

Un método sencillo para la medición de la triyodotironina en suero por radioinmunoanálisis utilizando columnas de Sephadex G-25

Guillermo Arango R. *
y Heinz W. Wahner **

Un nuevo método para la medición de la triyodotironina (T3) en suero ha aparecido recientemente en el comercio; puede efectuarse en un corto período de tiempo, aproximadamente 4 horas, en cualquier laboratorio equipado con un contador de pozo para rayos gamma. El método es muy similar al que se utiliza para la tiroxina sérica, ampliamente conocido. Ambos procedimientos están al alcance prácticamente de cualquier médico interesado en el diagnóstico de las enfermedades de la tiroides.

La medición de T3 en sangre y otros líquidos biológicos ha atraído recientemente considerable atención a causa de su importancia en la fisiología tiroidea normal y patológica; aunque su papel no se ha aclarado todavía en forma completa, hay evidencias que sugieren que esta puede ser la única forma activa de hormona tiroidea al nivel celular y quizás uno de los factores más importantes en la expresión clínica del estado fun-

cional de la tiroides¹. Su medición también ha ayudado considerablemente a la caracterización del nuevo síndrome llamado "hipertiroidismo por T3"^{2,15}. Actualmente la mayoría de las indicaciones para la medición de T3 se encuentran en el campo de la investigación pero desde el punto de vista de la práctica clínica la prueba está especialmente indicada en el paciente que presenta signos y síntomas de hipertiroidismo pero cuyas pruebas usuales de función tiroidea son normales. La incidencia reportada de hipertiroidismo por T3 ha variado, desde un 5% de todos los casos de hipertiroidismo, en el Canadá³ hasta un 10% en una área donde había deficiencia de yodo⁴. En Colombia, donde existen áreas con alta incidencia de bocio, la frecuencia del síndrome no se conoce pero ya se han descrito algunos casos⁵⁻⁶.

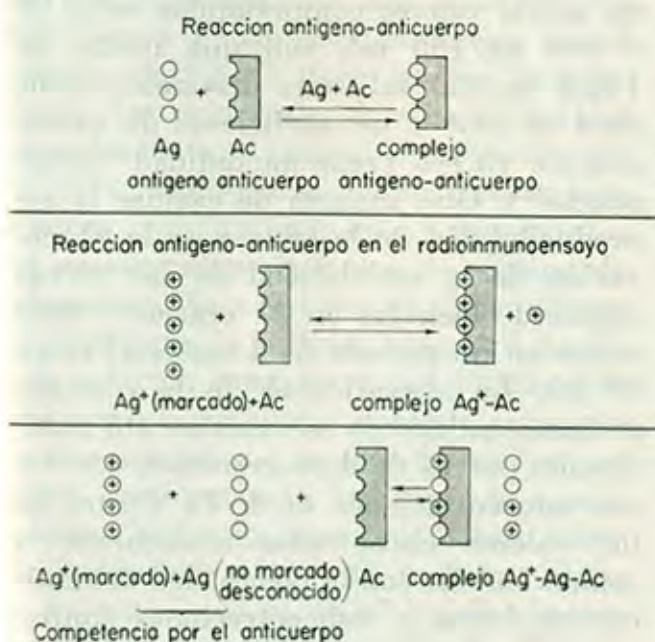
Otra interesante y probable aplicación de la medición de T3 en el suero sería la de su uso como prueba funcional del eje hipófisis-tiroides. Como lo ha demostrado Larsen⁷, la administración de TSH a pacientes eutiroides provoca un marcado aumento de los niveles séricos de T3 —(105% del nivel basal en 8 horas)— mientras que el aumento en los niveles de T4 es solo del 41% en el mismo intervalo de tiempo; tal aumento, al menos en esa magnitud, no sería de esperar en pacientes con hipotiroidismo

* Profesor de la Facultad de Medicina, Sección de Endocrinología, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia. Visitante en el Departamento de Laboratorio Clínico, Sección de Medicina nuclear de la Clínica Mayo, Rochester, Minnesota, U.S.A., en uso de una beca Latino Americana del American College of Physicians.

** Jefe, Sección de Medicina Nuclear, Departamento de Laboratorio Clínico, Clínica Mayo, Rochester, Minnesota, U. S.A.

primario. A pesar de que, como puede colegirse de lo expresado anteriormente, la ocasión para la determinación de T3 en suero puede no presentarse muy frecuentemente, el hecho de que el radioisótopo utilizado en los "Kits" (^{125}I) tiene una larga vida media, permite que estos sigan siendo utilizables por varios meses después de ser adquiridos.

El propósito de esta comunicación es la evaluación de un nuevo "Kit" para el radioinmunoanálisis de T3 que puede ya obtenerse comercialmente* y la descripción de nuestra experiencia con tal procedimiento. La Figura N^o 1 es una representación esquemática de la bien conocida reacción antígeno-anticuerpo; una breve descripción de las etapas básicas en el procedimiento del radioinmunoanálisis aparece en la Tabla N^o 1.



Descripción General de la Prueba

El "Kit" consiste en una serie de columnas de Sephadex G-25 que contiene

una solución tampón alcalina, un antisuero para T3, liofilizado, obtenido en conejos, una solución standard de T3 en sero-albúmina bovina también liofilizada, un frasco de solución tampón de fosfato de EDTA y una solución de ^{125}I -T3 con un máximo de radioactividad de 2.5 microcuries.

Tres de las columnas se utilizan como standards con las siguientes concentraciones de T3: 0.05, 0.20 y 0.40 ml. correspondiendo en la curva standard a 75, 300 y 600 nanogramos/100 ml.; el resto de las columnas se utiliza para las muestras que se quiere analizar (0.2 ml. de suero).

A cada una de las columnas, standards y desconocidos, se añade entonces la T3 marcada: el pH altamente alcalino de la columna libera la T3 de sus proteínas transportadoras y estas son enseguida extraídas de la columna. Después de reajustar el pH se añade el antisuero y la mezcla se incuba a temperatura ambiente por 2 horas para permitir la equilibración de la reacción antígeno-anticuerpo. Durante la incubación se mide la radioactividad inicial; una vez completada aquella la columna se lava nuevamente con el tampón para descartar el complejo antígeno-anticuerpo dejando en la columna únicamente el antígeno no ligado (T3) tanto marcado como no marcado. La cantidad residual de T3 marcada (cuenta final de radioactividad) es directamente proporcional a la cantidad de T3 originalmente presente en las muestras analizadas.

El conteo y los cálculos se facilitan grandemente usando el Thyrimeter* un instrumento disponible comercialmente y que es prácticamente una combinación de un contador de pozo para

* Ames ^{125}I Reagent Kit for the Quantitative Determination of Total T3 (Triiodothyronine) in serum. Ames Company Division Miles Laboratories, Inc., Elkhart, Indiana 46514, U.S.A.

* Producido por Ames Company, División Miles Laboratories, Inc., Elkhart, Indiana 46514, U. S. A.

rayos gamma con un calculador; el aparato muestra en su pantalla el porcentaje de T3 marcada retenida en la columna después del conteo final.

Por último se construye la curva standard y se obtienen los valores para los desconocidos como se explica en la Tabla N° 1. El "Kit" viene acompañado de instrucciones perfectamente detalladas.

Materiales y Métodos:

El método utilizado ya fue descrito. El estudio abarcó un total de 196 individuos distribuidos así: 13 pacientes con hipertiroidismo de los cuales 9 tenían el diagnóstico de enfermedad de Graves y 4 el de bocio nodular tóxico; 48 pacientes con hipotiroidismo distribuidos así: tiroiditis de Hashimoto 9, post-tratamiento con yodo radioactivo 9, etiología desconocida 29 y bocio congénito 1. Finalmente, 135 pacientes eutiroideos con la siguiente distribución: 27 personas normales, es decir sin ninguna enfermedad; 78 pacientes en buenas condiciones generales con enfermedades variadas pero leves y sin enfermedad tiroidea y 30 pacientes con enfermedades más severas pero sin compromiso de la función tiroidea.

La evaluación del estado tiroideo desde el punto de vista clínico fue hecha por diferentes miembros de las secciones de Endocrinología y de la Consulta de Tiroides de la Clínica Mayo con el auxilio de las pruebas usuales de función tiroidea (Tiroxina total y libre, TBG, captación de T3, TSH, etc.). Las muestras de sangre fueron obtenidas en ayunas y una vez separado el suero, este en ocasiones fue procesado el mismo día o conservado por congelación para procesamiento posterior.

Cada muestra fue analizada algunas veces en duplicado, otras en triplicado. La medición de la radioactividad se practicó en un contador de pozo para rayos

gamma, el thyrimeter, al cual ya nos hemos referido.

Resultados:

La reproducibilidad (Tabla N° 2) de la prueba se determinó con la práctica de 9 análisis verificados en la misma sesión en una muestra de suero tomada a su vez de un suero patrón formado por la mezcla de sueros de múltiples individuos no seleccionados; los valores oscilaron entre 224 y 283 nanogramos/100 ml. con un valor medio de 264.2 ng/100 ml., una desviación standard de 16.6 v un coeficiente de variación de 6.28%; dado el origen de la muestra estos valores no son representativos de la normalidad (reproducibilidad "intra-prueba"). El análisis de una misma muestra tomada de un suero patrón diferente al anterior, practicado en 19 oportunidades en días diferentes arrojó valores comprendidos entre 92 v 190 ng/100 ml, con una media de 142.2 ng/100 ml., una desviación standard de 26.6 v un coeficiente de variación de 18.7% (reproducibilidad "inter-prueba"). Otra manera de evaluar la reproducibilidad de la prueba es la observación de la variabilidad de las curvas standard obtenidas en 21 ocasiones diferentes en un período de 4 meses (Figura N° 2). La especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo se experimentó practicando curvas de dosis-respuesta con varias concentraciones de L-T3 dentro de los valores encontrados usualmente v comparándolas con la reactividad del anticuerpo frente a concentraciones similares v mucho mayores, de diiodotirosina (DIT) L-T4 (levo tiroxina) y D-T4 (dextro tiroxina). Los resultados pueden apreciarse en la Figura N° 3. En ella se observa claramente cómo mientras el anticuerpo reacciona con la L-T3 a concentraciones hasta cerca de 1 microgramo, frente a las soluciones de L-T4, D-T4 y DIT solo empieza a aparecer reactividad cruzada significativa en concentraciones de aproximadamente 50 microgramos.

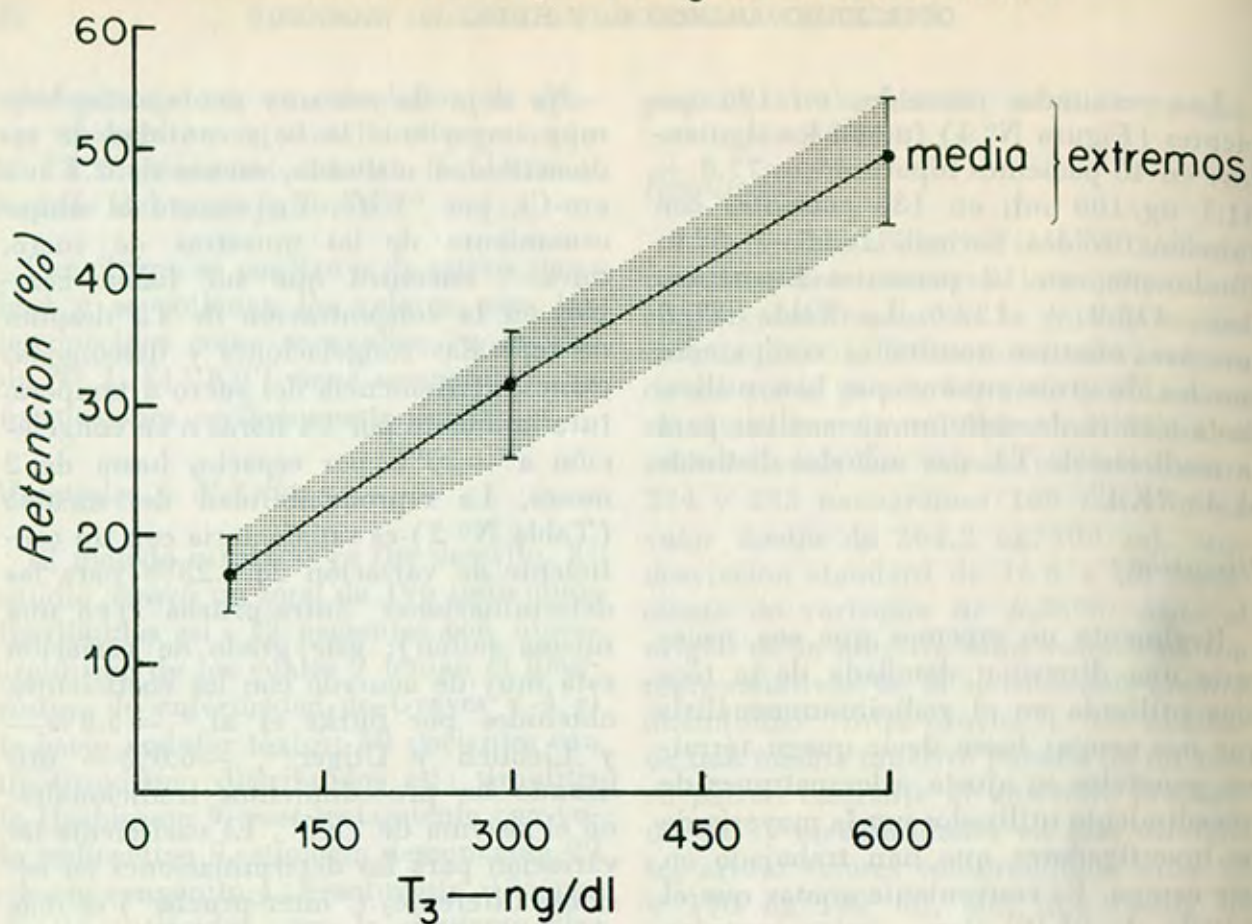
Los resultados obtenidos en 196 pacientes (Figura N° 4) fueron los siguientes: en 48 pacientes hipotiroideos 77.8 ± 61.1 ng/100 ml; en 135 pacientes con función tiroidea normal, 163.5 ± 57.4 ; finalmente, en 13 pacientes hipertiroideos, 415.8 ± 133.6 . La Tabla N° 3 muestra nuestros resultados comparados con los de otros autores que han utilizado la técnica de radioinmunoanálisis para la medición de T3, por métodos distintos al de "Kit".

Discusión:

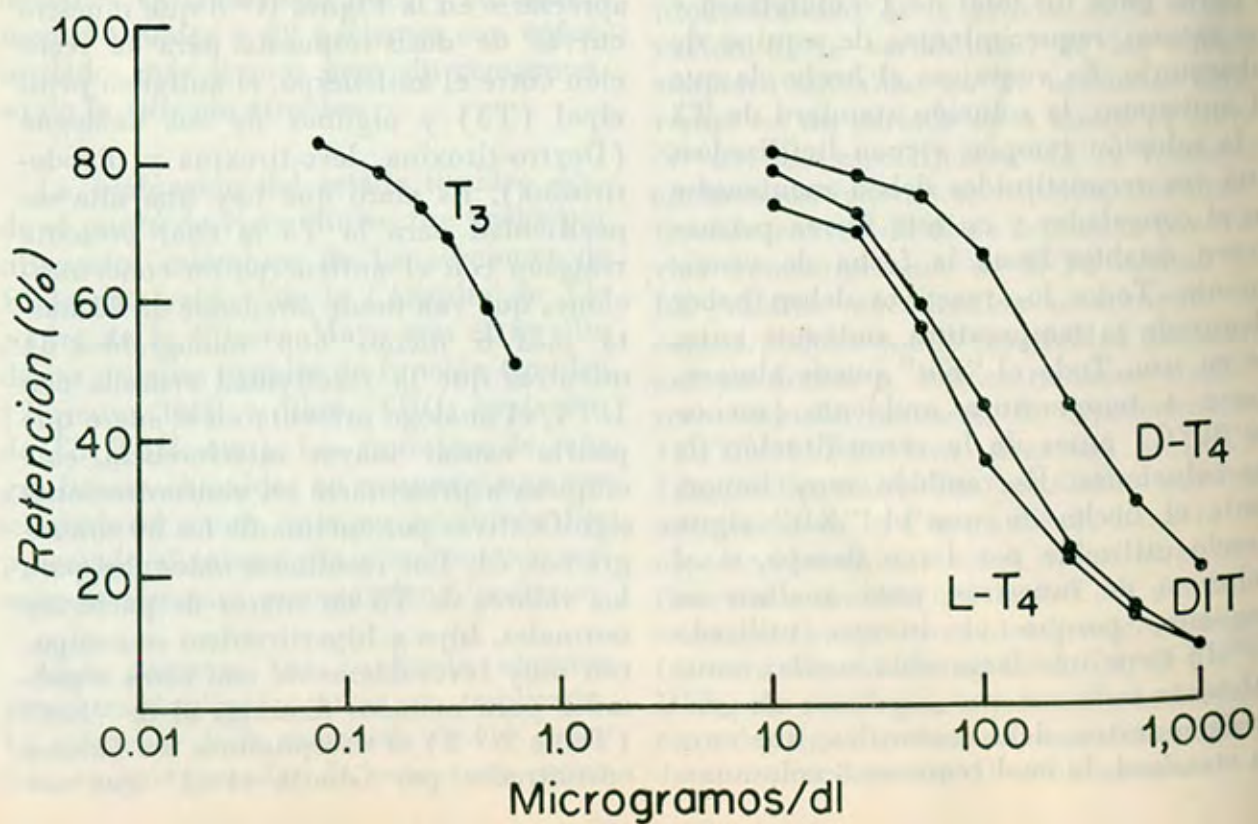
Realmente no creemos que sea necesaria una discusión detallada de la técnica utilizada en el radioinmunoanálisis que nos ocupa; baste decir que en términos generales se ajusta a los patrones de procedimiento utilizados por la mayoría de los investigadores que han trabajado en este campo. Es conveniente anotar que el método de "Kit" tiene varias ventajas siendo las principales la simplicidad del procedimiento, el corto tiempo que requiere para completarse (aproximadamente 4 horas para un total de 17 muestras) y los escasos requerimientos de equipo de laboratorio. Es ventajoso el hecho de que el anti-suero, la solución standard de T3 y la solución tampón vienen liofilizados; una vez reconstituidos deben mantenerse en el congelador y en esta forma permanecen estables hasta la fecha de vencimiento. Todos los reactivos deben haber alcanzado la temperatura ambiente antes de su uso. Todo el "Kit" puede almacenarse a temperatura ambiente (menor de 30°C) antes de la reconstitución de las soluciones. Es también muy importante el hecho de que el "Kit" sigue siendo utilizable por largo tiempo, si el volumen de muestras para analizar es pequeño, porque el isótopo utilizado (^{125}I) tiene una larga vida media; naturalmente cada vez que se procese un grupo de muestras debe construirse una curva standard, la cual requiere 3 columnas.

No deja de ser una ventaja también muy importante la baja cantidad de radioactividad utilizada, menos de 2.5 micro-Ci. por "Kit". En cuanto al almacenamiento de las muestras de suero, Surks⁸ encontró que no había cambios en la concentración de T3 después de repetidas congelaciones y descongelaciones, permanencia del suero a temperatura ambiente por 24 horas o su congelación a -20°C por espacios hasta de 2 meses. La reproducibilidad del método (Tabla N° 2) es satisfactoria con un coeficiente de variación de 6.28% para las determinaciones "intra-prueba" (en una misma sesión); este grado de variación está muy de acuerdo con los coeficientes obtenidos por Surks et al.⁸ —5.8%— y Liebllich y Utiger¹², —6.0%— utilizando los procedimientos tradicionales, no el sistema de "Kit". El coeficiente de variación para las determinaciones en sesiones diferentes ("inter-prueba") es más alto: (18.7%), pero esto no constituye un problema desde el punto de vista de la interpretación clínica. La especificación de la reacción antígeno-anticuerpo puede apreciarse en la Figura N° 3 que muestra curvas de dosis-respuesta para la reacción entre el anticuerpo, el antígeno principal (T3) y algunos de sus análogos (Dextro-tiroxina, levo-tiroxina y diyodotirosina). Es claro que hay una alta especificidad para la T3 la cual presenta reacción con el anticuerpo en concentraciones que van desde alrededor de 75 hasta más o menos 600 nanogramos/dl mientras que la reactividad cruzada con L-T4, el análogo presenta en el suero que podría causar mayor interferencia, solo empieza a presentarse en concentraciones significativas por encima de los 50 microgramos/dl. Los resultados obtenidos para los valores de T3 en sueros de pacientes normales, hipo e hipertiroideos se comparan muy favorablemente con otros reportados para métodos distintos al de "Kit" (Tabla N° 3) si exceptuamos los valores encontrados por Gharib et al.⁹ que son

Radioinmunoensayo de T₃ curvas standard



Radioinmunoensayo de T₃ especificidad

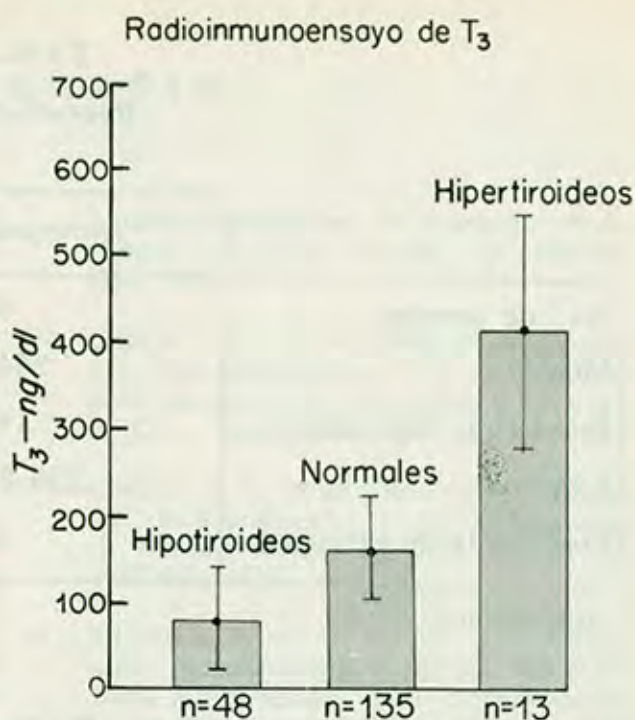


mucho más altos que todos los demás. Las posibles razones para explicar esta discrepancia y los múltiples factores que pueden producir variaciones en los valores séricos de T3 son analizados cuidadosamente por Gharib, Ryan, y Mayberry¹⁴.

La Figura N° 4 muestra cómo esta prueba hace una mejor discriminación entre pacientes normales e hipertiroides que entre normales e hipotiroideos.

Conclusiones:

Se analiza un nuevo método de "Kit" para la medición de T3 en suero por radioinmunoanálisis. El método presenta numerosas ventajas como son su simplicidad, su brevedad, su vida útil relativamente larga, los escasos requerimientos de equipo de laboratorio que implica y la baja cantidad de radioactividad envuelta en su manejo. Tiene una alta especificidad para la triyodotironina (T3) y una reproducibilidad satisfactoria. La determinación de T3 como prueba única de función tiroidea tiene poco valor; en la práctica debe asociarse con la determinación de T4. Su indicación clínica precisa reside en aquellos pacientes que presentan signos y síntomas de hipertiroidismo pero



cuyos niveles de T4 están dentro de límites normales; en estas circunstancias y solamente si la concentración de T3 es alta y la función tiroidea no puede suprimirse con la administración de T3, puede hacerse un diagnóstico de hipertiroidismo por T3. Una vez hecho tal diagnóstico el tratamiento es similar al de las otras variedades de hipertiroidismo.

TABLA 1

Etapas en el procedimiento de radioinmunoanálisis

- 1) Escogencia de tubos de material plástico adecuados.
- 2) Adición de la solución tampón, los standards y los desconocidos.
- 3) Adición del antígeno marcado.
- 4) Medición de la radioactividad inicial (100%).
- 5) Adición del anticuerpo específico.
- 6) Incubación.
- 7) Separación del antígeno libre de aquel ligado al anticuerpo (complejo antígeno-anticuerpo).
- 8) Medición de la radioactividad remanente (final) en cualquiera de las dos fracciones.
- 9) Construcción de la curva standard colocando en el eje de las ordenadas el valor B/F (antígeno ligado/antígeno libre) o bien el valor %B (porcentaje de antígeno ligado) y los valores de las distintas concentraciones de los standards en el eje de las abscisas.
- 10) Lectura de los valores correspondientes a los desconocidos, en la curva standard.

TABLA 2
Reproducibilidad *

| | <i>Intra-pruebas</i> | <i>Inter-pruebas</i> |
|---------------------------|----------------------|----------------------|
| No. de pruebas | 9 | 19 |
| Media | 264.2 | 142.2 |
| Desviación "Standard" | 16.6 | 26.6 |
| Extremos | 224-283 | 92-190 |
| Coefficiente de variación | 6.28% | 18.7% |

* Nanogramos/100 ml.

TABLA 3

T3 Sérica *—*Valores Obtenidos por Radioinmuncanálisis*

| <i>Autor</i> | <i>Hipotiroidismo</i> | <i>Normal</i> | <i>Hipertiroidismo</i> |
|----------------------|-----------------------|---------------|------------------------|
| Larsen (7) | 39 ± 21 | 110 ± 25 | 546 ± 442 |
| Surks et al. (8) | 44 ± 26 | 146 ± 24 | 665 ± 289 |
| Gharib et al. (9) | 103 ± 43 | 218 ± 55 | 760 ± 389 |
| Chopra et al. (10) | 100 | 100 — 170 | 100 — 1300 |
| Mitsuma et al. (11) | 62 ± 9 | 138 ± 23 | 494 ± 265 |
| Lieblich-Utiger (12) | 99 ± 24 | 145 ± 25 | 429 ± 146 |
| Guansing et al. (13) | 40 — 160 | 40 — 290 | 80 — 1100 |
| Arango-Wahner(**) | 77.8 ± 61.1 | 163.5 ± 57.4 | 415.8 ± 133.6 |

* Nanogramos/100 ml. (± D.S.).

** Método de "Kit".

BIBLIOGRAFIA

1. Sterling K.: The significance of circulating triiodothyronine. *Rec. Pro. Horm. Res.* 26:249-275, 1970.
2. Hollander, C.S.: On the nature of the circulating thyroid hormone: Clinical studies of triiodothyronine and thyroxine in serum using gas chromatographic methods. *Trans. Ass. Amer. Physicians. Philadelphia* 81:76, 1968.
3. Ballabarba, D.: Further observations on T3 thyrotoxicosis (Abstract). *Clin. Res.* 20:421, 1972.
4. Hollander, C.S., et al: T3 toxicosis: Association with iodine deficiency (Abstract). *Clin. Res.* 20: 263, 1972.
5. Gaitán, J. E., et al: Importancia de la medición de triyocotirona en suero como prueba de evaluación tiroidea. *Rev. Soc. Colomb. Endocrinol.* IX (1): 29-41, July 1973.
6. Gaitán, J. E. et al: Importancia de la medición de triyodotironina y de T4 unificada a la proteína en suero como pruebas de evaluación tiroidea. *Acta Med. Valle.* 4:8-13. 1973.
7. Larsen, P. R.: Direct immunoassay of triiodothyronine in human serum. *J. Clin. Invest.* 51:1939-1949, August 1972.
8. Surks, M. I., et al: A new radioimmunoassay for plasma L-triiodothyronine: Measurements in thyroid disease and in patients maintained on hormonal replacement. *J. Clin. Invest.* 51:3104-3113, Dec. 1972.
9. Gharib, H., et al: Radioimmunoassay for triiodothyronine (T3): I. Affinity and specificity of the antibody for T3. *J. Clin. Endocrinol. Met.* 33:509, 1971.
10. Chopra, I. J., et al: Radioimmunoassay for measurement of triiodothyronine in human serum. *J. Clin. Invest* 50: 2033-2041, 1971.
11. Mitsuma, T., et al: Serum triiodothyronine: Measurement in human serum by radioimmunoassay with corroboration by gas-liquid chromatography. *J. Clin. Invest.* 50:2679-26-68, 1971.
12. Liebllich, H. J., and R. D. Utiger: Triiodothyronine radioimmunoassay. *J. Clin. Invest.* 51:157, 1972.
13. Guansing, A. R., et al: Production of specific antibodies against triiodothyronine (T3) (Abstract). *Clin. Res.* 19:772, 1971.
14. Gharib, H., et al: Triiodothyronine (T3) radioimmunoassay. A critical evaluation. *Mayo Clin. Proc.* 47:934-937, 1972.
16. Wahner, H. W., and Colum A. Gorman: Interpretation of serum triiodothyronine levels measured by the Sterlin technic. *New Engl. J. Med.* 284:225, 1971.