1). La recuperación encontrada en el conjunto de muestras séricas de rata ha sido del 99,85 %. Las concentraciones medias de proteínas totales de las soluciones patrones fueron: en los sueros humanos, de $6,4 \pm 0,08$ g/100 ml, y de $6,6 \pm 0,03$ g/100 ml en los de rata, sobre 6 determinaciones efectuadas en ambos casos. Se aprecia en los resultados

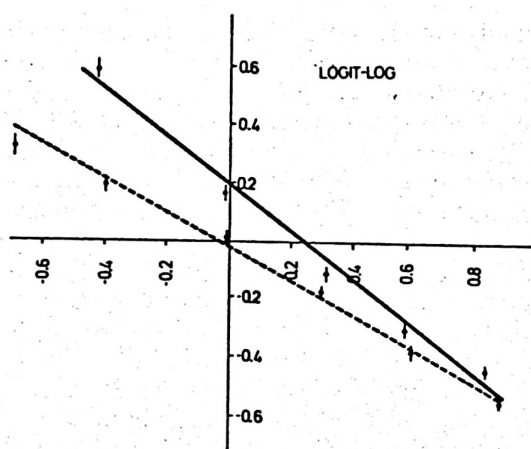


Fig. 1. Comparación de estándares no homólogos de triodo-L-tironina total.

— Estándar 1, realizada en suero humano: $r = -0,9920$. - - - Estándar 2, elaborada en suero de rata: $r = -0,9971$.

que, los estándares confrontados, presentan, tras el análisis de las pendientes realizado, una diferencia estadísticamente muy significativa, de $p < 0,005$, observándose que los patrones de suero de rata se encuentran por debajo de los realizados en suero humano. El efecto no específico, en este tipo de valoración, de cada suero sobre la reacción antígeno-anticuerpo, difiere en el de rata y en el humano. El error puede ser debido a una diferencia cuantitativa en los efectos de ambos sueros sobre la cantidad del antígeno marcado unido a su anticuerpo, o bien podría ser el resultado del mayor efecto inhibitor, sobre la reacción antígeno-anticuerpo, de las proteínas séricas de rata respecto a las del suero humano.

Esta diferencia podría darse en varias etapas: Primeramente, hay un cambio en el aprovechamiento de la hormona libre, debido a una afinidad diferente de la proteína de rata por la hormona tiroidea, como ha sido propuesto por STRINGER *et al.* (15). En segundo lugar, podría haber una interferencia directa con la reacción de

unión antígeno-anticuerpo; y en tercer lugar, podría existir también una diferencia en la recuperación de la cantidad de hormona marcada después de la centrifugación (15).

El fenómeno de efecto no específico de la proteína ha sido descrito con anterioridad (5, 15, 16), siendo frecuentemente atribuido a la interferencia con el complejo antígeno-anticuerpo. Estos mecanismos, no obstante, aún permanecen inciertos y sujetos a futuras investigaciones.

Existe una convergencia de ambas curvas patrones hacia el mayor rango, apreciándose una menor diferencia cuantitativa de antígeno marcado unido a su anticuerpo, cuanto mayor es la concentración de triodo-L-tironina en la curva estándar, por lo que la parcialidad de los resultados en la que se incurre con el uso de reactivos de procedencia humana inmodificados, no sería constante y podría variar considerablemente a la escala de concentración estudiada. Por esta razón no sería posible realizar una comparación relativa para medir muestras de rata en curva patrón de suero humano, considerando simplemente un factor de corrección (6).

En el aspecto comparativo son de destacar los resultados previamente publica-

Tabla 1. Datos sobre la sensibilidad, precisión y exactitud obtenidos en los ensayos realizados en los experimentos A y B.

Estándar 1: en suero humano; estándar 2: en suero de rata; estándar 3: a una concentración proteica total de 0,02 g/100 ml; estándar 4: a 3,3 g/100 ml; y estándar 5: a 6,6 g/100 ml.

Estándar	Sensibilidad (ng/ml)	Precisión (ng/ml)	Exactitud (%)
1	0,37	0,0558	102,6
2	0,20	0,0637	98,5
3	0,20	0,0605	99,3
4	0,20	0,0522	98,8
5	0,20	0,0642	98,4

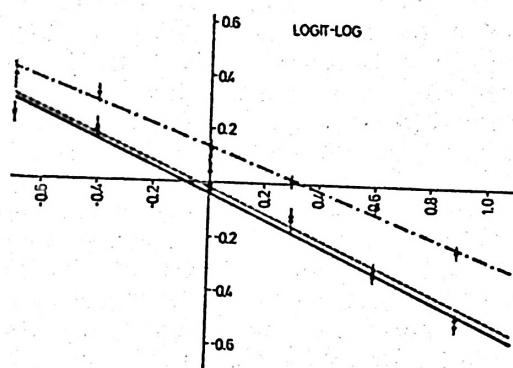


Fig. 2. Comparación de ensayos de triodo-L-tironina realizados en suero de rata, a distintas concentraciones proteicas.

— · — · — Estándar 3: 0,02 g de proteínas/100 ml, $r = -0,9958$. - - - Estándar 4: 3,3 g de proteínas/100 ml, $r = -0,9858$. — Estándar 5: 6,60 g de proteínas/100 ml, $r = -0,9905$.

dos (13), de triodo-L-tironina sérica en rata adulta ($0,40 \pm 0,04$ ng/ml), semejantes a los obtenidos por OBREGON *et al.* (11) ($0,65 \pm 0,1$ ng/ml) y NEJAD *et al.* (10) ($0,58 \pm 0,06$ ng/ml), empleando métodos modificados. Otros autores (9), utilizando estándares diluidos en suero humano, obtienen resultados más altos que los antes citados ($1,83 \pm 0,3$ ng/ml).

Experimento B: Comparación de curvas patrones realizadas en suero de rata a distintas concentraciones proteicas (fig. 2): Existe un paralelismo entre los estándares homólogos efectuados a distintas concentraciones proteicas, así como una ordenada mayor en el origen en los análisis realizados a menor concentración proteica, lo que representa, desde el punto de vista estadístico, diferencias significativas, ($p < 0,001$), entre la valoración con suero de rata realizado a 0,02 g/100 ml de proteínas totales y los realizados a 6,6 y 3,3 g/100 ml, los cuales no presentan entre sí diferencias estadísticamente significativas.

Según esto, se podría pensar que, en las valoraciones de T_3 total, la menor

concentración proteica de las soluciones patrones lleva implícito un menor efecto inhibidor proteico sobre la reacción antígeno-anticuerpo.

Los coeficientes de variación obtenidos como índices de precisión, en los estudios de reproducibilidad intra- e interanálisis en ambos experimentos A y B (figs. 1 y 2), han sido menores al 4 y al 14 % respectivamente, de acuerdo con los criterios estadísticos (2, 3).

Para que el RIA de T_3 total sea lo suficientemente preciso y exacto parece necesario utilizar el suero del animal de experimentación libre de hormonas tiroideas para elaborar las soluciones estándares y además, igualar las concentraciones proteicas entre muestras y patrones.

Resumen

Se estudian comparativamente, por radioinmunoanálisis, patrones de triodo-L-tironina total realizados en suero humano y en suero de rata. Existe una diferencia cuantitativa en los efectos que cada uno de estos sueros tiene sobre la cantidad del antígeno marcado, que se une a su anticuerpo en ambos casos. Asimismo, se ha estudiado el comportamiento del antígeno marcado frente a su anticuerpo, al cambiar la concentración de proteínas del suero de rata en el que se disuelven los estándares, resultando que, a menor concentración proteica existe una mayor cantidad de complejo antígeno marcado-anticuerpo. Se concluye que para que el RIA sea lo suficientemente preciso y exacto, además de ser homólogo, es necesario mantener igualados los niveles proteicos entre muestras y patrones.

Bibliografía

1. Brown, B. L., Ekins, R. P., Ellis, S. M. y Reith, W. S.: *Nature*, **226**, 359-368, 1970.
2. Carrasco, J. L.: El método estadístico en la investigación médica. Ed. Ciencia 3. Madrid, 1983.
3. Challand, G., Goldie, D. y Landon, J.: *Br. Med. J.*, **30**, 38-45, 1974.
4. Hunter, W. M.: *Br. Med. Bull.*, **30**, 18-24, 1974.
5. Hurn, B. A. L. y Landon, J.: En «Antisera for

- radioimmunoassay» (Kirkham, K. E. y Hunter, W. M., ed.). Radioimmunoassay Methods. European work-shop, Edimburgo, 1970, pp. 63-84.
6. Jordan, D., Rousset, B., Perrin, F., Fournier, M. y Orgiazzi, J.: *Endocrinology*, 107, 1245-1248, 1980.
 7. Krause, P. K., Hummerich, W. y Poulsen, K.: Radioimmunoassay of Renin-Angiotensin System. G. Thieme Pub., Stuttgart, 1978.
 8. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265-272, 1951.
 9. Nataf, B. M., Fragu, P. y Othman, S. D.: *Acta Endocr. Copenh.*, 88, 499-505, 1978.
 10. Nejad, I., Bollinger, J., Mitnick, M. A., Sullivan, P. y Reichlin, S.: *Endocrinology*, 96, 773-780, 1975.
 11. Obregón, M. J., Pascual, A., Morreale de Escobar, G. y Escobar del Rey, F.: *Endocrinology*, 104, 1467-1473, 1979.
 12. Rookh, V. H., Azukinawa, M., Distefano, J. J., Ogihara, Y. T. y Hershman, J. M.: *Endocrinology*, 104, 852-856, 1979.
 13. Sabell, I., Morata, P., Fernández-Pastor, V. J. y Morell, M.: *Rev. esp. Fisiol.*, 41, 61-68, 1985.
 14. Sabell, I., Morata, P., Quesada, J. y Morell, M.: *Enzyme*, 34, 27-32, 1985.
 15. Stringer, B. M. J. and Wynford-Thomas, D.: *Hormon Res.*, 16, 392-397, 1982.
 16. Tede, J. D.: Scientific foundations of clinical biochemistry. Williams, Nunn, Marks, ed., Londres, 1978.
 17. Yalow, R. S. y Berson, S. A.: En «Problems of validation of radioimmunoassay» (Odell, W. D. y Daughaday, W. H., eds.), Competitive Protein Binding Assays. J. B. Lippincott Company. Filadelfia, 1971, pp. 542-549.

