

RADIOINMUNOENSAYOS

ADALBERTO PARRA-COVARRUBIAS¹

UNO DE LOS descubrimientos que más han contribuido al desarrollo de la endocrinología en las últimas décadas, ha sido indudablemente el radioinmunoensayo. Gracias a dicha técnica, el fisiólogo pudo conocer nuevos y diferentes mecanismos de regulación hormonal y el clínico pudo hacer una valoración más objetiva de las diferentes endocrinopatías asociadas con hiper o hiposecreción de ciertas hormonas. A partir de 1960 fue posible, por primera vez, medir con exactitud la concentración de diferentes hormonas proteicas en una gran variedad de líquidos biológicos, inclusive la sangre. Las hormonas proteicas, debido a sus características estructurales y al hecho de que circulan en concentraciones pequeñísimas (del orden de nanogramos y picogramos), resultaban muy difíciles de detectar mediante bioensayos específicos. Más aún, la mayoría de los bioensayos exhiben pobre especificidad y el número de muestras que se pueden analizar, es limitado. El radioinmunoensayo vino a resolver estos y muchos otros problemas inherentes

a los bioensayos. En 1960 Yalow y Berson, publicaron por primera vez, el método radioinmunológico para medir insulina en plasma humano.¹ A partir de esa fecha, aparecieron en forma explosiva una serie de modificaciones al método original y en la actualidad es posible detectar, con dicho método, más de veinte hormonas proteicas,^{2, 3, 4} ocho a diez hormonas no proteicas^{2, 5} y aun sustancias no hormonales, tales como vitamina B₁₂ y ácido fólico.²

Los anticuerpos, gracias a su estructura complementaria, reaccionan en forma específica con el antígeno (en este caso, la hormona proteica), que estimula su producción. Esto constituye el principio fundamental del radioinmunoensayo. Al combinar la especificidad inmunológica con la gran sensibilidad del anticuerpo seleccionado, es posible medir las concentraciones de las hormonas proteicas en diferentes líquidos biológicos. Brevemente, el radioinmunoensayo se basa en la capacidad que tiene una hormona proteica, para competir por el anticuerpo específico con la misma hormona cuando ésta ha sido marcada con yodo 125 ó 131 y por lo tanto, inhibir la unión del anticuerpo con la

¹ División de Nutrición, Departamento de Investigación Científica, Centro Médico Nacional, Instituto Mexicano del Seguro Social.

hormona radioactiva. Como consecuencia de lo anterior, la relación entre hormona radiactiva unida al anticuerpo (B) y hormona radioactiva no unida al anticuerpo (F) va disminuyendo conforme va aumentando la concentración de la hormona no radioactiva, presente en el líquido biológico que se analiza. La concentración de la hormona no radioactiva, por ejemplo en el plasma, se obtiene al comparar la inhibición que dicho plasma ocasionó entre la unión de la hormona radioactiva y el anticuerpo específico (B:F), con la inhibición obtenida por las soluciones estándar que contienen concentraciones conocidas de dicha hormona.

La técnica en sí, consiste en lo siguiente: Simultáneamente se preparan tubos de ensayo que van a servir como estándar (en triplicado) y los que van a tener las muestras desconocidas (por ejemplo plasma) que se desea analizar (en duplicado). A ambos se les agrega una solución amortiguadora. Después, a la serie de tubos que van a constituir la curva estándar, se agregan concentraciones crecientes de la hormona que se desea medir y a las muestras desconocidas, se añade un volumen constante de plasma u otro líquido biológico. Finalmente, a ambas series de tubos se agrega la misma concentración de hormona radioactiva y del anticuerpo. Se incuban a 4°C por un tiempo determinado, dependiendo de las características del anticuerpo y después, se separan las fracciones "B" y "F" de la hormona radioactiva, tanto en los estándares como en las mues-

tras de plasma. Dicha separación puede llevarse a cabo mediante cromatografía en papel,⁶ doble anticuerpo⁷ o mediante el uso de talco⁸ o de una suspensión de carbón-dextrán.⁹ Ambas fracciones (B y F) se cuentan separadamente, durante un tiempo constante, en un contador automático de centelleo para radiaciones gama. La relación B:F de cada una de las soluciones estándar se grafica en papel aritmético, contra las concentraciones crecientes de la hormona y así se obtiene una curva estándar. La concentración de la hormona en cada una de las muestras analizadas, se obtiene al comparar la relación B:F de cada muestra, con el B:F obtenido con los estándar. Por separado, en este mismo número, se hace una descripción gráfica de lo expuesto en párrafos anteriores.

Existen varios requisitos que todo radioinmunoensayo debe cumplir, antes de aceptarlo confiadamente. En primer lugar, es necesario que sea muy específico; es decir, se debe estar seguro de que se está dosificando la hormona que se desea y no otra hormona o substancia que interfiere en el sistema. Para ello, es fundamental disponer del anticuerpo específico y demostrar:

1. Que la dilución progresiva de una misma muestra del plasma da por resultado, valores de la hormona proporcionalmente menores.
2. Que los estudios de recuperación son satisfactorios.
3. Que no es posible detectar niveles apreciables de la hormona en el plasma de un paciente que carece de dicha hormona. Por ejemplo, no se encontrará hormona de crecimiento en el

plasma de un paciente hipofisectomizado. El segundo requisito es una gran sensibilidad. Se debe conocer con absoluta certeza, cuál es la concentración máxima y mínima de la hormona, que el sistema puede detectar. Para ello, no basta con mostrarlo (o creer demostrarlo) en una curva estándar ordinaria, como gráfica en papel aritmético; es preciso presentar los datos de la curva estándar tanto en papel semilogarítmico, como en una hoja logit.^{3, 10} Los puntos de la curva estándar que queden incluidos en la porción recta de la línea, serán los que marquen los límites de la sensibilidad. Un tercer requisito lo constituye la precisión o variabilidad intraensayo. Esta se investiga con diferentes soluciones que contengan concentraciones crecientes conocidas de la hormona, analizadas en 8 a 10 muestras para cada una de las concentraciones, en un mismo ensayo. Los valores obtenidos para cada concentración se someten a análisis estadísticos y se obtienen el promedio y la desviación estándar, lo cual dará un índice de la precisión del sistema. Finalmente, es recomendable conocer la reproducibilidad o variabilidad interensayo. Para ello, se debe contar con alíquotas de diferentes muestras de plasma que contengan concentraciones bajas, medias y altas de la hormona. Se analiza una alíquota de cada muestra de plasma, cada vez que se efectúa un ensayo; en esta forma, después de 8 a 10 ensayos, se puede observar la reproducibilidad de los valores obtenidos a lo largo de varios meses.

Con el objeto de tener una valora-

ción global y objetiva de la calidad de un radioinmunoensayo, Rodbard y colaboradores han descrito detalladamente, en qué consiste el control de calidad de un radioinmunoensayo.¹⁰ Brevemente dicho control de calidad consiste en el registro longitudinal de diferentes variables: actividad específica de la hormona radioactiva,* cantidad de hormona radioactiva que se agrega a cada muestra, cuentas totales por minuto (cpm), porcentaje de hormona dañada,* la pendiente de la curva estándar, el punto de intersección al 50% en la hoja logit, variabilidad interensayo y la dilución inicial del anticuerpo. Entre más constantes se mantengan dichas variables, la calidad del ensayo será mayor.

El radioinmunoensayo es una técnica de un gran valor, no sólo en investigación científica sino aún en la clínica. Sin embargo, antes de empezar a utilizar el radioinmunoensayo para una hormona específica, es preciso demostrar entre otras cosas, que dicho sistema es específico para la hormona que se desea dosificar y sólo entonces —y por ningún motivo antes— se podrá dar una utilidad e interpretación óptima a los resultados obtenidos.

* Para la explicación de estos y otros términos, se refiere al lector a una de las extensas monografías mencionadas en la bibliografía.

REFERENCIAS

1. Yalow, R. S. y Berson, S. A.: *Immunoassay of endogenous plasma insulin in man*. J. Clin. Invest. 39: 1157, 1960.
2. Berson, S. A. y Yalow, R. S.: *General*

- principles of radioimmunoassay.* Clin. Chim. Acta. 22: 51, 1968.
3. Parra, A.: *Hormona de crecimiento. I. Radioimmunoensayo.* Gac. Méd. Méx. 101: 591, 1971.
 4. Chisholm, D. J.; Young, J. D. y Lazarus, L.: *The gastrointestinal stimulus to insulin release. I. Secretin.* J. Clin. Invest. 48: 1453, 1969.
 5. Abraham, G. E.: *Solid-phase radioimmunoassay of estradiol.* 17. J. Clin. Endocr. & Metab. 29: 866, 1969.
 6. Berson, S. A.; Yalow, R. S.; Glick, S. M. y Roth, J.: *Immunoassay of protein and peptide hormones.* Metabolism. 13: 1135, 1964.
 7. Schalch, D. S. y Parker, M. L.: *A sensitive double antibody immunoassay for human growth hormone in plasma.* Nature. 203: 1141, 1964.
 8. Rosselin, G.; Assan, R.; Yalow, R. S. y Berson, S. A.: *Separation of antibody-bound and unbound peptide hormones labeled with iodine-131 by talcum powder and precipitated silica.* Nature. 212: 355, 1966.
 9. Herbert, H.; Lan, K. S.; Gottlieb, C. W. y Bleicher, S. J.: *Coated charcoal immunoassay of insulin.* J. Clin. Endocr. & Metab. 25: 1375, 1965.
 10. Rodbard, D.; Rayford, P. L.; Cooper, J. A. y Ross, G. T.: *Statistical quality control of radioimmunoassays.* J. Clin. Endocr. & Metab. 28: 1412, 1968.