

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

PRODUCCION DE CONJUGADOS DE TIROXINA (T<sub>4</sub>) Y  
TRIIODOTIRONINA (T<sub>3</sub>) CON SEROALBUMINA BOVINA

Informe de Tesis

presentado por

Myriam Rebeca Alcázar Castillo

para obtener el título de

QUIMICO BIOLOGO

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

Guatemala, febrero de 1996

## ACTO QUE DEDICO

A Dios Trino y a la Santisima Virgen María por el amor que nos une.

A mi patria Guatemala.

A la Universidad San Carlos de Guatemala, especialmente a la facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

A mis padres: Julio C. Alcázar Flores,  
María C. Castillo de Alcázar.

A mis abuelos: José R. Alcázar y Rosario de Alcázar  
Juan de Dios Castillo y Rebeca de Castillo

A mis Hermanos: Julio y Gladys, César y Amalia, José y Judith  
Luis y Sandra, Mario Alejandro.

A mis tíos: Aracely Castillo Rodas, María Zucel Castillo,  
Guillermo Alcázar y Minerva Solís de Alcázar,  
Eliseo Reyna y Nidia Alcázar de Reyna.

A mis primos: Flor de María Recinos,  
Ricardo y Carmen Fortuny.

A mis amigos: Juan José Flores Asturias y Miriam de Flores,  
Jorge Calderon.

A la familia Salesiana, en especial al Padre Sergio Chechi quien me ayudó y continuamente me alentó a seguir adelante.

Al Hospital General San Juan de Dios, especialmente a los compañeros y amigos del laboratorio clínico que constantemente me dieron su apoyo, y un recuerdo imperecedero a mi estimada amiga Paula Alemán Herrera (QEPD).

Al Departamento de Radioinmunoanálisis del Hospital General San Juan de Dios, especialmente mi agradecimiento a la Lic. Cecilia Sánchez, por su constante apoyo en la realización de este trabajo.

## RESUMEN

Tomando en cuenta que ha existido una gran controversia en la preparación de conjugados de hormonas tiroideas, en este trabajo se determinaron las condiciones óptimas de reacción en la formación de conjugados entre tiroxina ( $T_4$ ) y triiodotironina ( $T_3$ ); se acopló la hormona a una proteína acarreadora seroalbumina bovina. El conjugado que se obtuvo se empleó en la inmunización de conejos y obtener así anticuerpos para ser utilizados en ensayos de radioinmunoanálisis (RIA). La reacción de formación del conjugado se llevó a cabo por el uso de la carbodiimida, analizándose por métodos radioquímicos.

Se estudió el efecto de diversas variables como: disolvente, pH, temperatura de reacción, la purificación del producto obtenido se hizo por los métodos de diálisis y cromatografía de exclusión molecular.

Los resultados mostraron que el pH más adecuado para la conjugación de la hormona  $T_3$  es utilizando un pH de conjugación igual a 5.0, como disolvente NaOH y una temperatura de 4 °C. El porcentaje de conjugación fué de 62.1% y una reacción molar  $T_3$  - BSA = 30.7.

Para la hormona  $T_4$  las condiciones que favorecieron la reacción fueron con NaOH, pH igual a 5.0 y una temperatura de 4 °C, ó con  $NH_4OH$ /etanol a un pH igual a 7.0 y una temperatu-

ra de 37 °C. En ambas condiciones se obtuvieron porcentajes de conjugación y relación similares, con NaOH el porcentaje de conjugación es de 90.133% y una reacción molar de T4 - BSA = 31.96, y con NH<sub>4</sub>OH/etanol el porcentaje de conjugación es de 87.2% y una reacción molar de 32.47.

En el sistema de purificación diálisis y columna cromatográfica Sephadex G-25, ambas pueden ser utilizadas para eliminar la hormona que quedó sin unirse a la seroalbumina bovina ya que no existe mayor variabilidad en ambos métodos en los porcentajes de conjugación. La ventaja con la columna cromatográfica es el tiempo.

*INDICE*

1.	INTRODUCCION.....	2
2.	ANTECEDENTES.....	5
3.	JUSTIFICACION.....	24
4.	OBJETIVOS.....	25
5.	HIPOTESIS.....	26
6.	MATERIALES Y METODOS.....	27
7.	RESULTADOS.....	31
8.	CONCLUSIONES.....	36
9.	RECOMENDACIONES.....	37
10.	REFERENCIAS.....	38
11.	ANEXOS.....	43

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

## 1. INTRODUCCION.

Los anticuerpos son proteínas que se encuentran en el suero de todos los vertebrados y que migran en la fracción de las gammaglobulinas en una electrofóresis; se forman contra ciertas regiones específicas de moléculas llamadas antígenos. Estas regiones específicas contra las cuales reaccionan los anticuerpos se llaman determinantes antigénicos. El número de determinantes diferentes varía, por lo general, en su tamaño y complejidad química.

Los inmunógenos normalmente son grandes moléculas y se dice que deben poseer cuando menos dos determinantes para estimular la formación de anticuerpos. Sin embargo, las moléculas de estructura química muy pequeña llamadas haptenos, no son capaces de inducir por si mismas la formación de anticuerpos y tienen que acoplarse de modo covalente a ciertos antígenos pre-existentes para crear nuevos determinantes; estos complejos de antígeno y hapteno son llamados antígenos conjugados o neoantígenos.

Para unir esta proteína a un hapteno se requiere una reacción química, en la que existen diferentes sustancias y condiciones, que han sido descritas por diversos autores.

En este trabajo se prepararon conjugados para las hormonas de tiroxina (T<sub>4</sub>) y triiodotironina (T<sub>3</sub>) con seroalbumina bovina (BSA).

Debido a que Guatemala es un país de alta incidencia de bocio endémico, se requiere contar con una metodología para la evaluación completa de la función tiroidea.

Los altos costos de estas pruebas no permiten su accesibilidad a la mayoría de la población, por lo que la producción de los propios reactivos en el laboratorio permite la reducción de estos, además de que amplía la cobertura a pacientes con problemas tiroideos.

En el método de radioinmunoanálisis utilizado para evaluar la concentración de hormonas tiroideas en suero, se requiere de anticuerpos obtenidos por inmunización; para la inmunización, las hormonas tiroideas no son capaces por si solas de producir anticuerpos, por lo que se requiere de acoplarse a una proteína transportadora para estimular la síntesis de anticuerpos.

Debido a que la técnica de preparación es comúnmente variable, y no existe una buena correlación entre los resultados de los diferentes investigadores, en este estudio se prepararon conjugados utilizando tres solventes: hidróxido de sodio, dimetilformamida y una dilución de hidróxido de amonio/etanol, a pH = 5 y pH = 7, temperatura 4 °C, ambiente y 37 °C, para establecer un método general y adecuado a las condiciones de laboratorio.

Los resultados en este trabajo determinaron que la condición más favorable para la reacción de conjugación de la hormona T<sub>3</sub>-BSA, fué utilizando NaOH como solvente, un pH de conjugación = 5 y la temperatura pueden utilizarse 4 °C, ambiente y 37 °C ya que no varía la reacción (p=0.7656).\*

Para la reacción de conjugación T<sub>4</sub>-BSA se determinó que las condiciones que favorecen la reacción son utilizando NaOH, con un pH de conjugación de 5.0 y una temperatura de 4 °C ó con NH<sub>4</sub>OH/etanol, pH de conjugación = 7 y una temperatura de 37 °C (p=0.2930).

Los porcentajes de conjugación para la hormona T<sub>3</sub> que se obtuvieron fué fr un 62.1% y una reacción molar de T<sub>3</sub>/BSA de 30.7.

Para la hormona T<sub>4</sub>, los porcentajes de conjugación obtenidos fué de 90.133% y una reacción molar T<sub>4</sub>/BSA de 31.96 utilizando NaOH, pH = 5 y temperatura 4 °C, ó NH<sub>4</sub>OH/etanol, pH = 7 y temperatura 37 °C, el porcentaje de conjugación fué de 87.2% y una reacción molar T<sub>4</sub>/BSA = 32.47.

Los métodos de purificación con diálisis y columna cromatográfica Sephadex G-25, ambas pueden ser utilizadas para eliminar la hormona que quedó sin unirse a la seroalbumina bovina, ya que no existe mayor variabilidad.

\*p = nivel de significancia.



## 2. ANTECEDENTES

Una sustancia química para funcionar como antígeno, debe ser extraña al cuerpo animal o humano.

Prácticamente todas las proteínas son antígenos y se decía también que todos los antígenos eran proteínas, pero muchas lipoproteínas, nucleoproteínas, polipéptidos sintéticos y polisacáridos también son antígenos. Un antígeno completo se caracteriza por dos propiedades indispensables: inmunogenicidad y antigenicidad (1-3).

### 2.1. INMUNOGENICIDAD.

La inmunogenicidad es una propiedad de las sustancias que pueden inducir a una respuesta inmunitaria reconocible (humoral, celular o más comunmente ambas), cuando son introducidas a un animal, tales sustancias son llamadas inmunógenos o antígenos (2, 4-6).

#### 2.1.1. INMUNOGENOS:

Son macromoléculas que producen una respuesta inmune, ellas incluyen carbohidratos, proteínas y lipopolisacáridos. La respuesta inmune está en función del tamaño y complejidad molecular (4, 7, 8).

## **2.1.2. REQUERIMIENTOS PARA LA INMUNOGENICIDAD:**

### **2.1.2.1. Exogenicidad:**

El sistema inmunológico en alguna forma reconoce lo propio y lo no propio, de manera que sólo moléculas que son extrañas a la circulación del sistema del normal resultan inmunogénos (1, 6, 9).

### **2.1.2.2. Tamaño molecular:**

Las moléculas extremadamente pequeñas como los aminoácidos y los monosacáridos no son inmunógenos. El tamaño molecular y la inmunogenicidad han sido correlacionados en una serie de estudios utilizando para ello una serie de polipéptidos y polisacáridos de diferente peso molecular y se ha determinado que las moléculas con peso molecular entre 1,000 y 5,000 son usualmente inmunógenos débiles. Estas pequeñas moléculas pueden producir una buena respuesta si se les administra con adyuvante completo (3, 4, 9).

### **2.1.2.3. Complejidad Química:**

Una molécula debe poseer cierto grado de complejidad para ser inmunógeno, por ejemplo los homopolímeros compuestos de unidades repetidas de un solo aminoácido son malos

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

inmunógenos, independientemente de su tamaño, en tanto los copolímeros, de dos o aún mejor de tres aminoácidos pueden tener alta inmunogenicidad. Es difícil establecer un umbral definido y la regla general es que la inmunogenicidad aumenta con la complejidad estructural (1, 2, 6, 10, 11).

#### **2.1.2.4. Constitución genética del animal:**

Las especies utilizadas para la inmunización son extremadamente importantes para obtener una respuesta inmunogénica. Arquilla y Fian en 1965 demostraron la variación de respuestas producidas en diferentes especies, estos demostraron que la región antigénica de una proteína no es característica y que puede variar dependiendo de las especies de animales y del nivel de inmunidad de cada animal, ya que su capacidad para responder a un antígeno particular varía con la composición genética (3, 7).

#### **2.1.2.5. Modo de administración de un antígeno:**

La respuesta inmunitaria inducida por un antígeno depende de la dosis y de la forma de administración. La cantidad de antígeno es ineficaz cuando se inyecta por vía intravenosa, pero puede dar una respuesta copiosa cuando se administra por vía intradérmica o subcutánea en adyuvante (3, 4, 12, 13-15).

Con frecuencia las cantidades de material usadas para

inmunizar son del orden de 1 mg. por animal y dosis inmunizante; el uso de mayores cantidades de antígeno no se recomienda, pues existe la posibilidad de que la persistencia prolongada de los inmunógenos de lugar a la formación selectiva in vivo de complejos de la mejor subpoblación de anticuerpos que es la de mayor afinidad, la cual estaría seguida de la depuración metabólica fagocítico mononuclear de estos complejos de la circulación, y el antisuero resultante sufriría depresión selectiva de anticuerpos de gran afinidad (3, 4).

#### *2.1.2.6. Conformación:*

No existe una configuración que no sea inmunógena. Los polipéptidos lineales ramificados o carbohidratados de cualquier tipo, así como proteínas globulares son capaces de producir respuesta inmunitaria. El anticuerpo formado por estas estructuras de conformaciones diferentes es específico, y puede discriminar tales diferencias (1, 3, 4, 6).

#### *2.1.2.7. Carga:*

La capacidad inmunógena no esta limitada a una carga molecular determinada; sustancias positivas, negativas y neutras pueden ser inmunógenas (1, 2, 9). Sin embargo, la carga neta de un inmunógeno parece influir en la carga neta del anticuerpo resultante. Se ha comprobado que inmunógenos de

carga positiva originan anticuerpos de carga negativa. Estos datos sugieren que la producción de anticuerpos puede estar influenciada por la carga global de inmunógeno (2, 6, 9).

#### **2.1.2.8. Accesibilidad:**

La accesibilidad de los grupos determinantes para el sistema de reconocimiento, regula el futuro de la respuesta inmunitaria. Estudios recientes han permitido a los investigadores preparar polipéptidos sintéticos inmunógenos que contienen un número limitado de aminoácidos, en los cuales se puede definir la estructura química (1, 2, 6, 9).

#### **2.1.3. PROPIEDADES QUIMICAS:**

La mayor parte de compuestos orgánicos con excepción de los lípidos puros, pueden ser inmunógenos puros. Los inmunógenos más eficaces son los que presentan diversas características químicas y estructurales. Pero la variación de un aminoácido en una proteína puede dar origen a una nueva especificidad del anticuerpo debido a un cambio profundo de conformación. Como resultado de esta conformación única, hay dos tipos de estructura química que parecen influir en la inmunogenicidad:

a) Los determinantes seriados, cuya especificidad está regida por la secuencia de subunidades dentro del determinante; por ejemplo, una secuencia primaria de aminoácidos en el caso de

una proteína; y b) Los determinantes de conformación, que dependen de la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria (1, 2, 6, 16).

#### **2.1.3.1. Digestibilidad:**

En general, un inmunógeno potente es susceptible de ser fagocitado o desintegrado dentro del huésped. Sin embargo, la información reciente ha demostrado que sustancias no metabolizadas o no catabolizadas, como el poliestireno, también pueden ser inmunógenas en pequeñas cantidades. Además, procede señalar que la eficacia con la cual tiene lugar la fagocitosis, establece si un antígeno es eliminado o persiste. Este resultado es de significación biológica pues la eliminación de antígenos establecerá si una respuesta inmunitaria resulta beneficiosa o lesiva. (6).

#### **2.1.3.2. Tipos químicos diferentes de inmunógeno:**

La mayor parte de inmunógenos en la naturaleza son proteínas. Pueden existir como proteínas puras, o combinarse con otras sustancias como lípidos (lipoproteínas), ácidos nucleicos (nucleoproteínas), o carbohidratos (glucoproteínas).

Algunos ejemplos de proteínas extrañas que pueden ser inmunógenos incluyen proteínas séricas y tisulares, las proteínas estructurales de virus, bacterias y otros microorganismos, to-

xinas, proteínas vegetales y enzimas. Los anticuerpos de estas sustancias se utilizan clínicamente en inmunoterapia (antitoxinas) y en la preparación de vacunas (7, 17).

#### *2.1.3.3. Factores relacionados con el huésped.*

La inmunogenicidad tiene gran importancia biológica. La respuesta a cualquier inmunógeno no solo es función de las propiedades físico-químicas de las sustancias; también guarda relación con varios factores dependientes del huésped, incluyendo la naturaleza genética del mismo, la edad, el estado nutritivo, y cualquiera dá diversos efectos secundarios.

#### *2.1.3.4. Preparación de inmunógenos:*

En general componentes de alto peso molecular, como son las proteínas y hormonas polipeptídicas, son inmunológicas para la producción de anticuerpos en el animal. Componentes de bajo peso molecular como son los esteroides y las hormonas tiroideas y otros, no son inmunógenos a menos que se encuentren ligados covalentemente a una proteína transportadora. Varias proteínas han sido utilizadas en el proceso de conjugación: las gammaglobulinas, ovoalbúminas, tiroglobulinas, albumina bovina y humana que son las más comúnmente utilizadas (1, 2, 3, 5, 11).

### 2.2.1. HAPTENOS.

El concepto de hapteno provino de los estudios de Karl Landsteiner durante los primeros años del siglo XX. Son sustancias pequeñas, de bajo peso molecular, químicamente definidas, que son inmunogénicos, pero que pueden reaccionar con anticuerpos de especificidad apropiada. Estos complejos de antígeno-hapteno llamados antígenos conjugados o neoantígenos, estimulan la síntesis de anticuerpos con especificidad para el nuevo grupo hapténico (1, 3, 7, 17). Landsteiner acopló covalentemente los derivados de diazonio de una amplia variedad de aminas aromáticas a los residuos de lisina, tirosina e histidina de las proteínas inmunogénicas. Las proteínas conjugadas originaban anticuerpos específicos para los sustituyentes azoicos demostrados por la capacidad hapteno libre para fijar anticuerpos (1, 3, 6, 9).

Un segundo método empleado para evaluar la especificidad de estos antisueros fué la pre-incubación de estos con el hapteno correspondiente (en su forma no diazoica) antes de incubarlos con el hapteno del antígeno original, el grado de inhibición de la segunda reacción, sirve de medición de la especificidad del antisuero para el hapteno.

Estas investigaciones permitieron ciertas conclusiones en el sistema antígeno diazohapteno:



- a) Los grupos fuertemente ácidos o básicos suelen ser decisivos para regir la especificidad de los anticuerpos.
- b) Grupos no iónicos de tamaños y formas similares son intercambiables sin pérdidas significativas de actividad serológica.
- c) Las configuraciones espaciales de los haptenos son importantes (D, L, orto, meta, para y otros).
- d) Los componentes terminales de un antígeno influyen controlando la especificidad de los anticuerpos formados (1, 2, 7).

#### *2.2.1.1. Haptenos auto-acoplantes.*

Diversos compuestos de bajo peso molecular producirán anticuerpos si se inyectan solos a un animal. Ejemplo: sales libres de diazonio compuestos de dinitro finilo clorados o fluorados, anhídridos ácidos y otros. Todas estas sustancias tienen una propiedad en común, de formar espontáneamente un enlace covalente con proteínas y polisacáridos tisulares para formar neoantígenos in vivo (4).

#### *2.2.1.2. Algunos factores importantes para el acoplamiento covalente de la proteína de transporte y el hapteno.*

- a) Las condiciones de la reacción deben mantenerse de tal

forma que no afecten las estructuras básicas químicas del hapteno.

b) El reactivo usado para el acoplamiento no debe desnaturar la proteína.

c) El uso adecuado de un grupo de reactivos que pueden ser utilizados en el hapteno bajo condiciones adecuadas y formar una unión covalente a una proteína de transporte. Por ejemplo un hapteno derivado con un grupo amino libre que ha sido acoplado con el grupo carboxilo de la proteína usando carbodiimida soluble al agua; o también hapteno con un grupo amino de la proteína para el uso de un reactivo bifuncional como es el gluteraldehído (1, 2, 4).

#### *2.2.1.3. Elección de los transportadores.*

Los transportadores más comunes son la seroalbumina de varias especies (generalmente por su solubilidad), hemocianina, tiroglobulina, ovoalbumina y fibrinógeno. Estos han sido utilizados para inmunización y ensayos, o viceversa, y sus anticuerpos han sido removidos por absorción (5, 14, 18).

Las uniones de los haptenos a la proteína generalmente ocurre con el grupo más reactivo de las proteínas; por ejemplo, la amino (pKa 10-8 respectivamente), fenoles y sulfihidrilos a pK-9, Imidazol pK-7 y carboxilos a pK -2-4. La pK y el pH, con que el medio de los grupos es protonado, es de-

terminado por los cambios de sus reactividades (5, 15, 16, 19).

#### *2.2.1.4. Conjugación de haptenos a proteínas.*

Un número de reactivos han sido sucesivamente utilizados para acoplar haptenos a proteínas transportadoras por medio de uniones covalentes. La conjugación de proteínas es teóricamente posible acoplándose a algún residuo de aminoácidos funcionales (algún aminoácido capaz de asumir una carga sobre ellas del lado de la unión); pero las reacciones más comunes usadas utilizan grupos aminos o carboxilos libres en las proteínas. En muchas instancias la conjugación puede ser directamente acoplada a ambos porque los haptenos no contienen grupos funcionales (COOH o NH) o porque estos grupos deben ser no sustituidos o activados, logrando el máximo grado de especificidad del anticuerpo por el componente medido (13, 14, 20, 21).

Estas dificultades son resueltas sintetizando un derivado del hapteno. Esto usualmente implica la introducción de un grupo hidróxilo, ceto o aldehído, utilizado para la reacción de estos compuestos reactivos, como anhídrido succínico, fósforo o bromocianuro II (12).

*2.2.1.4.1. Haptenos conteniendo grupos carbohílicos o que pueden ser carboxilados.*

Si los haptenos no contienen grupos carboxílicos, estos son introducidos frecuentemente por la alcalinización de los sustituyentes de oxígeno o nitrógeno con halóester, seguida por la de un hemosuccinato éster o (carboximetil) oximas respectivamente. Los métodos utilizados para la conjugación de proteínas a moléculas que contienen grupos carboxílicos son: a) métodos de mezcla de anhídridos, b) método CDI [(1-etil-3-(3-dimetil aminopropil)] carbodiimida (13-15).

*2.2.1.4.2. Haptenos con grupos aminos o grupos nitroproductores.*

Los compuestos con grupos aminos han sido divididos en dos clases: aminas aromáticas y aminas alifáticas. Los grupos nitro pueden también ser reducidos a grupos aminos. Los clásicos trabajos de Landsteiner fueron realizados con aminas aromáticas. Estas son convertidas a sales de diazonio mediante la adición de ácido nítrico, reaccionando con las proteínas a un pH de aproximadamente nueve (1, 2, 17).

Los haptenos con aminas alifáticas pueden ser conjugados a proteínas mediante CDI, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, compuestos de maleimidias o con Iodato de sodio. Otra metodología convierte aminas alifáticas a aminas aromá-

ticas mediante la reacción con cloruro de p-nitro benzolamida y la reducción subsecuente a amidas. Estas aminas pueden ser acopladas a las proteínas después de la diazotización.

#### **2.2.1.4.3. Haptenos con grupos sulfihidrilos.**

Los maleimidas son utilizadas particularmente para la conjugación de haptenos que contienen el grupo thiol. Otros enfoques se basan en la activación de las proteínas con grupos de bromoacetamida o en la formación de uniones disulfuro entre el transportador y el hapteno en buffer de acetato a pH 4.0 en presencia de peróxido de hidrógeno. Este método ha sido utilizado para la conjugación de ácidos penicilínicos.

#### **2.2.1.4.4. Haptenos con grupos hidróxilos.**

Estos grupos incluyen azúcares, nucleósidos, fenoles y alcoholes. La conjugación directa generalmente no es posible. La conversión del alcohol es mediada por un éster del ácido succínico (hemosuccinato) introducen un grupo carboxílico disponible para la conjugación. Estos métodos han sido usados para un gran número de haptenos.

Los fenoles pueden ser activados con un ácido p-amino-benzoico diazotizado en el cual introduce un grupo carboxílico que puede reaccionar con la proteína de transporte mediante una reacción de anhídridos (21).

Los azúcares pueden ser activados por el método de Landsteiner, formando p-nitrofenil glucósido, seguido por la reducción de un grupo nitro y la conjugación después de la diazotización. Un método simple se basa en el desdoblamiento de los glicoles de los azúcares o aldehídos que son después acoplados a las aminas por una alquilación reductora. Este método ha sido sucesivamente aplicado a la conjugación de nucleótidos y digoxina. La conjugación de haptenos es llevada a cabo por la alta reactividad del clorocarbonato preparada con una cantidad equimolar de fósforo. Estas alternativas son utilizadas también para la testosterona (2, 5, 20, 24).

#### ***2.2.1.4.5. Haptenos con grupos aldehídos o cetonas.***

Los grupos carboxílicos pueden ser preparados introduciendo a las cetonas y aldehídos mediante la formación de o-(carboximetil) oxima. Grupos cetónicos pueden también derivarse con ácido p-hidrazinobenzoico, para producir grupos carboxílicos que pueden conjugarse a un acarreador. Los haptenos que contienen aldehídos que pueden conjugarse mediante la formación de bases de Schiff las cuales se estabilizan mediante una reducción con  $\text{NaBH}_4$  (1, 21, 25).

#### ***2.2.1.4.6. Purificación de haptenos conjugados.***

Para los ensayos de elisa es importante establecer los grados de sustitución, la actividad total y especificidad de

las enzimas recuperadas. Así como la inmunoreactividad recuperada. El número de grupos aminos sustituidos por los haptenos en la molécula transportadora se establece convenientemente por la determinación del número de grupos aminos libres antes y después de la sustitución. Otro método es el uso de haptenos radioactivos.

Los haptenos pequeños pueden removerse del conjugado por varios métodos; por ejemplo; 1) El más simple es diálisis contra un buffer al cual se ha adicionado Norit A al 1-2% para aumentar la eficiencia. 2) afinidad cromatográfica. 3) por un procedimiento de purificación que es aplicable a muchos conjugados, que consiste en remover el hapteno libre por diálisis, seguido por la absorción del conjugado en una columna de afinidad (inmunoabsorventes con anticuerpos - anti-haptenos) (5, 11, 17, 25, 26).

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

#### 2.2.1.4.7. *Uso de carbodiimida en inmunología.*

La formación de anticuerpos en animales de laboratorio contra sustancias de bajo peso molecular puede estimularse por la inyección de un conjugado formado por las pequeñas moléculas unidas a proteínas. El reactivo más comunmente utilizado para la conjugación es la carbodiimida hidrosoluble. Las carbodiimidias han sido acopladas a componentes que contienen varios tipos de grupos funcionales incluyendo ácidos carboxílicos, aminos, fosfatos, alcoholes y tioles con la

formación de éster amidas. Este acoplamiento probablemente procede de dos pasos mínimos (reacción A y B anexo No. 1). Las carbodiimidas también pueden adicionarse a ácidos carboxílicos por un reordenamiento y formar ureas estables N-sustituídas. Esta adición producen en el caso de la albumina una urea sustituida unida a grupos carboxílicos de la proteína (13,14).

En estas uniones de ambos productos, el complejo de hapteno proteína y el complejo sustituido urea-proteína se forman durante la síntesis de los inmunógenos.

Las dos carbodiimidas que son reactivas son reactivo I) 1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida(CDI), y reactivo II) 1-ciclohexil-3-(2-morpholinil-4-etil) carbodiimida meto-p-toluensulfonato (morpho-CDI).

La reacción es terminada por diálisis contra agua por 24 horas. La evidencia indirecta de una exitosa conjugación hapteno proteína es algunas veces por la formación de precipitados o suspensiones coloidales, probablemente causados por los cambios en la solubilidad de las proteínas cuando los sustituyentes son adicionados. Por lo tanto, la formación visible de precipitado no es siempre seguida de la formación de conjugados. Cuando se forman precipitados, éstos son usados conjuntamente para la inmunización. Los componentes antigénicos sintetizados con etil-CDI han sido utilizados para



inmunizar conejos, mientras que el antígeno sintetizado con morpho-CDI se ha usado en experimentos in vitro (23, 25-27).

El pK del ácido es muy importante para la participación del grupo ácido hacia la formación de un ester activo de carbodiimida. A partir de la secuencia de la reacción I (anexo 2), el ataque del grupo ácido se lleva a cabo en el átomo de carbono de la carbodiimida al cual le falta un electrón, esto sólo se dá al estar en la forma ionizada; y es importante para dar el paso II (anexo 2). No es posible aislar la molécula en el paso II de la reacción en su forma pura, ya que no es estable (esteractivo).

Para mantener a la función ácida en su forma ionizada, es importante mantener el pH de la mezcla reaccionante más alto que el pK del ácido. Esta es una de las razones por las cuales esta reacción no funciona muy bien con ácidos que tienen un pK de 7 o más. Hay reacciones secundarias que involucran diferentes especies aniónicas en la solución del pH más altos, que también reaccionan con el átomo de carbono de la carbodiimida al que le falta un electrón. El éster activo II (anexo 2), puede dar el origen a diferentes productos, algunos deseados y algunos no deseables. Puede reaccionar con el grupo amino de la proteína para dar el conjugado deseable (V) y urea (VI) (anexo 2), o puede reaccionar con otra molécula o ácido carboxílico para dar un anhídrido (III) (anexo 2) que a su vez puede reaccionar con el grupo amino de la proteína, dando el producto deseado (V) (anexo 2). Alter-

nativamente, el éster activo I puede sufrir una reordenación intramolecular, dando un producto no deseado, la acilurea (IV). Este parece ser dependiente del solvente (anexo 2) (13, 17, 19, 23).

#### *2.1.5. DIFERENTES TECNICAS UTILIZANDO CARBODIIMIDA COMO METODO DE CONJUGACION.*

Diversos autores han descrito diferentes técnicas para la preparación de conjugados. Algunos varían la cantidad de proteína acarreadora, pH, solventes como los métodos de purificación. En las hormonas tiroideas se ha conjugado la triiodotironina y la tiroxina a diferentes acarreadores como: seroalbuminas bovina, conejo o humana, así como a material sintético, fracción microsomal, carbón o tiroglobulina.

La técnica de preparación de estos conjugados es sumamente variable, no encontrándose una verdadera correlación entre los diferentes investigadores, por ejemplo -Goodfriend, Levine y Fasman- en un estudio en el que conjugaron bradikina y angiotensina utilizaron de 100 a 200 mg. de dos diferentes carbodiimidias, la Morpho-CDI y etil-CDI con un pH = 6 a 8 y temperatura ambiente (28-30).

En la técnica de Inder J. Chopra produjo anticuerpos específicos para las hormonas T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> preparando diversos con-

jugados y complejos de T carbón. Para la preparación de conjugados utilizó Tiroglobulina, Fracción microsomal de la tiroides, tres conjugados sintéticos: polilisina, ácido poliglutámico y seroalbumina bovina (18, 30).

Larsen Pr. en un trabajo sobre inmunoensayos directos de triiodotironina en suero humano, conjugó la triiodotironina a seroalbumina bovina utilizando la técnica de la carbodiimida a un pH = 7.4 y temperatura ambiente. En la purificación del conjugado utilizó el método de diálisis usando un Buffer de fosfatos 0.1M. (31).

### 3. JUSTIFICACION

Guatemala es un país con alta incidencia de bocio endémico, por lo que se hace necesario contar con una metodología para la evaluación completa de la función tiroidea.

Para realizar estas pruebas y aumentar su cobertura a los pacientes que la necesiten, se requiere contar con un juego de reactivos propios que permitan una disminución en los costos prueba-paciente.

Para la producción de los reactivos por el método de radioinmunoanálisis, el cual se utiliza para evaluar la concentración de hormonas tiroideas en suero humano, se requiere de anticuerpos que han sido obtenidos por la inmunización de conejos. Para la inmunización de los conejos se preparan conjugados con las hormonas tiroideas específicas para la producción de anticuerpos.

Tomando en cuenta la gran controversia que se ha reportado en la preparación de conjugado de hormona tiroidea, en este trabajo se determinaron las condiciones óptimas de reacción en la formación de conjugados entre triiodotironina (T<sub>3</sub>) y tiroxina (T<sub>4</sub>) y seroalbumina bovina (BSA) como proteína acarreadora con el fin de obtener un método general adecuado a las condiciones de trabajo de laboratorio.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL.

4.1.1. Obtener un inmunógeno óptimo para la producción de anticuerpos antihormonas tiroideas en conejos.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

4.2.1. Encontrar las condiciones óptimas de reacción en la formación de conjugados entre T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> y proteína acarreadora seroalbumina bovina (BSA).

4.2.2. Establecer el mejor método para evaluación del porcentaje de conjugación para las hormonas T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> a seroalbumina bovina (BSA).

4.2.3. Demostrar cual es el mejor método para la purificación del producto obtenido.

## 5. HIPOTESIS

La mejor condición para la obtención de conjugados de las hormonas tiroideas es utilizando hidróxido de sodio como solvente, un pH = 5 y una temperatura de 4 °C.

## 6. MATERIALES Y METODOS

### 6.1. Universo del trabajo.

En este trabajo se determinaron las condiciones óptimas de reacción para la formación de conjugados de tiroxina (T<sub>4</sub>) y triiodotironina (T<sub>3</sub>) con seroalbumina bovina (BSA)

### 6.2. Medios

#### 6.2.1. Recursos Humanos:

Autor: Myriam Rebeca Alcázar Castillo.

Asesor: Lic. Rosana Mazariegos López

Personal profesional y técnico del laboratorio del Departamento de Medicina Nuclear, Dirección General de Energía Nuclear, Ministerio de Energía y Minas con sede en el Hospital General San Juan de Dios.

#### 6.2.2. Recursos Materiales

Baño María

Agitador magnético.

Pipetas automáticas de 20 ul, 50 ul, 100 ul y 1000 ul.

2 balones 25, 50, 100 ml.

3 baeckers 10, 50, 100 ml.

200 tubos de poliestireno.

2 columnas cromatográficas.

1 espectrofotómetro.

1 contador gamma.

### **6.2.3. Reactivos.**

450. mgr. seroalbumina bovina fracción V, Sigma Cat. A-2153.

360 mgr. L-tiroxina (ácido libre), Sigma cat. T-2376.

40 ml. Dimetilformamida, Sigma cat. D-4254

1-etil-3-(3 dimetil-aminopropil) carbodiimida hidrociorada,  
Sigma cat. E-6383.

Sephadex G-25 fine, Sigma cat. G-2580.

Hidróxido de sodio (NaOH).

Hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub> OH).

Etanol (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH).

Acido clorhídrico (HCl).

Acido acético (CH<sub>3</sub>COOH)

Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>

T<sub>4</sub> 125I

Agua destilada.

### **6.3. Procedimiento.**

- Se preparó la solución A disolviendo 25 mg. de seroalbumina bovina en 12.5 ml. de agua tridestilada para pH = 5 o un buffer de fosfatos 0.1 M. si es a un pH = 7.



- En la solución A se disolvieron 15 mg. de clorhidrato de 1-etil-3[3 dimetil aminopropil carbodiimida (CDI)].
- Se ajustó el pH a 5 o 7 según sea el caso.
- Preparación de la solución B: 10 mg. de hormona ácido libre se disolvieron en 1 ml. del disolvente a probar, luego se agrega la hormona marcada.
- Se adicionó la solución B a la solución A gota a gota con agitación constante y con la temperatura convenida (4 °C, temperatura ambiente ó 37 °C).
- Después de 10 minutos se adicionó nuevamente 10 mg. de clorhidrato de 1-etil-3(3-dimetil aminopropil) carbodiimida. (ver anexo 3 y 4).
- Se dejó agitando durante 24 horas a la temperatura a probar.
- Antes de purificar el conjugado se tomó la lectura inicial.
- Después de la purificación del conjugado se tomó la lectura final.
- Se realizaron los cálculos para determinar el porcentaje de unión.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

#### 6.4. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Análisis de varianza para un diseño factorial de 2 x 3 x 3.

Factores y niveles:

1. pH (2 niveles = 5 y 7)
2. Disolvente (3 niveles = NaOH, DMF, NH<sub>4</sub>OH/ET).
3. Temperatura (3 niveles = 4 °C, ambiente, 37 °C).

Respuesta a medir = cuentas por minuto (cpm) transformando a logit. para normalizar los datos.

- Se dió una diferencia significativa entre los factores:  
Por lo que se realizó comparaciones múltiples (prueba de la mínima diferencia significativa de Fischer-LSD)
- Se realizaron gráficas de interacción para la selección de la combinación más adecuada.

## 7. RESULTADOS

En este trabajo se evaluaron diferentes condiciones de conjugación, con el objeto de obtener el mayor número de grupos hapténicos acoplados a la proteína acarreadora.

Los grupos hapténicos utilizados fueron hormonas T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>, como proteína acarreadora se empleó la seroalbumina bovina.

T<sub>3</sub>: Las condiciones que se utilizaron para la conjugación de la hormona T<sub>3</sub> fueron pH=5 y pH=7, temperaturas ambiente, 4 °C y 37 °C; como solventes NaOH y Dimetilformamida (DMF). Para cada condición se realizaron pruebas por triplicado.

Los resultados obtenidos para las diferentes condiciones se muestran en la tabla No. 1, los cuales se expresan en porcentaje de conjugación y relación T<sub>3</sub>-BSA.

De acuerdo con estos, se observa que las condiciones en las que mayor porcentaje de conjugación y relación molar se obtuvo, es utilizando como solvente: NaOH, pH de conjugación = 5, temperaturas de 4 °C y 37 °C. Si se utiliza NaOH con un pH de conjugación = 7, la temperatura que favorece la reacción es a 37 °C. Como puede observarse los pH y las temperaturas varían, por lo que para determinar la mejor condición

para la reacción de acoplamiento, se aplicó un análisis de varianza, con un diseño factorial de  $2 \times 3 \times 2$  en donde la probabilidad de error fué para un  $\alpha = 0.05$ .

En la tabla No. 2 se muestra la probabilidad de error para cada uno de los factores y sus interacciones. Los factores que presentan una probabilidad menor para un  $\alpha = 0.05$  son, el solvente y la interacción pH/solvente, esto determina que entre estos, existe una diferencia estadísticamente significativa y que por lo tanto el pH y el solvente son factores que influyen en la reacción de conjugación, entre la hormona y la proteína acarreadora.

Haciendo un análisis de los diferentes factores se observa que en la interacción temperatura y pH no existe mayor diferencia en los porcentajes de conjugación ( $p=0.8358$ ) (gráfica No. 1), en cambio entre los solventes y el pH de conjugación los porcentajes de conjugación varían ( $p=0.0268$ ), obteniéndose el mayor porcentaje usando NaOH y un pH= 5 (gráfica No 2).

Realizando una combinación de los tres factores: pH, temperatura, solvente, se observa que, a pH=5 con NaOH y en todas las temperaturas evaluadas, ( $p=0.7656$ ), los porcentajes de conjugación varían poco, en cambio con la Dimetilformamida (DMF) se observa un aumento del porcentaje de conjugación utilizando una temperatura de  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $p=0.0039$ ).

Al comparar los porcentajes de conjugación obtenidos con los solventes (NaOH, DMF), a un pH=7, no se observó diferencia significativa en las tres temperaturas evaluadas ( $p=0.7656$ ). A este pH, si se utiliza NaOH, se observa mejor conjugación a 37 °C. Con DMF la conjugación se favorece a temperatura ambiente.

T<sub>4</sub>: En la conjugación de la hormona T<sub>4</sub> a la seroalbumina (BSA), se realizaron pruebas por triplicado en las que se utilizaron las siguientes condiciones: pH=5 y pH=7, temperatura: ambiente, 4 °C y 37 °C y como solvente NaOH, DMF, NH<sub>4</sub>OH/etanol.

Los resultados obtenidos para las diferentes condiciones se muestran en la tabla No. 7, los cuales se expresan en porcentajes de conjugación y relación T<sub>4</sub>-BSA.

De acuerdo con estos, se observa que los mayores porcentajes se muestran en las siguientes condiciones:

Con NaOH, temperatura de 4 °C y un pH de conjugación=5.

NaOH, temperatura de 37 °C y un pH de conjugación=5.

NH<sub>4</sub>OH/etanol, temperatura de 37 °C y un pH de conjugación= 7.

Para determinar la mejor combinación, se aplicó un análisis de varianza con un diseño de 2x3x3 en donde la probabilidad de error es para un  $\alpha = 0.05$ .

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla No. 8, en donde la probabilidad de error menor para un  $\alpha = 0.05$  se muestran en los factores siguientes: pH, interacción temperatura/solvente y pH/temperatura/solvente, esto determina que entre estas condiciones, existe una diferencia significativa y que por lo tanto son factores que influyen en la reacción de conjugación.

Haciendo un análisis de los diferentes factores se observa que, en la interacción pH y temperatura, los porcentajes de conjugación muestran poca variación ( $p=0.293$ ) (gráfica No. 4), similar resultado se observan en la interacción solvente y pH ( $p=0.0681$ ) (gráfica No. 5), en cambio en la interacción temperatura/solvente los porcentajes de conjugación varían, ( $p=0.0007$ ), obteniéndose los mayores porcentajes, utilizando NaOH con una temperatura de 4 °C ó con NH<sub>4</sub>OH/etanol a una temperatura de 37 °C (gráfica No. 6).

Realizando una combinación de los tres factores, pH, temperatura y solvente se observa que las condiciones en las que se obtiene un mayor porcentaje de conjugación en la reacción de acoplamiento T<sub>4</sub>-BSA es utilizando NaOH, un pH de conjugación = 5 y una temperatura de 4 °C; similares porcentajes de conjugación se obtienen al utilizar NH<sub>4</sub>OH/etanol con pH de conjugación = 7 y un temperatura de 37 °C (gráfica No. 7).

Al existir una diferencia estadística, se realizaron com

paraciones múltiples (prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher-LSD) en la que los resultados obtenidos fueron que las mejores combinaciones para la reacción es utilizando NaOH/pH=5/temp.= 4 °C ó NH<sub>4</sub>OH/etanol/temp.= 37 °C, no existiendo mayor variabilidad al comparar ambas combinaciones de condiciones (p=0.0014).

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

## 8. CONCLUSIONES:

Para la conjugación de la hormona T<sub>3</sub> con seroalbumina bovina, la condición en la que se obtiene mayor porcentaje es utilizando como solvente el NaOH y un pH de conjugación igual a 5, las temperaturas no varían ( $p=0.8912$ ), por lo tanto la reacción puede realizarse tanto a temperatura ambiente como a 4 °C y 37 °C.

Para la conjugación de la hormona T<sub>4</sub> con seroalbumina bovina, las condiciones en las que se obtiene mayor porcentaje de conjugación son utilizando como solventes NaOH, pH de conjugación igual a 5 y una temperatura de 4 °C ó usando NH<sub>4</sub>OH/etanol, pH de conjugación igual a 7 y una temperatura de 37 °C. En ambas condiciones no existe mayor variabilidad.

Con respecto al método de purificación diálisis y columna cromatográfica, ambas metodologías pueden ser utilizadas para eliminar la hormona que quedó sin unirse a la seroalbumina bovina. La única diferencia entre ambos métodos es el tiempo que se utiliza, ya que la diálisis se realiza en 72 horas y la columna emplea 3 horas.



## 9. RECOMENDACIONES:

Para la conjugación de la hormona T<sub>4</sub> se considera que deben realizarse mayor número de determinaciones para las interacciones pH de 5/NaOH/temp. = 4 °C ó NH<sub>4</sub>OH/etanol/pH de 7/temp. = 37 °C y establecer cuál es la mejor técnica, sus ventajas y desventajas.

Con los conjugados producidos se deberá inocular animales de laboratorio para determinar que técnica de conjugación produce una mejor respuesta en la producción de anticuerpos.

En los cambios de pH, debe determinarse la cantidad de hidróxidos o ácido que se agrega a la solución de albumina, ya que esta se desnaturaliza fácilmente en los cambios de pH bruscos.

En el método de purificación por columna, los volúmenes de cada fracción recolectada deben ser uniformes, pues la actividad del trazador utilizado para monitorear la conjugación es proporcional al volumen.

## 10. REFERENCIAS

- 10.1. Gradwhol J. Métodos y diagnóstico de laboratorio. 8a. ed. México: Panamericana 1983. p. 1066-1067.
- 10.2. Kaplan L. Clinical chemistry. 2a. ed. USA: The CV, Mosby Company. 1987. p. 153-205.
- 10.3. Stites S. Inmunología Básica y Clínica. 4a. ed. México D.F.: Manual Moderno C.S.A. 1983. p. 756-762.
- 10.4. Hudson L. Inmunología Práctica. Barcelona: Jims. 1976. p. 326-335.
- 10.5. Jaffe B. Methods of hormone radioimmunoassay. 2a. ed. New York: Academic Prees. 1979. p. 257.
- 10.6. Bellanti AJ. Inmunología. 3a. ed. México D.F.: Interamericana 1988. p. 87-95.
- 10.7. Richard G. et al. Principles of radioimmunoassay. USA: Departments of Health an Human Services Centers for Disease Control. 1984. p. 35-197.
- 10.8. Bennet CW. Serología Clínica. Buenos Aires: Panamericana. 1976. p. 244.

- 10.9. Roitt J. Esencial Inmonology. 3a. ed. Oxford, London:  
Blackwell Scientific Publications. 1977. p. 324-340.
- 10.10. Barret J. Inmunología Médica. 5a. ed. México D.F.:  
Interamericana. 1990. p. 463.
- 10.11. Hunter WM, Cerrie JE. Immunoassay for clinical  
Chemistry. 2a. ed. New York: Churchill Living Stone.  
1983. p. 447-455.
- 10.12. Castrillo R. Naturaleza química de los adyuvantes.  
1993, vol. XIII.71. p. 30-33.
- 10.13. Sheehan J. The use of water soluble and basic  
carbodiimide in peptides synthesis. J. Organic Chem.  
1956. 21:439-441.
- 10.14. Vaughan J Jr. Scylalkyl carbonates as acylating agents  
for the synthesis of peptides. J. am chem soc. 1951.  
73:35-47.
- 10.15. Sheehan C, Prees G. A new method forming peptide  
bonds. J. am chem soc. 1956. 77:1067
- 10.16. Berzotsky JA. Intrinsic and extrinsic factor in  
protein antigenic structure. Science 1985. 29:932-940.

- 10.17. Curtis AW. Methods in immunology: preparation of antigen and antibodies. New York: Academic press. vols. 2, vol. I, 1967. p. 153-157.
- 10.18. Inder JC, et al. Production of antibodies specifically binding triiodo thyronine and thyroxine. J. clin end. 1971. 32:299-301.
- 10.19. Inder J, Chopra. A radioimmunoassay for measurement of thyroxine in unextracted serum. J. clin endermet. 1972. 34:938.
- 10.20. Sean PC, et al. Hapten concentrations in the circulation of animals actively immunized with hapten protein conjugates. J. immunol. 1976. 116:2:363-366.
- 10.21. Erlanger, B. et al. Steroid protein conjugates. I. preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone. J. biol chem. 1957. 228:713:435-440.
- 10.22. Jhonson K, Hall H. The use of water-soluble carbodiimide as a coupling reagent in the passive hemagglutinations test. J. inm. 1966. 97:791.
- 10.23 Goodfriend TL, et al. Antibodies to bradkin and angiotensin: a use of carbodiimide in immunology.

Science 1964. 144:1344-1346.

10.24 Oliver G. Jr, et al. The measurement of digitoxin in human serum by radioimmunoassay. J. clin inv. 1968. 47: 1035-1041.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

10.25 Burke C, Shakespear. Rapid purification of triiodothyronine and thyroxine protein conjugates for antibody production. J. endocr 1975. 5: 133-138.

10.26 Erlanger B, et al. Steroid-protein conjugates: II. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum with progesterone deoxycorticosterone and estrone. J. biol chem. 1958. 234: 15: 1099.

10.27 Inder J, Chopra. A radioimmunoassay for measurement of 3, 3'5' - triiodothyronine (reverse T3). J. clin inv. 1978. 54:583-593.

10.28 Hossein, et al. Radioimmunoassay for triiodothyronine (T3). I. Affinity and specificity of antibody for T3. J. clin endocr metab. 1971. 33:507.

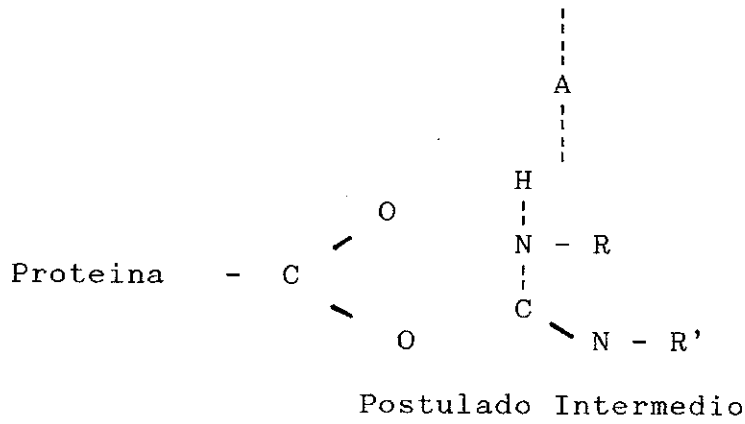
10.29 Terunori Mitsuma, et al. Radioimmunoassay of triiodothyronine in unextracted human serum. J. clin metab. 1971. 33:365-367.

10.30 Chopra J. et al. Radioimmunoassay for measurement of 3,5,3' - triiodothyroidal sulfate. Studies in thyroidal and nonthyroidal disease, pregnancy and neonatal. J. clin ender metb. 1992. 75:189-194.

10.31 Larsen Pr. Direct immunoassay of triiodothyronine inhuman serum. J. clin inv. 1972. 51:1939.

*ANEXOS*

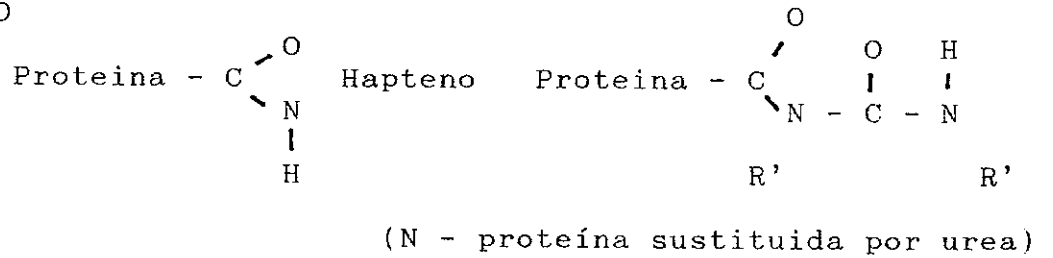
PROBABLE MECANISMO DE REACCION DEL  
HAPTENO PROTEINA - CARBODIIMIDA



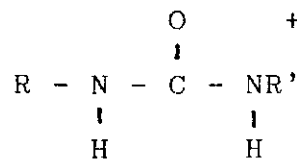
+



ACOPLADO

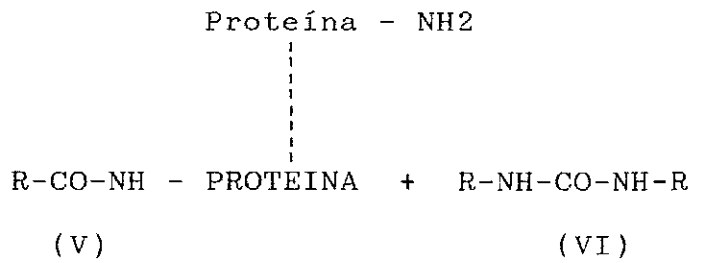
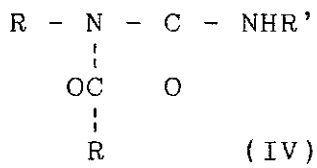
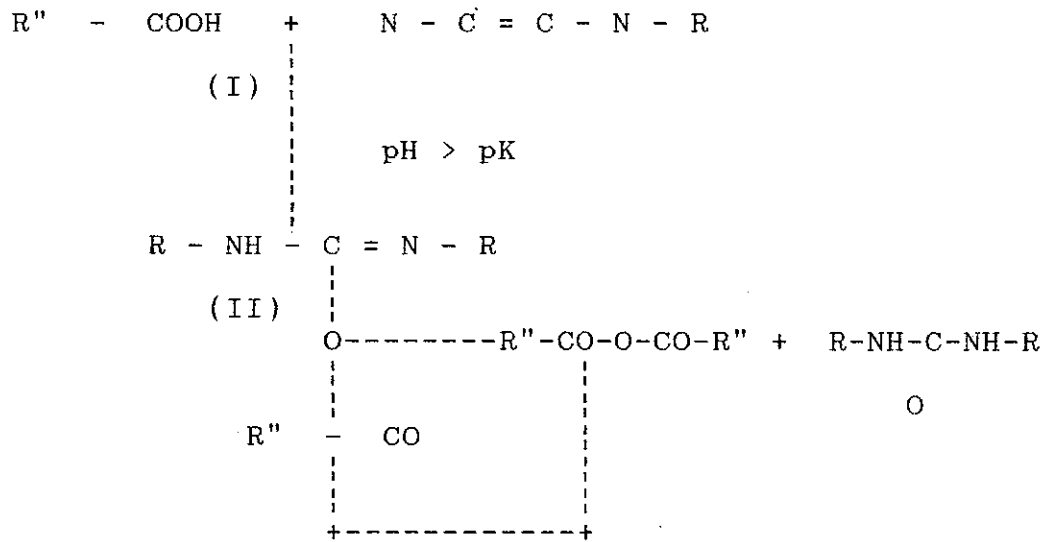


Producto acoplado





REACCION DE LA CARBODIIMIDA



PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

## ANEXO No. 3

TABLA DE PROCEDIMIENTO PARA T4

No.	HORMONA	pH	TEMPERATURA	SOLVENTE
01	T4	5.0	4 °C	NaOH
02	T4	5.0	4 °C	NaOH
03	T4	5.0	4 °C	NaOH
04	T4	5.0	ambiente	DMF
05	T4	5.0	ambiente	DMF
06	T4	5.0	ambiente	DMF
07	T4	5.0	37 °C	NH <sub>4</sub> OH/ET
08	T4	5.0	37 °C	NH <sub>4</sub> OH/ET
09	T4	5.0	37 °C	NH <sub>4</sub> OH/ET
10	T4	7.0	4 °C	NaOH
11	T4	7.0	4 °C	NaOH
12	T4	7.0	4 °C	NaOH
13	T4	7.0	ambiente	DMF
14	T4	7.0	ambiente	DMF
15	T4	7.0	ambiente	DMF
16	T4	7.0	37 °C	NH <sub>4</sub> OH/ET
17	T4	7.0	37 °C	NH <sub>4</sub> OH/ET
18	T4	7.0	37 °C	NH <sub>4</sub> OH/ET

NaOH                    Hidróxido de sodio  
DMF                      Dimetil formamida  
NH<sub>4</sub>OH/ET              Hidróxido de amonio/etanol

## ANEXO No. 4

TABLA DE PROCEDIMIENTO PARA T3

No.	HORMONA	pH	TEMPERATURA	SOLVENTE
01	T3	5.0	4 °C	NaOH
02	T3	5.0	4 °C	NaOH
03	T3	5.0	4 °C	NaOH
04	T3	5.0	ambiente	DMF
05	T3	5.0	ambiente	DMF
06	T3	5.0	ambiente	DMF
07	T3	5.0	37 °C	NH <sub>4</sub> OH/ET
08	T3	5.0	37 °C	NH <sub>4</sub> OH/ET
09	T3	5.0	37 °C	NH <sub>4</sub> OH/ET
10	T3	7.0	4 °C	NaOH
11	T3	7.0	4 °C	NaOH
12	T3	7.0	4 °C	NaOH
13	T3	7.0	ambiente	DMF
14	T3	7.0	ambiente	DMF
15	T3	7.0	ambiente	DMF
16	T3	7.0	37 °C	NH <sub>4</sub> OH/ET
17	T3	7.0	37 °C	NH <sub>4</sub> OH/ET
18	T3	7.0	37 °C	NH <sub>4</sub> OH/ET

NaOH                    Hidróxido de sodio  
DMF                      Dimetil formamida  
NH<sub>4</sub> OH/ET            Hidróxido de amonio/etanol

Tabla No. 1  
 RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA CONJUGACION DE HORMONA T3 A SEROALBUMINA BOVINA

No.	pH	Temp.	Solvente	Metodo Purif.	% conj	% conj	% conj	T3/BSA	T3/BSA	T3/BSA
01.	5	amb.	NaOH	D	23.9	81.4	89.2	10.88	32.94	28.5
02.	5	4 C	NaOH	D	24.0	85.3	77.0	9.01	30.70	22.5
03.	5	37 C	NaOH	D	19.0	79.0	82.0	11.56	19.28	24.3
04.	7	amb.	NaOH	D	25.0	49.2	48.3	21.0	18.0	22.3
05.	7	4 C	NaOH	C	48.1	28.0	35.5			
06.	7	37 C	NaOH	D	22.79	70.5	66.0	5.76	10.39	16.4
07.	5	amb.	DMF	D	16.0	23.0	18.0	10.52	5.88	9.45
08.	5	4 C	DMF	D	15.4	16.0	20.2	15.38	21.18	18.6
09.	5	37 C	DMF	D	15.3	46.3	38.0	18.00	24.00	22.0
10.	7	amb.	DMF	D	56.7	42.6	52.0	3.03	18.73	13.2
11.	7	4 C	DMF	D	17.6	47.7	42.2	4.80	11.55	17.3
12.	7	37 C	DMF	C	12.9	31.6	31.0			

D = Dialisis.  
 C = Columna Cromatografica.

**Tabla No. 2**  
**ANALISIS DE VARIANZA PARA UN DISEÑO FACTORIAL DE 2 × 3 × 3**  
**EN HORMONA T3**

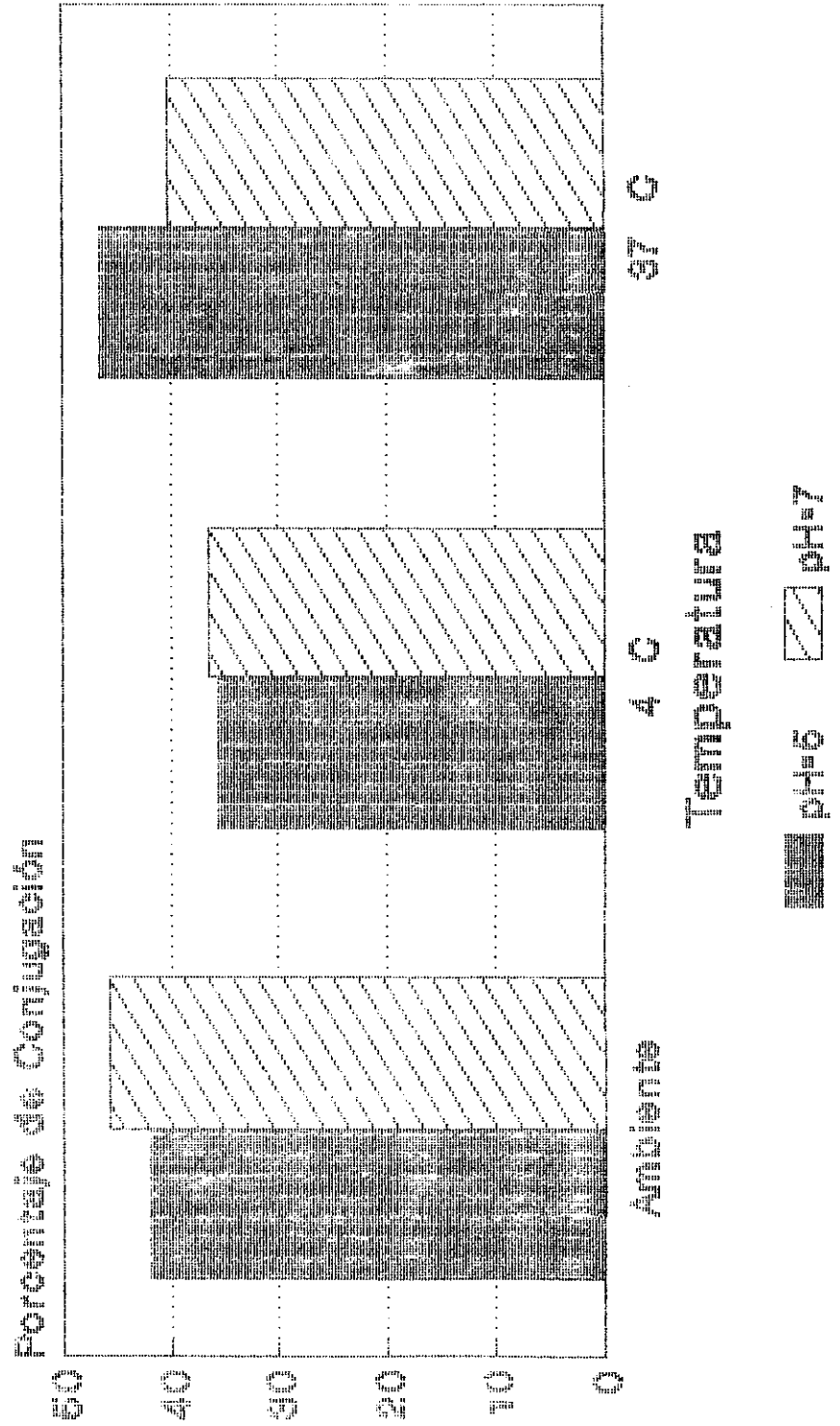
FACTORES	DS	Suma de cuadrados	media al cuadrado	Prueba S	valor promedio
pH(A)	1	34.633	34.633	.077	.7833
Temperatura (B)	2	241.869	120.935	.27	.7656
AB	2	161.779	80.889	.181	.8358
Solvente (C)	1	4571.788	4571.788	10.213	.0039
AC	1	2491.84	2491.84	5.566	.0268
BC	2	103.646	51.823	.116	.8912
ABC	2	1234.732	617.366	1.379	.2711
Error	24	10743.759	447.657		

**Tabla No. 3**  
**PORCENTAJE DE CONJUGACION EN LA INTERACCION pH/TEMPERATURA**  
**DE LA HORMONA T3**

		Temperaturas			total
		ambiente	4 C	37 C	
pH	5	41.917	39.65	46.6	42.722
	7	45.633	36.517	40.132	40.761
Totales		43.775	38.083	43.366	41.741

Gráfica No. 1 (Tabla No. 3)

# Interacción pH/Temperatura para la Conjugación T3-BSA



**Tabla No. 4**  
**PORCENTAJE DE CONJUGACION EN LA INTERACCION pH/SOLVENTE**  
**EN HORMONA T3**

		Solvente		Totales
		NaOH	DMF	
pH	5	62.311	23.133	42.722
	7	43.71	37.811	40.761
Totales		53.011	30.472	41.741

**Tabla No. 5**  
**PORCENTAJE DE CONJUGACION EN LA INTERACCION TEMPERATURA/SOLVENTE**  
**EN HORMONA T3**

		Solvente		Totales
		NaOH	DMF	
Temp.	ambiente	52.833	34.717	43.775
	4 C	49.65	26.517	38.083
	37 C	56.548	30.183	43.366
Totales		53.011	30.472	41.741

Gráfica No. 2 (Tabla No. 4)

# Interacción pH/Solvente para la Conjugación T3-BSA

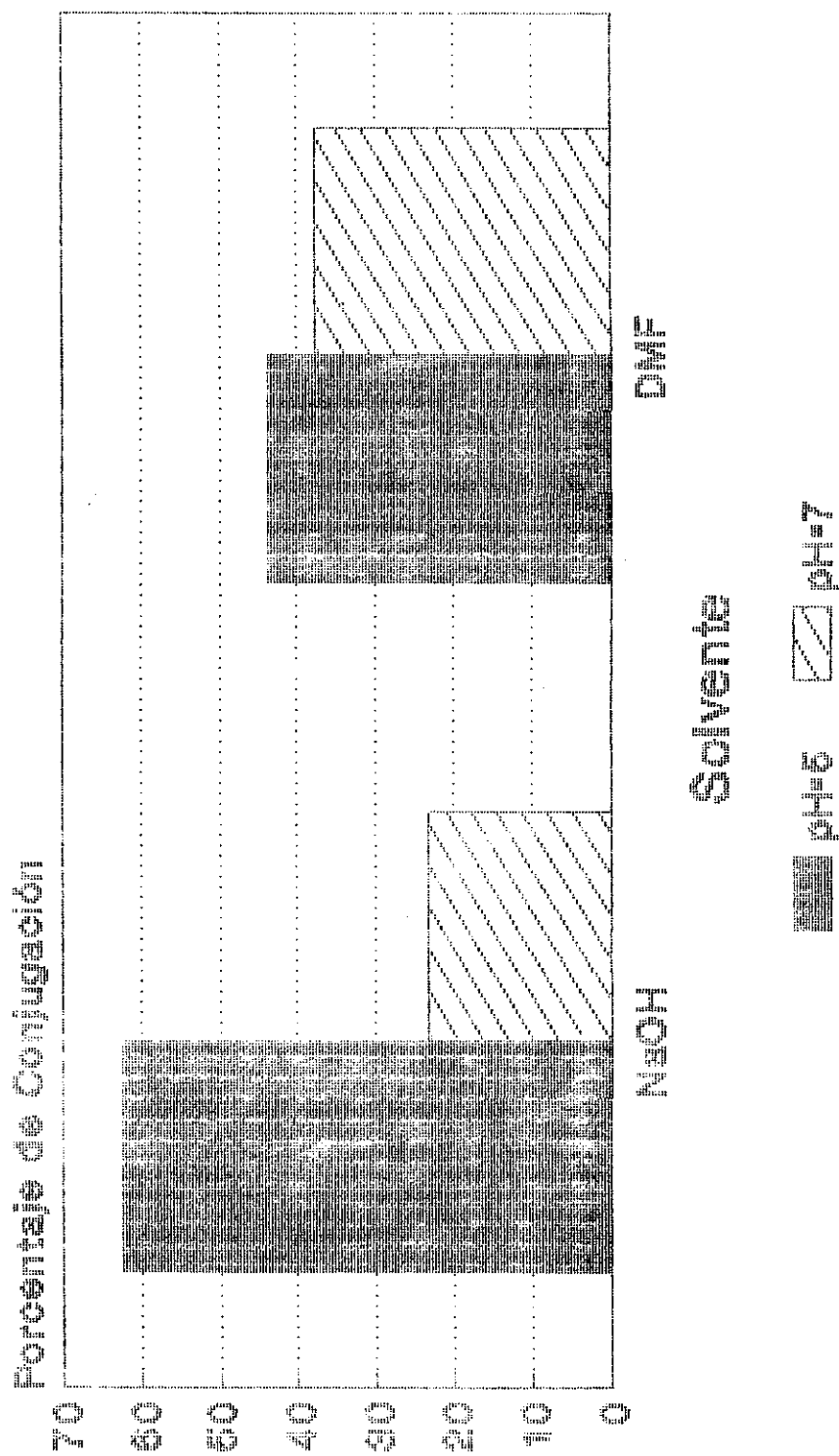


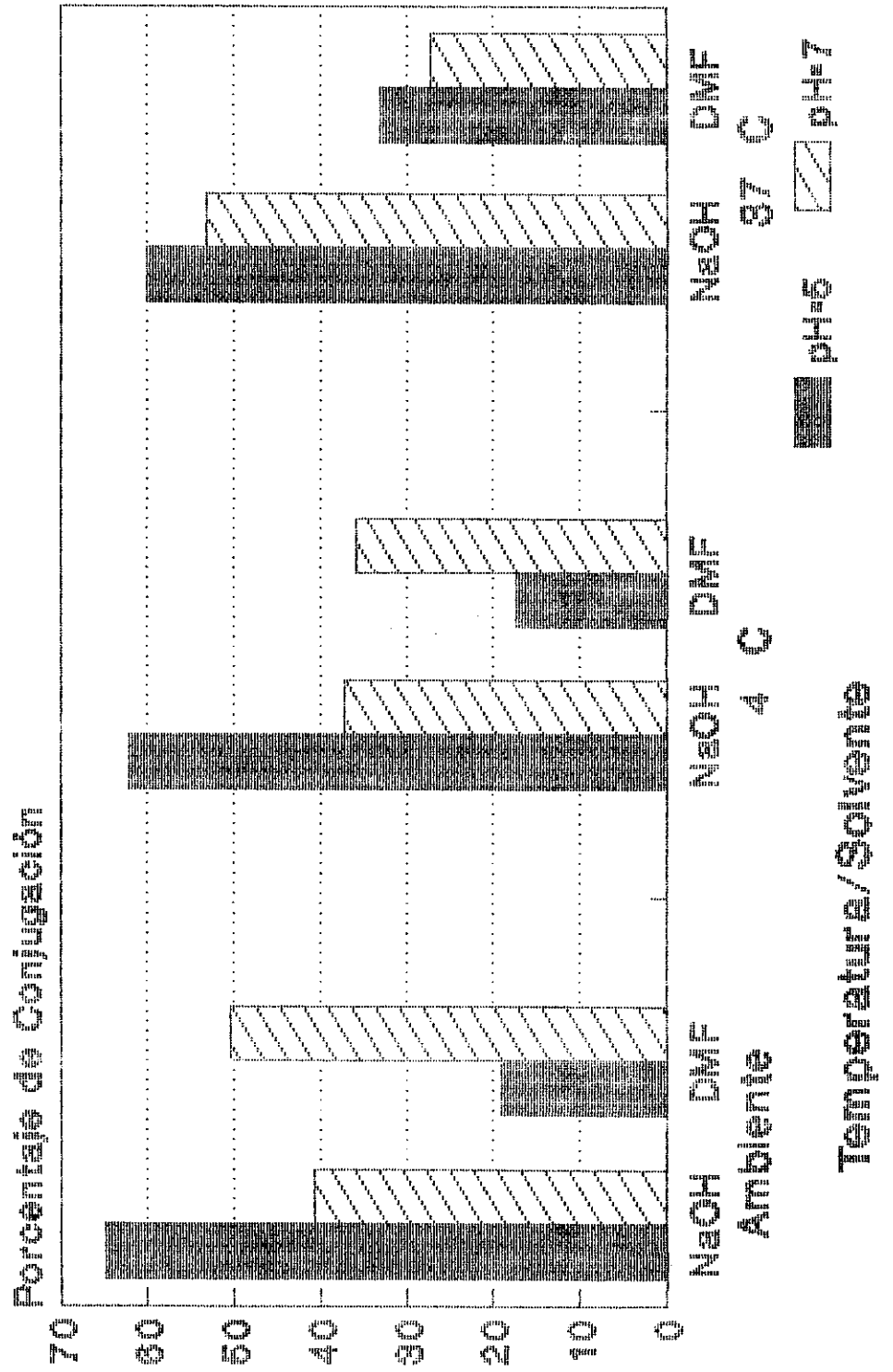


Tabla No. 6  
 PORCENTAJE DE CONJUGACION EN LA INTERACCION pH/TEMPERATURA/SOLVENTE EN HORMONA T3

Solvente		Temperatura						Totales
		ambiente		4 C		37 C		
		NaOH	DMF	NaOH	DMF	NaOH	DMF	
pH	5	64.833	19	62.1	17.2	60	33.2	42.722
	7	40.833	50.433	37.2	35.833	53.097	27.167	40.761
Totales		52.833	34.717	49.65	26.517	56.548	30.183	41.741

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
 Biblioteca Central

Gráfica No. 3 (Tabla No. 6)  
**Interacción pH/Temperatura/Solvente**  
**para la Conjugación T3-B5A**



**Tabla No 8**  
**ANALISIS DE VARIANZA PARA UN DISEÑO FACTORIAL DE 2 × 3 × 3**  
**EN HORMONA T4**

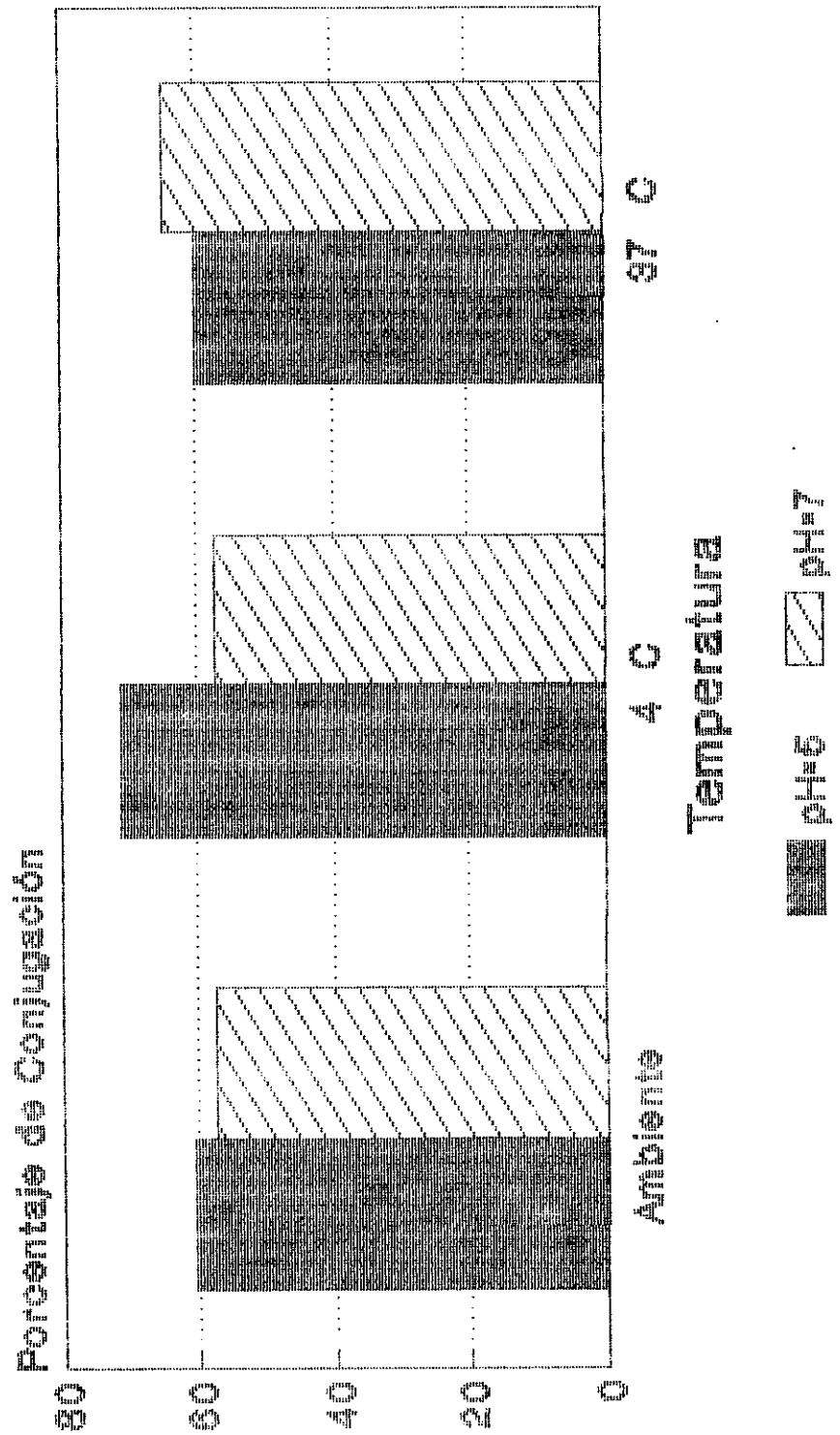
FACTORES	DS	Suma de cuadrados	media al cuadrado	Prueba S	valor promedio
pH(A)	1	599.8	599.8	4.771	.0355
Temperatura (B)	2	496.609	248.304	1.975	.1535
AB	2	319.425	159.713	1.271	.293
Solvente (C)	2	629.905	346.453	2.756	.077
AC	2	728.678	364.339	2.898	.0681
BC	4	3105.519	776.38	6.176	.0007
ABC	4	2789.235	697.309	5.547	.0014
Error	36	4525.447	125.707		

**Tabla No. 9**  
**PORCENTAJE DE CONJUGACION EN LA INTERACCION pH/TEMPERATURA**  
**EN HORMONA T4**

		Temperaturas			
		ambiente	4 C	37 C	total
pH	5	60.841	71.033	68.033	66.636
	7	57.567	57.489	64.856	59.97
Totales		59.204	64.261	66.444	63.303

Gráfico No. 4 (Tabla No. 9)

# Interacción pH/Temperatura para la Conjugación T4-BSA



**Tabla No. 10**  
**PORCENTAJE DE CONJUGACION EN LA INTERACCION pH/SOLVENTE**  
**EN HORMONA T4**

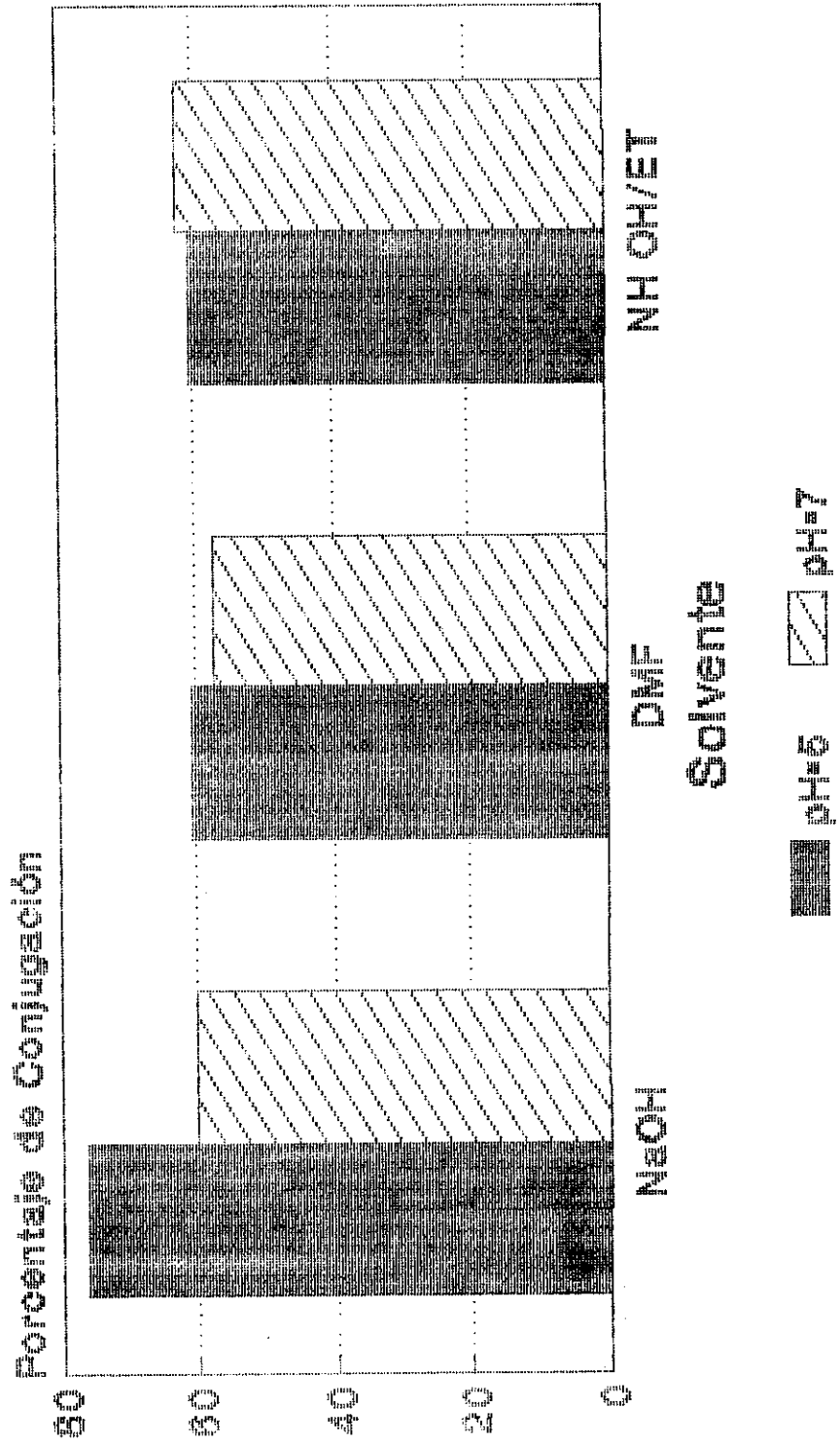
		Solvente			Totales
		NaOH	DMF	NH4OH/ET	
pH	5	76.452	62.633	60.822	66.636
	7	60.133	57.467	62.311	59.97
Totales		68.293	60.05	61.567	63.303

**Tabla No. 11**  
**PORCENTAJE DE CONJUGACION EN LA INTERACCION TEMPERATURA/SOLVENTE**  
**EN HORMONA T4**

		Solvente			Totales
		NaOH	DMF	NH4OH/ET	
Temp.	ambiente	62.245	68.933	46.433	59.204
	4 C	73.7	55.95	63.133	64.261
	37 C	68.933	55.267	75.133	66.444
Totales		68.293	60.05	61.567	63.303

Gráfico No. 6 (Tabla No. 10)

# Interacción Solvente/pH para la Conjugación T4-BSA



Gráfica No. 6 (Tabla No. 11)

# Interacción Temperatura/Solvente para la Conjugación T4-BSA

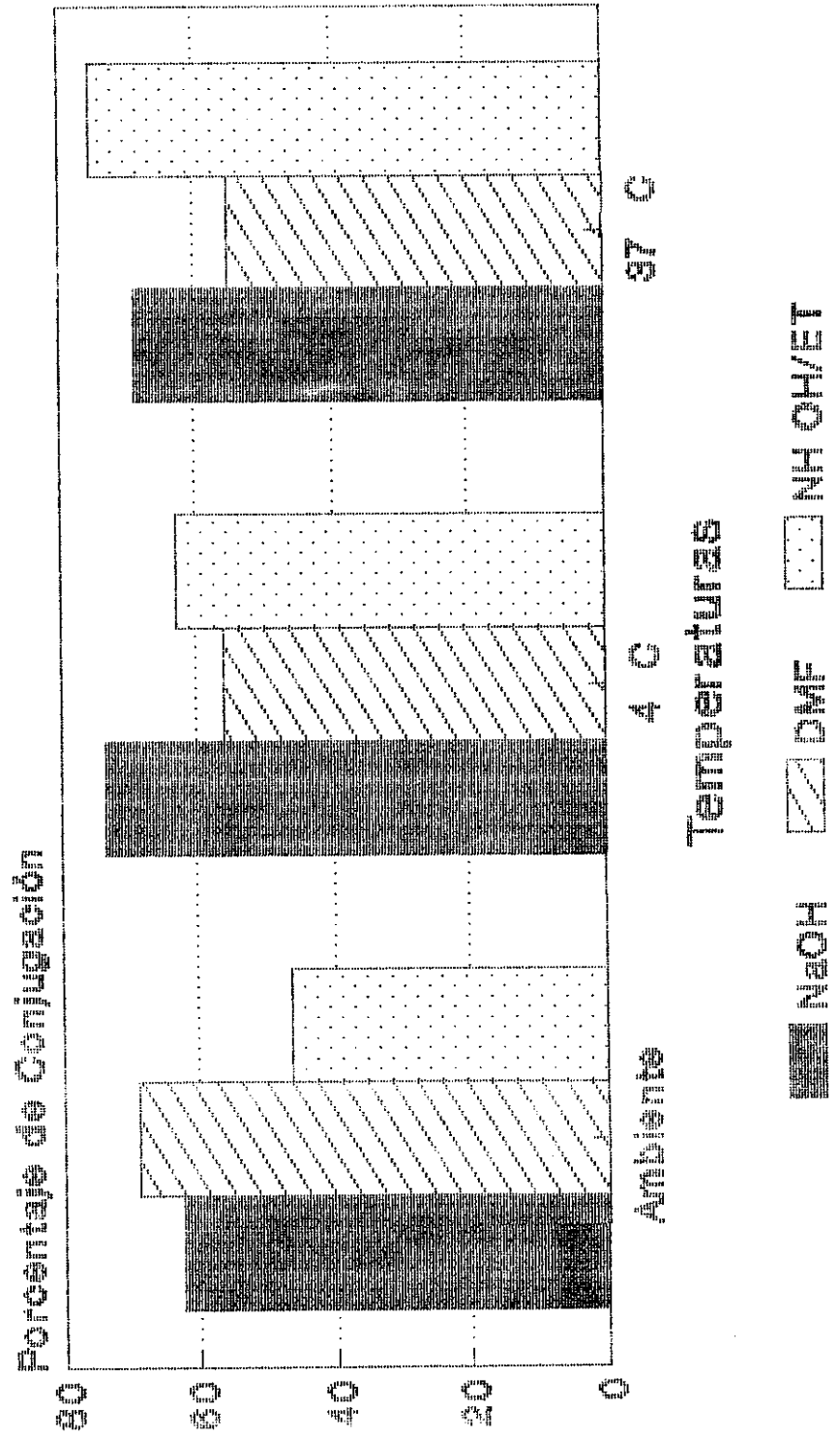
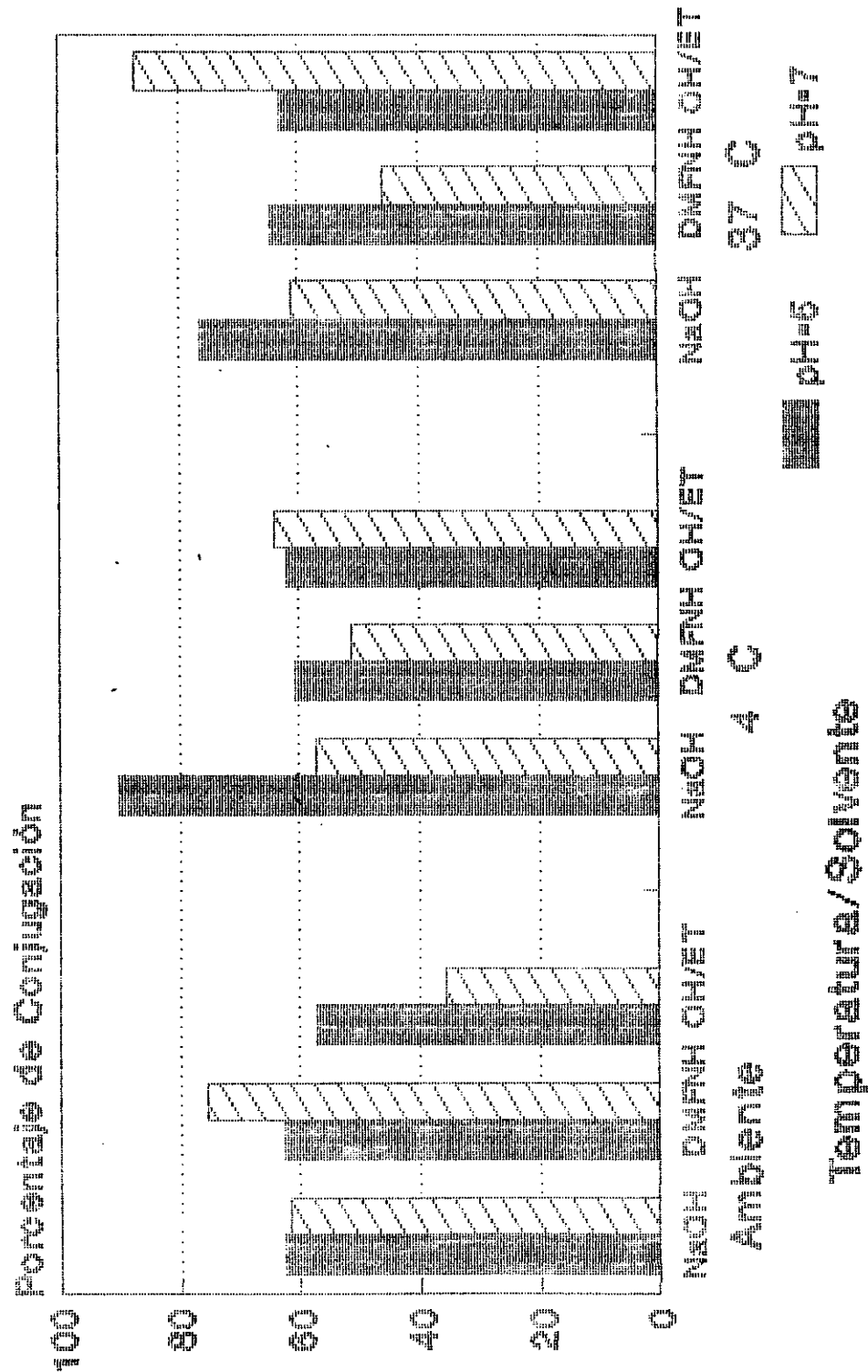


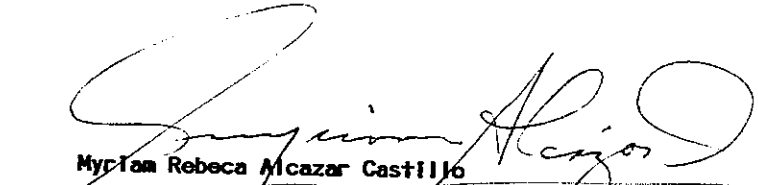
Tabla No. 12  
 PORCENTAJE DE CONJUGACION EN LA INTERACCION pH/TEMPERATURA/SOLVENTE EN HORMONA T4

		Temperatura									Totales
		ambiente			4 C			37 C			
		NaOH	DMF	NH4OH/ET	NaOH	DMF	NH4OH/ET	NaOH	DMF	NH4OH/ET	
pH	Solvente										
	5	62.657	62.633	57.233	90.133	60.8	62.167	76.567	64.467	63.067	66.636
	7	61.833	75.233	35.633	57.267	51.1	64.1	61.3	46.067	87.2	59.97
	Totales	62.245	68.933	46.433	73.7	55.95	63.133	68.933	55.267	75.133	63.303

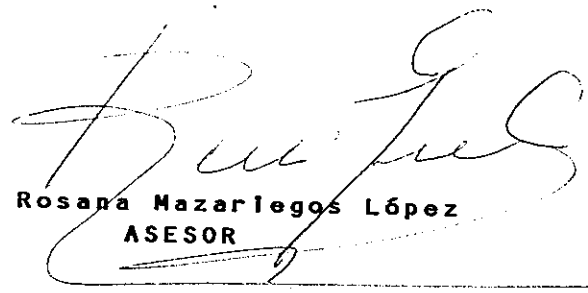


Gráfica No. 7 (Tabla No. 12)  
 Interacción pH/Temperatura/Solvente  
 para la Coniugación T4-BSA





**Myriam Rebeca Alcazar Castillo**  
**AUTOR**



**Lic. Rosana Mazarlegos López**  
**ASESOR**



**Lic. Gerardo Arroyo**  
**DIRECTOR**



**Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar**  
**DECANO**