

Radioinmunoanálisis en diagnóstico e investigaciones médicas

por R.A. Dudley y B. Vavrejn*

La salud y la enfermedad de los sistemas vivientes dependen de la interrelación dinámica de miles de sustancias bioquímicas. En su mayoría son moléculas complejas, que contienen decenas a millares de átomos. Muchas son sumamente delicadas y algunas se distinguen de otras por el tipo o la posición de algunos átomos. Estas moléculas se presentan en mezclas, en concentraciones que varían entre partes por cien y partes por mil millones o por billón.

Medir la concentración de esas sustancias bioquímicas (análisis) puede parecer una tarea ímprobable. Evidentemente no es así, puesto que los sistemas vivientes realizan esta operación constantemente con respecto a sus propios constituyentes. Las primeras tentativas efectuadas para medir sustancias biológicas fueron por consiguiente los *bioanálisis* —por ejemplo, para saber si una hembra está fecundada se inyecta una muestra de su orina en una rana y se observa la respuesta. Si bien estos métodos han sido muy instructivos, presentan el inconveniente de que son muy limitados en alcance y en precisión, y al mismo tiempo enormemente fatigosos. Hace 25 años se descubrió un nuevo método, llamado *radioinmunoanálisis*; el cual, parcialmente al menos, imita también los procesos biológicos, pero en un tubo de ensayo. Este método, con numerosas variantes, ha revolucionado de tal manera el estudio de las hormonas y de otras sustancias que Rosalyn Yalow, física especializada en medicina nuclear, recibió el Premio Nobel de medicina en 1977 en honor de la parte que le había cabido en su descubrimiento.

Las condiciones esenciales de un sistema de análisis práctico son la especificidad (la aptitud de distinguir de modo inequívoco moléculas muy similares) y la sensibilidad. El radioinmunoanálisis satisface estos requisitos utilizando, como reactivo “químico” distintivo, un anticuerpo de la sustancia (ligando) que se somete a ensayo. Los anticuerpos son moléculas proteicas sintetizadas por animales para inactivar sustancias biológicas extrañas que han penetrado en su organismo. Por ejemplo, si se inyecta insulina humana a un conejo, el animal sintetiza un anticuerpo que reacciona ante esta molécula extraña y la neutraliza. Sin embargo, el anticuerpo debe ser necesariamente tan discriminante que no reaccione ante las propias

moléculas del conejo, y hasta con su propia insulina: el anticuerpo puede servir de reactivo sumamente *específico*. Además, se crea el anticuerpo para defender el animal contra sustancias extrañas incluso en cantidades microscópicas: por consiguiente, el anticuerpo puede servir de reactivo de alta *sensibilidad*.

El principio del radioinmunoanálisis es sumamente sencillo —es uno de los temas laureados por un Premio Nobel que está al alcance del lector corriente. Supongamos que se prepara un tubo de ensayo que contiene un anticuerpo del que se sabe (por datos de calibración) que es capaz de ligar un nanogramo (una mil millonésima parte de un gramo) de insulina. Supongamos que se añade una cantidad desconocida de insulina (que contenga más de 1 ng). Un nanogramo quedará ligado, y esta fracción ligada se puede separar por medios relativamente sencillos. ¿Cómo se puede medir la fracción remanente no ligada? No se puede pesar por ser excesivamente pequeña y por ir acompañada de una inmensidad de contaminantes que tienen millones de veces su peso. Se resuelve el problema mediante la técnica de *trazadores*. Antes de mezclar con el anticuerpo la muestra original que ha de analizarse, se añade, en cantidades vestigiales, (por ejemplo, 1 nanogramo) insulina radiactiva (servirá insulina “marcada” con ^{125}I). La masa (y por lo tanto la radiactividad) de este trazador se repartirá proporcionalmente entre la fracción ligada y la no ligada en la misma forma que la masa de la insulina no radiactiva que se analiza. Si la radiactividad medida de la fracción no ligada es diez veces superior a la de la fracción ligada, la insulina no ligada será igual a 10×1 nanogramo = 10 nanogramos, y el total (fracción no ligada más fracción ligada) será $10 + 1 = 11$ nanogramos. De esa forma se ha conseguido analizar la muestra de insulina desconocida. Es evidente que el éxito de este método depende de la detectabilidad de masas sumamente pequeñas de trazadores, lo que se logra con radionucleidos trazadores. Desde luego, para efectuar adecuadamente un análisis real es preciso prestar atención a muchos detalles teóricos y empíricos.

Se han ideado numerosas variantes de esta técnica. El “enlace” puede no ser un anticuerpo sino otra molécula biológica específica: por ejemplo, un “enlace proteico” (utilizado en el organismo para transportar sustancias determinadas), o receptores celulares (utilizadas por las células para extraer selectivamente los nutrientes necesarios del suero plasmático en que bañan). Además de

* El Sr. Dudley es Jefe de la Sección de Aplicaciones Médicas de la División de Ciencias Biológicas del Organismo. El Sr. Vavrejn es miembro de la Sección de Aplicaciones Médicas.

los radionucleidos, se han desarrollado otros trazadores: por ejemplo, enzimas, sustancias fluorescentes. Se pueden fijar los trazadores tanto en el enlace como en el ligando.

En conjunto, todos estos numerosos procedimientos afines, actualmente basados en un amplísimo conocimiento tecnológico, presenta uno de los aspectos del diagnóstico e investigaciones médicas que han experimentado un mayor crecimiento. Por consiguiente, el Organismo Internacional de Energía Atómica celebró un simposio* para examinar los adelantos recientes, con particular atención a la metodología, y a su adaptación y aplicación en los países en desarrollo.

Técnicas de análisis

La producción y utilización de anticuerpos monoclonales constituye una reciente innovación. Como hasta ahora se "criaban" los anticuerpos en animales, a medida que se necesitaban, resultaban inevitablemente muy heterogéneos. Recientes adelantos en la ingeniería genética, no relacionada con el radioinmunoanálisis, han permitido la producción de anticuerpos a partir de cultivos celulares. Cada cultivo, que se puede propagar al infinito, producía un anticuerpo único. Examinando un gran número de esos cultivos, se identifican anticuerpos favorables. En el porvenir se podrán vender dichos anticuerpos como otros reactivos químicos; perfectamente adaptados para un determinado trabajo, exentos de contaminantes dignos de mención, de rendimiento normalizado, y disponibles en cantidades ilimitadas. Los ejemplos expuestos en el simposio indicaron que, utilizando técnicas basadas en el uso de anticuerpos monoclonales radiactivamente marcados, aumentaban la sensibilidad, el espectro de actividad y la uniformidad.

La sustancia empleada como trazador, sea ligando o enlace marcados, debe responder a muchas condiciones rigurosas y en el caso de numerosos análisis es el factor determinante para el logro de una calidad superior. Por lo tanto, sigue siendo objeto de intensos estudios. El ^{125}I es el radionucleido ideal desde el punto de vista de la conveniencia de medición. Este radionucleido, sin embargo, en presencia de muchas sustancias, —especialmente de esteroides— se comporta como un átomo extraño en una molécula, lo que impide que el trazador ejerza una acción idéntica a la de las sustancias que teóricamente debe trazar. El problema es todavía más difícil si el trazador no es un átomo único sino una molécula grande, tal como en el caso de las enzimas o de otros trazadores no radionucleidos. Por lo menos en lo que se refiere al ^{125}I , las condiciones requeridas para que el trazador funcione de modo aceptable se conocen cada vez mejor. Con respecto a las moléculas pequeñas, se han elaborado reglas que determinan el lugar y las circunstancias en que el átomo de ^{125}I debe fijarse a la molécula. Se informó acerca de la función aceptable de

ciertos esteroides marcados con ^{125}I , en comparación con esteroides marcados con ^3H químicamente inalterado, y se ha generalizado la utilización del trazador ^{125}I para esta importante clase de ligandos. Con respecto a los ligandos proteicos, se están perfeccionando igualmente métodos para marcar satisfactoriamente la molécula sin alterarla, así como métodos para la purificación del producto marcado (especialmente en la cromatografía en fase líquida de alta presión).

Por muchas razones se procura reemplazar los radionucleidos por otros trazadores y en esta tarea ya se ha logrado notable éxito. Se había esperado que estas tentativas tendrían como resultado instrumentos analíticos más baratos y reactivos de período más largo de almacenamiento, mejor sensibilidad, más fácil manipulación y mayor velocidad. Por razones fundamentales se hubiera podido lograr una sensibilidad mucho mayor con ciertos trazadores no radionucleidos, acompañado propablemente de un tratamiento más rápido de la muestra. Varias memorias presentadas en el simposio versaban sobre estos adelantos. Está muy difundida actualmente la utilización de trazadores enzimáticos, y su sensibilidad es comparable con la de los radionucleidos empleados como trazadores. Sin embargo, todavía queda por determinar si su rendimiento puede resultar eficaz ante sustancias interferentes y condiciones analíticas variables. Algunos investigadores predicen que la preferencia futura se inclinará hacia los trazadores quimioluminiscentes o los de fluorescencia retardada, que contienen compuestos de tierras raras; con respecto a estas técnicas se ha dado cuenta de los adelantos logrados, sin que se hayan conseguido descubrimientos espectaculares.

Continúan siendo objeto de intenso estudio, los métodos para separar los productos de la reacción ligando-enlace de la mezcla de incubación, dado que la etapa de separación es a menudo la causa de gran parte de la imprecisión de los resultados y del tiempo que necesita el analista. Varias memorias del simposio describían materiales en fase sólida nuevos o modificados, es decir partículas a las que se ha fijado uno de los componentes (enlace o ligando), de preferencia como covalente, a fin de permitir una conveniente separación mecánica por gravedad, por centrifugación o magnética. Este interés confirma la tendencia hacia los métodos de separación en fase sólida.

La elaboración reciente de técnicas de análisis de hormonas "libres" representa otro tipo de innovación metodológica. Muchas de las hormonas presentes en la sangre se encuentran ligadas predominantemente a proteínas portadoras específicas. Se supone que la acción fisiológica de tales hormonas obedece únicamente a la pequeña fracción de hormona no ligada que existe en equilibrio con la fracción mayor de hormona ligada a la proteína portadora. De ahí que el nivel de hormona libre, si se pudiera medir aisladamente, facilitaría información de diagnóstico más pertinente que la del nivel de la hormona total. Ahora se comprende de manera razonablemente

* Simposio internacional sobre radioinmunoanálisis y métodos afines en medicina, celebrado el 21–25 de junio de 1982 en Viena (Austria).

clara la teoría de otros métodos de análisis para este fin. Se ha logrado la aplicación práctica de algunos de estos métodos, y su utilidad a los fines de diagnóstico ha sido confirmada experimentalmente, aunque se requieren todavía nuevas investigaciones para fijar el alcance y el papel de esas técnicas.

Garantía de calidad

La evaluación y la mejora de la calidad de las mediciones es parte esencial de todo programa analítico. La garantía de calidad tiene especial importancia en el caso del radioinmunoanálisis y de métodos afines, susceptibles de numerosas perturbaciones provocadas ya sea de técnicas analíticas no completamente normalizadas o de irregularidades de los reactivos. El control *interno* de calidad describe los procedimientos observados en el laboratorio para asegurar la fiabilidad de los análisis, en tanto que el control *externo* de calidad se refiere a la vigilancia ejercida por una organización externa mediante la distribución de muestras de ensayo.

Un aspecto de control interno de calidad es el análisis crítico de los resultados de las mediciones, ya sea por computadora (como en numerosos laboratorios) o manual. Un orador en el simposio recomendó efectuar por computadora cada una de las partes de dichos análisis a fin de obtener la información más fiable, aunque otros fueron más escépticos acerca de la utilidad de las computadoras. Esta diversidad de enfoques se relaciona posiblemente con la calidad de los programas de computadora: los que utilizan la mayoría de los laboratorios, diseñados por ellos mismos o adquiridos en el mercado comercial, son deficientes. Se subrayó que un buen programa de computadora debe no solo aliviar el volumen de trabajo del analista en materia de cálculos manuales repetitivos y sujetos a errores, sino que también debe evaluar la fiabilidad de los resultados. La elaboración de programas de esa índole es una importante tarea, y requiere tal vez un año-hombre de programación experta. La rápida disminución de costes de las computadoras permitirá a la postre que todos los laboratorios exploten los mejores programas diseñados por profesionales, los cuales reemplazarán en ese momento a todos los demás métodos de análisis crítico.

Sin embargo, no se puede lograr la finalidad del control interno de calidad, a saber, el análisis de calidad uniformemente elevada, considerando únicamente los resultados. Se requiere una activa intervención del analista para determinar la causa de la falta de fiabilidad y eliminarla modificando los métodos analíticos. Se debe comprobar el análisis para establecer su validez ante la posibilidad de interferencias, y se deben conservar datos sobre muestras de control de calidad y otros índices de la integridad de los análisis con respecto a cada uno de los lotes de análisis a fin de evaluar el rendimiento corriente. Se debe considerar la calidad como un objetivo importantísimo en la disciplina del laboratorio y de la organización.

A título de ejemplo, en la evaluación de calidad externa un laboratorio central prepara y distribuye entre muchos laboratorios series idénticas de muestras, y analiza los resultados notificados para determinar su comparabilidad y estabilidad. De ser posible, se debería establecer independientemente la concentración de ligandos "verdaderos"; en otro se puede utilizar provisionalmente la media resultante como una aproximación de la concentración de ligandos. En todo caso es posible observar objetivamente la variabilidad dentro del propio laboratorio o entre laboratorios. Algunos de los planes de evaluación de calidad comprenden ensayos suplementarios, tales como los de vulnerabilidad a sustancia posiblemente interferentes o de recuperación de ligandos añadidos. Todos los programas ofrecen oportunidades para que los laboratorios participantes puedan aprovechar los conocimientos. En una discusión de un grupo de expertos se describieron diez programas para la evaluación del control externo de calidad. Dos de los mismos tenían un alcance mundial —uno patrocinado por el OIEA sobre las hormonas tiroideas, tal como se miden en unos 80 laboratorios, y otro patrocinado por el OMS sobre las hormonas reproductivas que se miden en unos 120 laboratorios.

El control de calidad, tanto interno como externo, aunque elogiado en todo el mundo, está muy abandonado. El número de proyectos de ese tipo presentados en este simposio da la impresión de que se va acordando progresivamente más importancia a este problema.

Análisis y aplicación

Continúa ampliándose el número de diferentes ligandos que hacen del radioinmunoanálisis y otros procedimientos afines una técnica analítica útil y se siguen mejorando muchas de las técnicas establecidas, haciéndose más prácticas sus aplicaciones. Se presentaron informes sobre dichos adelantos con respecto a diversas sustancias particulares. Los análisis pueden medir ahora, por ejemplo: la betaendorfina (un "opiáceo natural") en el fluido cerebroespinal —sustancia relacionada con la inhibición del dolor; la secretina (hormona que controla la secreción pancreática de enzimas gástricas) en el plasma; la clomipramina y la amitriptilina (fármacos para el tratamiento de la depresión) en el plasma, durante su utilización terapéutica; suriclón (tranquilizante) en el plasma, durante su utilización terapéutica; y esteroides anabólicos (fármacos utilizados a veces por los atletas) en el plasma.

Se ha prestado particular atención a las aplicaciones de importancia potencial en los países en desarrollo, cuyos problemas médicos pueden ser muy diferentes de los que se investigan en los países desarrollados, que son los que han elaborado la mayoría de las técnicas de radioinmunoanálisis. Es de esperar que el radioinmunoanálisis o métodos afines puedan finalmente reemplazar los procedimientos actuales en el estudio de muchas enfermedades infecciosas y parasitarias. Esto ocurre ya con el estudio de la hepatitis B.

Tres campos de aplicación son importantes: diagnóstico, epidemiología e investigación. En el diagnóstico, el objetivo consiste en identificar la presencia de una determinada enfermedad detectando productos (antígenos) por el agente (por ejemplo, un virus) que suele estar

presente en el paciente. Se considera hoy día que casi todos agentes patógenos, desde los virus a los helmintos, liberan cantidades microscópicas de antígenos. Esta teoría exige investigar las cantidades y las desigualdades de un vastísimo número de antígenos. Si la sensibilidad y la especificidad son adecuadas, el radioinmunoanálisis y métodos afines pueden permitir una diagnóstico rápido y fiable.

Si los agentes patógenos liberan antígenos, el organismo responde creando anticuerpos para combatir los agentes. Dichos anticuerpos —por ser ellos mismos moléculas biológicas complejas— se pueden analizar también con el radioinmunoanálisis o métodos afines. Sin embargo, como los niveles de anticuerpos pueden persistir mucho tiempo después de tratada la enfermedad, constituyen una prueba poco fiable de una infección, a pesar de que la presencia de anticuerpos demuestre que el paciente ya ha sufrido la enfermedad, y que, según la enfermedad, está inmunizado contra la misma. Como para determinar cuál es la fracción de la población que en uno u otro momento ha sufrido la enfermedad, y cuál es la fracción inmune es una tarea que corresponde a la epidemiología, el radioinmunoanálisis y métodos afines tienen un papel importante en esta disciplina. En realidad, como los niveles de anticuerpos suelen ser más altos, y por consiguiente más fáciles de medir, que los de antígenos, la epidemiología ha avanzado hasta ahora más rápidamente que el diagnóstico. Las investigaciones, por cierto, son la base de todo progreso en diagnóstico y en epidemiología; representan la aplicación más importante, si no la más frecuente, de estas técnicas.

La tuberculosis puede servir de modelo para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, y se presentaron dos memorias que informaban sobre los adelantos logrados. Cuando se cultivan en laboratorio muestras de esputo para multiplicar los bacilos de tuberculosis (BT) y sus correspondientes antígenos, el radioinmunoanálisis detecta los bacilos antes que cualquier otro método. En las muestras de esputo y en otros líquidos del organismo que refleja la existencia de focos de BT (por ejemplo, el líquido cerebroespinal en casos de meningitis tuberculosa) los antígenos se pueden detectar en muy poco tiempo. De esta forma el radioinmunoanálisis (o probablemente algún método aún más adecuado para utilizar en el campo) podría llegar a ser el método escogido para el diagnóstico de muchas formas de tuberculosis.

También se ha hecho posible el diagnóstico de diversas enfermedades parasitarias mediante el análisis de antígenos específicos, habiéndose comunicado adelantos en relación con la malaria, la enfermedad de Chagas, la amibiasis, la esquistosomiasis y ciertas enfermedades causadas por nematodos. Las mediciones de anticuerpos también ofrecen ciertas confirmaciones útiles sobre infecciones con respecto a varias de esas enfermedades.

Por último, en la mayoría de las enfermedades mencionadas, ya se han utilizado en las investigaciones epidemiológicas el radioinmunoanálisis y métodos afines.

En las investigaciones actuales, las tareas más urgentes son la identificación, la caracterización y la producción de antígenos específicos de estas enfermedades.

Práctica y peligros en los países en desarrollo

El radioinmunoanálisis y métodos afines se emplean ya en los países en desarrollo y es probable que tengan un papel muy importante en el futuro. La introducción de la metodología en este medio, en la que colabora el Organismo, presenta numerosos problemas que fueron examinados en el simposio. Antes de que se pueda establecer un servicio analítico, las autoridades deben cerciorarse de que pueden contar con un justificado apoyo público. Por lo tanto, es necesario demostrar su pertinencia con algo más tangible que las teorías médicas de los países occidentales.

Si se decide implantar el radioinmunoanálisis y métodos afines como una prioridad médica, hay que adiestrar convenientemente al personal. Se deberían capacitar técnicos en laboratorios adecuados cercanos al país, y formar especialistas académicos, cuando sea necesario, en laboratorios más adelantados del extranjero. Se debe escoger el equipo según el volumen y las necesidades de entretenimiento. En lo que se refiere a los problemas del equipo, las deficiencias son con frecuencia de carácter psicológico y de organización, mas bien que de índole técnica; por estas razones, la disponibilidad de piezas de recambio, de equipos de prueba, y de expertos deben establecerse de conformidad con un plan racional. Los artículos fungibles son difíciles de preparar y obtener, y las divisas para su adquisición escasean siempre. Por lo tanto, será preciso recurrir a reactivos "caseros" en sustitución de los juegos de análisis que se obtienen en el comercio. Se ha organizado igualmente la importante asistencia que pueden prestar laboratorios del mismo nivel y órganos internacionales tales como la OMS y el OIEA; y se debería fijar igual finalidad también para la cooperación regional. Con objeto de combatir enfermedades específicas comunes en más de uno de los países en desarrollo, convendría realizar las investigaciones sobre una base regional. Las técnicas, tras su adaptación a las necesidades y condiciones locales, deberían someterse a un riguroso control de calidad.

Futuro de las técnicas de trazadores en medicina

Indudablemente, con el tiempo el radioinmunoanálisis y métodos afines irán adquiriendo mayor fiabilidad y aplicabilidad. Entre los hechos nuevos más significativos cabe señalar que los trazadores no radionucleidos terminarán probablemente por imponerse. Es muy posible que las innovaciones en el uso de estas técnicas para combatir enfermedades infecciosas o parasitarias aumenten en gran medida su utilidad en los países en desarrollo. Existen numerosas oportunidades para realizar la eficacia de dichas técnicas en ese medio, especialmente mejorando la organización y la cooperación regionales.