

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
 FACULTAD DE MEDICINA
 Escuela de Tecnología Médica Laboratorio Clínico



***Incidencia de Anticuerpos Antitiroglobulínicos
 Antimicrosomales en Diferentes Patologías de
 la Tiroides, Utilizando el Método de Hemaglutinación
 Indirecta para su Detección***

SEMINARIO DE GRADUACION
 PRESENTADO POR:

**EMILIA ANTONIA LIRA GIRON
 GLADIS ALICIA MORALES VARGAS
 GLORIA LILIAN MANCIA HERRERA**

PREVIA A LA OPCION DEL TITULO DE:
LICENCIADO EN LABORATORIO CLINICO

MAYO DE 1986.



T
:16.44
° 768 i

EJ

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGIA MEDICA-LABORATORIO CLINICO

INCIDENCIA DE ANTICUERPOS ANTITIROGLOBULINICOS Y
ANTIMICROSOMALES EN DIFERENTES PATOLOGIAS DE LA
TIROIDES, UTILIZANDO EL METODO DE HEMAGLUTINACION
INDIRECTA PARA SU DETECCION.

Por

EMILIA ANTONIA LIRA GIRON
GLADIS ALICIA MORALES VARGAS
GLORIA LILIAN MANCIA HERRERA

Seminario presentado ante el Jurado Calificador de
la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional
de El Salvador, en satisfacción parcial de los re-
querimientos previos a la obtención del Título de
Licenciado en Laboratorio Clínico.

Lic. Guadalupe de Barahona
Asesor

MAYO 1986



MIEMBROS DEL JURADO

Dr. Roberto W. Cerritos

Dr. Renato Matamoros

TM. Jaime Soudy Call

A G R A D E C I M I E N T O S

A Lic. Guadalupe H. de Barahona.

Quien fue nuestra guía, sin cuya dirección y acertada asesoría, no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A los señores Miembros del Jurado: Dr. Roberto W. Cerritos H., Dr. Renato Matamoros, T.M. Jaime Soundy Call; quienes con sus valiosos conocimientos, aceptaron desinteresadamente la revisión y corrección de nuestro Seminario.

Al Dr. Rómulo Sosa C., quien nos brindó la oportunidad de realizar este trabajo y, a su vez la orientación adecuada que nos proporcionó; gracias a sus altos conocimientos y experiencia.

A la Dra. Yasmara López Meardi y Lic. Roberto Barahona, quienes con su brillante inteligencia colaboraron sabiamente, haciéndonos la tarea más fácil.

EMILIA ANTONIA LIRA GIRON

GLADIS ALICIA MORALES VARGAS

GLORIA LILIAN MANCIA HERRERA

DEDICATORIA

A Dios, Nuestro Señor,
con infinita fé.

A nuestras familias, con cariño y gratitud
al apoyo moral y comprensión que nos brindaron;
en los desvelos, esfuerzos y sacrificios
durante la realización de este trabajo, que
allanaron el camino para alcanzar la culminación
de nuestro ideal.

Emilia Antonia,

Gladis Alicia,

Gloria Lilian.

"INCIDENCIA DE ANTICUERPOS ANTITIROGLOBULINICOS
Y ANTIMICROSOMALES EN DIFERENTES PATOLOGIAS DE
LA TIROIDES, UTILIZANDO EL METODO DE HEMAGLUTI-
NACION INDIRECTA PARA SU DETECCION".

I N D I C E

	Página
I.- RESUMEN.	i
II.- INTRODUCCION	1
III.- OBJETIVOS DEL TRABAJO.	9
IV.- MATERIALES Y METODOS	10
V.- RESULTADOS	24
VI.- DISCUSION.	34
VII.- BIBLIOGRAFIA	41

R E S U M E N

Este trabajo de investigación se verificó con el objeto de evaluar la incidencia de anticuerpos antitiroideos microsomales (HAMC) y tiroglobulínicos (HATG) en diferentes grupos de población, por medio del método de Hemaglutinación Indirecta Sera-Tek.

Se procesaron 100 muestras de sangre, cincuenta de ellas provenientes de personas del Centro para Ciegos "Eugenia de Dueñas"; 25 con ceguera congénita y 25 con ceguera adquirida; 25 muestras provenientes de pacientes asegurados que adolecían desórdenes tiroideos, y 25 muestras de personas aseguradas supuestamente sanas.

Para la población con ceguera congénita y adquirida se obtuvo una positividad de 4% con el método HAMC y 0% con el método HATG; en los pacientes asegurados que adolecían de la Tiroides, el 24% con el método HAMC y el 8% con HATG; y en la población de asegurados supuestamente sanos, el 8% con HAMC y 0% con HATG.

Los resultados obtenidos en la población ciega demuestran que la presencia de anticuerpos antitiroideos microsomales y tiroglobulínicos no son causa de ceguera; estos anticuerpos son originados por una respuesta inmunológica desencadenada por una tiroiditis viral.

La incidencia de positividad obtenida de los anticuerpos antitiroideos en los diferentes casos estudiados con Enfermedad de Graves y Tiroiditis de Hashimoto, comprueba la especificidad de dichos anticuerpos en las patologías de la Tiroides.

En la población de asegurados supuestamente sanos la incidencia de anticuerpos antitiroideos obtenida concuerda con lo dicho por otros autores, quienes aseguran que en una población normal pueden encontrarse títulos bajos de estos anticuerpos en un 5 a 10%.

Las pruebas utilizadas en la determinación de anticuerpos antitiroideos son específicas, por lo que se recomienda que se utilicen tanto como métodos de rutina en la confirmación de un diagnóstico, como asimismo en el seguimiento de personas que presentan desórdenes tiroideos.

I N T R O D U C C I O N

La glándula tiroides es una invaginación tubular que procede de un divertículo medio de la pared anterior de la faringe y aparece hacia la cuarta semana del desarrollo intrauterino. Se compone de dos lóbulos voluminosos: derecho e izquierdo, unidos en su parte inferior y en la línea media por el istmo. Un tercer lóbulo llamado piramidal que se origina frecuentemente del istmo o en la porción adyacente de cada lóbulo. En el adulto la glándula pesa normalmente entre 20 y 30 gramos.

Desde el punto de vista histológico, la tiroides tiene una estructura folicular; estos acinos o folículos son de forma y tamaño variable, normalmente están llenos de una sustancia secretoria llamada coloide. El constituyente principal del coloide es la TIROGLOBULINA, una gluco-proteína. Cada molécula de Tiroglobulina contiene TIROSINA, el sustrato principal que se combina con el Iodo para formar las hormonas tiroideas. Estas hormonas se forman dentro de la molécula de Tiroglobulina.

El funcionamiento propiamente dicho de la glándula tiroides y su estructura histológica normal dependen del Iodo, el cual normalmente es proporcionado por la dieta en cantidades adecuadas. Aproximadamente a la décima semana de vida intrauterina, la glándula es capaz de organificar el --

Iodo y casi inmediatamente se puede encontrar hormona tiroidea formada.

La actividad y regulación de la tiroides depende de la Hormona Estimulante de la Tiroides o Tirotrópica (TSH), secretada por la adenohipófisis y que incrementa la secreción de T_3 y T_4 al aumentar todas las actividades conocidas de las células glandulares tiroideas. A su vez, el control de la secreción de TSH lo ejerce una hormona hipotalámica: Hormona Reguladora de Tirotropina (TRH). En resumen, la producción de hormona tiroidea tiene un efecto inverso sobre la secreción de TSH; es decir, que existe una regulación - por retroalimentación de la secreción tiroidea, por lo tanto, un aumento en la producción de T_3 y T_4 lleva a una disminución en la producción de TSH y viceversa.

La más abundante de las hormonas que produce la Tiroides es la Tiroxina (T_4). También se producen cantidades apreciables de Triyodotironina (T_3). Además secreta calcitonina, una hormona importante en el metabolismo del calcio.

A partir de la captación del yoduro plasmático por la glándula, éste sufre una serie de reacciones sucesivas en las que intervienen la tiroglobulina, enzimas y otras sustancias necesarias, culminando en la síntesis de las hormonas tiroideas (T_3 y T_4). Estas, después de formadas se almacenan en los folículos en forma de Tiroglobulina.

El paso de las hormonas tiroideas a la sangre circulante se verifica después de un proceso de liberación de T_3 y T_4 por la Tiroglobulina. Cuando estas hormonas libres penetran en la sangre, casi todas se combinan inmediatamente con varias proteínas plasmáticas y una proporción ínfima existe normalmente en el plasma en forma libre.

Entre las funciones de la hormona tiroidea en los tejidos se pueden mencionar: el aumento general del metabolismo, así como también sus efectos sobre el metabolismo de sustancias específicas de la dieta (proteínas, lípidos, carbohidratos, calcio, vitaminas). Todo esto implica una serie de efectos fisiológicos sobre distintos mecanismos del organismo.

Las alteraciones de la función tiroidea nos da una variedad de cuadros clínico-patológicos: Hiper o Hipotiroidismo, Tiroiditis, neoplasias. Estas anomalías en la función de la glándula están determinadas por alteraciones en tres niveles diferentes, los cuales al estar afectados provocan una condición de hiper o hipofunción. A nivel de glándula tiroides: disfunción primaria; a nivel de hipófisis: disfunción secundaria; a nivel de hipotálamo: disfunción terciaria.

El hipertiroidismo denota un complejo de alteraciones fisiológicas y bioquímicas que ocurren cuando los tejidos están expuestos a cantidades excesivas de hormona tiroidea.

El clásico ejemplo de esta anomalía es la enfermedad de Graves-Basedow.

El hipotiroidismo se caracteriza por una disminución progresiva de todas las actividades corporales por deficiencia de la hormona tiroidea.

La Tiroiditis aguda se refiere a una reacción inflamatoria pasajera de la tiroides provocada por invasión bacteriana. La Tiroiditis Sub-Aguda (T. de Quervain o Granulomatosa) es un proceso inflamatorio que dura semanas o meses, con gran tendencia a las recaídas. Suele presentarse 2 ó 3 semanas después de una infección viral aguda respiratoria alta. Esta asociación sugiere que la tiroiditis representa una respuesta inmunológica a la infección viral. La Tiroiditis Crónica no es una infección ni una inflamación y se han definido dos variedades: T. de Hashimoto y T. de Riedel. La Tiroiditis Linfocítica o de Hashimoto se considera una enfermedad autoinmune y su frecuencia es aproximadamente la misma que la de la enfermedad de Graves. En esta enfermedad se han descrito 3 sistemas Ac-Ag: anticuerpos que reaccionan con la Tiroglobulina; anticuerpos que reaccionan con un componente del citoplasma tiroideo; anticuerpos que reaccionan con un antígeno coloidal diferente de la Tiroglobulina.

La Tiroiditis de Riedel consiste en una fibrosis lenta

y progresiva de la glándula y algunos sugieren que es una variante de la anterior.

Las Neoplasias tiroideas pueden ser adenomas o tumores malignos. El más frecuente de estos últimos es el Carcinoma Tiroideo y, dentro de este grupo, el Carcinoma Folículo Papilar.

Actualmente el diagnóstico de las enfermedades de la Tiroides se hace en base a los hallazgos clínicos en conjunto con función tiroidea, pruebas inmunológicas y estudios familiares (biopsias, etc.).

Se han descrito muchas pruebas funcionales tiroideas con el fin de determinar el nivel de actividad metabólica y la índole de la anormalidad tiroidea. Todas ellas tienen sus propias aplicaciones, ventajas y desventajas, siendo importante la selección de aquellas más apropiadas para dilucidar un problema clínico. Entre estas pruebas se mencionan: las pruebas que miden las hormonas tiroideas circulantes (T_3 y T_4), la TSH y la TRH. Las pruebas que evalúan la acción periférica de la hormona tiroidea, por ejemplo el índice del metabolismo basal, que ya cayó en desuso. Las pruebas que determinan la presencia de anticuerpos antitiroideos, ya sea anticuerpos dirigidos contra la Tiroglobulina, o bien, anticuerpos que reaccionan con un componente del citoplasma tiroideo (microsomas).

A partir de la demostración de anticuerpos tiroideos en el suero de pacientes con Tiroiditis de Hashimoto, hecha por Roitt y Asociados en 1956, se sugirió considerar la investigación de dichos anticuerpos como un procedimiento de diagnóstico diferencial. Para demostrar la presencia de anticuerpos Tiroideos se han utilizado diferentes métodos; la sensibilidad, reproducibilidad y confiabilidad de los tests son muy amplios y algunos son apropiados solo para investigaciones.

En la detección de anticuerpos Tiroglobulínicos y Microsomales se han usado diversos métodos; entre ellos se pueden mencionar: Fijación de Complemento, Fijación de Látex, Prueba de Precipitación de Anticuerpos, Prueba de Anticuerpos Inmunofluorescentes. El método utilizado últimamente es el de Hemaglutinación Indirecta, basada en la aglutinación de células rojas de carnero tanificadas y sensibilizadas con Tiroglobulina humana para la prueba de anticuerpos tiroglobulínicos y antígeno microsomal de tiroides humana para la prueba de anticuerpos microsomales. Existe hasta el momento una extensa literatura (1, 3, 4, 8, 9, 13, 16, 18, 19, 20, 21, 31) sobre la evaluación de la función tiroidea por este método, demostrándose que es más sensible y específico que la Fijación de Complemento u otros, además de ser una prueba rápida, exacta y reproducible.

En nuestro medio se realizan algunas de estas pruebas, pero hasta el momento aún no se han incorporado aquéllas que determinan la presencia de inmunidad contra antígenos tiroideos (anticuerpos Tiroglobulínicos y Microsomales). Esto nos ha motivado a evaluar el método de Hemaglutinación Indirecta en la detección de anticuerpos anti-tiroideos en pacientes con diferentes patologías de la glándula tiroides; y al mismo tiempo, obtener parámetros normales en personas aparentemente sanas. Así como también, pretendemos establecer parámetros de comprobación de la positividad del método en estudio en personas ciegas, ya que según datos recopilados en entrevista con el Dr. Roberto W. Cerritos H. (endocrinólogo), se ha demostrado la presencia de estos anticuerpos en personas con ceguera congénita, especialmente en hijos de madres que han padecido alguna enfermedad viral durante su embarazo, lo que supuestamente sensibiliza inmunológicamente a la madre a desarrollar anticuerpos en el período de gestación. La formación de tales anticuerpos es desencadenada por un mecanismo inmunológico similar al que interviene en otros desórdenes autoinmunes tales como las colagenopatías, anemia hemolítica autoinmune y en otras manifestaciones autoinmunes órgano-específicas con desórdenes de la Tiroides, incluyendo Mixedema, Tiroiditis Granulomatosa, Bocio Nodular no Tóxico, Carcinoma de Tiroides las cuales ocasionalmente producen autoanticuerpos de la Tiroi

des. La presencia de estos anticuerpos tiroideos puede --
ser indicativo de un desorden autoinmune previo o señal tempr
prana de una enfermedad autoinmune. -

OBJETIVOS DEL TRABAJO

- 1) Evaluar la positividad del título de Anticuerpos Tiroglobulínicos y Microsomales en pacientes referidos con patologías comprobadas de la Tiroides, tanto en personas con ceguera congénita y adquirida, como también en personas aseguradas aparentemente sanas.

- 2) Incorporar métodos de Diagnóstico Inmunológico para el control de Auto-anticuerpos Tiroideos en el Laboratorio Clínico del Hospital General del Instituto Salvadoreño del Seguro Social (I.S.S.S.), que funciona como Centro de referencia.

MATERIALES Y METODOS

POBLACION ESTUDIADA

Se estudiaron un total de 100 muestras de suero obtenidas de cuatro grupos diferentes de población: 25 ciegos congénitos, 25 ciegos adquiridos, 25 pacientes asegurados que adolecen de la Tiroides y 25 personas aseguradas supuestamente sanos; cada una de las diferentes poblaciones fueron interrogados anotando en una hoja de entrevista los siguientes aspectos generales: nombre, edad, sexo, domicilio y aspectos propios de la enfermedad (se adjunta modelo en página No. 40).

COLECCION DE LA MUESTRA

Las personas incluidas en este estudio deberían estar en ayunas, obteniéndose la muestra por venopunción, recolectándose aproximadamente 5 mililitros de sangre en tubos al vacío de 10 mililitros sin anticoagulante. Se tuvo sumo cuidado de hacer en el sitio de venopunción una buena asepsia, recolectándose la muestra con el menor estasis sanguíneo para evitar hemólisis, con el objeto de disminuir al máximo la posibilidad de datos falsos por una muestra mal tomada.

Las 50 personas ciegas, fueron sangradas en el Instituto para Ciegos "Eugenia de Dueñas", y el resto de la po-

blación en estudio, en el Laboratorio Clínico del Hospital General del Instituto Salvadoreño del Seguro Social.

Los sueros a utilizarse eran separados lo más pronto posible de los elementos celulares, almacenándolos a $- 20^{\circ}\text{C}$, y antes de ser utilizados, eran descongelados a temperatura ambiente e inactivados a 56°C por 30 minutos antes de ser verificadas las pruebas. Una vez descongelados los sueros podían ser utilizados tan sólo una vez.

Cada semana se procesaron las muestras por el método de Hemaglutinación Indirecta, utilizando dos diferentes -- Tests: el Sera-Tek de Anticuerpos Tiroglobulínicos y el Sera-Tek de Anticuerpos Microsomales.

MATERIALES

- A.- Suero
- B.- Materiales para extracción de sangre (agujas descartables para recolectar sangre al vacío 21 x 1.1/2, sostenedor de tubo al vacío, tubos al vacío de 10 ml. sin anticoagulante, algodón, alcohol, etc.)
- C.- Gradillas
- D.- Pipetas calibradas de 25 microlitros.
- E.- Pipetas Oxford de 10 y 25 microlitros.
- F.- Pipetas serológicas de 0.1 ml. en 0.001.
- G.- Pipetas serológicas de 1 ml. en 0.01.

- H.- Puntas plásticas de 0.1 ml. para usar con pipeta tipo Oxford.
- I.- Baño de María.
- J.- Bandejas de dilución seriadas con base redonda.
- K.- Visualizador de bandeja.
- L.- Centrífuga.
- M.- Perillas.
- N.- Tubos de ensayo de 5 ml.
- Ñ.- Reactivos utilizados en el Sera-Tek Thyroglobulin Antibody Test (Thyroid Test).
- O.- Reactivos utilizados en el Sera-Tek Microsomal Antibody Test (Microsome Test).

METODO UTILIZADO EN EL TEST SERA-TEK DE ANTICUERPOS TIRO-
GLOBULINICOS.

PRINCIPIO DEL METODO.

El método está basado en la aglutinación de eritrocitos de carnero sensibilizados; con sueros que contienen auto anticuerpos a la Tiroglobulina. Antes de verificar la prueba el suero debe ser inactivado, posteriormente se mezcla con un diluyente absorbente para remover los anticuerpos no específicos. El suero que contiene anticuerpos específicos reaccionará con las células sensibilizadas de carnero con Tiroglobulina para formar una estera o petate ho-

reacciones negativas son caracterizadas por un botón compacto de células formadas al asentarse las células no aglutinadas.

REACTIVOS

- A) Diluyente Absorbente: Solución salina, buffer fosfato (ph 7.2) que contiene componentes solubles de células de membrana de eritrocitos de carnero (0.50%), componentes solubles de la membrana celular de eritrocitos bovinos (0.25%), suero normal de conejo (1.0%) y estabilizadores.
- B) Células Sensibilizadas: Eritrocitos de carnero tanificados, formalinizados, liofilizados, sensibilizados con Tiroglobulinas. El reactivo rehidratado es una suspensión al 2.5% de estas células.
- C) Células No Sensibilizadas: Eritrocitos de carnero tanificados, formalinizados, liofilizados. El reactivo rehidratado es una suspensión al 2.5% de estas células.
- D) Control Positivo: Es un preparado de suero de conejo liofilizado que contiene auto-anticuerpos a la Tiroglobulina.
- E) Agua Rehidratante: Debe ser agua destilada estéril.

DILUCIONES DE TRABAJO:

Una vez reconstituidos, todos los reactivos se dejaban en reposo durante una hora antes de su uso. De las células sensibilizadas y no sensibilizadas se preparaban diluciones de trabajo; agregando una parte de la suspensión de células rehidratadas a dos partes de diluyente absorbente. Preparándose únicamente el reactivo suficiente para las pruebas que se procesaban en el día. Para el cálculo de la cantidad de la suspensión de células rehidratadas que se utilizaban, se usó la siguiente fórmula:

$$C = \frac{A \times B}{3}$$

De donde:

A = Número total de pruebas que van a ser corridas.

B = Volúmen de la dilución de trabajo para cada prueba.

C = Volúmen de la suspensión de células rehidratadas.

Ejemplo: Si van a correrse 10 pruebas.

$$C = \frac{10 \text{ pruebas} \times 0.20 \text{ ml. de la dilución de trabajo de células}}{3}$$

$$C = \frac{10 \times 0.20}{3} = 0.67 \text{ ml. de suspensión de células rehidratadas.}$$

Las diluciones de trabajo no utilizadas se descartaban al

final del día.

PROCEDIMIENTO

Antes de ser procesado el suero, debía ser incubado a 56°C por 30 minutos; con el objeto de inactivar el complemento.

Cada prueba requería el uso de un tubo de 12 x 75 mm. y de diez pozos de la bandeja de microtitulación. El control positivo debía ser procesado al mismo tiempo que la muestra.

Una vez rotulada la bandeja de microtitulación para identificar cada una de las muestras y el control positivo, se preparaba una dilución 1 : 25 únicamente de las muestras y no del control.

Los sueros diluídos pueden ser almacenados de 2-8°C y ser reutilizados tan sólo una vez; tanto los reactivos como las muestras deberán estar a temperatura ambiente antes de iniciar la prueba.

- A) Se destinaban diez pozos para cada especimen depositando 0.050 ml. de diluyente absorbente en los pozos 1, 2 y 3, y 0.075 ml. en los pozos del 4 al 10 de cada línea.
- B) Se agregaba 0.025 ml. de la muestra diluída 1 : 25 a cada uno de los pozos 1, 2 y 3, mezclándose bien; del

control positivo únicamente se agregaba 0.025 ml. a los pozos 1 y 4.

C) Del pozo una de la muestra se transfería 0.025 ml. al pozo 4 mezclando su contenido; para el control positivo se transfería 0.025 del pozo a al 5.

D) Se continuaba transfiriendo sucesivamente 0.025 ml. de cada pozo desde el pozo 4 para la muestra y del pozo 5 para el control positivo, hasta el pozo 10 inclusive, descartándose 0.025 ml. del pozo 10; tanto de la muestra como del control positivo, de manera que al final se obtuviesen las siguientes diluciones:

Pozo 1 - 1 : 100 (suero diluído)

Pozo 2 - 1 : 100 (para control de células no-sensibilizadas).

Pozo 3 - 1 : 100 (para control de células sensibilizadas)

Pozo 4 - 1 : 400

Pozo 5 - 1 : 1,600

Pozo 6 - 1 : 6,400

Pozo 7 - 1 : 25,600

Pozo 8 - 1:102,400

Pozo 9 - 1:409,600

Pozo 10- 1:1.638,400

E) Después de completar la dilución se incubaba cada ban-

deja a temperatura ambiente por 30 minutos.

- F) Se agitaban suavemente las diluciones de trabajo de células sensibilizadas y no-sensibilizadas, hasta que las células estuviesen completamente suspendidas y no hubiese sedimento visible en el fondo de los tubos. Se adicionaba 0.025 ml. de la dilución de trabajo de células sensibilizadas a los pozos del 3 al 10 de cada una de las muestras; y del pozo 4 al 10 del control positivo.
- G) De las diluciones de trabajo de las células no-sensibilizadas, se adicionaba 0.025 ml. a los pozos número 2 de cada una de las muestras únicamente. Las células no-sensibilizadas sirven de control negativo.
- H) Se mezclaba el contenido de los pozos de las muestras y de los controles; golpeando suavemente con la palma de la mano uno de los lados de la bandeja de microtitulación, cubriéndose posteriormente las bodegas para evitar la evaporación y contaminación. Las bandejas se incubaban a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) durante toda la noche, procurando no mover las bandejas durante el período de incubación; al final de este período los resultados eran leídos.

Los resultados fueron obtenidos leyendo los patrones de asentamiento de los eritrocitos mediante el uso de

un espejo. El criterio para la observación y evaluación de las reacciones son definidas en comparación con los patrones de la reacción de células no-sensibilizadas y el suero control positivo.

METODO UTILIZADO EN EL TEST SERA-TEK DE ANTICUERPOS MICROSOMALES.

PRINCIPIO DEL METODO.

Este se basa en la aglutinación de eritrocitos de carnero sensibilizados, con suero que contiene auto-anticuerpos microsomales tiroideos. Antes de verificar la prueba, el suero se inactiva y se mezcla posteriormente con el diluyente absorbente para remover los anticuerpos no específicos. El suero que contiene anticuerpos específicos reaccionará con las células de carnero sensibilizadas con antígeno tiroideo microsomal para formar una estera o petate homogéneo de células en la bandeja de microtitulación. Las reacciones negativas son caracterizadas por un botón compacto de células formadas al asentarse las células no aglutinadas.

REACTIVOS.

- A) Diluyente absorbente: Solución salina, buffer fosfato (ph 7.2) que contiene componentes solubles de células

de membranas de eritrocitos de carnero (0.50%), componentes solubles de la membrana celular de eritrocitos bovinos (0.25%), suero normal de conejo (1.0%) y estabilizadores.

- B) Células Sensibilizadas: Eritrocitos de carnero tanificados, formalinizados, liofilizados, sensibilizados con antígeno tiroideo microsomal (es un extraído de tejido tiroideo de pacientes que adolecen de enfermedad de Graves) preparado de células acinares de la glándula tiroide tirotóxica por centrifugación a gran velocidad. El reactivo rehidratante es una suspensión al 2.5% de estas células.
- C) Células No-Sensibilizadas: Eritrocitos de carnero tanificados, formalinizados, liofilizados. El reactivo rehidratado es una suspensión al 2.5% de estas células.
- D) Control Positivo: Es un preparado de suero de conejo liofilizado que contiene auto-anticuerpos del microsoma tiroideo.
- E) Agua Rehidratante: Debe ser agua destilada estéril.

DILUCIONES DE TRABAJO:

Una vez reconstituidos, todos los reactivos se dejaban reposar durante una hora antes de su uso. De las células

sensibilizadas y no-sensibilizadas se preparaban diluciones de trabajo; agregando una parte de la suspensión de células rehidratadas a dos partes de diluyente absorbente. Preparándose únicamente el reactivo suficiente para las pruebas que se procesaban en el día. Para el cálculo de la cantidad de la suspensión de células rehidratadas que se utilizaron, se usó la siguiente fórmula:

$$C = \frac{A \times B}{3}$$

De donde:

A = Número total de pruebas que van a ser corridas.

B = Volúmen de la dilución de trabajo para cada prueba.

C = Volúmen de la suspensión de células rehidratadas.

Ejemplo: Si van a correrse 10 pruebas.

$$C = \frac{10 \text{ pruebas} \times 0.20 \text{ ml. de la dilución de trabajo de células}}{3}$$

$$C = \frac{10 \times 0.20}{3} = 0.67 \text{ ml. de suspensión de células rehidratadas.}$$

Las diluciones de trabajo no utilizadas se descartaban al final del día.

PROCEDIMIENTO

Antes de ser procesado el suero, debía ser incubado a

56°C por 30 minutos, con el objeto de inactivar el complemento.

Una vez rotulada la bandeja de microtitulación para identificar cada una de las muestras y el control positivo, se preparaba una dilución 1:25 de las muestras únicamente y no del control.

Los sueros diluídos pueden ser almacenados de 2-8°C y ser reutilizados tan sólo una vez; tanto los reactivos como las muestras deberán estar a temperatura ambiente antes de iniciar la prueba.

- A) Se destinaban diez pozos para cada espécimen depositando 0.050 ml. de diluyente absorbente en los pozos 1, 2 y 3 y 0.075 ml. en los pozos del 4 al 10 de cada línea.
- B) Se agregaba 0.025 ml. de la muestra diluída 1:25 a cada uno de los pozos 1, 2 y 3, mezclándose bien; del control positivo únicamente se agregaba 0.025 ml. a los pozos 1 y 4.
- C) Del pozo uno de la muestra se transfería 0.025 ml. al pozo 4 mezclando su contenido; para el control positivo se transfería 0.025 ml. del pozo 1 al 5.
- D) Se continuaba transfiriendo sucesivamente 0.025 ml. de cada pozo desde el pozo 4 para la muestra y del pozo 5 para el control positivo, hasta el pozo 10 inclusive, descartándose 0.025 ml. del pozo 10; tanto de la mues

tra como del control positivo, de manera que al final se obtuviesen las siguientes diluciones:

Pozo 1 - 1:	100 (suero diluído)
Pozo 2 - 1:	100 (para control de células no-sensibilizadas)
Pozo 3 - 1:	100 (para control de células sensibilizadas)
Pozo 4 - 1:	400
Pozo 5 - 1:	1,600
Pozo 6 - 1:	6,400
Pozo 7 - 1:	25,600
Pozo 8 - 1:	102,400
Pozo 9 - 1:	409,600
Pozo 10 - 1:	1.638,400

- E) Después de completar la dilución se incubaba cada bandeja a temperatura ambiente por 30 minutos.
- F) Se agitaban suavemente las diluciones de trabajo de células sensibilizadas y no-sensibilizadas, hasta que las células estuviesen completamente suspendidas y no hubiese sedimento visible en el fondo de los tubos, se adicionaba 0.025 ml. de la dilución de trabajo de células sensibilizadas a los pozos del 3 al 10 de cada una de las muestras; y del pozo 4 al 10 del control positivo.

- G) De las diluciones de trabajo de las células no-sensibilizadas se adicionaba 0.025 ml. a los pozos número 2 de cada una de las muestras únicamente. Las células no-sensibilizadas sirven de control negativo.
- H) Se mezclaba el contenido de los pozos de las muestras y de los controles; golpeando ligeramente con la palma de la mano uno de los lados de la bandeja de microtitulación, cubriéndose posteriormente las bandejas para evitar la evaporación y contaminación. Las bandejas se incubaban a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) durante toda la noche, procurando no mover las bandejas durante el período de incubación; al final de este período los resultados eran leídos.

Los resultados fueron obtenidos leyendo los patrones de asentamiento de los eritrocitos usando un espejo. El criterio para la observación y evaluación de las reacciones son definidas en comparación con los patrones de la reacción de células no-sensibilizadas y el suero control positivo.

R E S U L T A D O S

Para la realización del presente estudio se seleccionaron cuatro diferentes grupos de población: 25 personas con ceguera congénita, 25 con ceguera adquirida, 25 pacientes asegurados que adolecían de la tiroides y 25 personas aseguradas supuestamente sanas. Se obtuvieron 100 muestras en total y cada una de ellas fue procesada por los métodos cuantitativos de Hemaglutinación Indirecta: el Sera-Tek de anticuerpos antitiroglobulínicos y el Sera-Tek de anticuerpos antimicrosomales.

Para determinar la incidencia de estos anticuerpos en las muestras de las diferentes poblaciones estudiadas, se calculó en primer lugar el porcentaje de casos positivos y negativos con respecto al número total de muestras por cada población. Los casos positivos obtenidos al realizar cada prueba se distribuyeron por título.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS CUANTITATIVAS DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA
SERA-TEK DE ANTICUERPOS TIROGLOBULINICOS Y MICROSOMALES EN 25 PERSONAS
CON CEGUERA CONGENITA.

P R U E B A S	C A S O S P O S I T I V O S		C A S O S N E G A T I V O S	
	Nº	%	Nº	%
H A M C	1	4 %	24	96 %
H A T G	0	0 %	25	100 %

H A M C = Método de Hemaglutinación Indirecta de Anticuerpos Microsomales.

H A T G = Método de Hemaglutinación Indirecta de Anticuerpos Tiroglobulínicos.

De los 25 ciegos congénitos que fueron analizados, ninguno presentó positividad a Anticuerpos Tiroglobulínicos y solamente uno presentó positividad a Anticuerpos Microsomales (4%).

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS CUANTITATIVAS DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA
SERA-TEK DE ANTICUERPOS TIROGLOBULINICOS Y MICROSOMALES EN 25 PERSONAS
CON CEGUERA ADQUIRIDA

P R U E B A S	C A S O S P O S I T I V O S		C A S O S N E G A T I V O S	
	Nº	%	Nº	%
H A M C	1	4 %	24	96 %
H A T G	0	0 %	25	100 %

H A M C = Método de Hemaglutinación Indirecta de Anticuerpos Microsomales.

H A T G = Método de Hemaglutinación Indirecta de Anticuerpos Tiroglobulínicos.

En esta población solo un caso presentó positividad a Anticuerpos Microsomales, que representa al 4% de la población estudiada. Ningún caso fue positivo a Anticuerpos Tiroglobulínicos.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS CUANTITATIVAS DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA
 SERA-TEK DE ANTICUERPOS TIROGLOBULINICOS Y MICROSOMALES EN 25 PERSONAS
 ASEGURADAS QUE ADOLECEN DE LA TIROIDES.

P R U E B A S	C A S O S P O S I T I V O S		C A S O S N E G A T I V O S	
	Nº	%	Nº	%
H A M C	6	24 %	19	76 %
H A T G	2	8 %	23	92 %

H A M C = Método de Hemaglutinación Indirecta de Anticuerpos Microsomales.

H A T G = Método de Hemaglutinación Indirecta de Anticuerpos Tiroglobulínicos.

En los 25 casos de pacientes con padecimientos de la tiroides, fueron detectados 6 casos positivos a Anticuerpos Microsomales; y 2 casos positivos a Anticuerpos Tiroglobulínicos, que corresponden al 24% y 8% de la población estudiada respectivamente.

C U A D R O 4

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS CUANTITATIVAS DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA
SERA-TEK DE ANTICUERPOS TIROGLOBULINICOS Y MICROSOMALES EN 25 PERSONAS
ASEGURADAS SANAS.

P R U E B A S	C A S O S P O S I T I V O S		C A S O S N E G A T I V O S	
	N ^o	%	N ^o	%
H A M C	2	8 %	23	92 %
H A T G	0	0 %	25	100 %

H A M C = Método de Hemaglutinación Indirecta de Anticuerpos Microsomales.

H A T G = Método de Hemaglutinación Indirecta de Anticuerpos Tiroglobulínicos.

En este cuadro se observa que de 25 personas consideradas sanas, únicamente se detectaron dos casos positivos a Anticuerpos Microsomales (8%).

C U A D R O 5

DISTRIBUCION POR TITULO DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA CUANTITATIVA DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA SERA-TEK DE ANTICUERPOS MICROSOMALES Y TIROGLOBULINICOS EN LOS CASOS POSITIVOS OBTENIDOS EN LA POBLACION DE PERSONAS CON CEGUERA CONGENITA.

T I T U L O	N o . D E C A S O S P O R T I T U L O	
	H A M C	H A T G
1 : 100	-	-
1 : 400	-	-
1 : 1,600	-	-
1 : 6,400	1	-
1 : 25,600	-	-
1 : 102,400	-	-
T O T A L	1	-

H A M C = Método de Hemaglutinación Indirecta de Anticuerpos Microsomales.

H A T G = Método de Hemaglutinación Indirecta de Anticuerpos Tiroglobulínicos.

El único paciente con ceguera congénita en el que se detectaron Anticuerpos Microsomales, presentó un título moderado (1 : 6,400).

DISTRIBUCION POR TITULO DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA CUANTITATIVA DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA SERA-TEK DE ANTICUERPOS MICROSOMALES Y TIROGLOBULINICOS EN LOS CASOS POSITIVOS OBTENIDOS EN LA POBLACION DE PERSONAS CON CEGUERA ADQUIRIDA.

T I T U L O	Nº D E C A S O S P O R T I T U L O	
	H A M C	H A T G
1 : 100	-	-
1 : 400	-	-
1 : 1,600	-	-
1 : 6,400	1	-
1 : 25,600	-	-
1 : 102,400	-	-
T O T A L	1	-

H A M C = Método de Hemaglutinación Indirecta de Anticuerpos Microsomales.

H A T G = Método de Hemaglutinación Indirecta de Anticuerpos Tiroglobulínicos.

Se observa que se obtuvo un título bajo de 1:400 a Anticuerpos Microsomales, el único caso positivo encontrado en la población con ceguera adquirida.

DISTRIBUCION POR TITULO DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA CUANTITATIVA DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA SERA-TEK DE ANTICUERPOS MICROSOMALES Y TIROGLOBULINICOS EN LOS CASOS POSITIVOS OBTENIDOS EN LA POBLACION ASEGURADA DE PACIENTES QUE ADOLECIAN DE LA TIROIDES.

T I T U L O	Nº D E C A S O S P O R T I T U L O	
	H A M C	H A T G
1 : 100	-	1*
1 : 400	-	-
1 : 1,600	1**	-
1 : 6,400	1	-
1 : 25,600	2*	1**
1 : 102,400	2	-
T O T A L	6	2

H A M C = Método de Hemaglutinación Indirecta de Anticuerpos Microsomales.

H A T G = Método de Hemaglutinación Indirecta de Anticuerpos Tiroglobulínicos.

En este cuadro se observa que el mayor porcentaje de positividad correspondió a los anticuerpos Microsomales; y de éstos, el mayor número de casos está comprendido entre los títulos más altos.

Se hace la observación de que las dos positivities para Anticuerpos Tiroglobulínicos (*), (**), también lo fueron para Anticuerpos Microsomales.

DISTRIBUCION POR TITULO DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA CUANTITATIVA DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA SERA-TEK DE ANTICUERPOS MICROSOMALES Y TIROGLOBULINICOS EN LOS CASOS POSITIVOS OBTENIDOS EN LA POBLACION ASEGURADA DE PERSONAS SANAS.

T I T U L O	No. D E C A S O S P O R T I T U L O	
	H A M C	H A T G
1 : 100	-	-
1 : 400	1	-
1 : 1,600	1	-
1 : 6,400	-	-
1 : 25,600	-	-
1 : 102,400	-	-
T O T A L	2	-

H A M C = Método de Hemaglutinación Indirecta de Anticuerpos Microsomales.

H A T G = Método de Hemaglutinación Indirecta de Anticuerpos Tiroglobulínicos.

En este cuadro se observan los títulos obtenidos para los dos casos positivos a Anticuerpos Microsomales detectados en esta población, los cuales son considerados bajo (1 : 400) y moderados (1 : 1,600) respectivamente.

COMPARACION DE LOS RESULTADOS POSITIVOS OBTENIDOS PARA LOS CUATRO
GRUPOS ESTUDIADOS MEDIANTE AMBOS METODOS

POBLACION ESTUDIADA	Nº de C a s o s	H A M C		H A T G	
		Nº Casos Positivos	%	Nº Casos Positivos	%
Ciegos con ceguera adquirida	25	1	4 %	0	0 %
Ciegos con ceguera congénita	25	1	4 %	0	0 %
Pacientes asegurados que adolecían de la Tiroides	25	6	24 %	2	8 %
Personas Sanas	25	2	8 %	0	0 %

H A M C = Método de Hemaglutinación Indirecta de Anticuerpos Microsomales.

H A T G = Método de Hemaglutinación Indirecta de Anticuerpos Tiroglobulínicos.

En este cuadro comparativo se observa que la mayor positividad de Anticuerpos anti-tiroideos correspondió al segmento de población de pacientes asegurados que adolecían alguna patología tiroidea (24%), lo cual contrasta con el bajo número de positivities encontradas en el resto de los grupos en estudio.

D I S C U S I O N

Los métodos de hemaglutinación indirecta para detectar anticuerpos antitiroideos Microsomales (HAMC) y Tiroglobulínicos (HATG) usando células rojas de carnero sensibilizadas son pruebas de diagnóstico de gran valor en la comprobación de pacientes referidos con desórdenes tiroideos (3, 20).

La utilización conjunta de ambos métodos es específica para la detección de anticuerpos autoinmunes de la tiroides y han demostrado ser más sensitivos que la prueba de fijación de complemento para los anticuerpos microsomales, o la prueba de látex y prueba de precipitina para los anticuerpos tiroglobulínicos (1, 3, 4). Las pruebas son exactas y reproducibles; sin embargo, la prueba de anticuerpos microsomales es positiva más frecuentemente que la prueba de anticuerpos tiroglobulínicos.

Los resultados de positividad obtenidos por estos métodos en el presente trabajo de investigación en las cuatro poblaciones estudiadas fueron: para los ciegos congénitos y con ceguera adquirida, 4% para HAMC y 0% para HATG; en los pacientes asegurados que adolecían de la tiroides se obtuvo el 24% con la prueba HAMC y el 8% para HATG; y en la población de asegurados supuestamente sanos el 8% para HAMC y 0% con HATG. Estos resultados ratifican lo expuesto en el párrafo anterior.

Se investigó la presencia de anticuerpos microsomales y tiroglobulínicos en personas con ceguera congénita y adquirida para demostrar si había alguna relación entre la formación de anticuerpos autoinmunes tiroideos y la ceguera. Los resultados de positividad que se obtuvieron en ambas poblaciones descartan toda posibilidad de que la causa de la ceguera sea debida a la presencia de anticuerpos antitiroideos o a la aparición de éstos en las madres de las personas con ceguera congénita que hubieran padecido de rubeola durante su embarazo (10, 13, 14).

Al investigar la historia familiar del único caso positivo en el grupo de personas con ceguera congénita, no se descubrieron antecedentes de enfermedades virales ni trastornos relacionados con la tiroides en la madre. Consideramos que la ceguera de esta persona es debida a malformación del feto durante su desarrollo y que la etiología de estos anticuerpos no tiene relación con su ceguera. En la hoja de entrevista correspondiente se encontró una reciente infección de vías respiratorias superiores, que explica el título obtenido (1:6,400) como una respuesta inmune producida por una tiroiditis subaguda que suele presentarse 2 ó 3 semanas después de este tipo de infecciones.

Con respecto a la persona con ceguera adquirida, el título de anticuerpos tiroideos microsomales obtenido (1:400) no tiene ninguna relación con su ceguera, pero sí, con una

respuesta inmunológica provocada por una infección viral -- que desencadene una tiroiditis. Al entrevistar a la persona confirmó el haber padecido de rubeola en su infancia. Se sabe que algunas enfermedades virales pueden desencadenar una tiroiditis y por lo tanto un aumento de los anticuerpos antitiroideos (26, 29).

Al investigar la presencia de anticuerpos microsomales y tiroglobulínicos en pacientes asegurados que adolecían de la Tiroides (con Bocio difuso, Bocio nodular, Cáncer tiroideo, Hipertiroidismo y Tiroiditis) observamos que los resultados positivos fueron obtenidos en pacientes con diagnóstico de Bocio difuso y en un paciente con diagnóstico de Tiroiditis. En el resto, a pesar de haber sido referidos con padecimientos de la Tiroides, los resultados en la determinación de anticuerpos antitiroideos fueron negativos para ambas pruebas, ya que dichos anticuerpos no es usual encontrarlos en otras enfermedades que no sean Enfermedad de Graves y Enfermedad de Hashimoto (5, 12).

De 6 pacientes que presentaron positividad a la prueba microsomal, cuatro de ellos presentaron títulos elevados para anticuerpos microsomales, pero la prueba para anticuerpos tiroglobulínicos fue negativa en 3 de estos casos. La misma negatividad para anticuerpos tiroglobulínicos se obtuvo en un caso que presentó títulos moderados para anticuerpos microsomales. Al investigar el cuadro clínico de

estos pacientes se descubrió que presentaban valores de T_3 y T_4 en niveles normales, TSH elevada y centellograma anormal. En la misma población estudiada, únicamente dos casos resultaron con positividad para ambas pruebas; uno de ellos con diagnóstico de Bocio difuso, presentó un título moderado (1:1,600) para la prueba HAMC y un título elevado (1:25,600) para la prueba HATG. El otro paciente, con diagnóstico de Tiroiditis, presentó positividad para la prueba microsomal con un título elevado (1:25,600) y un título bajo (1:100) para la prueba HATG.

Como podemos observar, los títulos de positividad obtenidos en estos pacientes concuerdan con la patología presentada, lo cual confirma el diagnóstico clínico. Relacionando los resultados obtenidos con otros trabajos realizados (1, 5, 12), se determina que a los pacientes con Bocio difuso (Enfermedad de Graves) frecuentemente se les encuentran anticuerpos antitiroideos en su suero, al igual que aquellos con una enfermedad autoinmune de la Tiroides (Tiroiditis de Hashimoto).

Al revisar los resultados en la población investigada de personas consideradas sanas se detectaron dos casos positivos a anticuerpos microsomales (8%) con título bajo (1:400) y moderado (1:1,600), respectivamente. Ningún caso fue positivo con anticuerpos tiroglobulínicos.

Se sabe que los anticuerpos antitiroideos son raramente encontrados en sueros de personas normales; sin embargo, de un 5 a 10% de la población normal puede presentar títulos bajos de anticuerpos antitiroideos. Esta incidencia es mucho más elevada en la mujer, aumenta con la edad y está relacionada con factores fisiológicos de la función reproductora. Cabe mencionar que las 2 personas eran del sexo femenino; al interrogarlas manifestaron adolecer de trastornos relacionados con el aparato genitourinario (4, 6, 8, 10, 11, 26).

Los resultados obtenidos en este estudio comprueban la sensibilidad, reproducibilidad y especificidad de los métodos HAMC y HATG en la detección de anticuerpos antitiroideos. A la vez se demuestra que la prueba de anticuerpos microsomales suele ser más frecuentemente positiva que la prueba de anticuerpos tiroglobulínicos, debido a la naturaleza del antígeno que es una proteína microsomal extraída de una glándula tirotóxica de pacientes con enfermedad de Graves, lo que le da mayor sensibilidad.

La incidencia de positividad obtenida de los anticuerpos antitiroideos en los diferentes casos estudiados con Enfermedad de Graves y Tiroiditis, comprueba la especificidad de dichos anticuerpos con las patologías de la Tiroides, ya que estos anticuerpos no es usual encontrarlos en otras enfermedades.

Basándonos en los resultados obtenidos en la población ciega, concluimos que la presencia de anticuerpos antitiroideos Microsomales y Tiroglobulínicos no son causa de ceguera, ya que éstos son originados por una respuesta inmunológica desencadenada por una tiroiditis viral.

Recomendamos que estas pruebas sean utilizadas para -- confirmar un diagnóstico en el seguimiento de personas que presentan desórdenes tiroideos, las cuales deben ser examinadas periódicamente, puesto que la presencia de estos anticueros pueden ser señal temprana de una enfermedad autoinmune.

Las pruebas son fáciles de verificar, reproducibles y altamente específicas. Una ventaja es que ambas pueden correrse simultáneamente logrando un ahorro de tiempo en la obtención de los resultados, lo que redundará en beneficio del paciente y del médico; sin embargo, como toda prueba tiene sus limitaciones y desventajas siendo su mayor desventaja la dificultad de obtener estos reactivos en plaza.

Esperamos que en base a nuestra recomendación, se considere la incorporación de estas pruebas inmunológicas entre las pruebas de rutina del Laboratorio Clínico del Hospital General del Instituto Salvadoreño del Seguro Social, como también en aquellos laboratorios que funcionan como Centro de Referencia.

HOJA DE ENTREVISTA

No. Correlativo _____

Nombre del paciente: _____

Asegurado _____ No Asegurado _____

No. de Afiliación: _____

Edad: _____ Sexo: _____

Fecha: _____

Dirección A. Familiar: _____

Dirección B. Trabajo : _____

DATOS CLINICOS

Antecedentes familiares (_____), y de la madre durante el embarazo.

Enfermedades Virales: _____

Gripes: _____

Bocio: _____

Diabetes: _____

Ceguera: _____

Padecimientos del Entrevistado:

Enfermedades Virales: _____

Gripes: _____

Bocio: _____

Diabetes: _____

Ceguera: _____

Otros:

Embarazo: Anterior _____ Actual _____ Abortos _____

Toma anticonceptivos?: SI _____ NO _____

B I B L I O G R A F I A

- 1.- ANDERSON, James W., et als. "Diagnostic Value of Thyroid Antibodies". Journal Clinical Endocrinology. 2:937-944. 1967.
- 2.- BELLANTI, J. A. "Inmunología II". México, Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V., 1981. 333-359 pp.
- 3.- BIRD T. and Stephenson J. "Evaluation of a Tanned Red cell Technique for Thyroid Microsomal Antibodies" Journal Clinical Pathology. 26:623-627. 1973.
- 4.- CHOPRA, Inder J. et als. "Abnormalities in Thyroid Function in Relatives of Patients with Graves Disease and Hashimotos thyroiditis: Lack of Correlation with Inheritance of HLA-B8". J. C. E. & M. 45 (1) : 45-53. 1977.
- 5.- DEGROOT, Leslie J. et al. "Serum Antígenos and Antibodies in the Diagnosis of thyroid Cancer". Journal Clinical Endocrinology and Metabolism". 45, (6) : 1220-1223. 1977.
- 6.- DEGROOT, L. J. Stanbury JB. "The thyroid and its Diseases. 4th ed. New York. John Wiley & Sons. 1975.
- 7.- EHRENFELD EN, et als. "Human thyroglobulin and thyroid extract as specific stimulators of sensitized Lymphocytes". Journal Clinical Endocrinology Metabolismo. 32: 115-6, Jan. 71.

- 8.- EVERED DC, et als. "Grades of Hypothyroidismo". British Medical Journal. Mar, 657-661. 1973.
- 9.- GILDON, NB, and Salomon, DH. "Immunologic Features of Thyroid Diseases". Post-Graduate Medicine. 54 (5) : 181-189. 1973.
- 10.- HAMH, AW. y Cormack DH. "Tratado de Histología". 8a. Edición. México, Nueva Editorial Interamericana, S. A. de C.V. 1983. pp. 901-912.
- 11.- HARRINSON, et als. "Medicina Interna". 4a. Edición. México. La Prensa Médica Mexicana. 1973. pp. 496-519, Tomo I.
- 12.- HAZARD, JB., et al. "International Academy of Pathology; Monograph "the thyroid". Baltimore, The William J. Wilkins Co. 1973.
- 13.- HOPWOOD, NJ, MD et al. "Thyroid Antibodies in Children and Adolescents with thyroid disorders". The Journal of Pediatrics. 93, (1) : 57-61. 1978.
- 14.- JAWETZ, Ernest. "Manual de Microbiología Médica". 4a. Edición. México. Edit. "El Manual Moderno". 1970. pp. 182 y 457-458.
- 15.- LYNCH, Raphael et als. "Métodos de Laboratorio". 2a. Edición. México. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V. 1984. pp. 595-617.
- 16.- MORGANS, ME. and Trotter WR. "Association of Congenital Deafness with Gaitre". Mar. pp. 607-609. 1958.

- 17.- NELSON, Vaughan, McKay. "Tratado de Pediatría". 6a. Edición. México. Salvat Mexicana de Ediciones, S.A. de C.V. 1971. pp. 1222-1233. Tomo II.
- 18.- NIEBURG, Phillip J. et al. "Thyroiditis and Congenital Rubella Syndrome". The Journal of Pediatrics. Jul. 1976.
- 19.- NOBLE, Bernice et al. "Thyroid Antibodies in Spontaneous Autoimmune thyroiditis in the Buffalo rat." The Journal of Immunology. 177, (5): 1447-1455. 1976.
- 20.- NOBOYUKI, A. et al. "Measurement of Circulating thyroid Microsomal Antibodies by the tanned Cell Hemagglutination technique: its usefulness in the Diagnosis of autoimmune thyroid Diseases." Clinical Endocrinology. 5: 1115-125. 1976.
- 21.- PEREZ, Comas; Adolfo et al. "Congenital no rubella an acquired Hypothyroidism Secondary to Hashimoto's thyroiditis". The Journal of Pediatrics. 88: 1065-1066.- 1976.
- 22.- QUIÑONEZ, G. "Las Bases de la Inmunobiología Humana". 2a. Ed. El Salvador. Editorial Universitaria. 1976. Vol. 4
- 23.- RENNIE DP, et als. "The influence of Methinazole on thyroglobulin-Induced Autoimmune thyroiditis in the Rat." Endocrinology 112 (1) : 326. 1983.
- 24.- ROBBINS, Stanley L. "Tratado de Patología" 3a. Edic. México. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V. 1969 pp. 1088-1110

- 25.- SAMUELS, Herbert H. et als. "Depletion of L- 3, 5, 3 triiodothyronine and L-thyroxine in Euthyroid Calf Serum for use in cell culture studies of the action of thyroid Hormone." *Endocrinology*. 105:80. 1979.
- 26.- SODEMAN, W. "Fisiopatología Clínica". 6a. Edición. México. Editorial Interamericana S.A. de C.V. 1983. pp. 174-177.
- 27.- SUNDECK, RS et als. "Abnormal thyroid Regulation in chickens with autoimmune thyroiditis". *Endocrinology*. pp. 493. 1979.
- 28.- TAKEDA, Y. and Kriss JP. "Radiometric Measurement of Thyroglobulin-Antithyroglobulin Immune Complex in Human Serum". *Journal Clinical Endocrinology and Metabolism*. 44(1): 46-55. 1977.
- 29.- THOMSON, J.A. "Endocrinología Clínica; Tiroides". 2a. Ed. México. Nueva Editorial Interamericana. 1984.
- 30.- TODD, Sanford, David Sohn. "Diagnóstico y Tratamiento Clínico por el Laboratorio". 7a. Ed. México, Salvat Editores, S.A., 1984. pp. 408-429.
- 31.- TORRIGIANI, G. et als. "Serum Thyroglobulin Levels in Healthy Subjects and Patients with Thyroid Disease" *New York State Journal of Medicine*. 1:56-59. 1969.
- 32.- TRAKOSCK, CR et als. "Thyroid Stimulating Antibodies in Patients with subacute thyroiditis". *Journal Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2:345. 1978.

- 33.- VOLPE, R. "The Role of Immunity in Hypoendocrine -- Function". Annals of Internal Medicine. 87, (1): 86-99. 1977.
- 34.- WITEBSKY, E. and Rose, NR. "Autoimmunity and Its Relationship to thyroid Disease". New York State Journal of Medicine. 1: 56-59. 1963.
- 35.- WYSE, Eduardo P. et al. "Opthalmopathy without Hyperthyroidism in patients with Histologic Hashimoto's Thyroiditis". Journal Clinical Endocrinology. 28:1623-1629. 1968.