RADIOINMUNOANALISIS EN EL ESTUDIO DE ANEMIAS

Dr. MARIO LOPEZ JIMENEZ, Sr. JOSE RIVERA, Sr. MANUEL BALDEON, Srta. PATRICIA DAZA, Sr. FERNANDO MARIÑO, Dr. PATRICIO LOPEZ–JARAMILLO

Facultad de Ciencias Médicas. Laboratorio de Investigación, Unidad de RIA.

RESUMEN

Se discute las propiedades de sensibilidad y especificidad del radioinmunoanálisis y su aplicabilidad para la dosificación de ferritina sérica. Se describe el método empleado en el Laboratorio de Investigaciones de Bioquímica de la Facultad de Medicina para la medición de la misma, destacándose su importancia en el diagnóstico y pronóstico de la anemia por déficit de Fe, que es la mayor incidencia en nuestro medio. **(Revista de la Facultad de Ciencias Médicas (Quito), 11: 33, 1986).**

La deficiencia de Hierro es la más común de las deficiencias nutricionales identificables en países industrializados (1). En el Ecuador a pesar de no existir un diagnóstico nacional, los varios estudios regionales realizados hasta el momento, llevaron a la conclusión que la anemia por déficit de hierro es la más común en nuestro país, afectando especialmente a grupos de alto riesgo, como son mujeres en edad reproductiva y niños en fase de crecimiento rápido (10).

Por estos motivos una serie de procedimientos diagnósticos han sido desarrollados en perspectivas de evaluar el "status de hierro", tales como la determinación de hierro sérico, la capacidad ligadora de hierro total y la transferrina sérica, los mismos que han sido probados y validados (7).

RADIOINMUNOENSAYO

El aporte que en el estudio de esta problemática pueden dar las técnicas radioinmunoanalíticas, se refieren especialmente a la determinación cuantitativa de ferritina sérica.

El radioinmunoensayo (RIA), método descrito por los doctores Berson y Yalow (11), y, que años más tarde les hiciera acreedores al premio Nobel, han permitido un salto gigantesco en ciertas especialidades médicas, por ser un método de alta sensibilidad que permite la medida y la posibilidad de expresar en números las concentraciones de un gran número de sustancias que se encuentran en un orden tan bajo como el de picogramos por litro, y que por su gran especificidad permite dosificar separadamente sustancias casi idénticas en su estructura química, a pesar que estas se encuentren mezcladas como sucede en la sangre y la orina, sustancias que ejemplarizan lo dicho son muchas de las hormonas que se encuentran en la sangre.

FUNDAMENTOS DEL RIA

La técnica de radioinmunoensayo se basa en la competencia entre un antígeno marcado con un radioisótopo y un antígeno no marcado, por un número limitado de sitios de unión

de un anticuerpo específico. Esta reacción obedece a la Ley de Acción de las Masas. Si es limitada la concentración de los anticuerpos y la cantidad del antígeno marcado, la cantidad del complejo antígeno marcado–anticuerpo será inversalmente proporcional a la cantidad del antígeno no marcado (Suero desconocido o patrón) midiendo la concentración del complejo antígeno frío–anticuerpo, permitiéndonos construir una curva patrón adecuada utilizando concentraciones perfectamente conocidas del antígeno idéntico al que va a ser dosificado. El método se completa con la separación del antígeno ligado del antígeno libre, siendo utilizado actualmente en forma general, el método del segundo anticuerpo, que consiste en la adisión de un segundo anticuerpo que es una gamaglobulina generada en cabra contra la gamaglobulina del animal (conejo) que produjo el primer anticuerpo. Para el montaje de un radioinmunoensayo se necesita principalmente del antígeno puro para la marcación del isótopo radioactivo y para los standares de la curva patrón. El primer anticuerpo específico es producido en una especie animal lejana de la escala zoológica del hombre, generalmente utilizamos el conejo y, el segundo anticuerpo a anti-primer anticuerpo que permita la separación de la fracción libre de la ligada. El método montado para la dosificación de ferritina sérica circulante representa un clásico radioinmunoensayo de doble anticuerpo (12).

CUANTIFICACION POR RIA DE FERRITINA

El principio del método consiste en que una alicuota de la muestra de suero del paciente conteniendo la ferritina endógena es combinada con ferritina radiomarcada con I^{125}. Una alicuota de antisuero anti–ferritina humana obtenida de conejo es luego añadida e incubada durante una hora. La separación de la forma libre de la ligada se realiza a través de la adisión de un segundo antisuero de gammaglobulina de cabra anticonejo, en la presencia de un acelerador de precipitación proteíca como es la centrifugación a altas revoluciones y la medición en el cintilografo gamma del precipitado completan el ensayo. La cantidad total de radioactividad utilizada es menor que 10 microcuries (2, 3, 4, 7, 9).

La muestra necesaria para el ensayo es de 0.5 mililitros de suero no hemolizado, no lipídico y el mismo puede ser almacenado entre temperaturas de 2° a 8° C., si el ensayo se lo realiza, en las primeras 48 horas, si no es este el caso el almacenamiento de la muestra deberá hacerse a 20° C.

Debemos anotar que los desórdenes inflamatorios crónicos, enfermedades infecciosas y/o neoplásticas producen un desproporcionado aumento en los niveles de ferritina sérica en relación al hierro corporal almacenado (6). Elevaciones excepcionales de ferritina pueden ocurrir en condiciones que causen una destrucción de las células parenquimatosas hepáticas ricas en ferritina (hepatitis viral, cirrosis, etc.) (3). Como en todos los test diagnósticos, un diagnótico clínico definitivo no puede basarse en el resultado de un solo test, sino que debe ser realizado sólamente después de que todos los hallazgos clínicos y laboratoriales hayan sido considerados.

La presencia de radioactividad o radioterapia o por test de Medicina Nuclear "in vivo" pueden afectar el resultado del radioinmunoensayo "in vitro".

La concentración media de ferritina en sangre de cordón es similar a la de hombres adultos, sufriendo un aumento en el primer mes de vida hasta alcanzar un pico máximo de 350 ug/L y luego decrece hasta cerca de 30 ug/L en los siguientes 3 a 5 meses. En la pubertad los niveles aumentan hasta alcanzar los 40 ug/L en la mujer adulta y los 140 ug/L en el hombre adulto (4).

La literatura ofrece una variada opinión sobre el rango de normalidad de los adultos por lo que es recomendable que cada Laboratorio establezca su propio rango basado en su propia población. La anemia por deficiencia de hierro, no complicada, está caracterizada generalmente por una ferritina sérica menor a los 120 ug/L (5).

El antisuero por nosotros empleado es obtenido de conejo contra ferritina humana altamente purificada de bazo. La dósis mínima detectable de este ensayo para ferritina sérica es de 1.2 ug/L.

UTILIDAD CLINICA

Se ha conceptualizado a la anemia como un estado patológico en el cual la tasa de hemoglobina es inferior a lo normal para un individuo dado, sinembargo podemos afirmar que la disminución de la tasa de hemoglobina es una manifestación tardía de la carencia de hierro, pudiéndose encontrar valores normales de hemoglobina cuando prácticamente los almacenamientos de hierro están depletados, al ser valorados por la dosificación de ferritina sérica, si se encuentra valores menores a 12 ug/L, y guarda una correlación directa con el hierro almacenado en una variedad de estados clínicos como fue demostrado por Addison en 1972 (3). Estudios posteriores han confirmado esta apreciación y actualmente la dosificación de ferritina sérica puede aportar valiosa información en el diagnóstico diferencial de deficiencia de hierro con otras formas de anemia. Además, la dosificación de ferritina sérica es un método no invasivo y muy sensible para la evaluación del hierro almacenado. La confiabilidad del método queda demostrado por las diferencias en los valores de ferritina sérica que se observa en mujeres, que son de 2 a 3 veces menores que la de los hombres, indicando una diferencia en el tamaño del hierro almacenado entre hombres y mujeres. Por otro lado, la administración de suplementos de hierro llevan a un incremento de la media de ferritina sérica en mujeres normomenstruantes.

Estos datos nos llevan a la conclusión, que en el estudio del diagnóstico nacional de carencia de hierro, la determinación de este parámetro bioquímico es fundamental, sobre todo si se pretende tomar medidas preventivas. La unidad de RIA del Laboratorio de Investigaciones de la Facultad de Medicina se encuentra en la actualidad realizando la dosificación de ferritina sérica por este método.

BIBLIOGRAFIA

1. **Fairbanks, V. and Bentler, E.:** *Iron defiency. Hematology* ed. Williams, Bentler, Erslev and Rundles, McGraw–Hill, New York pp 305–326, 1972.

2. **Colltrell, D.B.:** The Clinical Significance of Serum Ferritin Levels. *Laboratory Management*, 1978.

3. **Addison, F.M., et al.:** An immunoradiometric assay for ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload *J. Clin. Path.*, 25: 326, 1972.

4. **Goldie, D.J., and Thomas, M.J.:** Measurement of serum ferritin by radioimmunoassay. *Ann. Clin. Biochem.*, 15: 102, 1978.

5. **Lipschitz, D.A., Cook, J.D. and Finch, C.A.:** A Clinical evaluation of serum ferritin as an index of iron storess. *New. Eng. Jour. Med.*, 290: 1213, 1974.

6. **Mori W., Asakawa, H. and Taguchi, T.:** Anti–placental ferritin antiserum for cancer diagnosis. *Ann. NY Acad. Sci.*, 259: 446, 1975.

7. **Baur, J.D.:** Iron and trace metals, *Gradwohlis Clinical laboratory methods and diagnosis*, Chapter 22 Vol. 1 pp 436–458, 1970.

8. **Forman, D.T., and Vye, M.V.:** Immunoradiometric Serum Ferritin Concentration Compared with Stainable Bone Marrow Iron as Indices to Iron Stores. *Clin. Chem.*, 26: 145, 1980.

9. **Hazard, J.T., Yokota, M., Arosio, P., and Drysdale, J.W.:** Immunologic Differences in Human Iso ferritins; Implications for Immunologic Quantitation of Serum Ferritin. *Blood*, 49: 139, 1977.

10. **Freire, W.:** Use of Hemoglobin Levels to Determi-

ne Iron Deficiency in High Prevalence Areas of Iron Deficiency Anemias. *Cornell University*, pp 228, 1982.

11. Berson, S., Yalow., R.S., Glick, S.M. and Roth, J.: Immunoassay of Protein and Peptide Hormones. *Metabolism*. 13: 1135, 1964.

12. Cordeiro, M., López–Jaramillo, P., Souza, D., Laks, D.: Dosagem Radioimunobiológica de hormonios protéicos. *Monografía*. Ribeirao Preto, Brasil. 1981.