



**"INDUCCION DE ANTICUERPOS PÓLICLONALES  
ANTI-HORMONAS ESTEROIDES PARA SU  
APLICACION EN RADIOINMUNOANALISIS"**

**POR:**

**L.C.B. MARTHA MERINO RUIZ**

**TESIS PRESENTADA A LA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DE LA**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA**

**LA OBTENCION DEL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA**

**DE LA REPRODUCCION**

**MONTERREY, N.L.**

**JULIO DE 1992**

TM

Z6658

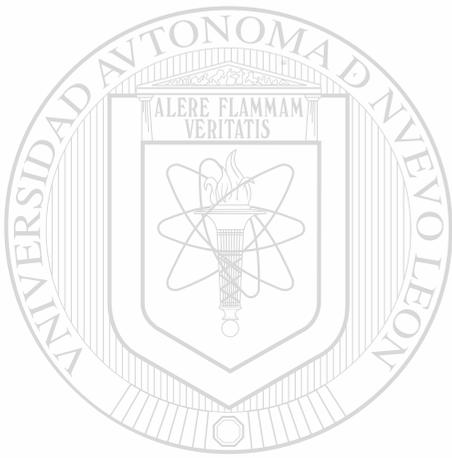
FM

1992

M4



1020071207



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**"INDUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI-HORMONAS  
ESTEROIDES PARA SU APLICACION EN  
RADIOINMUNOANALISIS"**

**POR:**

**L.C.B. MARTHA MERINO RUIZ**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN**  
**TESIS PRESENTADA A LA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS**  
**DE LA**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA**  
**LA OBTENCION DEL GRADO DE**  
**MAESTRO EN CIENCIAS**  
**CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION**

**Monterrey, N.L.**

**Julio de 1992**

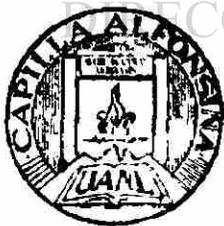
7M  
26658  
F21  
1992  
H4



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®



**FONDO TESIS**

24000

**INDUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI-HORMONAS  
ESTEROIDES PARA SU APLICACION EN  
RADIOINMUNOANALISIS**

**TESIS PRESENTADA POR:  
L.C.B. MARTHA MERINO RUIZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA LA  
OBTENCION DEL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION**



**COMISION DE TESIS:**

**PRESIDENTE**

Dr. Mario César Salinas Carmona

**SECRETARIO**

Q.C.B., M.C. Irma A. Salinas González

**PRIMER VOCAL**

Dra. Ma. del Socorro Flores de Castañeda

**SEGUNDO VOCAL**

Dr. Rogelio F. García Flores

**TERCER VOCAL**

Biol., M.C. Olimpia V. González Guerra

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de la Unidad de Biología de la Reproducción,  
Departamento de Ginecología y Obstetricia de la Facultad de Medicina, U.A.N.L.

Asesor: **Dra. Ma.del Socorro Flores de Castañeda**  
**Departamento de Inmunología**

Co-Asesor: **Dr. Rogelio F. García Flores**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
Unidad de Biología de la Reproducción

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**CON AMOR:**

**A MI ESPOSO,**



**A NUESTROS HIJOS,**

UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

**A MIS PADRES.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Ma. del Socorro Flores de Castañeda por su apoyo, comprensión y amistad.

Al Dr. Rogelio F. García Flores por la confianza depositada en mí como profesionista.

Al Dr. Mario César Salinas Carmona por su apoyo y estímulo para llegar a la meta.

A la Biol.,MC. Olimpia V. González Guerra por sus consejos acertados y su valiosa amistad.

A la Q.C.B.,MC. Irma A. Salinas González por su disposición y sincera amistad.

Al Dr. Tomás Morato Cartagena por los valiosos conocimientos proporcionados.

A cada uno de los integrantes de la Unidad de Biología de la Reproducción, del Departamento de Gineco-Obstetricia de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. por su apoyo y compañerismo y en especial a la Q.C.B. Hilda M. Luna de Villa.

A la Sra. Socorrito Valles por su siempre amable disposición.

Este proyecto fué auspiciado en forma parcial por la Dirección General de Investigación Científica y Superación Académica bajo el convenio No. C90-01-0216.

## INDICE

	Pag
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> -----	<b>10</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b> -----	<b>12</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b> -----	<b>14</b>
<b>I. INTRODUCCION</b> -----	<b>16</b>
<b>II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS</b> -----	<b>25</b>
<b>III. MATERIAL Y METODO</b> -----	<b>26</b>
<b>1. REACTIVOS QUIMICOS</b> -----	<b>26</b>
1.1. Esteroides puros -----	<b>26</b>
1.2. Esteroides conjugados -----	<b>27</b>
1.3. Esteroides marcados isotópicamente -----	<b>27</b>
1.4. Adyuvante completo de Freund -----	<b>27</b>
1.5. Solventes orgánicos -----	<b>28</b>
1.6. Solución (0.9%) de cloruro de sodio -----	<b>28</b>
<b>2. PREPARACION DE SOLUCIONES</b> -----	<b>28</b>
2.1. Amortiguadores -----	<b>28</b>
2.2. Soluciones precipitantes -----	<b>28</b>
2.3. Solución de Centelleo -----	<b>29</b>
2.4. Solución de esteroides puros -----	<b>29</b>
2.5. Solución de esteroides marcados con H <sup>3</sup> -----	<b>30</b>

<b>3. MUESTRAS BIOLÓGICAS</b>	<b>31</b>
3.1. Sueros humanos	31
3.2. Sueros de conejos	32
<b>4. INDUCCIÓN DE ANTICUERPOS</b>	<b>32</b>
4.1. Animales de experimentación	32
4.2. Inmunizaciones	32
<b>5. ESTIMACIÓN DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS</b>	
<b>ANTIESTEROIDES Y SELECCIÓN DEL MÉTODO DE RIA</b>	<b>32</b>
<b>6. AJUSTE DE LA CURVA PATRÓN PARA RIA</b>	<b>38</b>
<b>7. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTISUEROS</b>	<b>39</b>
<b>8. CONFIABILIDAD DEL MÉTODO</b>	<b>42</b>
8.1. Precisión	45
8.2. Sensibilidad	45
8.3. Exactitud	46
8.4. Especificidad	46
<b>9. APLICACIÓN DEL MÉTODO</b>	<b>46</b>
9.1. Determinación de 17-Hidroxiprogesterona	47
9.2. Determinación de Cortisol	47
<b>10. TRATAMIENTO DE LOS SUEROS PREVIO AL RIA</b>	<b>48</b>

**IV. RESULTADOS ----- 51**

**1. 17-HIDROXIPROGESTERONA**

**1.1. Producción y caracterización de los antisueros ----- 51**

**1.1.1. Estimación de los niveles de anticuerpos ----- 51**

**1.1.2. Ajuste de la curva patrón ----- 51**

**1.1.3. Caracterización de los antisueros ----- 56**

**1.2. Confiabilidad del método de RIA ----- 63**

**1.2.1. Precisión ----- 63**

**1.2.2. Sensibilidad ----- 63**

**1.2.3. Exactitud ----- 65**

**1.2.4. Especificidad ----- 65**

**1.3. Aplicación del método de RIA ----- 65**

**1.3.1. Determinación de 17-hidroxiprogesterona durante el ciclo ovárico ----- 65**

**1.3.2. Determinación de 17-hidroxiprogesterona post-estimulación de las**

**glándulas suprarrenales con ACTH ----- 69**

**2. CORTISOL.**

**2.1. Producción y caracterización de los antisueros ----- 69**

**2.1.1. Estimación de los niveles de anticuerpos ----- 69**

**2.1.2. Ajuste de la curva patrón para el radioinmunoanálisis ----- 74**

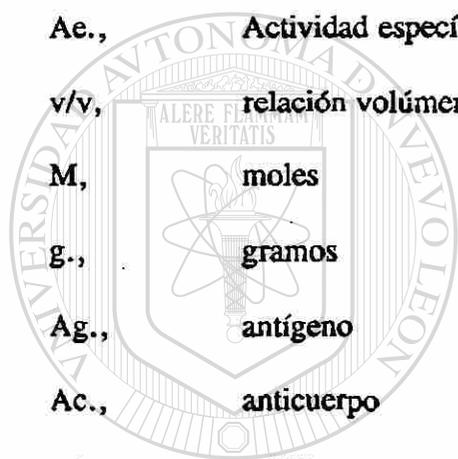
**2.1.3. Caracterización de los antisueros obtenidos ----- 74**

Pag.

2.2.Reproducibilidad del método de RIA	80
2.2.1.Precisión	80
2.2.2.Sensibilidad	80
2.2.3.Exactitud	80
2.2.4.Especificidad	85
2.3.Aplicación del método de RIA	85
2.3.1.Determinación de cortisol sérico durante su variación diurna y post-supresión con dexametasona	85
2.3.2.Comparación de los resultados de Cortisol con dos métodos de RIA	85
V DISCUSION	90
VI CONCLUSIONES	97
VII RESUMEN	98
VIII BIBLIOGRAFIA	99

## LISTA DE ABREVIATURAS

A.C.T.H.,	Hormona adenocorticotrófica
17-OHCS,	17 hidroxisteroides cetogénicos
Ci.,	Curies
mmol.,	milimoles
Ae.,	Actividad específica
v/v,	relación volumen a volumen
M,	moles
g.,	gramos
Ag.,	antígeno
Ac.,	anticuerpo
ml.,	mililitro
mg.,	miligramos
µg.,	microgramos
pg.,	picogramos
cpm,	cuentas por minuto
µCi.,	microCuries
kg.,	kilogramo
ng.,	nanogramos
UI,	unidades internacionales
VPS,	volúmen de suero procesado



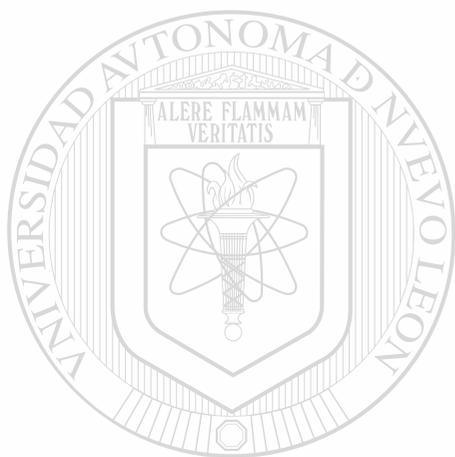
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



CV,	coeficiente de variación
CT,	cuentas totales
ui,	unión inespecífica
CNPM,	cuentas netas por minuto
U,	unión



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**INDICE DE TABLAS**

- Tabla I. Protocolo de trabajo para el ajuste de la curva patrón con los antisueros anti-17-hidroxiprogesterona.
- Tabla II. Protocolo de trabajo para el ajuste de la curva patrón con los antisueros anti-cortisol.
- Tabla III. Protocolo de trabajo para la caracterización de los antisueros anti 17-hidroxiprogesterona.
- Tabla IV. Protocolo de trabajo para la caracterización de los antisueros anti-cortisol.
- Tabla V. Fórmula descrita por Abraham para obtener el % de reactividad cruzada de los antisueros con otros esteroides.
- Tabla VI. Evaluación de los títulos de los antisueros anti-17-hidroxiprogesterona.
- Tabla VII. Actividad del antisuero en diferentes concentraciones en la curva dosis-respuesta para el RIA de 17-hidroxiprogesterona.
- Tabla VIII. Caracterización parcial del antisuero anti-17-hidroxiprogesterona del primer san grado del conejo 1.
- Tabla IX. Caracterizaciones parciales de los antisueros anti-17-hidroxiprogesterona obtenidos del conejo 1.
- Tabla X. Caracterización general. Reactividad cruzada de los antisueros anti-17hidroxiprogesterona con 23 esteroides.
- Tabla XI. Precisión del método de RIA para medir 17-hidroxiprogesterona.
- Tabla XII. Sensibilidad y precisión de la curva patrón del método de RIA para medir 17-hidroxiprogesterona.
- Tabla XIII. Exactitud del método de RIA para medir 17-hidroxiprogesterona.

Tabla XIV. Determinación de 17hidroxiprogesterona en suero de mujeres normales durante el ciclo ovárico.

Tabla XV. Determinación de 17-hidroxiprogesterona post-estimulación con A.C.T.H.

Tabla XVI. Evaluación de los títulos de antisueros anti-cortisol.

Tabla XVII. Actividad del antisuero en diferentes concentraciones en la curva dosis-respuesta para el RIA de cortisol.

Tabla XVIII. Caracterización parcial del antisuero anti-cortisol del sangrado 5 del conejo 7.

Tabla XIX. Caracterización general de los antisueros anti-cortisol.

Tabla XX. Precisión del método de RIA para medir cortisol.

Tabla XXI. Sensibilidad y precisión de la curva patrón del método de RIA para medir cortisol.

Tabla XXII. Exactitud del método de RIA para medir cortisol.

Tabla XXIII. Variación diurna y post-supresión con dexametasona del cortisol sérico en individuos normales.

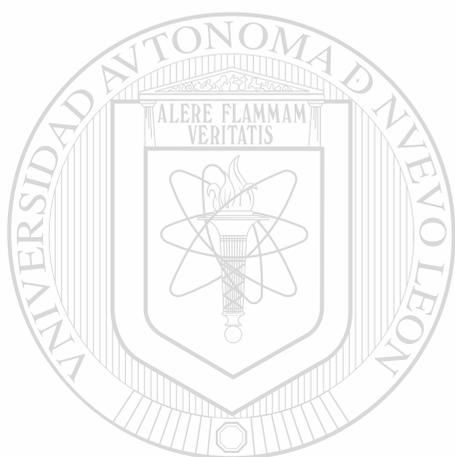
---

Tabla XXIV. Cortisol sérico medido por dos métodos.

## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Biosíntesis de esteroides.
- Figura 2. Diferenciación Bioquímica de células productoras de esteroides.
- Figura 3. Esquema general del método utilizado para el RIA de 17-hidroxiprogesterona.
- Figura 4. Esquema general del método utilizado para el RIA de cortisol.
- Figura 5. Titulación de tres diferentes antisueros anti-17-hidroxiprogesterona.
- Figura 6. Fecha de los sangrados mayores y títulos de los antisueros anti-17-hidroxiprogesterona que unen el 50% de hormona marcada.
- Figura 7. Ajuste de la curva patrón graficado en papel semi-logarítmico.
- Figura 8. Ajuste de la curva patrón graficado en papel Logit-log.
- Figura 9. Caracterización parcial del antisuero anti-17-hidroxiprogesterona del primer sangrado del conejo 1.
- 
- Figura 10. Precisión de la curva patrón del método de RIA para medir 17-hidroxiprogesterona.
- Figura 11. Titulación de tres diferentes antisueros anti-cortisol.
- Figura 12. Fechado de los sangrados mayores y título de los antisueros anti-cortisol que unen el 50% de hormona marcada.
- Figura 13. Ajuste de la curva patrón para el RIA de cortisol graficado en papel semi-logarítmico.
- Figura 14. Ajuste de la curva patrón para el RIA de cortisol graficado en papel Logit-log.
- Figura 15. Caracterización parcial del antisuero anti-cortisol del conejo 2 en el sangrado 5.
- Figura 16. Precisión de la curva patrón del método de RIA para medir cortisol.

**Figura 17. Esquema de variación diurna y post-supresión con dexametasona de cortisol plasmático en individuos normales.**



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## I. INTRODUCCION

Las hormonas esteroides se caracterizan por presentar el núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno y su síntesis comienza a partir del colesterol. En los mamíferos, la fuente principal de colesterol se obtiene de las lipoproteínas plasmáticas de la circulación o de los ésteres de colesterol, aunque también hay síntesis en las glándulas endócrinas a partir de acetato. El proceso de conversión de colesterol a hormonas esteroides comprende varias transformaciones químicas reguladas por acciones enzimáticas. Los principales pasos implicados en la derivación de los esteroides hormonales se presentan en la figura 1. Los esteroides producidos se clasifican dependiendo del número de átomos de carbono que presentan, así tenemos los pregnanos (C-21), los androstanos (C-19) y los estranos (C-18).

Las hormonas esteroides se sintetizan en el humano en los siguientes órganos: glándulas suprarrenales, ovarios y testículos y la presencia en mayor o menor concentración de ciertas enzimas, como la 17-hidroxilasa o aromatasa, deciden la ruta biosintética a seguir. Así, en la corteza suprarrenal se sintetiza principalmente cortisol [C-21] y pequeñas cantidades de andrógenos [C-19]; el testículo, produce testosterona [C-19] y pequeñas cantidades de estrógenos; las células de la teca ovárica sintetizan estrógenos [C-18]; mientras que el cuerpo lúteo produce progesterona [C-21] y pequeñas cantidades de estrógenos [C-18] como se observa en la figura 2.

La 17-hidroxiprogesterona es un producto intermedio de todas las rutas esteroideas y su nivel de producción se puede ver afectado en la suprarrenal por la deficiencia de enzimas que

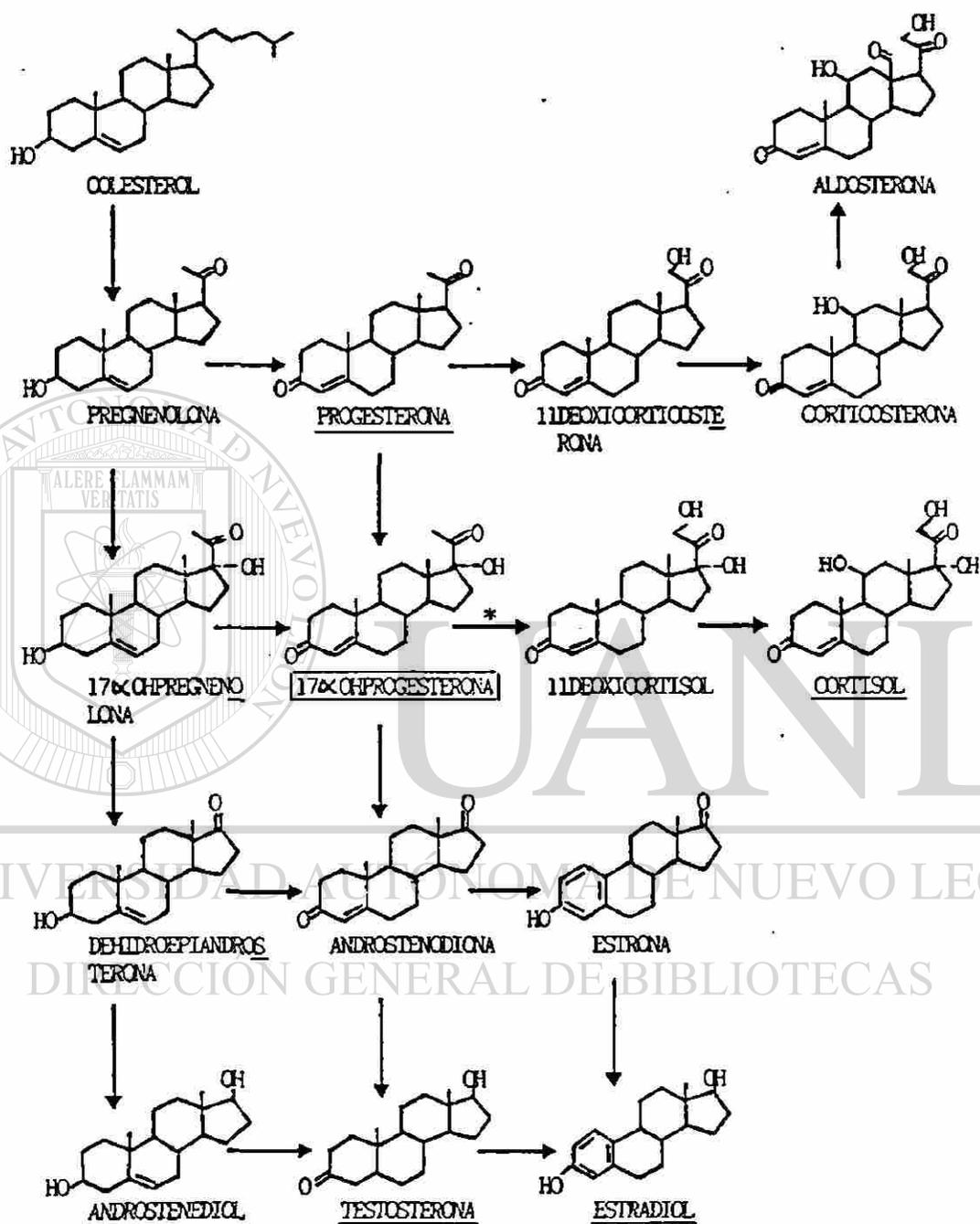


Figura 1. Biosíntesis de esteroides.

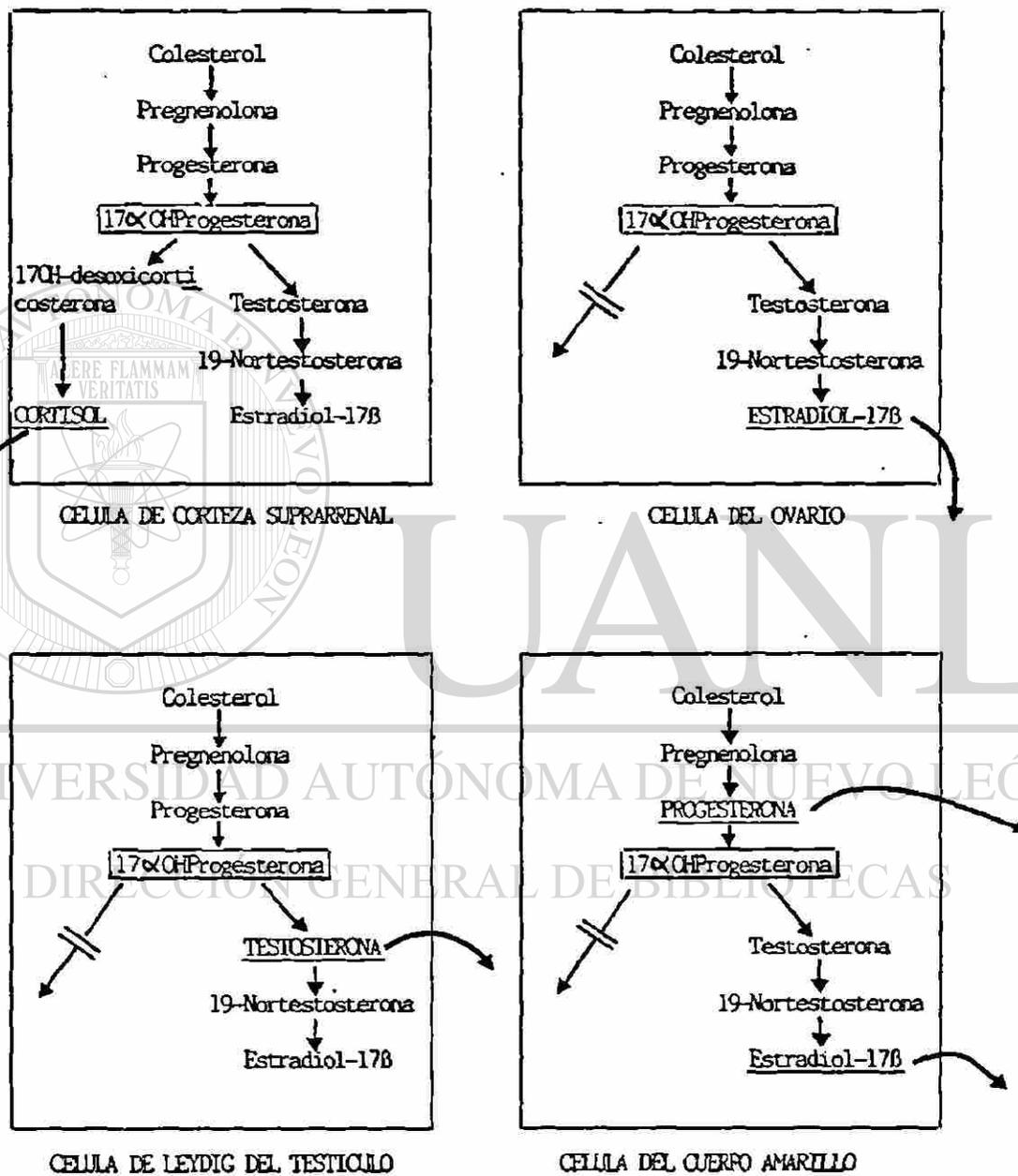


Figura 2. Diferenciación Bioquímica de células productoras de esteroides.

participan en la síntesis de cortisol, como en el caso de la hiperplasia adrenal congénita debida principalmente a deficiencia de 21-hidroxilasa o a deficiencia de 11-hidroxilasa en menor grado. También se pueden encontrar niveles elevados de 8 a 10 veces sobre las concentraciones normales, originados por la presencia de ovarios poliquísticos.

En condiciones normales, los niveles periféricos de 17-hidroxiprogesterona durante la fase luteínica, reflejan la actividad secretora del ovario que contiene el cuerpo amarillo, al presentar un patrón de excreción paralelo al de la progesterona. Esta característica puede utilizarse como un método indirecto para detectar ovulación.

El cortisol es el principal glucocorticoide humano producido en la zona fasciculada de la glándula suprarrenal y su secreción es controlada por la hormona adenocorticotrófica [ACTH] hipofisiaria. Esta hormona es secretada en forma intermitente produciéndose variaciones diurnas con cifras máximas alrededor de las 6:00 a 8:00 hrs y las cifras disminuyen a la mitad por la tarde [18:00 hrs]. Algunas de las funciones más importantes que ejerce el cortisol es el control de la secreción de ACTH en la hipófisis, mantiene el nivel de glucosa sanguínea, favorece la gluconeogénesis en el hígado, etc., por lo que su determinación permite evaluar la actividad de la corteza suprarrenal. Esta actividad puede verse afectada, y podemos encontrar hipercortisolismo plasmático en el síndrome de Cushing que puede ser: dependiente de ACTH como en el caso de adenomas hipofisarios y ACTH ectópica e independiente de ACTH debida a una producción autónoma por tumor adrenal. La producción de cortisol puede estar disminuída en pacientes con insuficiencia adrenal [Síndrome de Addison] o debido a deficiencias enzimáticas como en la

hiperplasia adrenal congénita. El poder medir éstas hormonas permite conocer la fisiopatología orgánica y evaluar la respuesta al tratamiento.

Una de las necesidades para la medición de dichas hormonas, es la de contar con técnicas lo suficientemente sencillas para hacer determinaciones cuantitativas y que puedan ejecutarse en pequeños volúmenes de una muestra de fluido biológico.

Antes de 1960 las sustancias presentes en pequeñas cantidades en los fluidos corporales eran difíciles de medir y los métodos para cuantificar hormonas esteroides se realizaban en forma indirecta mediante la medición de sus metabolitos en la orina.

En la década de los 60's, la disponibilidad de hormonas marcadas isotópicamente, hizo posible la utilización de métodos sofisticados que permitieron valorar la mayor parte de las hormonas esteroides con actividad biológica reconocida. Sin embargo, estos métodos requerían gran volumen sanguíneo, procesos de purificación cromatográfica tediosos y demasiado tiempo para el número de muestras a procesar, resultando inadecuados para la rutina.

Berson y Yallow [1] en 1959 establecieron una metodología basada en un ensayo de unión competitiva utilizando anticuerpos anti-insulina. Posteriormente Murphy [2] en 1963 describió un método de unión competitiva utilizando proteínas transportadoras para la determinación de esteroides y en 1969, Abraham [3] publicó la primer aplicación del radioinmunoanálisis para la medición de esteroides en líquidos biológicos .

El radioinmunoanálisis [RIA] es un método que ofrece algunas ventajas como son: a] sensibilidad, que es la capacidad de un sistema de medición para detectar pequeñas cantidades de sustancias, b] especificidad, esto es, la capacidad del sistema para medir únicamente la sustancia de interés, c] exactitud, que es la capacidad para determinar la cantidad real de sustancia presente y d] la precisión, que se refiere a la reproducibilidad del ensayo y representa la característica final especial ya que proporciona determinaciones extremadamente reproducibles de duplicados de muestras aplicadas durante un solo ensayo.

El radioinmunoanálisis es el resultado de las observaciones de Berson y Yallow [1], en donde, se pueden detectar bajas concentraciones de una hormona al determinar su capacidad antigénica y ser unida específicamente por anticuerpos dirigidos contra ella. Por lo tanto, la competencia entre moléculas de hormona no marcadas con aquellas que están marcadas con radioisótopos por los mismos sitios de unión con el anticuerpo, causa una disminución de la cantidad de material marcado unido a los anticuerpos presentes.

Una muestra, con una cantidad de hormona desconocida, puede ser medida al compararla con una serie de estándares con cantidades conocidas de hormona no marcada, porque presenta la misma competencia con las moléculas de hormona marcada por la unión con los anticuerpos. Al incrementar las cantidades de antígeno no marcado, los sitios de unión de los anticuerpos presentes en el ensayo son progresivamente saturados, consecuentemente, se une menos antígeno marcado.

La incubación de los componentes del sistema permite que ocurra una reacción de equilibrio

y la suosecuente separación del antígeno unido a los anticuerpos del "no unido" o "libre" y la medición de la cantidad de radioactividad de una o ambas fases, permite la cuantificación de la reacción que ha ocurrido.

En términos simples; el radioinmunoanálisis se realiza de la siguiente manera: 1] obtención de los componentes necesarios para hacer el ensayo [antígeno no marcado, antígeno marcado, anticuerpo], 2] interacción de los componentes bajo circunstancias apropiadas, 3] separación de los componentes específicos, 4] medición de éstos componentes con técnicas que midan el trazador radioactivo y 5] elaboración de una curva patrón con una serie de cantidades conocidas de la sustancia a medir [hormona no marcada], para tenerla como referencia al comparar una muestra desconocida de paciente y poder encontrar su valor.

Los anticuerpos son el reactivo mas importante del radioinmunoanálisis, por lo que es necesario contar con antisueros de buena calidad. La producción de éstos anticuerpos se ha mostrado en numerosos reportes, en los que se manejan esteroides conjugados en forma covalente a una proteína de alto peso molecular. Para lograr esta unión se han utilizado puentes de hemisuccinato [4-7], carboximetiloxima [5-8] o bién por medio de un puente sulfhidrilo [9] entre ambas moléculas.

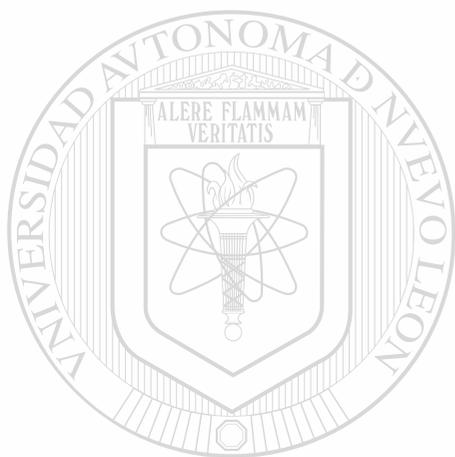
Un factor importante que influye en la especificidad del antisuero producido, es el sitio de conjugación de la proteína acarreadora. La proteína debe estar acoplada al esteroide en una región alejada de los grupos funcionales, para que puedan actuar como determinantes antigénicos [10]. Las

dosis y las vías de inoculación, el tiempo y los animales de experimentación para producir anticuerpos son variadas [5-7,11]. Los animales que se han utilizado son caballos, cerdos, ovejas y chivos, sin embargo es el conejo de Nueva Zelanda el que brinda mejores resultados y es de más fácil manejo.

La 17-hidroxiprogesterona se ha medido en forma indirecta por métodos químicos al medir su metabolito urinario, el pregnantriol [12]. Esta hormona se ha medido en plasma por métodos de unión competitiva que utilizan proteína transportadora de corticosteroides [13-14] y también por radioinmunoanálisis (RIA) se han descrito numerosos reportes, sin embargo los antisueros utilizados presentan diferentes características debido al sitio de conjugación con la proteína acarreadora del antígeno inductor. Así, West [15] utilizó un antígeno acoplado a una proteína en posición C-21 y un puente hemisuccinato; Hamond [16] utilizó el mismo puente en posición C-17, y Abraham [7], Lee [17] y Pratt [5] utilizaron como puente carboximetiloxima en posición C-3.

El cortisol puede ser determinado colorimétricamente porque su cadena lateral de dihidroxiacetona reacciona con la fenilhidracina en ácido sulfúrico. Este método fue desarrollado por Porter y Silver [18,19] y comúnmente se conocen como 17 hidroxicetoesteroides (17-OHCS). También se ha medido por métodos cromatográficos [20] y por métodos de unión competitiva utilizando la transcortina (proteína transportadora del cortisol) [2,21]. Por radioinmunoanálisis se han utilizado diferentes antisueros: Ruder [22] los induce al utilizar el antígeno unido en posición C-21 a la proteína por un puente hemisuccinato, Nishina y cols. [10] inducen además con otro antígeno unido en posición C-3 con un puente de carboximetiloxima, antígeno que también

utilizaron Fahmy [23] y Magyar [24]. Ellos obtuvieron antisueros relativamente específicos por lo que sugieren que la muestra a determinar sea tratada previamente con una cromatografía de columna para separar los componentes específicos.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

Al ver la necesidad de contar con métodos como el radioinmunoanálisis para medir hormonas esteroides que sean de utilidad en las clínicas de endocrinología, endocrinología ginecológica y andrología, es que se han planteado los siguientes objetivos:

1. Inducir anticuerpos anti-hormonas esteroides [cortisol y 17- hidroxiprogesterona] en conejos de Nueva Zelanda.
2. Caracterizar dichos antisueros para conocer su especificidad.
3. Demostrar su utilidad al aplicarlos en técnicas de radioinmunoanálisis.
4. Incrementar los recursos técnicos en clínica e investigación en el área endocrinológica.
5. Reducir el costo operativo.

### III. MATERIAL Y METODOS

#### 1. REACTIVOS QUIMICOS

##### 1.1. Esteroides puros [Steraloids Inc.]

##### 1.1.1. Estrógenos [C-18]

- Estratrien-3,17 $\beta$  diol [Estradiol]
- Estratrien-3-ol,17-one [Estrona]
- Estratrien-3,16,17 $\beta$  triol [Estriol]

##### 1.1.2. Andrógenos [C-19]

- 5 Androstan-17 $\beta$  ol-3-one [5 Dihidrotestosterona]
- 4-Androsten-3,17-dione [Androstendiona]
- 4-Androsten-17 $\beta$  ol-3-one [Testosterona]

---

- 5-Androsten-3 $\beta$  ol-17-one [Dehidroepiandrosterona]

- 5-Androsten-3 $\beta$  ol-17-one-NaO<sub>3</sub>SO [Dehidroepiandrosterona Sulfato]

##### 1.1.3. Progestágenos [C-21]

- 5Pregnan-3,20-dione [Pregnandiona]
- 5 $\beta$ Pregnan-3,20 -diol [Pregnandiol]
- 5 $\beta$ Pregnan-3 $\alpha$ ,21-diol-20-one [Tetrahidrocortisol]
- 5 $\beta$ Pregnan-17 $\alpha$ ,21-diol-3,11,20-trione [Dihidrocortisona]
- 5 $\beta$ Pregnan-3-20-dione [5 $\beta$  Hidroxiprogesterona]
- 5 $\beta$ Pregnan-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-tetrol-20-one [Tetrahidrocortisol]
- 5 $\beta$ Pregnan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ ,21-tetrol-11-one [Cortolona]

- 5 $\beta$ Pregnan-3,17,20-triol [Pregnantriol]
- 5 $\beta$ Pregnan-11 $\beta$ ,17,21-triol-3,20-dione [5 $\beta$  Dihidroocortisol]
- 5 $\beta$ Pregnan-3,11 $\beta$ ,21-triol-20-one [Tetrahidrodesoxicorticosterona]
- 4-Pregnen-17,21-diol-3,20-dione [11-Desoxicortisol]
- 4-Pregnen-17 $\alpha$ -21-diol-3,11,20-trione [Cortisona]
- 4-Pregnen-3,20-dione [Progesterona]
- 4-Pregnen-17 $\alpha$ -ol-3,20-dione [17\_ Hidroxiprogesterona]
- 4-Pregnen-21-ol-3,20-dione [Desoxicorticosterona]
- 4-Pregnen-21-ol-3,11,20-trione [11-Dehidrocorticosterona]
- 4-Pregnen-11 $\beta$ -17 $\alpha$ ,21-triol-3,20-dione [Cortisol]
- 5-Pregnen-3 $\beta$ -17 $\alpha$ -diol-20-one [17-Hidroxipregnenolona]
- 5-Pregnen-3 $\beta$ -ol-20-one [Pregnenolona]

## 1.2. Esteroides conjugados con albúmina bovina [Steraloids Inc.]

1.2.1. 4-Pregnen-17 $\alpha$ -ol-3,20-dione-3-O-Carboximetiloxima:BSA

1.2.2. 4-Pregnen-11 $\beta$ -17 $\alpha$ ,21-triol-3,20-dione-3-O-Carboximetiloxima:BSA

## 1.3. Esteroides marcados isotópicamente [New England Nuclear]

1.3.1. Hidrocortisone [1,2,6,7- H<sup>3</sup>(N)]

Ae 80.0 Ci/mmol, 0.25 mCi/0.25 ml -Benzeno/Etanol 9:1 v/v

1.3.2. Hidroxiprogesterone 17 $\alpha$  [1,2-H<sup>3</sup>(N)]

Ae 50.0 Ci/mmol, 0.25 mCi/0.25 ml -Benzeno/Etanol 9:1 v/v

## 1.4. Adyuvante completo de Freund [Gibco]

**1.5. Solventes orgánicos**

1.5.1. Eter etílico [Merck]

1.5.2. Tolueno [Merck]

1.5.3. Metanol [Merck]

**1.6. Solución (0.9 %) de Cloruro de Sodio [Lab. Piza]****2. PREPARACION DE SOLUCIONES****2.1. Amortiguadores**

2.1.1. Sol. amortiguadora de fosfatos (0.1 M) (pH 7) con .1% de gelatina y .1% de azida de sodio

Fosfato de Sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_3$ )	0.05 M
Fosfato de Sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_3$ )	0.05 M
Cloruro de Sodio (NaCl)	9.00 g

---

Azida de Sodio ( $\text{NaN}_3$ )	1.00 g
-----------------------------------	--------

Gelatina [Knox]	1.00 g
-----------------	--------

Agua destilada y desmineralizada	1000 ml
----------------------------------	---------

2.1.2. Sol. amortiguadora de boratos (0.06 M) (pH 8)

Acido Bórico	4.00 g
--------------	--------

Agua destilada y desmineralizada	1000 ml
----------------------------------	---------

2.1.3. Sol. amortiguadora de boratos/metanol 90/10 v/v

**2.2. Soluciones precipitantes**

2.2.1. Solución de Carbón-Dextrán

Carbón activado [Darco]	625.0 mg
Dextrán T-70 [Sigma]	62.5 mg
Sol. amortiguadora de fosfatos	100.0 ml

#### 2.2.2. Sol. sobresaturada de Sulfato de Amonio

#### 2.3. Solución de centelleo

PPO (2,5,dipheniloxazole) [Sigma]	4.0 g
2-Metil-POPOP-2-(4-metil-5-pheniloxazolil)[Sigma]	0.1 g
Tolueno	1000 ml

#### 2.4. Soluciones de esteroides puros. Para cada esteroide se preparó la siguiente serie de diluciones:

##### - Solución Base

5.0 mg de esteroide y aforar a 5.0 ml con metanol (1.0 mg/1.0 ml)

##### - Solución Base diluída (S.B.dil.)

tomar 0.1 ml de sol. Base y aforar a 10.0 ml con metanol (10.0 µg/1.0 ml)

##### - Soluciones para la Curva Patrón -

##### -Solución A

tomar 0.2 ml de S.B.dil. y aforar a 10.0 ml con diluyente (100,000 pg/0.5 ml)

##### -Solución B

tomar 0.1 ml de S.B.dil. y aforar a 10.0 ml con diluyente (10,000 pg/0.5 ml)

##### -Solución C

tomar 0.2 ml de Solución A y aforar a 10.0 ml con diluyente (2,000 pg/0.5 ml)

##### -Solución D

tomar 0.1 ml de Solución A y aforar a 10.0 ml con diluyente (1,000 pg/0.5 ml)

-Solución E

tomar 0.05 ml de Solución A y aforar a 10.0 ml con diluyente (500 pg/0.5 ml)

-Solución F

tomar 0.025 ml de Solución A y aforar a 10.0 ml con diluyente (250 pg/0.5 ml)

-Solución G

tomar 0.1 ml de Solución B y aforar a 10.0 ml con diluyente (100 pg/0.5 ml)

-Solución H

tomar 0.05 ml de Solución B y aforar a 10.0 ml con diluyente (50 pg/0.5 ml)

-Solución I

tomar 0.025 ml de Solución B y aforar a 10.0 ml con diluyente (25 pg/0.5 ml)

-Solución J

tomar 0.1 ml de Solución C y aforar a 10.0 ml con diluyente (10 pg/0.5 ml)

-Diluyentes:

-Para la técnica de 17 hidroxiprogesterona se utilizó sol. amortiguadora de fosfatos.

-Para la técnica de cortisol se utilizó Metanol/Benceno 5/95 v/v.

## 2.5. Soluciones de esteroides marcados isotópicamente

2.5.1. Solución Base marcada de 17 hidroxiprogesterona tomar 0.25 ml de esteroide

marcado y aforar a 10.0 ml con Benceno/Etanol (9:1) v/v.

-Solución Base marcada diluída de 17-hidroxiprogesterona.

tomar 0.1 ml de sol. Base y evaporar en presencia de Nitrógeno, resuspender

en 21.0 ml de sol. amortiguadora de fosfatos.

Esta solución contiene 0.012  $\mu\text{Ci}/0.1\text{ml}$   
 (~10,000 cpm ~75.0 pg de masa/0.1 ml).

### 2.5.2. Solución Base marcada de cortisol.

tomar 0.25 ml de esteroide marcado y aforar a 10.0 ml con Benceno/Etanol  
 (9:1) v/v.

-Solución Base marcada diluída de cortisol.

tomar 0.1 ml de sol. Base y evapora en presencia de Nitrógeno, resuspender  
 en 20.0 ml de sol. amortiguadora de boratos. Agregar 1.0 ml de gamma  
 globulina humana.

Esta solución contiene 0.012  $\mu\text{Ci}/0.1\text{ml}$   
 (~10,000 cpm ~50.0 pg de masa/0.1 ml)

## MUESTRAS BIOLÓGICAS.

### 3.1. Sueros humanos.

3.1.1. Sueros obtenidos de mujeres que acudieron a la consulta de infertilidad del

Hospital Universitario en:

a) Fase lútea y fase folicular.

b) condiciones basales, y post-estimulación con A.C.T.H.

3.1.2. Sueros de varones de la misma consulta en condiciones basales y post-supresión  
 con dexametasona.

3.1.3. Sueros de varones estudiantes voluntarios de la carrera de Médico Cirujano

Partero de la U.A.N.L. en condiciones basales y post-supresión con dexametasona.

### **3.2. Sueros de conejos.**

Obtenidos post-inmunización.

## **4. INDUCCION DE ANTICUERPOS**

### **4.1. Animales de experimentación.**

Se utilizaron conejos de Nueva Zelanda de 45 días de edad, machos, blancos, con peso aproximado de 1.5 kg.

### **4.2. Inmunizaciones.**

Emulsiones formadas por un mg de esteroide conjugado disuelto en un ml. de solución salina y un ml. de adyuvante completo de Freund, fueron aplicadas en el lomo a cada uno de los conejos, (3 animales por esteroide) por vía intradérmica y/o subcutánea. El primer mes en forma semanal, el segundo mes en forma quincenal y del tercer mes en adelante en forma mensual durante 35 semanas.

## **5. ESTIMACION DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS ANTI-ESTEROIDES Y SELECCION DEL METODO DE RADIOINMUNOANALISIS.**

A partir del segundo mes de iniciadas las inoculaciones, se evaluó la respuesta inmunológica a través de punción de la vena marginal de la oreja de cada conejo. Se realizaron pequeños sangrados y por radioinmunoanálisis se midió el título de anticuerpos producidos, determinado por el porcentaje de antígeno marcado que se une a los anticuerpos al utilizar una cantidad constante de

hormona marcada y diluciones seriadas de antisuero.

Como no se conocía el comportamiento de los antisueros frente a los antígenos, ni los requerimientos de pH de la solución amortiguadora o el período de incubación para llegar al equilibrio, fué necesario probar en dos métodos convencionales de RIA los dos antisueros. Se utilizaron amortiguadores diferentes, se modificaron los períodos de incubación y se probaron varios métodos de separación de los componentes formados durante la reacción antígeno-anticuerpo.

Es indispensable mencionar que el método de separación en RIA es un factor determinante para la división de los componentes formados, la medición de dichos componentes y los cálculos posteriores, ya que el complejo antígeno- anticuerpo formado durante el procedimiento no precipita debido a que éste ocurre a concentraciones extremadamente bajas ( $10^{-10}$  a  $10^{-12}$ M). Por tanto, para remover el complejo antígeno-anticuerpo o el antígeno no unido es necesario seleccionar un procedimiento basado en las propiedades del antígeno y la naturaleza del material biológico ensayado. El procedimiento debe ser rápido, de bajo costo, simple y el factor mas importante es una completa separación con un mínimo margen de error.

Existen numerosas técnicas de separación descritas para RIA pero aquí solo se mencionan las utilizadas en este proyecto:

1) Técnicas de adsorción.- Están basadas en la remoción del antígeno marcado no unido del sistema, después que ha concluído la reacción. Muchos factores físicos y químicos determinan el

sistema de adsorción como el tamaño y carga del antígeno, la composición y concentración de otras proteínas presentes, pH, fuerza iónica y otras variables en la mezcla. Una ventaja adicional es, que reducen la concentración de el antígeno libre a un valor cercano a cero en forma rápida, esto, reduce o elimina factores que pueden causar disociación del complejo. Algunos adsorbentes comúnmente utilizados son el carbón, talco, silicatos, etc., estos agentes tienen como característica común, la rápida unión al antígeno no unido. Uno de los agentes mas utilizados es el carbón pre-tratado con dextrán (en una relación de dextrán al 10% en carbón) que mejora las propiedades adsorptivas y que con una simple centrifugación permite hacer la separación al empacar el carbón-dextrán en el fondo de un tubo de ensaye.

2) Técnicas de precipitación no específica.- Utilizan el principio de que a una concentración crítica de sales inorgánicas o líquidos orgánicos, los anticuerpos (gamma globulinas) son insolubles, mientras que el antígeno libre permanece en solución. En consecuencia, éste procedimiento precipita todo el anticuerpo presente, que incluye la porción de antígeno marcado unida al antisuero. Bajo éstas condiciones la separación de las fracciones unidas y libres de antígeno marcado pueden ser separadas por centrifugación. Este efecto de precipitación con sales puede ser afectado por varios factores como pH, fuerza iónica, constante dieléctrica, temperatura y concentración proteica. Los reactivos mas utilizados son el sulfato de amonio en solución sobresaturada y al 60 % y el etanol 96°.

Para desarrollar la fase de separación en esta metodología, en el RIA de 17-hidroxiprogesterona se decidió utilizar la precipitación con carbón-dextrán, que deja en suspensión el

complejo Ag-Ac (fracción unida) que es lo que se mide en el contador de centelleo. Este método, requiere de un testigo de la capacidad precipitante de la mezcla, para conocer la cantidad de hormona marcada que se une en forma inespecífica (ui) a la proteína de la solución amortiguadora. Esta mezcla debe precipitar más del 90% de hormona marcada, por lo que en los tubos marcados (ui) el % de unión deberá ser  $< 10\%$ . Esta cantidad de hormona marcada que queda en suspensión, se resta a todo el ensayo.

Para el RIA de cortisol se utilizó una solución sobresaturada de sulfato de amonio que precipita la fracción unida al anticuerpo y en suspensión queda la fracción libre, que en éste caso es la que se lleva al conteo de radioactividad. Por lo tanto, para conocer la fracción unida se obtiene la diferencia de los valores de las cuentas totales (cantidad constante de hormona marcada que es añadida a cada uno de los tubos del ensayo) y la fracción libre (hormona marcada no unida al antisuero) y al relacionar la diferencia con las cuentas totales se conoce el porcentaje de unión.

Para estimar los niveles de anticuerpos anti-esteroides producidos se hizo una dilución inicial del antisuero 1:100, a partir de esta dilución se prepararon las diluciones siguientes: 1:1000, 1:2500, 1:5000 y 1:10000. Cada dilución del antisuero fue enfrentada a una cantidad constante del antígeno marcado correspondiente.

En las figuras 3 y 4 se presentan los diagramas de flujo que representan los esquemas de los métodos finalmente utilizados en las titulaciones. Estos métodos fueron manejados durante todo el estudio para cada hormona y se indica la cantidad de reactivo necesario, el tiempo y la temperatura de incubación y la velocidad de centrifugación. Cada dilución fue trabajada por duplicado y se buscó

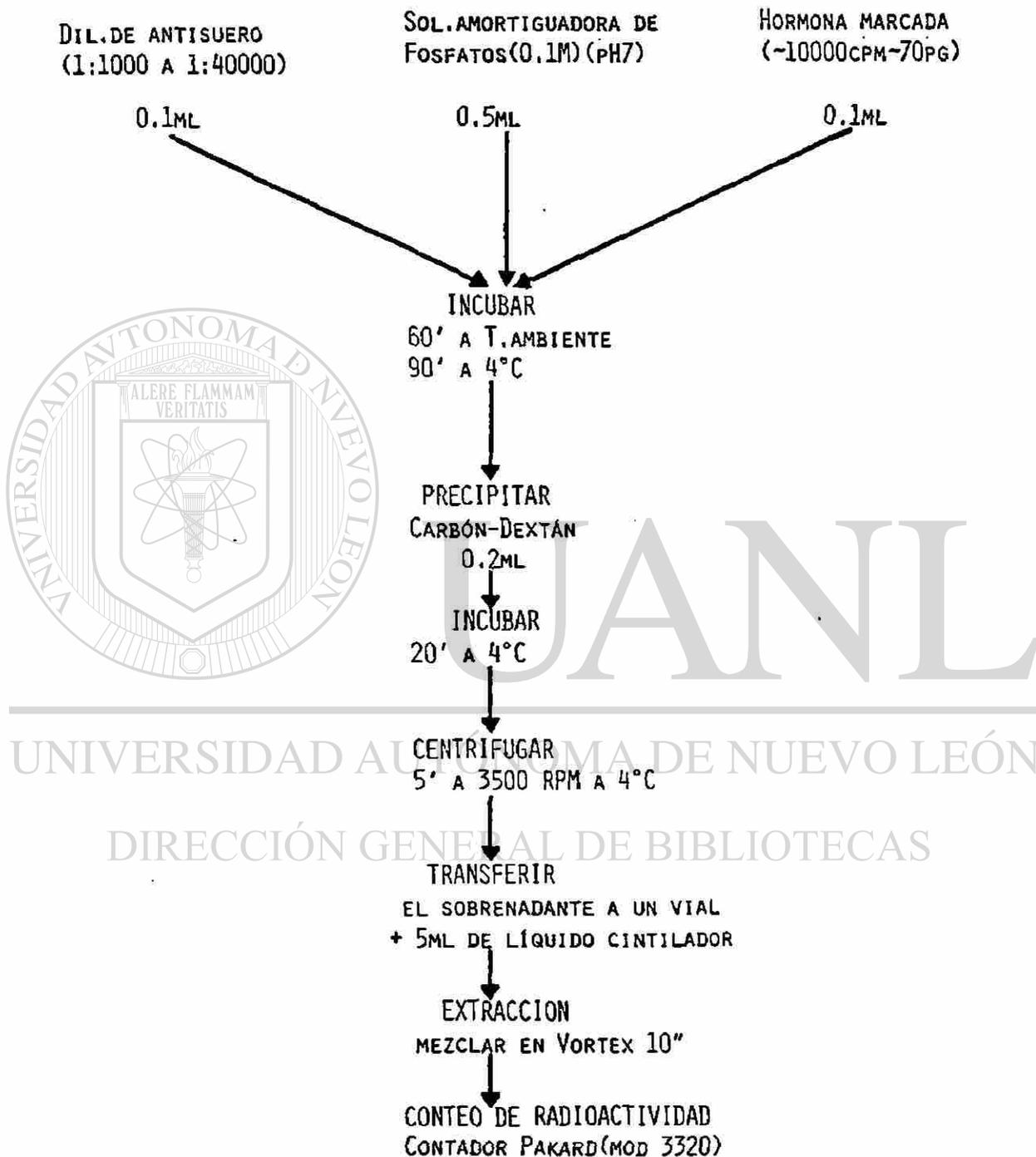


Figura 3. Esquema general del método utilizado para el RIA de 17-hidroxiprogesterona.

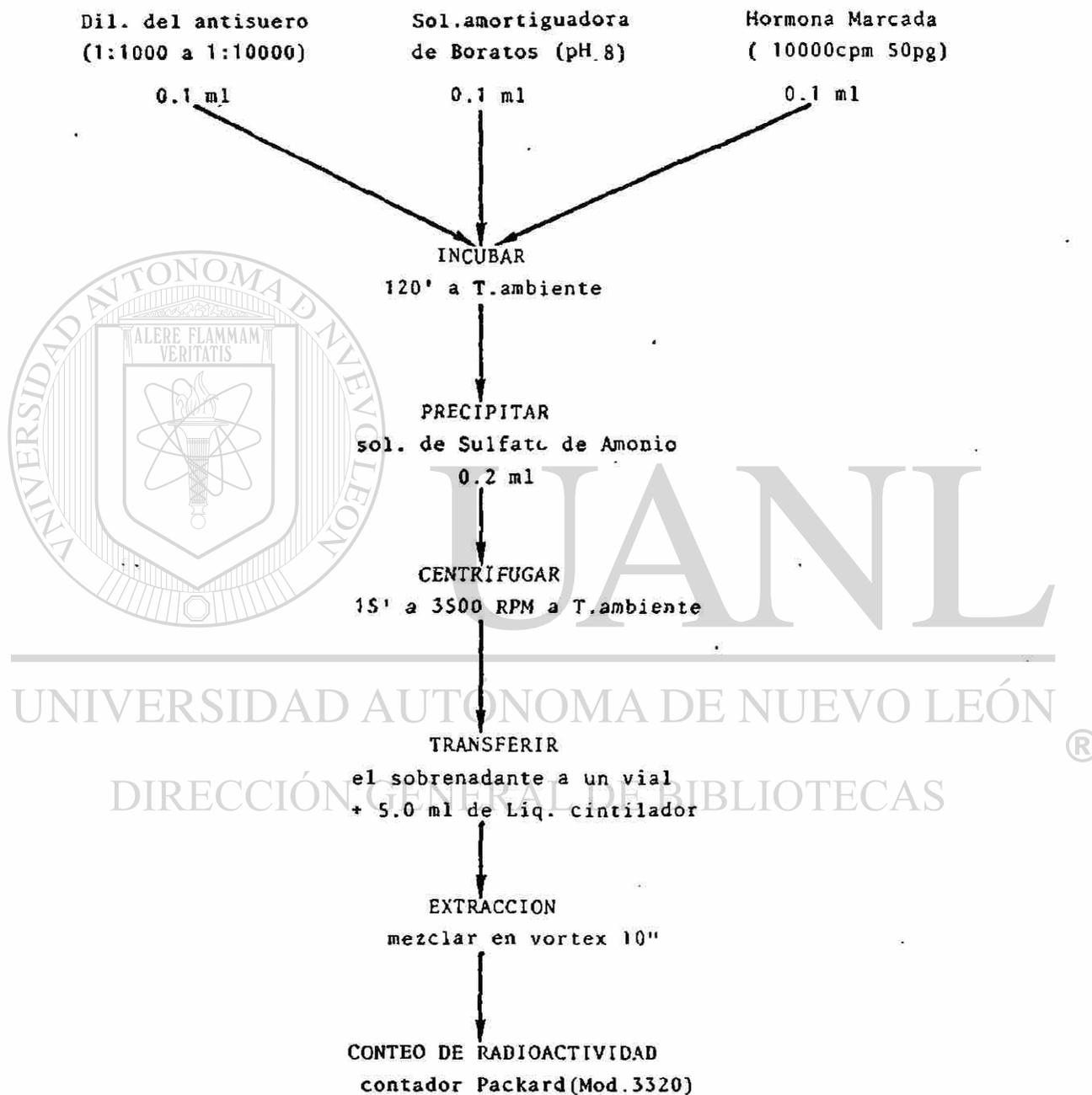


Figura 4. Esquema general del método utilizado para el RIA de Cortisol.

aquella que uniera el 50% de hormona marcada. Esto se logró al relacionar las cuentas de la fracción unida (complejo Ag-Ac) /las cuentas totales x 100.

Al obtener títulos adecuados ( $> 1:1000$ ) se hicieron sangrados mayores a través de la arteria central de la oreja de los conejos. El suero fué separado y para preservarlo se añadió azida de sodio al 0.1% y se congeló a  $-10^{\circ}\text{C}$ .

## 6. AJUSTE DE LA CURVA PATRON.

Para lograr un buen equilibrio entre el anticuerpo y el antígeno marcado y el no marcado, fué necesario ajustar las concentraciones de los mismos para buscar aquellos que permitieran tener una buena pendiente en una curva patrón dosis-respuesta. La curva patrón seleccionada tenía sensibilidad, es decir, cubría un amplio margen de concentraciones de hormona no marcada. La sensibilidad se mejora cuando se cuenta con una hormona marcada de alta actividad específica (Ae) que permita manejar una baja concentración de masa marcada y la concentración del anticuerpo permitirá manejar un amplio rango de valores de antígeno no marcado.

Como las hormonas marcadas utilizadas en este estudio son de alta actividad específica se manejaron concentraciones que proporcionaron  $\sim 10,000$  cpm con una masa  $< 100$  pg/tubo. Las curvas patrón comprendieron soluciones de esteroide no marcado en concentraciones de 10, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 pg/tubo para 17-hidroxiprogesterona y 50, 100, 250, 500 y 1000 pg/tubo para cortisol. Los rangos se escogieron conforme a las diferentes concentraciones en que se encuentran circulando en plasma sanguíneo (17-hidroxiprogesterona: 0.1 - 3.3 ng/ml mujeres normales y 3.6

·26.3 ng/ml mujeres embarazadas. Cortisol: 50 - 250 ng/ml).

Con respecto al antisuero, se manejaron tres diluciones que unieran entre 40 y 60% de hormona marcada (permanecen constantes las cantidades de hormona marcada y no marcada de la curva patrón). En la tabla I se presenta el protocolo de trabajo a seguir para 17-hidroxiprogesterona y en la tabla II el protocolo para cortisol, en donde se indican los volúmenes requeridos de la dilución de esteroide puro, de la hormona marcada y de la dilución del antisuero utilizado. Cada curva fue realizada por duplicado. Como se manejaron tres diluciones de antisuero, se llevó una curva patrón para cada una y se eligió aquella que mostró mejor desplazamiento de la hormona marcada.

Los datos de las curvas patrón obtenidas fueron graficadas en papel semi-logarítmico y logit-log (El primero proporciona una curva sigmoide y el segundo la lineariza al utilizar la conversión logarítmica del eje de las abscisas y logarítmica neperiana del eje de las oordenadas) [25].

## 7. CARACTERIZACION DE LOS ANTISUEROS

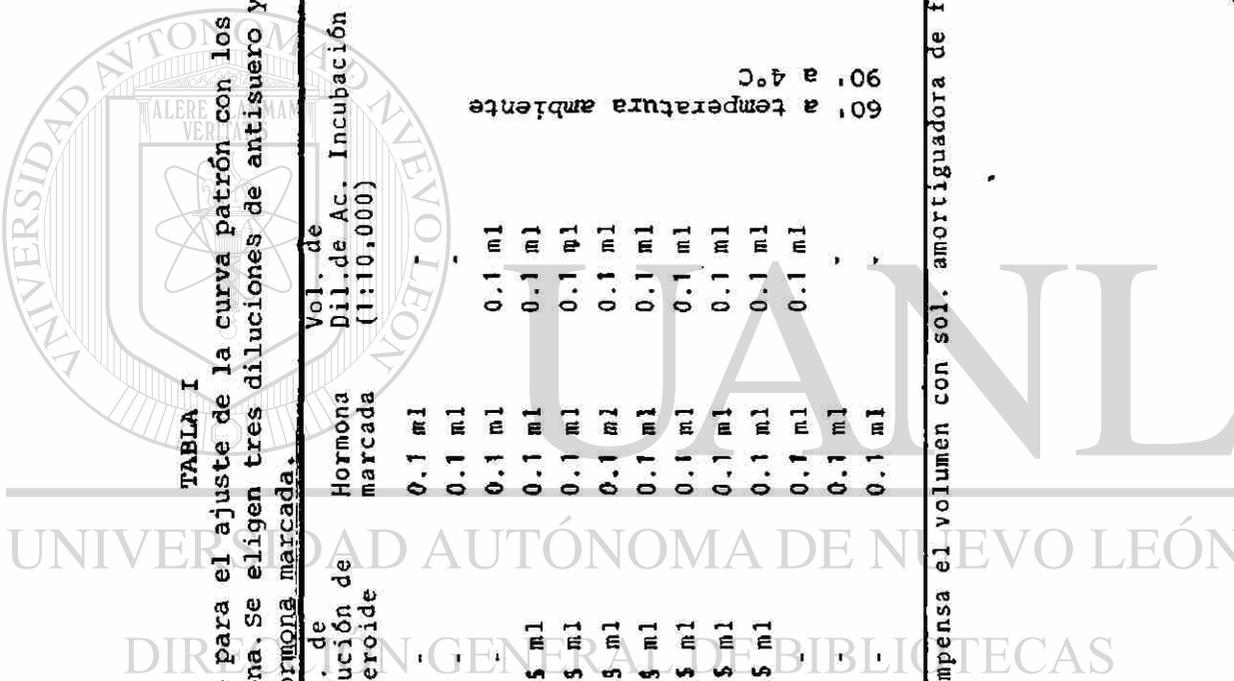
Las características de especificidad fueron evaluadas al cruzar la dilución óptima del antisuero obtenido con otros esteroides que tienen características estructurales muy semejantes o bien que circulan en concentraciones fisiológicas altas. Para este propósito, se desarrolló un ensayo en el que se manejó la curva patrón elegida en el ajuste de reactantes es decir con la dilución de antisuero y en otras series de tubos la curva patrón fue substituida por las curvas de los otros esteroides no marcados en concentraciones de 50, 100, 250, 500, 1,000, 10,000 y 100,000 pg/tubo.

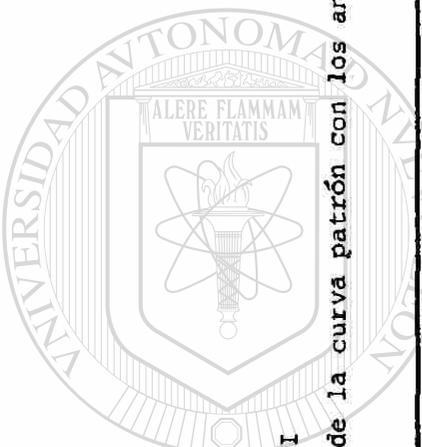
TABLA I

Protocolo de trabajo para el ajuste de la curva patrón con los antiseros anti-17-hidroxiprogesterona. Se eligen tres diluciones de antisuero y se incluye aquella que une el 50% de hormona marcada.

Tubo	Clave	Vol. de dilución de Esteroide	Hormona marcada	Vol. de Dil. de Ac. (1:10,000)	Incubación	Cabón Dextrán	Incubación
1-2	CT	-	0.1 ml	-	60° a temperatura ambiente	-	20° a 4° Centrifugar a 3,500 rpm a 4° C
3-4	ui	-	0.1 ml	-	90° a 4° C	0.2 ml	-
5-6	"0"masa	-	0.1 ml	0.1 ml	-	0.2 ml	-
7-8	10 pg	0.5 ml	0.1 ml	0.1 ml	-	0.2 ml	-
9-10	25 pg	0.5 ml	0.1 ml	0.1 ml	-	0.2 ml	-
11-12	50 pg	0.5 ml	0.1 ml	0.1 ml	-	0.2 ml	-
13-14	100 pg	0.5 ml	0.1 ml	0.1 ml	-	0.2 ml	-
15-16	250 pg	0.5 ml	0.1 ml	0.1 ml	-	0.2 ml	-
17-18	500 pg	0.5 ml	0.1 ml	0.1 ml	-	0.2 ml	-
19-20	1000 pg	0.5 ml	0.1 ml	0.1 ml	-	0.2 ml	-
21-22	"0"masa	-	0.1 ml	0.1 ml	-	0.2 ml	-
23-24	ui	-	0.1 ml	-	60° a temperatura ambiente	-	-
25-26	CT	-	0.1 ml	-	90° a 4° C	-	-

CT, ui y "0"masa se compensa el volumen con sol. amortiguadora de fosfatos





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA II

Protocolo de trabajo para el ajuste de la curva patrón con los antisueros anti-cortisol.

Tubo	Clave	Vol. de dilución de Esteroide	Hormona marcada	Vol. de Dil. de Ac. (1:2,500)	Incubación	Sulfato de Amonio	Centrifugar 15' a 3500 RPM
1- 2	CT		0.1 ml	-		-	
3- 4	"0"masa		0.1 ml	0.1 ml		0.2 ml	
5- 6	50 pg	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml		0.2 ml	
7- 8	100 pg	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml		0.2 ml	
9-10	250 pg	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml		0.2 ml	
11-12	500 pg	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml		0.2 ml	
13-14	1000 pg	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml		0.2 ml	
15-16	2000 pg	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml		0.2 ml	
17-18	"0"masa		0.1 ml	0.1 ml		0.2 ml	
19-20	CT		0.1 ml	-		-	

120' a temperatura ambiente

CT y "0"masa se llevaron a un vol. final de 0.5 ml con sol. amortiguadora de MeOH(S<sub>1</sub>)/Boratos.

En las tablas III y IV se muestran los protocolos a seguir en una caracterización parcial con esteroides que se encuentran en concentraciones fisiológicas de importancia en el humano. Los volúmenes que se indican fueron aplicados por tubo para cada concentración de esteroide no marcado siguiendo el esquema correspondiente para cada hormona. Todo el ensayo fue realizado por duplicado.

Para conocer el grado de reactividad cruzada que presenta el antisuero con otros esteroides, se procedió a graficar las curvas patrón obtenidas del esteroide apropiado y los esteroides en cuestión en papel semi-logarítmico. Se buscó en la gráfica la cantidad de picogramos de hormona que desplaza el 50% de hormona marcada para cada uno de los esteroides y se utilizó la fórmula descrita por Abraham [25] que se presenta en la tabla V.

Al conocer las características parciales de los diferentes antisueros, se procedió a mezclar aquellos que presentaron características semejantes y posteriormente se les practicó una caracterización con una serie mas completa de esteroides.

## **8. CONFIABILIDAD DEL METODO DE RADIOINMUNOANALISIS.**

La utilización e interpretación óptimas de los datos proporcionados por el radioinmunoanálisis, requieren un fino conocimiento sobre la precisión y reproducibilidad del método. Idealmente un RIA es confiable, si los resultados siempre expresan el contenido real de la muestra con un grado aceptable de precisión dentro de los límites del error experimental. En la práctica, la expresión del contenido real de la concentración de una muestra nunca ocurre, ya que las

TABLA III

Protocolo de trabajo para la caracterización de los antisueros anti-17 hidroxiprogestero-  
 progesterona.

Tubo	Clave	Concentraciones de hormonas (10-100,000 pg)	Dil. de antisuero (1:20,000)	17hidroxi- progesterona marcada.
1- 22	17 Hidroxiprogestero- progesterona	0.5 ml	0.1 ml	0.1 ml
23- 44	Progesterona	0.5 ml	0.1 ml	0.1 ml
45- 66	5 Dehidroprogesterona	0.5 ml	0.1 ml	0.1 ml
67- 88	Testosterona	0.5 ml	0.1 ml	0.1 ml
89-110	Dehidroepiandrosterona	0.5 ml	0.1 ml	0.1 ml
111-132	Dehidroepiandrosterona-S	0.5 ml	0.1 ml	0.1 ml
133-154	Cortisol	0.5 ml	0.1 ml	0.1 ml
155-176	Pregnenolona	0.5 ml	0.1 ml	0.1 ml
177-198	Estradiol	0.5 ml	0.1 ml	0.1 ml

TABLA IV

Protocolo de trabajo para la caracterización de los antisueros anti-  
 cortisol.

Tubo	Clave	Concentraciones de Hormonas (50-100,000 pg)	Dil. de anticuerpo 1:20,000	Cortisol Marcado
1- 22	Cortisol	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
21- 40	Compuesto-S	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
41- 60	Compuesto-E	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
61- 80	Progesterona	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
81-100	17-OHProgesterona	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
101-120	Desoxicortisol	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
121-140	Testosterona	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
141-160	Tetrahidrocortisol	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
161-180	Dihidrocortisol	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml



TABLA V

Fórmula descrita por Abraham para obtener la reactividad cruzada de los antisueros con otros esteroides expresada en %.

$$\% \text{ de reactividad cruzada} = \frac{\text{Masa de 17-OHprogesterona requerida para desplazar al 50\% de antígeno marcado.}}{\text{Masa de esteroide "X" requerida para desplazar al 50\% de antígeno marcado.}} \times 100$$

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



mediciones se encuentran siempre dispersas alrededor de una media aproximada al valor real. Como en todo método cuantitativo, los criterios de confiabilidad del RIA incluyen la precisión, la sensibilidad, la exactitud y la especificidad.

### 8.1. Precisión.

La precisión de un análisis se define como el grado de variación en la cuantificación repetida de una misma muestra alrededor de la media y se expresa en términos de dispersión dentro de un análisis (variación intra-análisis) y entre "n" número de análisis (variación interanálisis), ésta última expresión es el reflejo de la reproducibilidad del método.

La precisión en este estudio, se evaluó en determinaciones por sextuplicado de la misma muestra en el mismo análisis y en diferentes análisis. Este parámetro, habitualmente se expresa como coeficiente de variación y se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$CV = \frac{DE}{\bar{X}} \times 100$$

$DE = \text{desviación estándar}$   
 $\bar{X} = \text{promedio de los valores obtenidos.}$

### 8.2. Sensibilidad.

La sensibilidad del análisis, que se define como la mínima cantidad detectable que es significativamente diferente de cero y además permite distinguir una concentración de otra, es dependiente de la precisión de la curva dosis-respuesta. Por lo que fue estudiada a través de la

variación interanálisis de la curva patrón en siete diferentes ensayos.

### **8.3. Exactitud.**

La exactitud de un análisis, es el grado de acercamiento entre el valor obtenido a través del RIA y la concentración real de la muestra. Fué evaluada con experimentos de recuperación, en los que a unos sueros que contenían la hormona a determinar en concentraciones extremadamente bajas, obtenidos de pacientes sometidos a supresión de las glándulas suprarrenales con dexametasona, se les agregaron cantidades conocidas del esteroide en valores alto, medio y bajo, para demostrar la proporcionalidad de lo añadido y lo recuperado expresado en porciento.

### **8.4. Especificidad.**

La especificidad de un RIA, se define como el reconocimiento selectivo de una estructura química, por ejemplo una hormona que desea cuantificarse sin que exista interferencia de estructuras análogas u otras sustancias presentes en la muestra. Este criterio es altamente dependiente de la especificidad de los anticuerpos. En este trabajo, la especificidad fué estudiada en los experimentos de reactividad cruzada del antisuero con sustancias análogas.

## **9. APLICACION DEL METODO**

Para demostrar la aplicación de cada método, se midieron los niveles de esteroide sérico en varias condiciones fisiológicas.

### **9.1. Determinación de 17 hidroxiprogesterona.**

a) Se midió en suero de 12 mujeres voluntarias que acudieron a la consulta de infertilidad del Hospital Universitario, cuyas edades fluctuaron entre 21 y 44 años y a las que se les pidieron determinaciones hormonales durante las fases folicular, ovulatoria y lútea. La 17-hidroxiprogesterona solo se determinó durante los días -9 y -21 en cuenta inversa del ciclo menstrual.

b) También se midió esta hormona en el suero de tres mujeres que fueron sometidas a estimulación de las glándulas suprarrenales con ACTH (hormona adenocorticotrófica) para conocer su capacidad esteroidogénica. El día del estudio se canalizó la vena radial y se hizo toma de sangre (denominada basal), inmediatamente después se administraron 40 UI de ACTH diluidas en 10 ml de suero fisiológico y a los 30', 60', 90' y 120' después de dicha dosis se colectaron muestras de sangre.

---

### **9.2. Determinación de cortisol.**

a) El cortisol se midió en sueros de 24 varones voluntarios, estudiantes de la carrera de Médico Cirujano Partero de la U.A.N.L. cuyas edades fluctuaron entre los 19 y 23 años y a los que se les efectuó una historia clínica completa, la cual no reveló patología aparente. El día del estudio se les practicaron sangrados venosos a las 8:00 y 20:00 hrs, posteriormente se les administró una dosis de 2 mg de dexametasona a las 23.00 hrs para suprimir la función de las glándulas suprarrenales y 9 horas después de dicha administración (8:00 hrs del siguiente día) se les hizo otro sangrado venoso.

Se separaron los sueros por centrifugación y se mantuvieron en congelación a  $-10^{\circ}\text{C}$  hasta antes de ser procesados.

b) Finalmente, para confirmar la capacidad del método implementado para medir cortisol, se hicieron determinaciones de esta hormona con dicho método en 28 sueros procedentes de otro laboratorio a los que se había medido la hormona con un estuche comercial marca Amersham. Se determinó el coeficiente de correlación  $r$  de Pearson entre ambos resultados.

## 10. TRATAMIENTO DE LOS SUEROS PREVIO AL RIA

Debido a las diferentes concentraciones en que se encuentran en sangre los esteroides a medir y para tener óptimos resultados fué necesario tratar los sueros de la siguiente manera.

### 10.1. RIA de 17 hiroxiprogesterona.

Antes de realizar el RIA se requirió una extracción del suero con eter dietílico, para obtener los esteroides y evitar interferencias con los componentes del mismo. Se tomó 0.5 ml de suero mas 5.0 ml de eter dietílico y se mezcló en forma vigorosa con agitador mecánico por un minuto. Se esperó a que se separaran las fases, se congeló a  $-10^{\circ}\text{C}$  la fase acuosa y se evaporó en atmósfera de nitrógeno. El extracto seco fué resuspendido en 2.5 ml de solución amortiguadora de fosfatos y se tomó 0.5 ml para el RIA.

Para llevar un control en el proceso de extracción, se utilizaron testigos para conocer las pérdidas de esteroide que se presentan durante el mismo, en el que se utilizaron tubos a los que se

les añadió 0.4 ml de suero y 0.1 ml de hormona marcada ( $\sim 10,000$  cpm/0.1 ml) y se sometieron al mismo procedimiento. La diferencia es que el extracto seco de estos tubos se resuspendió en 0.5 ml de solución amortiguadora y todo el volumen se llevó a contar. Las cuentas obtenidas se relacionaron con las de testigos de hormona marcada que fueron pipeteados directamente en viales y así se obtuvo la recuperación en por ciento.

Así, para obtener la concentración de la hormona se siguió la fórmula:

$$\frac{\text{pg} \times 5}{(\text{VSP}) (\% \text{ R}) (1000)} = \text{ng de 17 hidroxiprogesterona/ml}$$

pg = lectura de masa al leer en la curva patrón.

5 = dilución del suero al resuspender en 2.5 ml.

VPS = volumen de suero procesado (0.5 ml)

%R = % de recuperación

1000 = para transformar picogramos (pg) a nanogramos (ng)

## 10.2. RIA de cortisol.

Para la determinación de cortisol solo fué necesario hacer una dilución 1:50 del suero.

Tomar 0.1 ml de suero mas 4.9 ml, de esta dilución se tomó 0.1 ml para el RIA.

Por lo que la fórmula para conocer la concentración de la hormona fué:

pg x 50

----- = ng de cortisol/ml

(VSP) (1000)

pg = lectura de masa en la curva patrón.

50 = dilución del suero.

VSP = volúmen de suero procesado (0.1 ml)

1000 = para transformar pg a ng.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## IV RESULTADOS

### 1. 17 HIDROXIPROGESTERONA

#### 1.1. Producción y caracterización de los antisueros anti-17 hidroxiprogesterona.

##### 1.1.1. Estimación de los niveles de anticuerpos .

La tabla VI muestra los resultados de las titulaciones de los sueros obtenidos durante el tercer sangrado hecho a cada uno de los conejos, y en la figura 5, se presentan los mismos resultados graficados en papel semi-logarítmico. Las flechas indican el punto en que se encuentra el 50% de la hormona marcada unida al anticuerpo, se puede observar muy buena respuesta en los tres conejos, ya que los títulos en este sangrado fueron superiores a 1:5,000.

Se hizo una titulación y su gráfica correspondiente para cada uno de los sangrados obtenidos durante la monitorización.

En la figura 6 se presentan las fechas de los sangrados mayores (15-20 ml cada uno), cada punto expresa el título del antisuero que une un 50% de esteroide marcado. Se observan respuestas diferentes, los conejos 3 y 5 muestran respuestas paralelas, pero los títulos del conejo 3 fueron muy superiores. Es de sorprender la gran respuesta que presentó el conejo 1 en el cuarto sangrado con un título de 1:35000.

##### 1.1.2. Ajuste de la curva patrón.

En la tabla VII se muestran como ejemplo, los resultados del ajuste de la curva patrón del

TABLA VI

Evaluación de los títulos de los antisueros anti-  
17-hidroxiprogesterona.

<u>Conejo-1</u>				
Tubo	Clave	CNPM	CNPM -ui	Uo %
1- 2	CT	10637	10327	
3- 4	ui	310		
5- 6	1: 1000	8472	8162	79.0
7- 8	1: 5000	8856	8546	82.7
9-10	1:10000	6414	6104	59.1
11-12	1:20000	3745	3435	33.2
13-14	1:30000	2715	2405	23.2
<u>Conejo-3</u>				
15-16	1: 1000	8448	7220	75.8
17-18	1: 5000	8469	8159	79.0
19-20	1:10000	6479	6169	59.7
21-22	1:20000	3879	3569	34.5
23-24	1:30000	2630	2320	22.4

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Conejo-5

25-26	1: 1000	8983	8673	83.9
27-28	1: 5000	6706	6396	61.9
29-30	1:10000	4127	3817	36.9
31-32	1:20000	2103	1793	17.3
33-34	1:30000	1635	1325	12.8
35-36	ui			
37-38	CT			

CT= cuentas totales

ui= unión inespecífica

CPM=cuentas por minuto

CNPM=promedio del par de CPM

Uo%=cantidad de hormona marcada que se une al anti-  
suero

CT - 100

CNPM-UI -  $\frac{Uo}{x} \times 100$

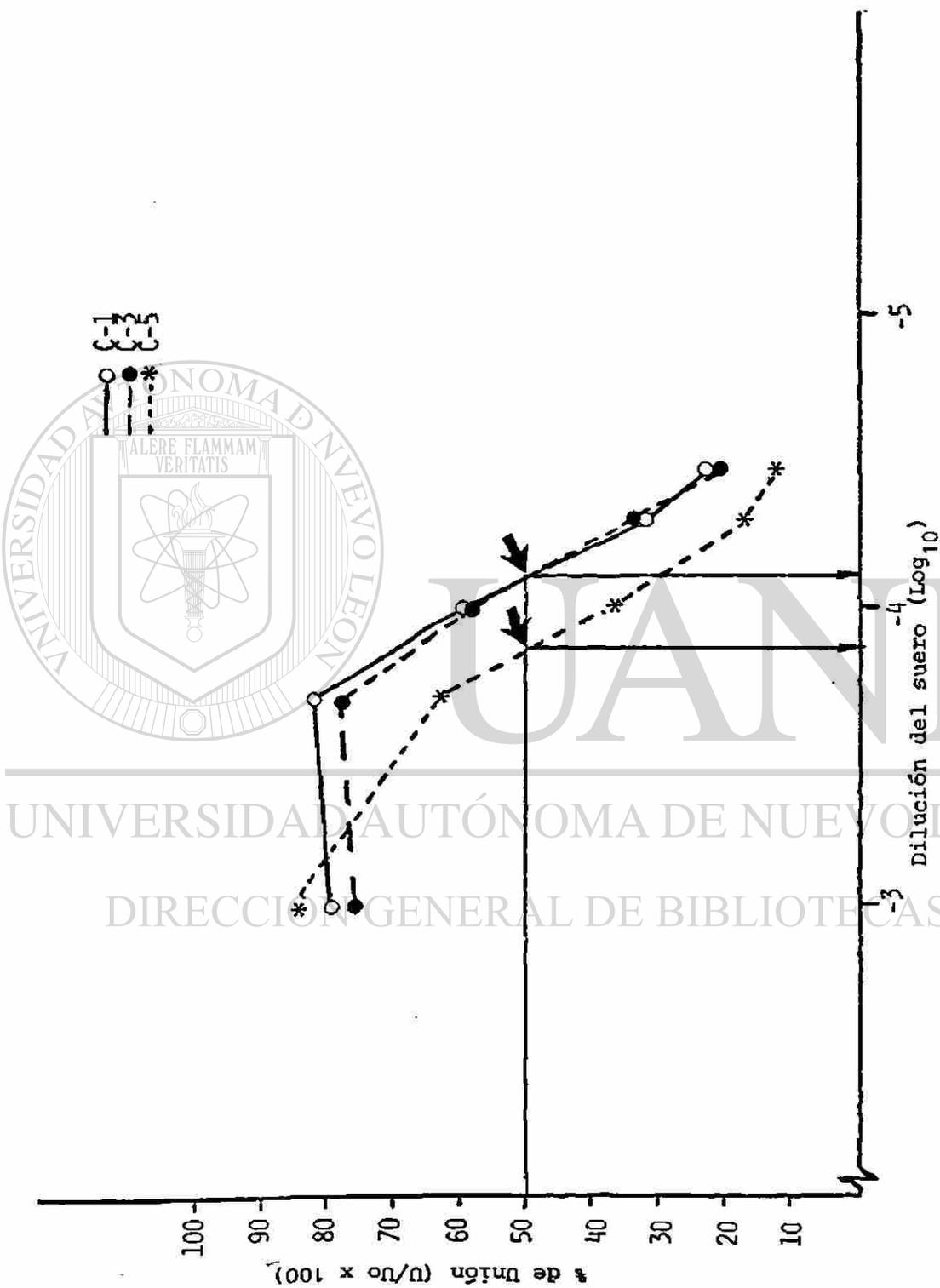


Figura 5. Gráfica correspondiente a la titulación de tres diferentes antisueros anti-17-hidroprogesterona.

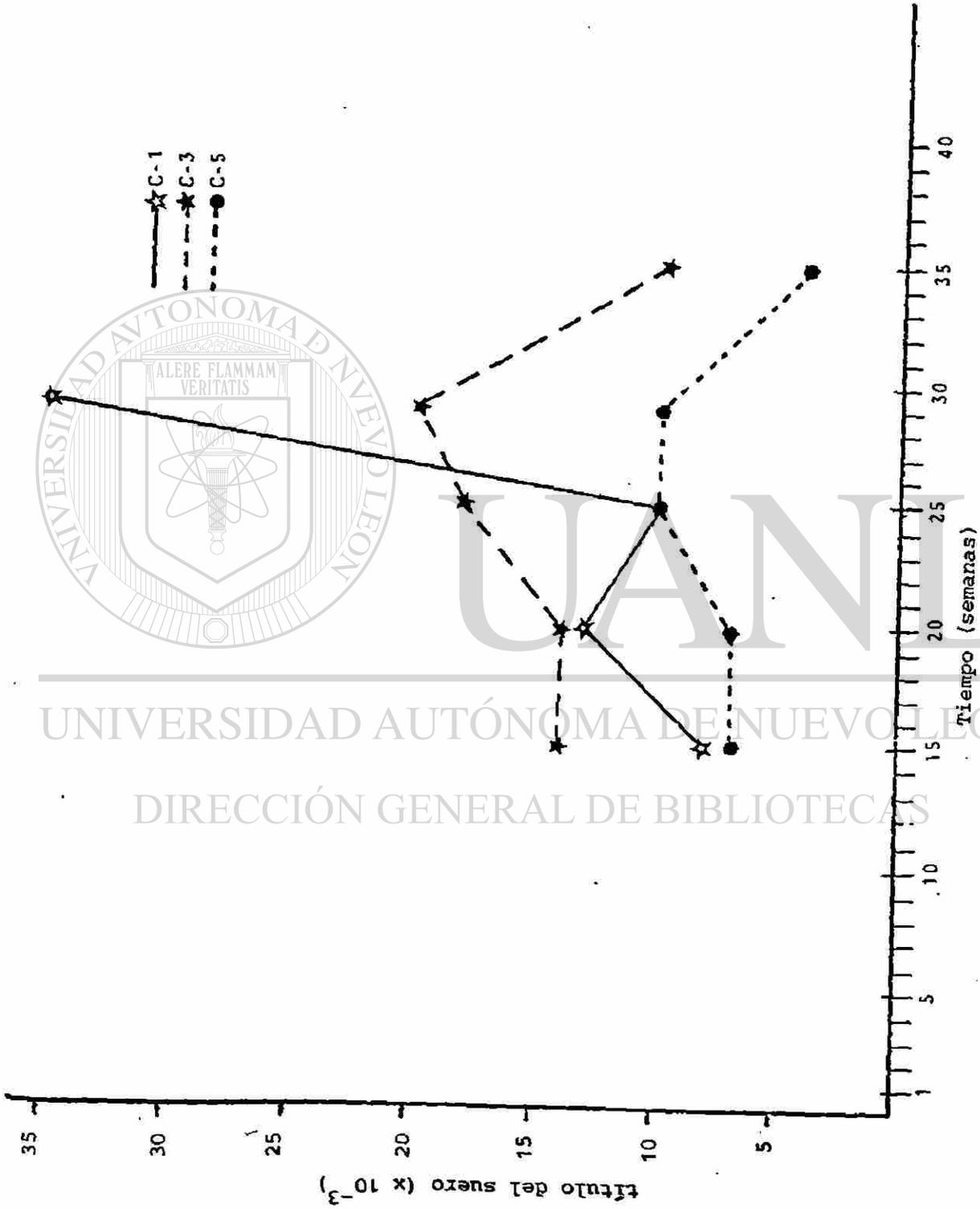


Figura 6. Fecha de los sangrados mayores y títulos de los antisueros anti-17hidroxiprogesteroona que unen el 50% de hormona marcada.

TABLA VII

Actividad del antisuero en diferentes concentraciones en la curva dosis respuesta para el RIA de 17hidroxiprogesterona.

Dilución 1:10000		CNPM		
tubo	Clave	CNPM	-ui (U)	U/Uo
1- 2	CT	10803	10377	
3- 4	ui	426		
5- 6	"0"masa	6925	6499	
7- 8	10 pg	6488	6062	93.2
9-10	25 pg	5903	5477	84.3
11-12	50 pg	5633	5207	80.1
13-14	100 pg	4598	4172	64.2
15-16	250 pg	2707	2281	35.1
17-18	500 pg	1876	1450	22.3
19-20	1000 pg	1407	981	15.1
21-22	"0"masa			
Dilución 1:15000				
23-24	CT	10803	10377	
25-26	ui	426		
27-28	"0"masa	5729	5303	
29-30	10 pg	5209	4783	90.2
31-32	25 pg	4815	4389	82.7
33-34	50 pg	4291	3685	72.9
35-36	100 pg	3477	3051	57.5
37-38	250 pg	2074	1648	31.0
39-40	500 pg	1721	1295	24.4
41-42	1000 pg	1291	865	16.3
43-44	"0"masa			
Dilución 1:20000				
45-46	CT	10803	10377	
47-48	ui	426		
49-50	"0"masa	4362	3936	
51-52	10 pg	4067	3641	92.5
53-54	25 pg	3659	3233	82.1
55-56	50 pg	3260	2834	72.0
57-58	100 pg	2662	2236	56.8
59-60	250 pg	1547	1121	28.4
61-62	500 pg	1221	795	20.1
63-64	1000 pg	876	450	11.4
65-66	"0"masa			

U =cantidad de hormona marcada unida al antisuero en presencia de hormona no marcada.

Uo=cantidad de hormona marcada unida al antisuero en ausencia de hormona no marcada.

2° sangrado del conejo 3. En la figura 7, los resultados obtenidos graficados en papel semi-logarítmico y en la figura 8 los mismos resultados graficados en papel logit-log que permite linearizar la curva sigmoide obtenida en la gráfica anterior. Las curvas dosis-respuesta obtenidas, muestran un buen desplazamiento de la hormona marcada con las tres diluciones de antisuero, sin embargo la dilución 1:20000 cubre un rango que va del 90% al 10% de la gráfica, permitiendo mayor discriminación entre una dosis y otra. Para cada sangrado mayor se hizo una elección del título ajustado que fué el que se utilizó para su caracterización.

### 1.1.3. Caracterización de los antisueros obtenidos.

En la tabla VIII se presentan los cálculos obtenidos para cada una de las curvas patrón de los diferentes esteroides en una caracterización parcial del antisuero obtenido del conejo 1 en el 2° sangrado, se puede observar que los esteroides estudiados producen un desplazamiento de la hormona marcada en concentraciones muy altas. En la figura 9, se muestran los mismos resultados graficados en papel semi-logarítmico. Fué en este tipo de gráfica en donde se obtuvieron los datos para aplicar la fórmula de Abraham y así conocer la cantidad de masa de esteroide no marcado que desplaza el 50% de hormona marcada. En la tabla IX se muestran los cálculos para obtener el porcentaje de reactividad cruzada y los resultados de las caracterizaciones parciales de los sangrados del conejo 1.

Como se observa en estos resultados, los antisueros muestran características muy semejantes, por lo que se procedió a hacer mezclas (pool) de sueros para realizar una caracterización mas completa. Los resultados se presentan en la tabla X y muestran una reactividad cruzada del

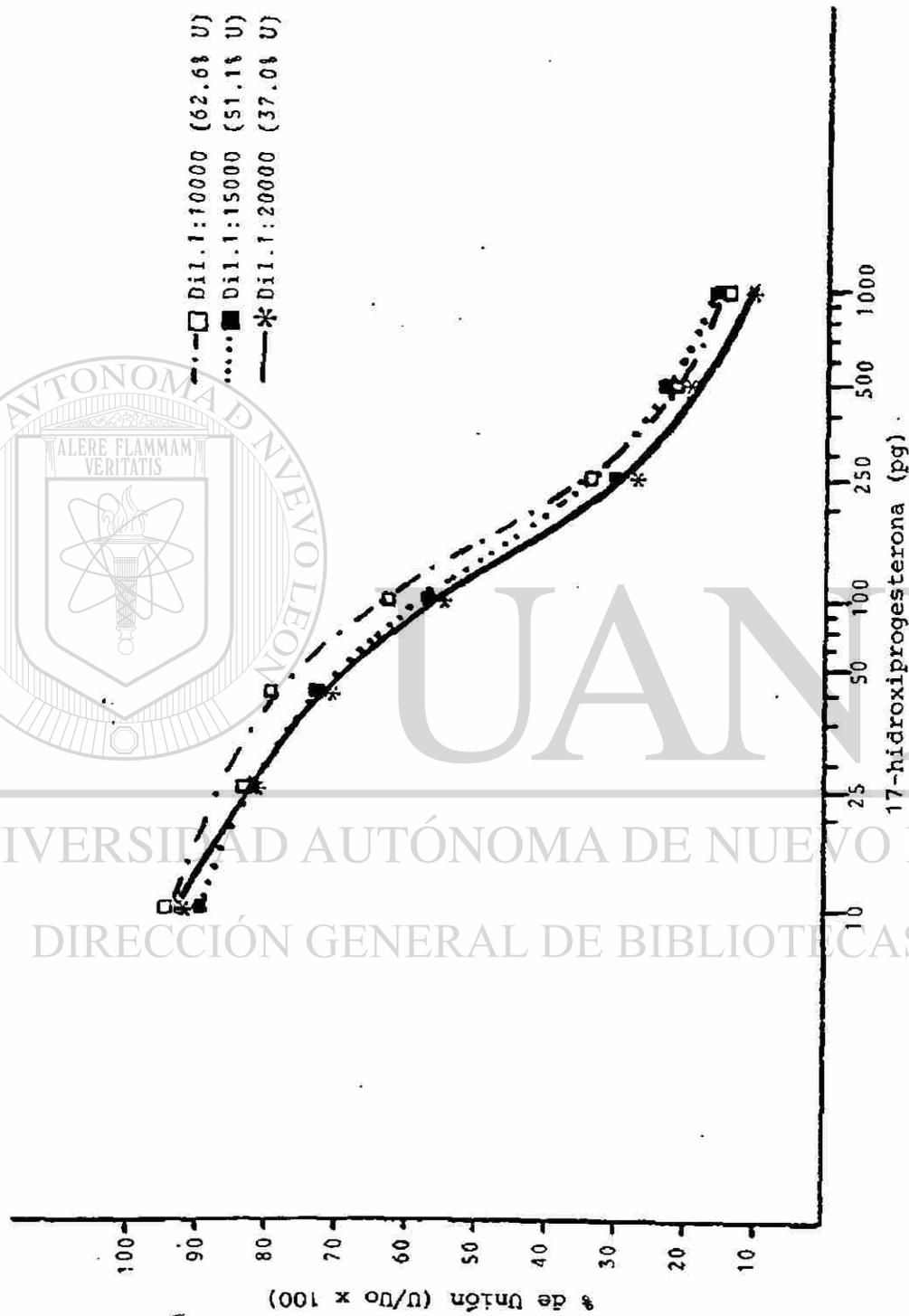


Figura 7. Ajuste de la curva patrón graficado en papel semilogarítmico.

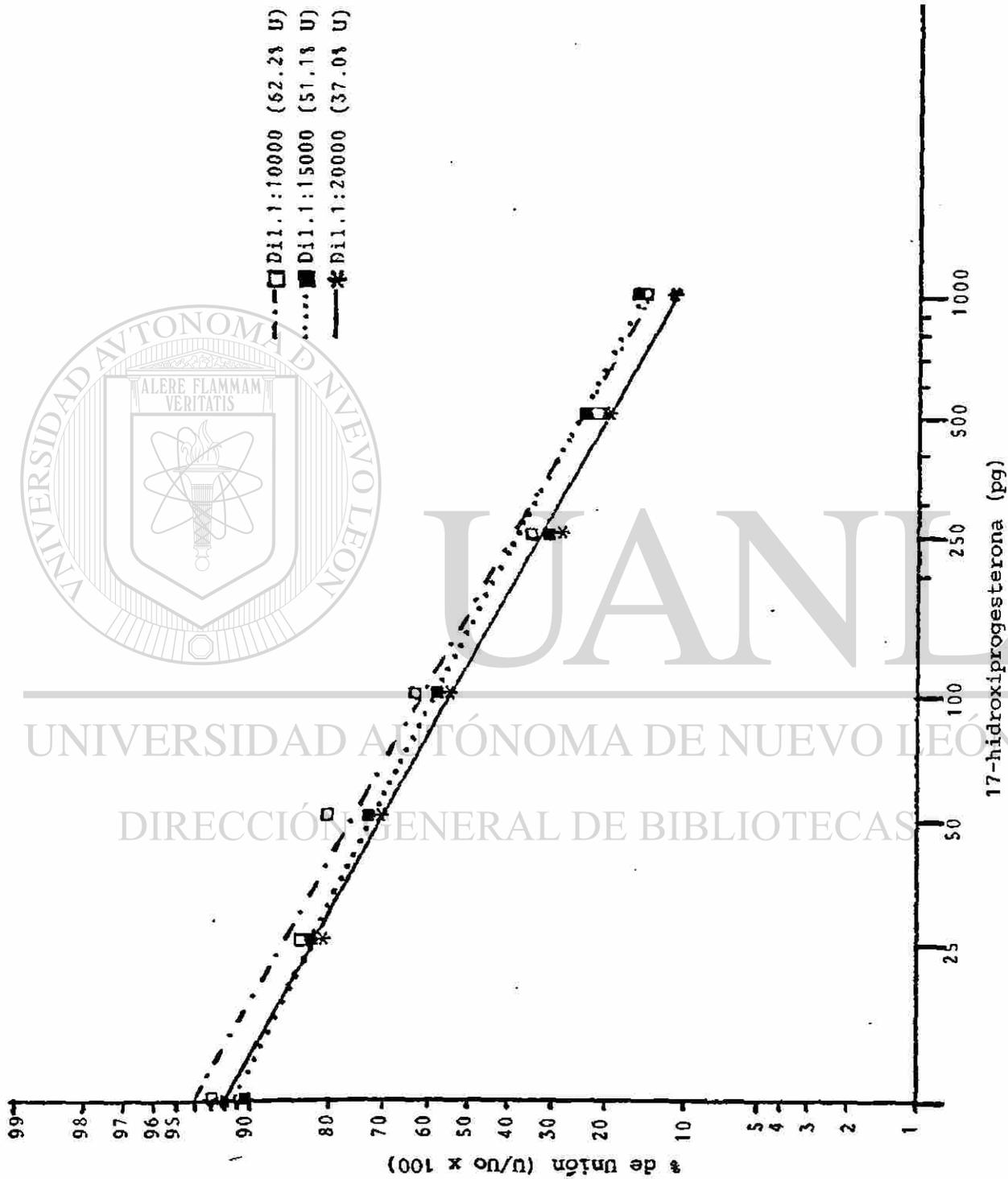


Figura 8. Ajuste de la curva patrón graficado en papel Logit-Log.

TABLA VIII

Caracterización parcial del antisuero anti-17hidroxiprogesterona del primer sangrado del conejo 1.

17 HIDROXIPROGESTERONA			DEHIDROEPIANDROSTERONA-SULFATO		
Tubo	Clave	U/Uo	Tubo	Clave	U/Uo
1- 2	CT		61-62	50 pg	100.0
3- 4	ui		63-64	100 "	100.0
5- 6	10' masa		65-66	500 "	100.0
7- 8	10 pg	93.8	67-68	100 "	100.0
9-10	25 pg	76.8	69-70	10000 "	100.0
11-12	50 pg	72.2	71-72	100000 "	86.4
13-14	100 pg	58.1			
15-16	250 pg	34.2			
17-18	500 pg	19.5			
19-20	1000 pg	10.8			
PROGESTERONA					
21-22	50 pg	100.0			
23-24	100 "	98.2			
25-26	500 "	83.8			
27-28	1000 "	75.1			
29-30	10000 "	58.2			
31-32	100000 "	26.9			
5 $\beta$ DEHIDROPROGESTERONA					
33-34	50 pg	100.0			
35-36	100 "	100.0			
37-38	500 "	100.0			
39-40	1000 "	95.6			
41-42	10000 "	58.4			
43-44	100000 "	18.6			
CORTISOL					
45-46	50 pg	100.0			
47-48	100 "	100.0			
49-50	500 "	100.0			
51-52	1000 "	100.0			
53-54	10000 "	92.5			
55-56	100000 "	59.9			
PREGNENOLONA					
57-58	50 pg	100.0			
59-60	100 "	100.0			
61-62	500 "	95.3			
63-64	1000 "	86.8			
65-66	10000 "	73.4			
67-68	100000 "	49.6			

TESTOSTERONA

DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHA)

ESTRADIOL

muestran resultados muy semejantes a los de DHA-Sulfato.

CT=cuentas totales

ui=unión inespecífica

U =cantidad de hormona marcada unida al antisuero en presencia de hormona no marcada.

Uo=cantidad de hormona marcada unida al antisuero en ausencia de hormona no marcada.

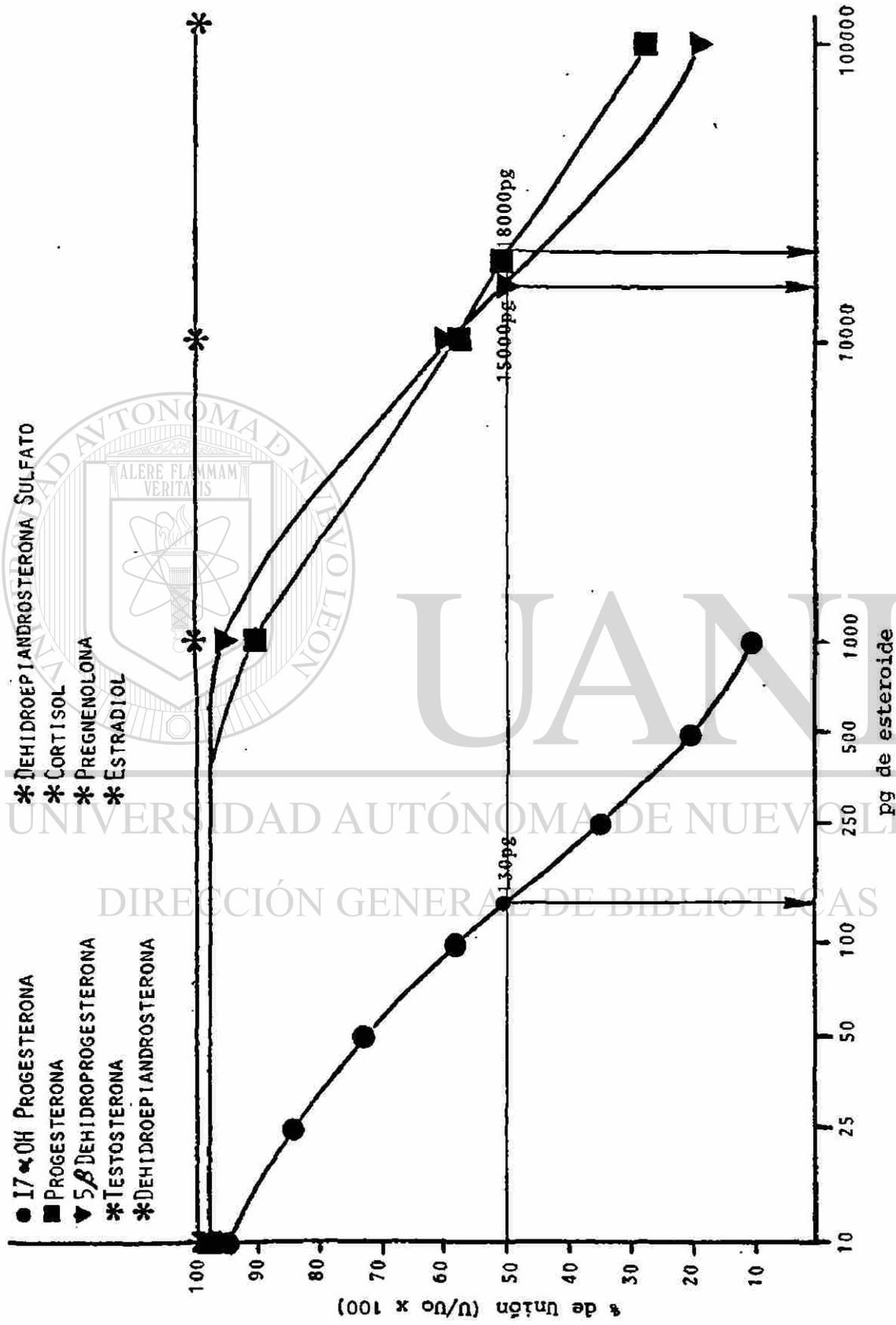


Figura 9. Caracterización parcial del antisuero anti-17hidroxiprogesterona del primer sangrado del conejo 1.

TABLA IX

Caracterizaciones parciales de los antisueros anti-17hidroxiprogesterona obtenidos del conejo 1.

<u>ESTEROIDE</u>	<u>Sangrado-1</u>	<u>Sangrado-2</u>	<u>Sangrado-3</u>
17 Hidroxiprogesterona	100.00	100.00	100.00
Progesterona	0.72	0.70	1.50
5 $\beta$ Dehidroprogesterona	0.86	1.00	0.30
Pregnenolona	0.13	0.10	0.10
Cortisol	0.10	0.10	0.10
Testosterona	0.10	0.10	0.10
Dehidroepiandrosterona	0.10	0.10	0.10
Dehidroepiandrosterona-S	0.10	0.10	0.10
Estradiol	0.10	0.10	0.10

Concentraciones de masa de las diferentes hormonas que muestran desplazamiento del 50% de hormona marcada.

17 HIDROXIPROGESTERONA	130 pg
PROGESTERONA	15000 "
5 $\beta$ DEHIDROPROGESTERONA	18000 "
PREGNENOLONA	100000 "

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Cálculos para obtener el % de reactividad cruzada.

Al substituir estos valores en la fórmula de Abraham tenemos:

$$\text{Progesterona: } \frac{130}{18000} \times 100 = 0.72\%$$

$$5\beta \text{ Dehidroprogesterona: } \frac{130}{15000} \times 100 = 0.86\%$$

$$\text{Pregnenolona: } \frac{130}{100000} \times 100 = 0.13\%$$

TABLA X

Caracterización General. Reactividad cruzada de los antisueros anti-17-hidroxiprogesterona con algunos esteroides.

ESTEROIDE	% de Reacción Cruzada		
	Pool C-1	Pool C-3	Pool C-5
17 $\alpha$ -HIDROXIPROGESTERONA	100.00	100.00	100.00
17 $\alpha$ -HIDROXIPREGNENOLONA	1.15	4.33	2.60
PROGESTERONA	1.33	0.55	1.14
PREGNANDIONA	0.51	0.15	0.30
5 $\alpha$ -PREGNEN 3,20 DIONE	0.19	0.17	0.48
PREGNENOLONA	<0.1	<0.1	0.16
CORTISONA	<0.1	<0.1	<0.1
DIHIDROCORTISONA	<0.1	<0.1	<0.1
CORTISOL	<0.1	<0.1	<0.1
11-DESOXICORTISOL	<0.1	<0.1	<0.1
5 $\beta$ -DIHIDROCORTISOL	<0.1	<0.1	<0.1
TETRAHIDROCORTISOL	<0.1	<0.1	<0.1
TETRAHIDRODESOXICORTISOL	<0.1	<0.1	<0.1
DESOXICORTICOSTERONA	<0.1	<0.1	<0.1
11-DEHIDROCORTICOSTERONA	<0.1	<0.1	<0.1
TETRAHIDROCORTICOSTERONA	<0.1	<0.1	<0.1
CORTOLONA	<0.1	<0.1	<0.1
PREGNANDIOL	<0.1	<0.1	<0.1
PREGNANTRIOL	<0.1	<0.1	<0.1
DEHIDROEPIANDROSTERONA	<0.1	<0.1	<0.1
DEHIDROEPIANDROSTERONA-SULFATO	<0.1	<0.1	<0.1
ANDROSTENDIONA	<0.1	<0.1	<0.1
TESTOSTERONA	<0.1	<0.1	<0.1
DIHIDROTESTOSTERONA	<0.1	<0.1	<0.1
ESTRONA	<0.1	<0.1	<0.1
ESTRADIOL	<0.1	<0.1	<0.1
ESTRIOL	<0.1	<0.1	<0.1

antisuero con otros esteroides muy baja, lo que indica una alta especificidad para la 17-hidroxiprogesterona.

De los sangrados mayores se logró obtener los siguientes volúmenes de suero:

conejo 1- 37.0 ml

conejo 2- 69.0 ml

conejo 3- 90.0 ml

total 196.0 ml

Los sueros fueron fraccionados en alícuotas de 0.5 y 1.0 ml en frascos ampula, se liofilizaron, sellaron y congelaron a  $-10^{\circ}\text{C}$  para su conservación.

## 1.2. Confiabilidad del método de radioinmunoanálisis.

### 1.2.1. Precisión.

La precisión, estudiada a través de intra-análisis e interanálisis en plasmas de 4 diferentes concentraciones, se presenta en la tabla XI. El coeficiente de variación intra-análisis mas alto fué de 11.9% y el del inter-análisis del 10.0%.

### 1.2.2. Sensibilidad.

La sensibilidad del método, estudiada a través de la variación interanálisis de la curva patrón en 7 diferentes análisis fué de 10 pg de 17-hidroxiprogesterona, que es la menor cantidad de

TABLA XI

Precisión del método de RIA para medir  
17-hidroxiprogesterona.

Intra-análisis	(n)	17-hidroxiprogesterona ( $\bar{x} \pm 1DS$ )	CV (%)
Suero A	(6)	(0.67 $\pm$ 0.08)	(11.9)
Suero B	(6)	(2.11 $\pm$ 0.25)	(11.8)
Inter-análisis			
Suero C	(6)	(0.50 $\pm$ 0.05)	(10.0)
Suero D	(6)	(0.83 $\pm$ 0.06)	( 7.3)

n = número de determinaciones  
CV = coeficiente de variación

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

hormona que se puede distinguir de  $0$  con un coeficiente de variación del 1.3% y un 95% de límite de confianza. En la tabla XII se presentan los resultados de la sensibilidad y precisión de la curva patrón, en la que se muestran los promedios de los porcentos de unión  $(U/U_0 \times 100) \pm 1$  DE (Desviación Estándar) para cada una de las concentraciones estudiadas y el coeficiente de variación respectivo. En la última línea se presenta el coeficiente de correlación  $r$  de Pearson efectuado a las curva patrón de los análisis 1, 4, 7 y a la curva promedio. Los resultados muestran una correlación superior a 0.8, conociendo como correlación perfecta la unidad. En la figura 10 se presentan estos datos en una gráfica utilizando papel semi-logarítmico.

### 1.2.3. Exactitud.

La exactitud del método, que se estudió al añadir 1000 y 2000 pg/ml de 17-hidroxiprogesterona no marcada a sueros con concentraciones extremadamente bajas de la hormona y determinadas las concentraciones de dicha hormona en estos sueros con el método implementado, se presenta en la tabla XIII. La recuperación fué superior al 95%.

### 1.2.4. Especificidad.

La especificidad del método, dependiente de la reactividad cruzada de los antisueros con otros esteroides, fué demostrada durante la caracterización de los mismos.

## 1.3. Aplicación del método de radioinmunoanálisis.

### 1.3.1. Determinación de 17-hidroxiprogesterona durante el ciclo ovárico.

Los niveles de 17-hidroxiprogesterona durante el ciclo ovárico, en los días -21 (fase proliferativa)

TABLA XII  
Sensibilidad y precisión de la curva patrón del método de RIA para medir  
17-hidroxiprogesterona.

hormona	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	$\bar{x}$	$\pm$ 1DE	CV%
10 pg	85.2	88.1	86.0	87.6	86.8	88.4	87.8	87.1	$\pm$ 1.17	1.3
25 pg	74.4	70.5	72.5	77.3	71.7	75.3	73.4	73.5	$\pm$ 2.29	3.1
50 pg	59.1	58.3	60.2	61.9	59.6	63.6	60.8	60.5	$\pm$ 1.79	2.9
100 pg	46.7	46.3	54.2	54.0	51.1	52.9	48.9	50.7	$\pm$ 3.49	6.8
250 pg	27.6	25.5	31.3	23.8	28.0	26.3	25.1	26.8	$\pm$ 2.45	9.1
500 pg	16.5	18.4	21.1	16.9	21.8	13.3	15.0	17.5	$\pm$ 3.09	17.6
1000 pg	8.6	10.6	11.6	11.6	12.1	8.5	10.9	10.5	$\pm$ 1.85	17.6
"r"	-0.846			-0.828			-0.824	-0.841		

"r"=coeficiente de correlación de Pearson.

$\bar{x}$  =promedio

DE =desviación estandar

CV =coeficiente de variación

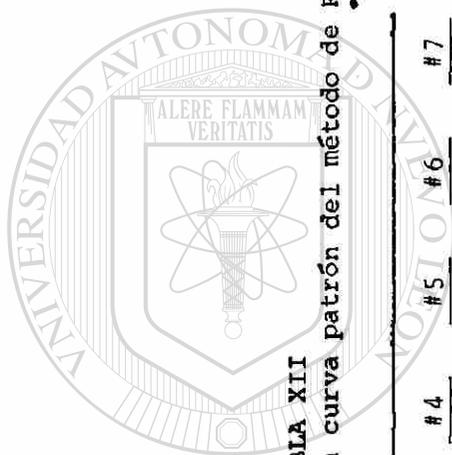
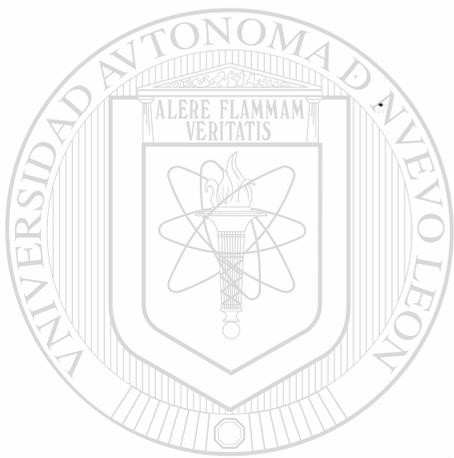




Figura 10. Precisión de la curva patrón del RIA para medir 17-hidroxiprogesterona.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA XIII

Exactitud del método de RIA para medir 17-hidroxi-  
progesterona.

17-hidroxi- progesterona añadida (ng/ml)	(n)	17-hidroxi- progesterona recuperada (media $\pm$ 1DE)	Recuperación (%)
1.0	(6)	(0.95 $\pm$ 0.12)	( 95.6)
2.0	(6)	(2.12 $\pm$ 0.27)	(106.0)

n = número de determinaciones

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

y -9 (fase secretora) de la cuenta inversa del ciclo ovárico, se presentan en la tabla XIV. Se observa que el promedio de los niveles de la fase proliferativa son muy bajos comparados con los de la fase secretora.

### 1.3.2. Determinación de 17 hidroxiprogesterona post-estimulación con A.C.T.H..

Al estudiar los niveles de 17-hidroxiprogesterona en 3 pacientes a las que se les estimuló las suprarrenales con 40 UI de A.C.T.H., para conocer su capacidad esteroidogénica, se muestra en la tabla XV que con respecto a una muestra basal, tomada minutos antes de la administración de A.C.T.H. hay una respuesta a los 30' post-estimulación del doble de los niveles basales y que continúa en aumento hasta los 90' con tendencia a la baja a 120'.

## 2. CORTISOL

### 2.1. Producción y caracterización de los antisueros anti-cortisol.

#### 2.1.1. Estimación de los niveles de anticuerpos.

En la tabla XVI se presentan los resultados de la titulación de los antisueros obtenidos durante el segundo sangrado hecho a cada uno de los conejos y en la figura 11 la gráfica obtenida en papel semi-logarítmico. Las flechas indican el punto en que la hormona marcada se une al antisuero en un 50%. Para cada monitoreo realizado se hizo una titulación y una gráfica.

En la figura 12 se indican con flechas, las fechas de inoculación y cada punto de la gráfica representa la fecha y título de un sangrado mayor. Las respuestas fueron muy variadas ya que no se obtuvo respuesta del conejo 3. Uno de los mejores sueros obtenidos fué el del conejo 2 en el sangrado 3 que presenta un título de 1:5000. El conejo 1 respondió en una forma mas lenta y el mejor suero

TABLA XIV

Determinación de 17-hidroxiprogesterona en suero de mujeres normales durante el ciclo ovárico (n=12)

Fase del ciclo	17-hidroxiprogesterona
	(ng/ml) media $\pm$ 1DE
Fase Proliferativa (día -21)	0.31 $\pm$ 0.24
Fase Secretora (día - 9)	1.47 $\pm$ 0.65

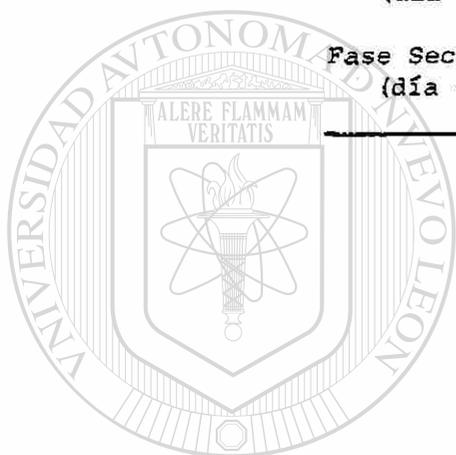


TABLA XV

Determinación de 17hidroxiprogesterona por RIA post-estimulación con ACTH.

	17 hidroxiprogesterona ng/ml			$\bar{x}$ $\pm$ 1DS
	P-1	P-2	P-3	
Basal	0.30	0.46	0.31	0.35 $\pm$ 0.09
Post-estim				
30'	0.63	0.72	0.74	0.69 $\pm$ 0.06
60'	0.88	1.15	0.81	0.94 $\pm$ 0.18
90'	0.78	1.37	0.96	1.03 $\pm$ 0.30
120'	1.10	0.81	1.06	1.01 $\pm$ 0.18

$\bar{x}$  = promedio

DS= desviación estandar

TABLA XVI

Evaluación de los títulos de antisueros anti-cortisol.

CONEJO-1			CT	
Tubo	Clave	CNPM(L)	-CNPM(U)	U/Uo
1- 2	CT	10737		
3- 4	1: 100	948	9789	91.1
5- 6	1: 250	1811	8926	83.6
7- 8	1: 500	3447	7290	67.9
9-10	1:1000	5579	5158	48.0
11-12	1:2000	7875	2862	26.0
13-14	1:5000	9295	1442	13.4
CONEJO-2				
15-16	CT	10514		
17-18	1: 100	644	9870	93.8
19-20	1: 250	1059	9425	89.6
21-22	1: 500	1558	8956	85.1
23-24	1:1000	2708	7806	74.2
25-26	1:2000	4200	6314	60.0
27-28	1:5000	6017	4497	42.7
CONEJO-3				
29-30	CT	10260		
31-32	1: 100	3932	6328	61.6
33-34	1: 250	5806	4454	43.4
35-36	1: 500	7119	3141	30.6
37-38	1:1000	8394	1866	18.2
39-40	1:2000	9419	841	8.6
41-42	1:5000	9582	678	6.6
43-44	CT			

CT =cuentas totales

CNPM =promedio del par de CPM

L =fracción libre(hormona marcada libre)

U =fracción unida(hormona marcada unida al antisuero)

Uo% =cantidad de hormona marcada que se une al antisuero expresada en %.

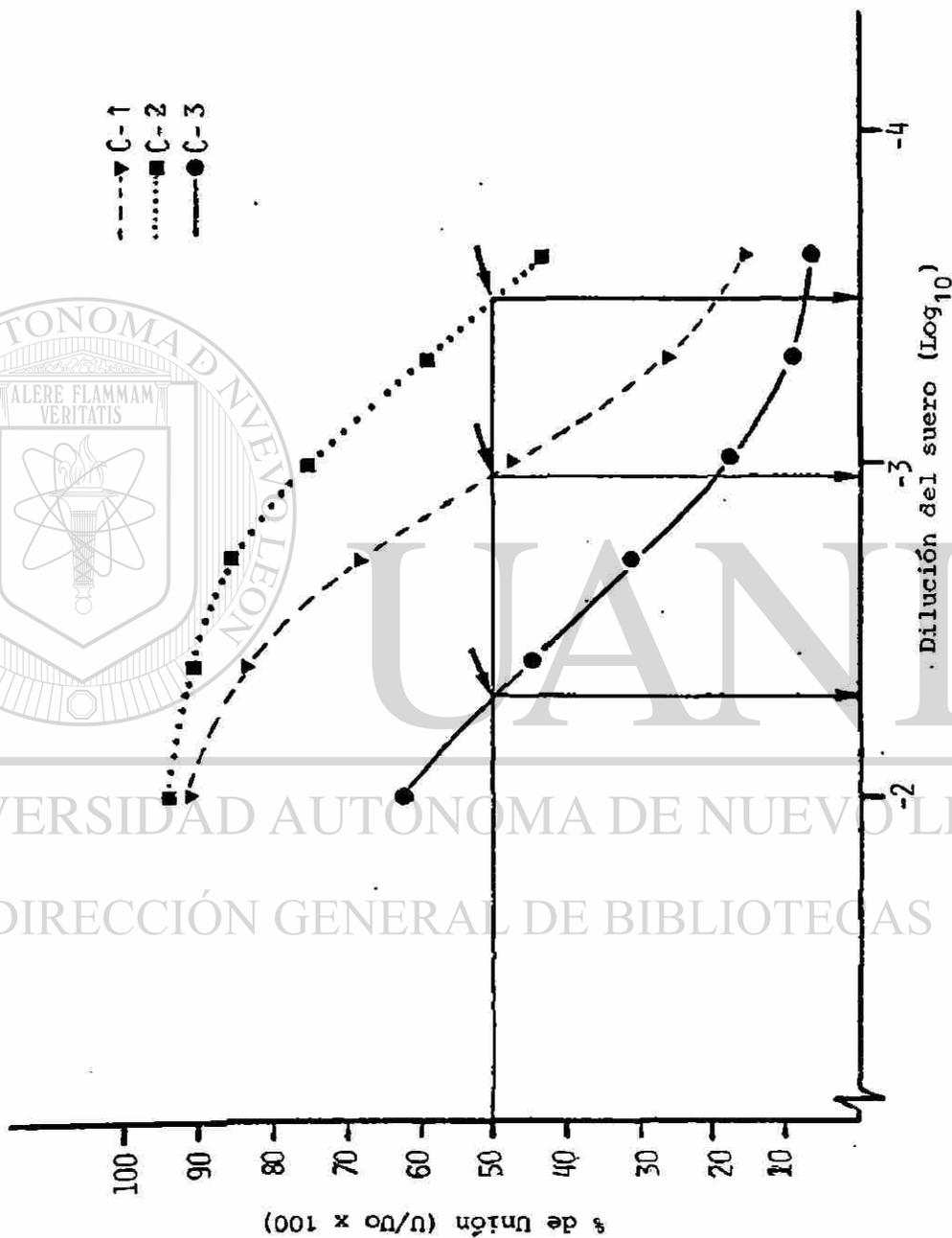
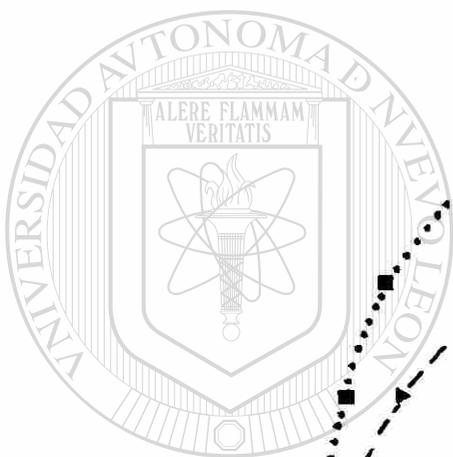


Figura 11. Titulación de tres diferentes antisueros anti-cortisol.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



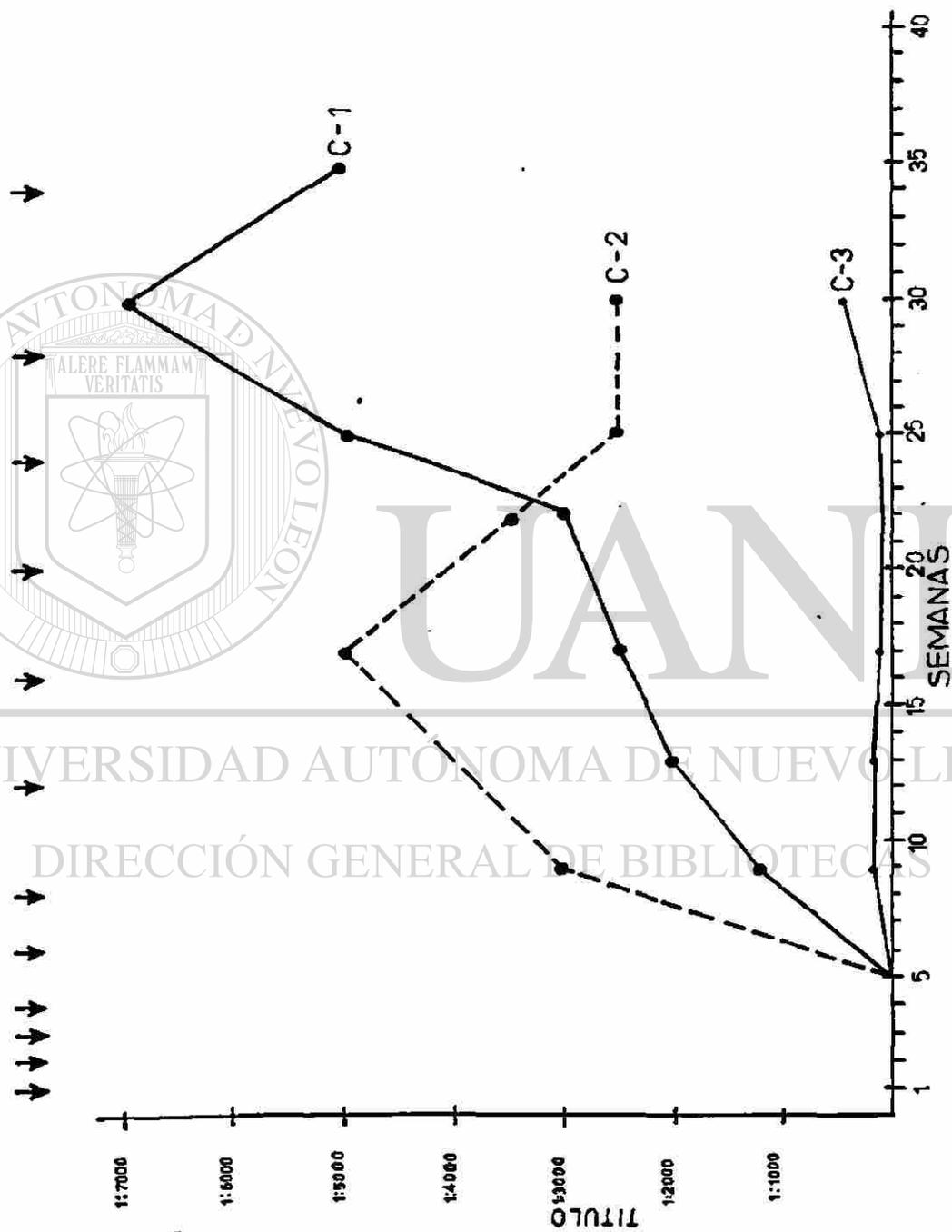
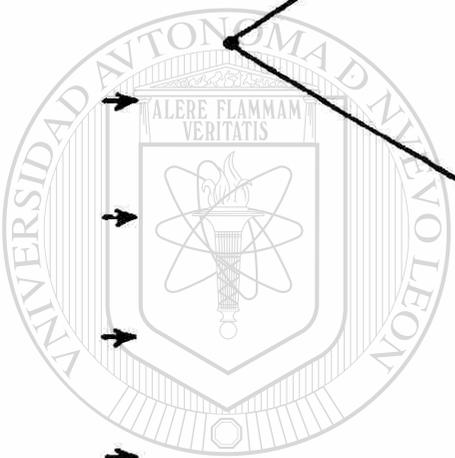


Figura 12. Fechas de los sangrados mayores y títulos de los antisueros anti-cortisol que unen el 50% de hormona marcada.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

fué el del sangrado 7 que mostró un título de 1:7000.

### 2.1.2. Ajuste de la curva patrón para el RIA de cortisol.

En la tabla XVII se presentan los cálculos para el ajuste de la curva patrón, utilizando como ejemplo lo realizado con el suero del sangrado 4 del conejo 2. En la figura 13 se muestra la relación  $U/U_0 \times 100$  graficadas en papel semi-logarítmico y en la figura 14 se graficó en papel logit-log para linearizar la curva sigmoide. La curva patrón que muestra mejor desplazamiento de la hormona marcada es la que utiliza el suero diluido 1:7000 en este caso, pues cubre del 80% al 10% de la gráfica.

Para cada sangrado mayor se hizo un ajuste de reactantes de la curva patrón, la dilución óptima lograda en el ajuste fué la que se utilizó para su caracterización parcial.

### 2.1.3. Caracterización de los antisueros obtenidos.

En la tabla XVIII se presentan los datos obtenidos en una caracterización parcial del antisuero del conejo 2 en el sangrado 5 y en la figura 15 estos resultados graficados en papel semi-logarítmico. Se puede observar en esta figura que los esteroides como cortisona, 17-hidroxiprogesterona y 11-desoxicortisol logran desplazar el cortisol- $H^3$  unido al anti-cortisol en forma importante, de tal forma que al utilizar la fórmula de Abraham, este antisuero cruza con cortisona 62%, con 17-hidroxiprogesterona un 28.7% y un 23% con 11-desoxicortisol.

Como en las caracterizaciones parciales de los sangrados de los conejos 1 y 2 se obtuvieron

**TABLA XVII**  
**Actividad del antisuero en diferentes concen-**  
**traciones en la curva dosis respuesta para el**  
**RIA de cortisol.**

**DILUCION 1:3000**

Tubo	Clave	CNPM(L)	CT -CNPM(U)	U/Uo
1- 2	CT	8965		
3- 4	"0"masa	4213	4752	
5- 6	50pg	4924	4013	84.4
7- 8	100 "	5797	3168	66.6
9-10	250 "	6488	2477	52.1
11-12	500 "	7365	1600	33.6
13-14	1000 "	7967	998	21.0

**DILUCION 1:5000**

15-16	CT	8965		
17-18	"0"masa	4781	4184	
19-20	50pg	5680	3285	78.5
21-22	100 "	6020	2945	70.3
23-24	250 "	7183	1762	42.6
25-26	500 "	7570	1395	33.3
27-28	1000 "	8104	861	20.5

**DILUCION 1:7000**

29-30	CT	8965		
31-32	"0"masa	5733	3232	
33-34	50pg	6459	2506	77.5
35-36	100 "	6889	2076	64.2
37-38	250 "	7850	1115	34.5
39-40	500 "	8225	740	22.8
41-42	1000 "	8568	397	12.2

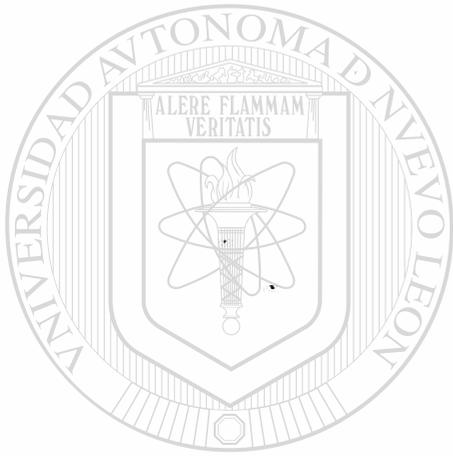
CT=cuentas totales

CNPM=promedio del par de CPM

L =fracción libre (hormona marcada libre)

U =fracción unida(hormona marcada unida al antisuero)

Uo=cantidad de hormona marcada unida al anti-  
 suero en ausencia de hormona no marcada.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

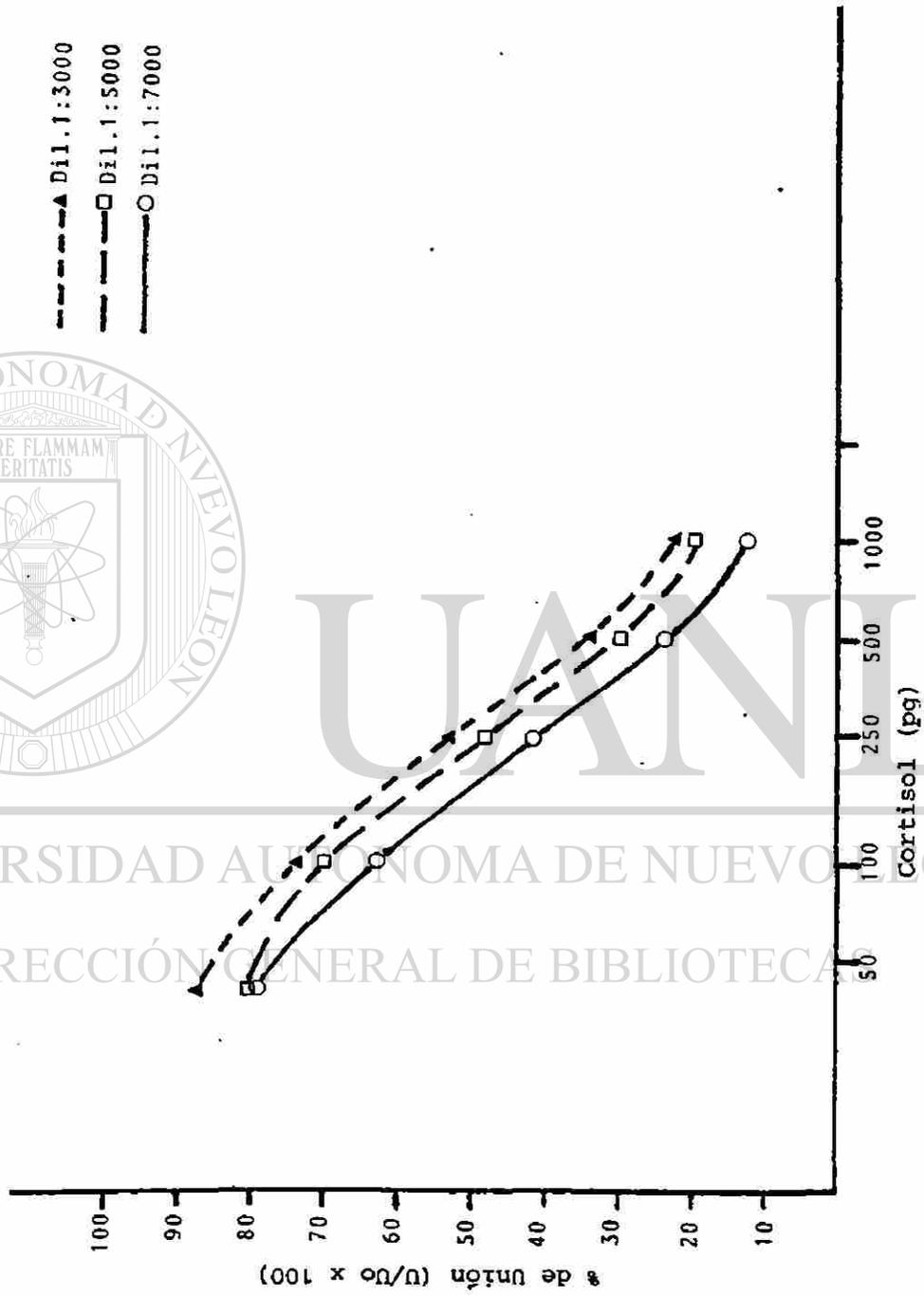


Figura 13. Ajuste de la curva patrón para el RIA de cortisol graficado en papel semilogarítmico.®

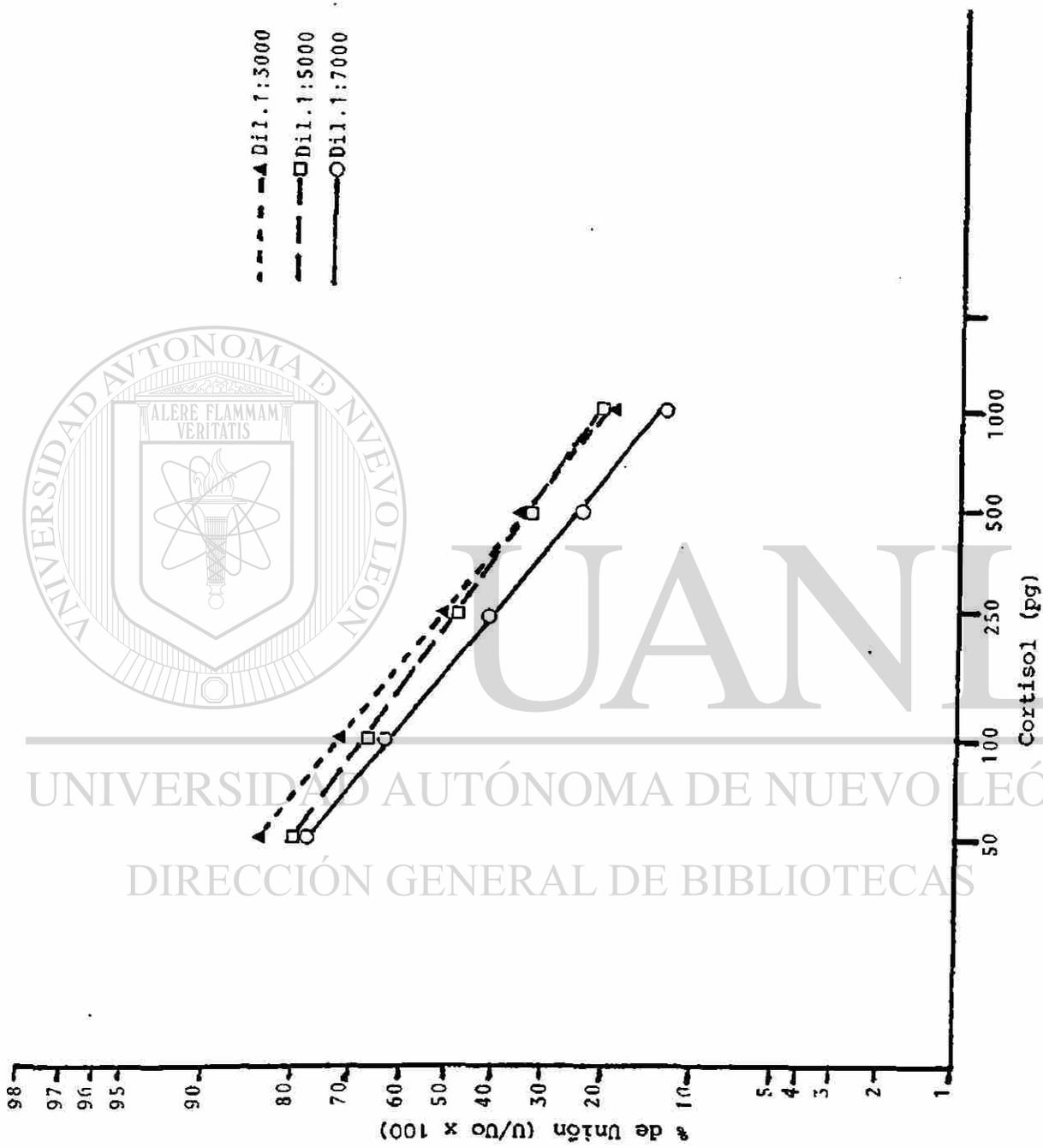
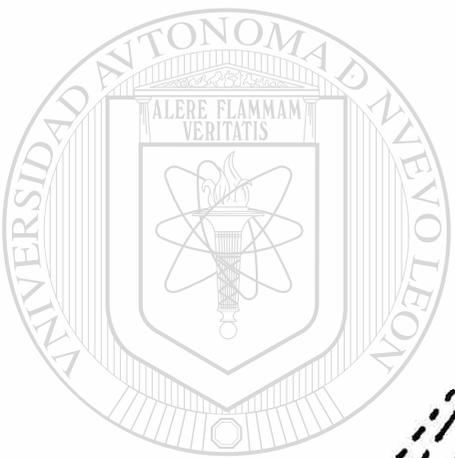


Figura 14. Ajuste de la curva patrón para el RIA de cortisol graficado en papel Logit-log.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA XVIII

Caracterización parcial del antisuero anti-cortisol del sangrado 5 del conejo 2.

CORTISOL			DIHIDROCORTISOL		
Tubo	Clave	U/Uo	Tubo	Clave	U/Uo
1- 2	CT				
3- 4	"0"masa				
5- 6	50pg	79.2	53-54	50pg	90.3
7- 8	100"	71.3	55-56	100"	89.5
9-10	250"	46.1	57-58	500"	81.3
11-12	500"	30.6	59-60	1000"	78.1
13-14	1000"	16.1	61-62	10000"	51.7
15-16	2000"	11.6	63-64	100000"	12.5

CORTISONA			DESOXICORTICOSTERONA		
17-18	50pg	82.1	65-66	50pg	97.4
19-20	100"	73.3	67-68	100"	94.5
21-22	500"	42.9	69-70	500"	92.6
23-24	1000"	31.8	71-72	1000"	90.5
25-26	10000"	9.5	73-74	10000"	75.6
27-28	100000"	6.6	75-76	100000"	54.6

17 HIDROXIPROGESTERONA			TETRAHIDROCORTISOL		
29-30	50pg	89.2	77-78	50pg	95.2
31-32	100"	84.4	79-80	100"	93.9
33-34	500"	58.6	81-82	500"	91.0
35-36	1000"	48.9	83-84	1000"	85.5
37-38	10000"	16.3	85-86	10000"	79.2
39-40	100000"	7.4	87-88	100000"	56.8

11 DESOXCORTISOL			PROGESTERONA		
41-42	50pg	90.8	89-90	50pg	100.0
43-44	100"	85.5	91-92	100"	100.0
45-46	500"	69.2	93-94	500"	98.9
47-48	1000"	48.9	95-96	1000"	94.8
49-50	10000"	26.2	97-98	10000"	88.2
51-52	100000"	20.6	99-100	100000"	77.1

TESTOSTERONA		
101-102	50pg	100.0
103-104	100"	100.0
105-106	500"	100.0
107-108	1000"	100.0
109-110	10000"	98.0
111-112	100000"	97.0
113-114	"0"masa	
115-116	CT	

ESTRADIOL		
ANDROSTENDIONA		
DEHIDROEPIANDROSTERONA		
muestran resultados semejantes a los de Testosterona.		

CT =cuentas totales

U =cantidad de hormona marcada unida al antisuero en presencia de hormona no marcada.

Uo =cantidad de hormona marcada unida al antisuero en ausencia de hormona no marcada.

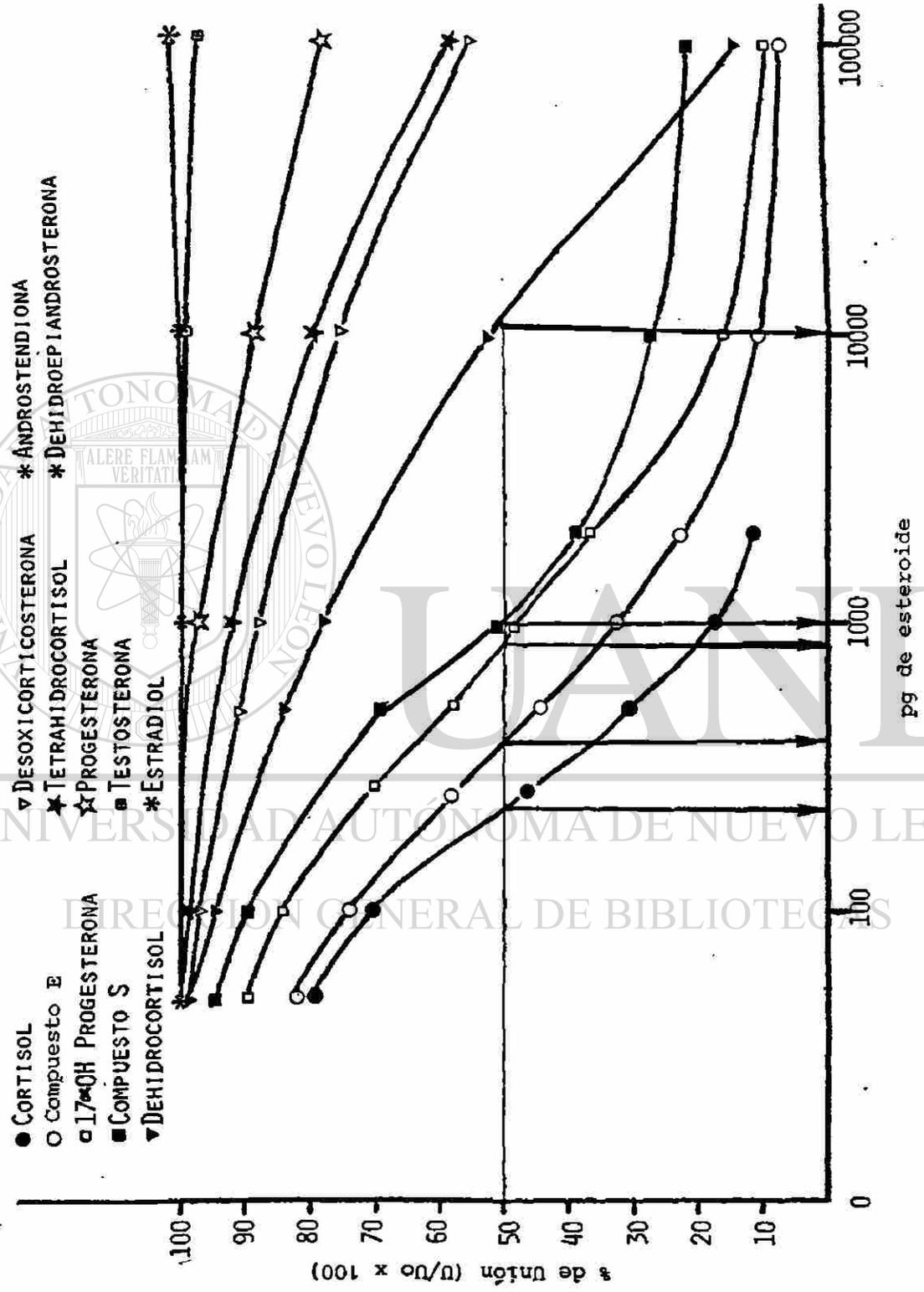


Figura 15. Caracterización parcial del antisuero anti-cortisol del sangrado 5 del conejo 2.

resultados muy semejantes, se procedió a hacer mezclas de sueros. Los resultados de las caracterizaciones más completas en las mezclas de estos sueros se presentan en la tabla XIX. Estos antisueros además de reconocer el cortisol, también reconocen la cortisona, la 17-hidroxiprogesterona, el 11-desoxicortisol, la desoxicorticosterona y el dihidrocortisol esteroides que se encuentran circulando en plasma, y además reconocen tetrahidrocortisol y tetrahidrodesoxicorticosterona que son metabolitos urinarios.

## **2.2. Reproducibilidad del método de radioinmunoanálisis de cortisol.**

### **2.2.1. Precisión.**

La precisión estudiada a través de intra-análisis e inter-análisis en plasmas con diferentes concentraciones, se presenta en la tabla XX. Los coeficientes de variación intra-análisis fueron menores del 10% y los del interanálisis menores del 20%

### **2.2.2. Sensibilidad.**

La sensibilidad del método, estudiada a través de la curva patrón, fué de 50 pg de cortisol, que es la menor cantidad de hormona que se puede distinguir de "0" con un coeficiente de variación del 4.9% y límite de confianza del 95%. En la tabla XXI se presentan los resultados de sensibilidad y precisión de la curva patrón y en la figura 16 estos datos se representan graficados.

### **2.2.3. Exactitud.**

La exactitud del método, valorada al añadir cantidades de cortisol puro a sueros con

TABLA XIX

Caracterización general. Reactividad cruzada de los  
antisueros anti-cortisol con algunos esteroides.

ESTEROIDES	% de Reacción Cruzada	
	Pool C-1	Pool C-2
CORTISOL	100.00	100.00
CORTISONA	38.0	24.0
DIHIDROCORTISOL	1.7	23.1
17 $\alpha$ -HIDROXIPROGESTERONA	14.4	1.3
11-DESOXICORTISOL	13.6	1.0
TETRAHIDROCORTISOL	<0.1	13.1
DESOXICORTICOSTERONA	<0.1	1.5
TETRAHIDRODESOXICORTICOSTERONA	0.65	0.48
PROGESTERONA	<0.1	<0.1
PREGNANDIOL	<0.1	<0.1
PREGNANTRIOL	<0.1	<0.1
PREGNENOLONA	<0.1	<0.1
TETRAHIDROCORTICOSTERONA	<0.1	<0.1
DIHIDROCORTISONA	<0.1	<0.1
ANDROSTENDIONA	<0.1	<0.1
TESTOSTERONA	<0.1	<0.1
DEHIDROEPIANDROSTERONA	<0.1	<0.1
DEHIDROEPIANDROSTERONA-SULFATO	<0.1	<0.1
ESTRONA	<0.1	<0.1
ESTRADIOL	<0.1	<0.1
ESTRIOL	<0.1	<0.1

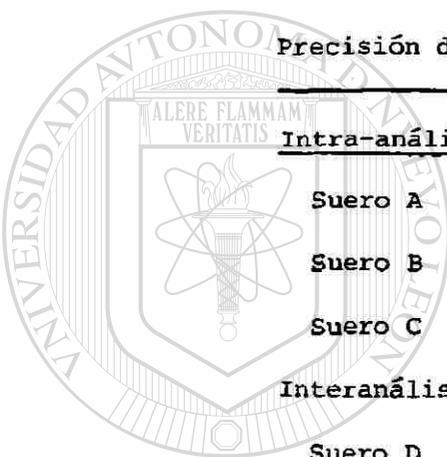
TABLA XX

Precisión del método de RIA para medir Cortisol

Intra-análisis	(n)	Cortisol (media $\pm$ 1DE)	CV (%)
Suero A	(6)	92.1 $\pm$ 8.9	9.7
Suero B	(6)	188.0 $\pm$ 14.7	7.8
Suero C	(6)	830.0 $\pm$ 75.6	9.1
Interanálisis			
Suero D	(6)	15.0 $\pm$ 2.6	17.6
Suero E	(6)	153.0 $\pm$ 8.4	5.5
Suero F	(6)	459.0 $\pm$ 62.4	13.6

n = número de determinaciones

CV = coeficiente de variación



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



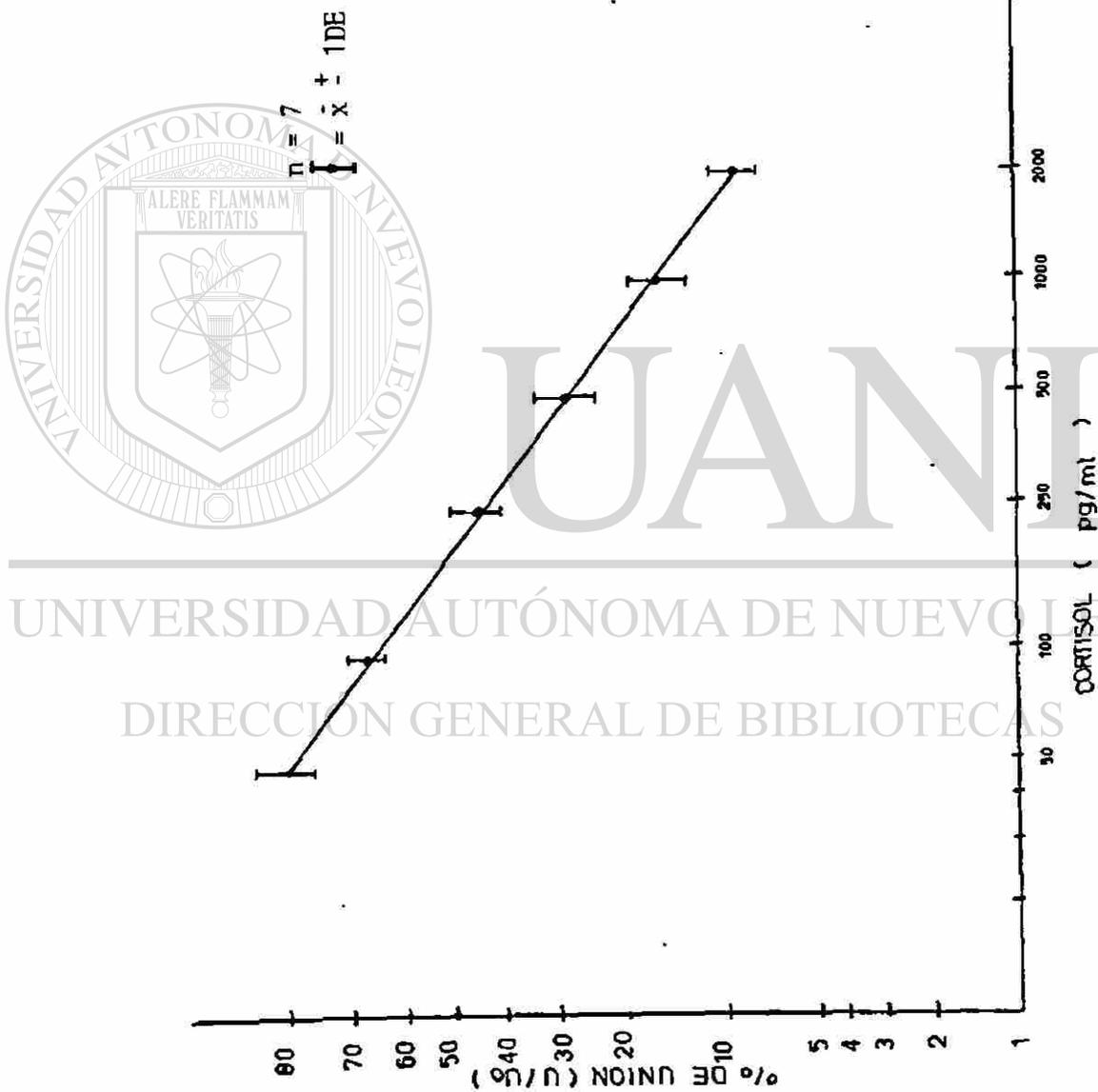


Figura 16. Precisión de la curva patrón del método de RIA para medir cortisol.

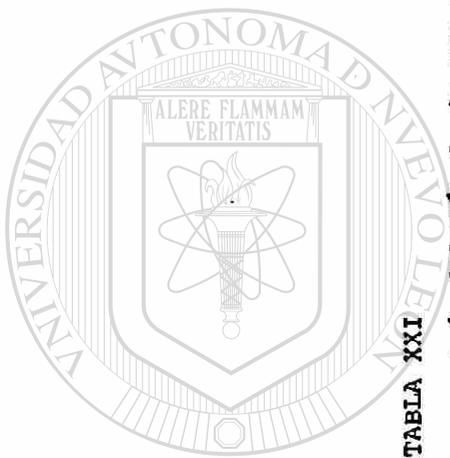


TABLA XXI

Sensibilidad y precisión de la curva patrón del método de RIA para medircortisol.

hormona	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	$\bar{x}$	$\pm 1DE$	CV%
50 pg	82.5	80.7	72.4	81.9	85.0	78.0	79.0	80.0	$\pm 3.99$	4.9
100 pg	69.0	66.4	62.4	65.7	72.0	67.0	71.0	67.6	$\pm 3.29$	4.8
250 pg	51.5	45.6	40.8	47.8	52.0	44.0	40.5	46.0	$\pm 4.67$	10.1
500 pg	36.0	34.4	27.3	39.0	40.0	36.0	26.6	34.2	$\pm 5.30$	15.5
1000 pg	20.3	21.9	14.2	23.4	20.0	16.0	19.6	19.3	$\pm 3.21$	16.5
2000 pg	10.5	10.5	10.0	10.0	7.0	10.0	7.0	9.3	$\pm 1.57$	16.9
"r"	-0.841			-0.846			-0.828	-0.824		

concentraciones endógenas extremadamente bajas se presenta en la tabla XXII la recuperación en todos los casos fue superior al 87%.

#### 2.2.4. Especificidad.

La especificidad del método fue demostrada durante la caracterización de los antisueros.

### 2.3. Aplicación del método de radioinmunoanálisis de cortisol.

2.3.1. Determinación de cortisol sérico durante su variación diurna y post-supresión con dexametasona.

Los niveles de cortisol plasmático en los 24 individuos estudiados se presentan en la tabla XXIII. Al analizar estos valores en cada horario y obtener cifras promedio  $\pm$  1 desviación estándar, los valores nocturnos representan aproximadamente el 50% de los valores matutinos. Con respecto a la respuesta post-supresión con dexametasona se observa que los niveles disminuyen un 27% al ser relacionados con los mismos valores matutinos. Estos datos se muestran en la figura 17, aquí se puede observar que los valores obtenidos con el método descrito muestran el esquema de variación diurna del cortisol.

#### 2.3.2. Comparación de dos métodos para medir cortisol.

Al comparar el método desarrollado en esta tesis, con el de un estuche comercial de la casa comercial Amersham para medir cortisol por RIA y hacer determinaciones de cortisol en suero por ambos métodos, se observa que los resultados que se presentan en la tabla XXIV son muy semejantes en

TABLA XXII

Exactitud del método de RIA para medir cortisol.

Cortisol añadido (ng/ml)	(n)	Cortisol recuperado ( ng/ml $\pm$ 1DE)	Recuperación (%)
50	(6)	43.6 $\pm$ 6.2	87.2
100	(7)	98.0 $\pm$ 8.2	98.0
250	(6)	228.0 $\pm$ 18.2	93.0

n = número de determinaciones

TABLA XXIII

Variación diurna y post-supresión con Dexametasona del Cortisol plasmático en individuos normales (n=24).

Horas del día	Cortisol plasmático (ng/ml) media $\pm$ 1DE (niveles $\pm$ 2 DE)
8:00	151.2 $\pm$ 40.4 (70.4 - 232.0)
20:00	85.8 $\pm$ 28.5 (28.8 - 142.8)
21:00	Supresión con 2 mg de Dexametasona
8:00	41.3 $\pm$ 13.7 (13.9 - 68.7)

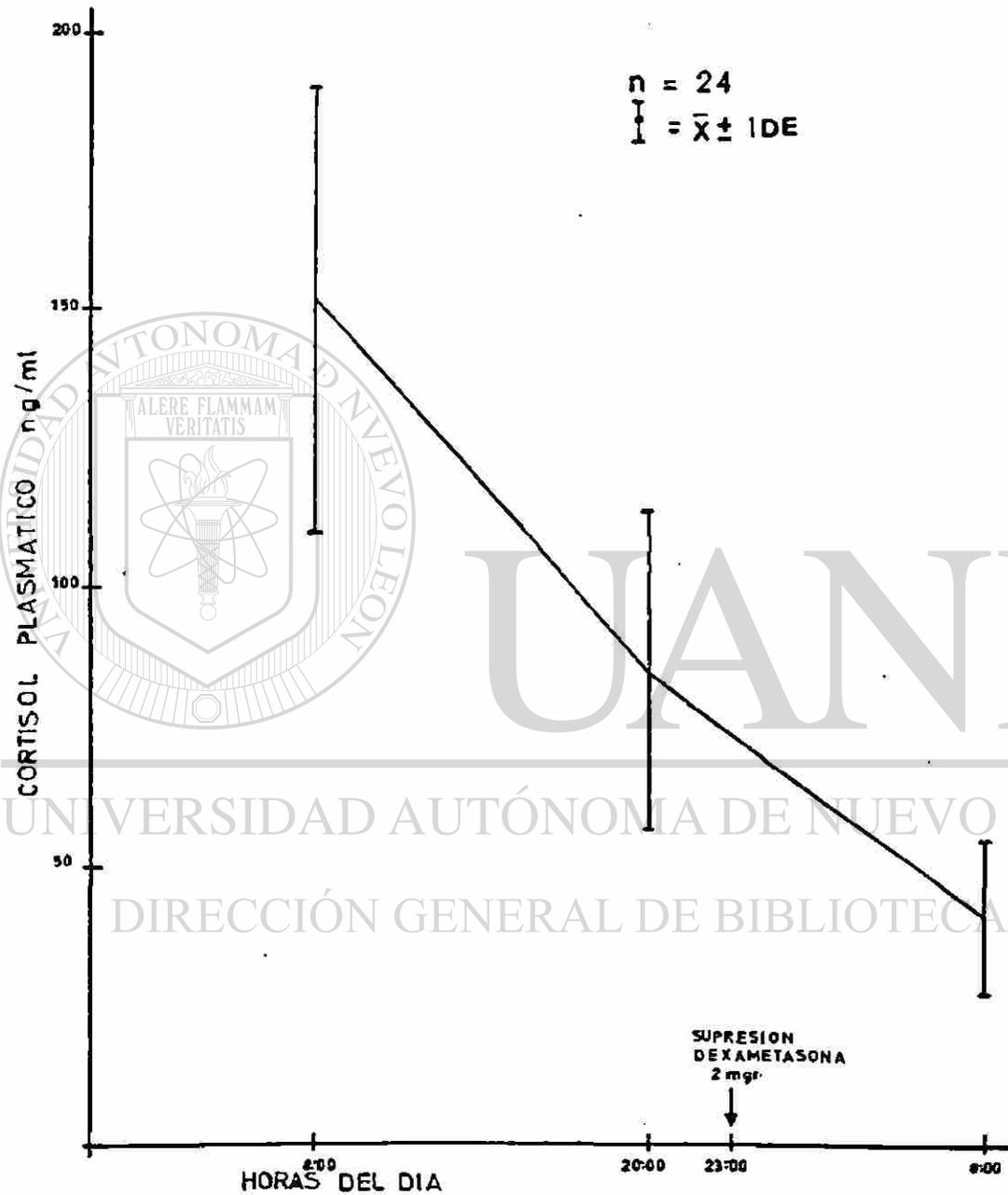
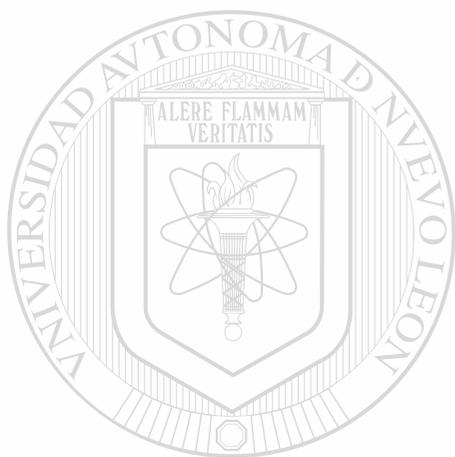


Figura 17. Esquema de variación diurna y post-supresión con dexametasona del cortisol plasmático en individuos normales.

TABLA XXIV  
Cortisol sérico medido  
por dos métodos de RIA.

# de muestra	Estuche Amersham	Método descrito
1	111	115
2	78	80
3	99	100
4	2.4	21
5	6	20
6	3	21
7	31	85
8	171	130
9	250	260
10	207	160
11	243	210
12	283	300
13	93	80
14	105	120
15	58	60
16	160	210
17	3.3	95
18	71	95
19	176	210
20	34	90
21	2.7	24
22	28	55
23	49	65
24	70	55
25	86	75
26	145	125
27	129	145
28	3.4	53

cifras superiores a 25 pg, en cambio en resultados por abajo de esta cantidad no lo son tanto. No obstante el coeficiente de correlación  $r$  de Pearson indica una correlación de 0.92.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## V DISCUSION

Dos importantes ventajas que presenta el radioinmunoanálisis sobre otros métodos analíticos son su alta especificidad y sensibilidad, características que se presentan cuando se dispone de un antisuero adecuado para tal propósito.

La producción de antisueros se logra mediante esquemas complejos, existen algunos factores que pueden afectar dicha producción y especificidad como son: los sistemas de inmunización, tiempo y cantidades de antígeno aplicado. En el presente estudio, las respuestas obtenidas fueron muy variadas ya que se tuvieron respuestas rápidas, tardías y nulas como fué demostrado en la representación gráfica de las diluciones de los sueros versus tiempo (figuras 6 y 12). Estos resultados eran de esperarse pues West [15], Hammond [16] y Abraham [26,27] en el caso de 17-hidroxiprogesterona y Nishina [10], Ruder [22] y Ellis [28] para cortisol reportan resultados similares.

En cambio, los títulos de los sueros logrados son aceptables para anti-cortisol y excelentes para anti-17-hidroxiprogesterona al compararlos con los mismos autores.

Otro factor importante para que se desencadene una respuesta inmunológica y obtener antisueros con un buen grado de especificidad, es que la sustancia estimulante (antígeno) posea un determinado tamaño molecular y una composición química adecuada, razón por la cual las hormonas esteroideas (de bajo peso molecular) deben estar covalentemente unidas a moléculas

acarreadoras de alto peso molecular como la albúmina. Para la obtención de buenos antisueros anti-esteroides es muy conveniente efectuar la inducción utilizando conjugados comerciales, pues se ha visto que la preparación de los mismos es muy compleja y en pocas ocasiones se obtienen antisueros de buena calidad.

En la producción de antisueros anti-17-hidroxiprogesterona se han utilizado antígenos acoplados a albúmina en el C-21 [16] y en el C-17 [27]. En estos reportes se utilizó un proceso de purificación cromatográfico previo al RIA, pues la reactividad cruzada con otros esteroides resultó muy alta. Así, al revisar el reporte de Abraham y cols. [27], el antisuero obtenido muestra una reactividad cruzada del 100% con progesterona, 90% con 17-hidroxiprogesterona, 90% con 11-desoxicortisol y 35% para 11-desoxicorticosterona. Por otro lado, Wuest y cols. [15] al inducir con el esteroide acoplado en C-21 obtienen una reactividad cruzada con progesterona del 10% y con desoxicorticosterona del 5%.

Para la obtención de antisueros anti-cortisol, algunos investigadores [14-16,22,28,29] han obtenido un éxito relativo cuando han utilizado esteroides conjugados en el C-21 [13-15,21,27, 28], Nishina y cols.[10] manejaron como antígeno, cortisol acoplado en posiciones C-3,C-6<sub>α</sub>,C-6<sub>β</sub> y C-21, pero ninguno de los antisueros obtenidos mostró alta especificidad y las reacciones cruzadas fueron similares.

En cambio, otros investigadores [23,24] han obtenido antisueros anti-cortisol muy específicos, Fahmy y cols. [23], reportan que su antisuero presenta reacción cruzada con 11-

desoxicortisol 7.1%, corticosterona 0.4% y cortisona 0.7% al utilizar como antígeno el esteroide acoplado en C-3.

En el presente estudio, se utilizaron conjugados comerciales acoplados en el C-3 de ambas hormonas. En el caso de los antisueros anti-17-hidroxiprogesterona obtenidos, resultaron ser altamente específicos, pues muestran una máxima reactividad cruzada con 17-hidroxipregnenolona de 4.33% en la mezcla de sueros del conejo 3, con progesterona 1.33% en la mezcla de sueros del conejo 1 y con pregnandiona 0.51% en el mismo suero. Estas características permiten evitar el proceso de purificación de la muestra problema previo al RIA. Esto fue demostrado al poder cuantificar, con este método en 12 mujeres normales, los cambios que durante la fase folicular y fase lútea del ciclo ovárico presenta la 17-hidroxiprogesterona, resultados que coinciden con los reportados por otros investigadores [13-15,36].

En cambio, la mezcla de los antisueros anti-cortisol de los conejos 1 y 2 presentan reacción cruzada con metabolitos plasmáticos como cortisona (38% y 24%), dihidro-cortisol (1.7% y 23%), 17-hidroxiprogesterona (14.4% y 1.3%), 11-desoxicortisol (13.6% y 1.0%) y desoxicorticosterona (<0.1% y 1.5%) y con metabolitos urinarios como tetrahidrocortisol (<0.1% y 13.1%), tetrahidrodesoxicorticosterona (0.65% y 0.48%).

La especificidad de un radioinmunoanálisis depende de tres factores: a) la especificidad del antisuero, b) la concentración en sangre de los esteroides que interfieren y c) la interferencia no específica por lípidos y proteínas. Al conocer la reactividad cruzada de antisueros obtenidos y

conocer las cifras normales en suero de los esteroides en cuestión (cortisol 50-250 ng/ml, cortisona 14-31 ng/ml, 17-hidroxiprogesterona 0.4-3.3 ng/ml y 11-desoxicortisol 0.3-2 ng/ml) se pueden hacer varias observaciones:

1) La cortisona, circula en sangre como producto de la biotransformación del cortisol por tejidos periféricos intercambiándose ambas hormonas por actividad de la 11- $\beta$ -hidroxilasa, la cual muestra mayor eficiencia para convertir cortisona en cortisol manteniendo una relación 1:7, esta biotransformación se ha considerado que juega un papel regulador del cortisol [30,31]. Las concentraciones séricas de cortisona normales representan menos del 10% de los niveles bajos de cortisol, por lo tanto, solo en los casos en que las cifras de cortisol sérico sean menores de 50 ng/ml determinadas con nuestro método, podrían verse afectados con la presencia de cortisona.

2) Con respecto a los niveles circulantes de dihidro-cortisol, 17-hidroxiprogesterona y 11-desoxicortisol, estas representan menos del 1% de las cifras normales de cortisol por lo que el reconocimiento del antisuero hacia estas hormonas no impacta en los resultados reportados con este método.

3) Al realizar las determinaciones de cortisol en suero, la reactividad cruzada del antisuero hacia metabolitos esteroides urinarios, no afectan los resultados.

Esto fué observado con los estudios realizados en el presente trabajo , en los que se demuestra la detección del ciclo circadiano del cortisol y la respuesta normal a la supresión con dexametasona en 24 individuos normales, ya que las cifras encontradas corresponden a las reportadas por otros

autores [15,21-23,28,37]

A través de la utilización de diferentes soluciones amortiguadoras, tiempos de incubación y reactivos precipitantes para separar la fracción ``unida'' de la ``libre'', se logró obtener una metodología adecuada de radioinmunoanálisis para la aplicación de los antisueros producidos.

Para conocer la confiabilidad del método elegido se han publicado numerosos artículos entre los que destacan los de Roadbard [25,32], Migdley [33] y Cekan [34,35] que describen los parámetros que sugieren deben ser aplicados a cada radioinmunoanálisis.

Abraham [26] propone que la aceptabilidad del RIA de esteroides está dada por experimentos de seguridad. En estos experimentos, la especificidad del método es demostrada a través de la especificidad del antisuero y cuando los niveles en plasma de los esteroides medidos por ese RIA bajo varias condiciones fisiológicas, correlacionan bien con niveles obtenidos por otros métodos.

La precisión de un RIA debe ser pre-determinado por cada laboratorio en base a los coeficientes de variabilidad intra e inter-análisis, en general un RIA es rechazado si sus CV son superiores al 20%. La precisión de cada método en este estudio, fué cotejada en sueros con diferentes concentraciones de 17-hidroxiprogesterona y cortisol y en ambos métodos fué posible demostrar que la variabilidad está dentro de los límites aceptables y que su reproducibilidad fué adecuada en los diferentes ensayos practicados.

La sensibilidad del método es dependiente de las concentraciones en el líquido biológico a medir, por lo que se recomienda considerar a la dosis menor de la curva patrón linearizada cuyo % de unión sea igual ó menor al 90%. Así la sensibilidad para el RIA de 17-hidroxiprogesterona fué de 10 pg/tubo (0.11 ng/ml) y para cortisol de 50 pg/tubo (25ng/ml).

Los estudios de recuperación de los métodos son superiores al 95% para el RIA de 17-hidroxiprogesterona y del 87% para cortisol. De estos resultados se puede inferir que la exactitud de los métodos son aceptables.

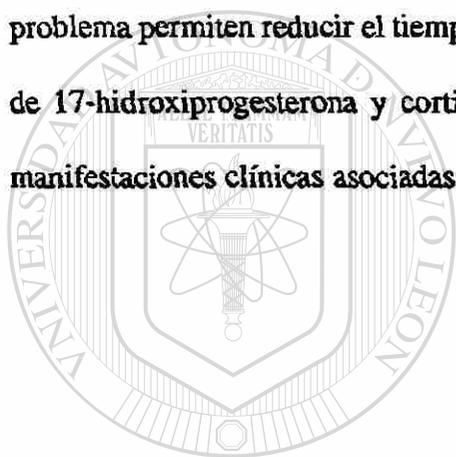
Al comparar las determinaciones realizadas a través de este método para medir cortisol con los de un estuche de importación, se puede ver que solamente en los resultados en que las cifras son < de 25ng/ml detectado por el método descrito, difieren de los reportados por el otro método.

Hay que mencionar que las determinaciones realizadas con el método reportado fueron hechas por duplicado, y las practicadas con el estuche comercial fueron muestras únicas. Las muestras 7,17,20 y 28 fueron repetidas, en un segundo análisis, con el primer método y se obtuvieron resultados similares a los previos; estos sueros no fué posible repetirlos con el método comercial.

La sensibilidad podría mejorarse al hacer ajustes en la curva patrón, al cambiar las concentraciones del antisuero y la actividad específica de la hormona marcada, sin embargo, los

resultados de ambos métodos correlacionan bien brindando seguridad al radioinmunoanálisis aquí descrito.

Los resultados de este estudio, permiten efectuar la determinación de cortisol y 17-hidroxiprogesterona en plasma humano con buen grado de seguridad y fácil ejecución. La eliminación de pasos cromatográficos de purificación, substituidos por procesos de extracción ó dilución del suero problema permiten reducir el tiempo de trabajo. Así el presente trabajo permitirá la cuantificación de 17-hidroxiprogesterona y cortisol en sueros normales y sueros de pacientes que presenten manifestaciones clínicas asociadas con patología del ovario y las glándulas suprarrenales.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## VI CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron antisueros anti-17-hidroxiprogesterona y anti-cortisol al estimular conejos de Nueva Zelanda con conjugados esteroides acoplados en el C-3.

2. Los antisueros anti-17-hidroxiprogesterona resultaron ser altamente específicos. Los antisueros anticortisol presentan reactividad cruzada con algunos esteroides que no interfieren con los resultados al utilizarlos clínicamente, por tratarse de metabolitos no presentes en plasma o que circulan en cantidades mínimas.

3. Se demostró la utilidad de estos antisueros en la aplicación de métodos de radioinmunoanálisis mediante estudios de confiabilidad apropiados.

4. Los resultados de este estudio permiten medir 17-hidroxiprogesterona y cortisol en plasma humano con buen grado de seguridad y fácil manejo.

5. Con la metodología utilizada se logra reducir el costo operativo.

## VII RESUMEN

Se obtuvieron antisueros de conejos inmunizados contra 17-hidroxiprogesterona-3-CMO-BSA y cortisol-3-CMO-BSA para ser aplicados en técnicas de radioinmunoanálisis de cada esteroide.

Cada antisuero fué estudiado en detalle para conocer su reactividad cruzada con otros esteroides normalmente presentes en plasma humano. La especificidad fué alta para los antisueros anti-17-hidroxiprogesterona, los antisueros anti-cortisol mostraron reactividad cruzada con algunos esteroides que no interfieren con los resultados al utilizarlos clínicamente, por tratarse de metabolitos no presentes en plasma o que circulan en cantidades mínimas.

Se demuestra la aplicación de de los antisueros obtenidos en métodos de radioinmunoanálisis a través de estudios de confiabilidad apropiados, realizados en sueros de individuos normales en diferentes condiciones fisiológicas.

Los resultados de este estudio permiten medir 17-hidroxiprogesterona y cortisol en plasma humano con buen grado de seguridad y fácil manejo, logrando además reducir el costo operativo.

## VIII BIBLIOGRAFIA

1. Berson, S.A. and Yalow, R.S. Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. *J. Clin. Invest.* 38:1996-2001 (1959)
  2. Murphy, B.P., Engelberg, W. and Pattee, Ch.J. Simple method for the determination of plasma corticoids. *J. Clin. Endocrinol.* 23:293-300 (1963).
  3. Abraham, G.E. Solid-phase radioimmunoassay of estradiol 17 $\beta$ . *J. Clin. Endocrinol.* 29:866-870 (1969).
  4. Erlanger, B.F., Borek, F., Beiser, S. and Lieberman, S. Steroid protein conjugates. *J. Biol. Chem.* 228:713-727 (1957).
  5. Pratt, J.J. Steroid immunoassay in Clinical Chemistry. *Clin. Chem.* 24:1869-1890 (1978).
  6. Skelley, D.S., Brown, L.P. and Besch, P.K. Radioimmunoassay. *Clin. Chem.* 19:146-186 (1973).
- 
7. Grose, J.H. and Lebel, M. Radioimmunoassay for plasma Corticosterona. *Clin. Biochem.* 11:32-33 (1978).
  8. Duval, D., Desfosses, B. and Emiliozzi, R. Preparation of dehydroepiandrosterone, testosterone and progesterone antigens through 7-carboximethyl derivatives: characteristics of the antisera to testosterone and progesterone. *Steroids* 35:235-249 (1980).
  9. Pang, C.N. and Johnson, D.C. A method for the preparation of steroid-protein antigens for use in immunoassay of steroids. *Steroids* 23:203-219 (1974).
  10. Nishina, T., Tsuji, A. and Fukushima, D.K. Site of conjugation of bovine serum albumin to corticosteroid hormones and specific antibodies. *Steroids* 24:861-874 (1974).

11. Vaitukaitis, J., Robbins, J.B., Nieschlag, E. and Ross, G.T. A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J.Clin.Endocrinol.* 33:988-991 (1971)
12. Loraine, J.A. and Bell, E.T. *Hormone Assays and their Clinical Applications.* Churchill Livingstone Edinburgh, London, England. New York, N. Y., U.S.A. (1976).
13. Strott, Ch.A. and Lipsett, M.B. Measurement of 17-Hidroxiprogesterone in Human Plasma. *J.Clin.Endocrinol.* 28:1426-1430 (1968).
14. Stewart-Bentley, M. and Horton, R. 17\_Hidroxiprogesterone in Human Plasma. *J.Clin.Endocrinol.* 33:542-544 (1971).
15. Wuest, Ch.D., Mahajan, D.K., Chavre, V.J., Navors, Ch.J. and Tyler, F.H. Simultaneous measurement of multiple plasma steroids by radioimmunoassay demonstrating episodic secretion. *J.Clin.Endocrinol.* 36:1230-1236 (1973).
16. Hammond, G.L., Ruokonen, A., Kontturi, M., Koskela, E. and Vihko, R. The simultaneous radioimmunoassay of seven steroids in human spermatic and peripheral venous blood. *J.Clin.Endocrinol.* 45:16-27 (1977).
17. Lee, P.A. and Migeon, J.C. Puberty in boys: Correlation of plasma levels of gonadotropin (L.H., F.S.H.), Androgens (Testosterone, Androstendione, Dehidroepiandrosterone and its sulfate), Estrogens (Estrone and Estradiol) and Progestins (Progesterone and 17-Hidroxiprogesterone). *J.Clin.Endocrinol.* 41:556-564 (1975).
18. Orth, D.N., Island, D.P. and Liddle, G.W. Experimental alteration of the Circadian Rhythm in plasma Cortisol (17-OHCS) concentration in man. *J.Clin.Endocrinol.* 27:549-555 (1967).
19. Krieger, D.T., Allen, W., Rizzo, F. and Krieger, H.P. Characterization of the normal tempo

- ral pattern of plasma corticosteroid levels. *J.Clin.Endocrinol.* 32:255-284 (1971).
20. Klein,G.P.,Baden,M. and Giroud,C.J.P. Quantitative Measurement and significance of five plasma corticosteroids during the perinatal period. *J.Clin.Endocrinol.* 34:944-950 (1973).
21. Newsome,H.H.,Clements,A.S. and Borum,E.H. The simultaneous assay of Cortisol, Corticosterone,11-Deoxycortisol and Cortisone in human plasma. *J.Clin.Endocrinol.* 34:473-483 (1972).
22. Ruder,H.J.,Guy,R.L. and Lipsett,M.B. A radioimmunoassay for Cortisol in plasma and urine. *J.Clin.Endocrinol.* 35:219-224 (1972).
23. Fahmy,D.,Read,G.F. and Hillier,S.G. Some observations on the determination of Cortisol in human plasma by radioimmunoassay using antisera against cortisol-3-BSA. *Steroids* 26:267-280 (1975).
24. Magyar,D.M.,Elsner,C.W.Nathanielsz,P.W.,Lowe.K.C. and Buster,J.E. Comparison of two rapid cortisol radioimmunoassays for use in the fetal sheep. *Steroids* 34:111-119 (1979).
25. Roadbar,D.,Bridson,W. and Rayford,P.L. Rapid calculation of radioimmunoassay results. *J.Lab.Clin.Med.* 74:770-781 (1969).
26. Abraham,G.E. Radioimmunoassay of steroids in biological fluids. *J.Steroid Biochem.* 6:261-270 (1975).
27. Abraham,G.E.,Swerdloff,R.,Tulchinsky,D. and Odell,W.D. Radioimmunoassay of plasma Progesterone. *J.Clin.Endocr.* 32:619-624 (1971).
28. Ellis,G. and Morris,R. A one-tube micromethod for radioimmunoasay of plasma Cortisol.

- Clin.Chem. 24:1954-1957 (1978).
29. Srivastava,L.S., Wekk,E.E., Thrasher,K., Sholiton,L.J., Kozera,R., Nolten,W. and Knowles,H.C. Plasma Cortisone concentration as measured by Radioimmunoassay. J.Clin.Endocrinol. 36: 937-943 (1973).
30. Greenspan,F.S. y Forsham,P.H. Endocrinología Básica y Clínica. Ed. El Manual Moderno, México,D.F. (1988).
31. Kowarski,A.,Lawrence,B.,Hung,W. and Migeon,C.J. Interconversion of Cortisol and Cortisone in Man and Its Effect on the measurement of Cortisol Secretion Rate. J.Clin.Endocrinol. 29:377-381 (1969).
32. Roadbard,D.,Rayford,P.L.,Cooper,J.A. and Ross,G.T. Statistical Quality Control of Radioimmunoassays. J.Clin.Endocrinol. 28:1412-1417 (1968).
33. Migdley,A.R.,Niswender,G.D. and Rebar,R.W. Principles for the assessment of the reliability of radioimmunoassay methods. Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology. 163-180 (1969).
34. Cekan,Z. Assessment of reliability of steroid radioimmunoassays. J.Steroid Biochem. 6:271-275 (1975).
35. Cekan,Z. On the assessment of validity of steroid Radioimmunoassay. J.Steroid.Biochem. 11:1629-1634 (1979).
36. Abraham, G. E., Swerdloff, R. S., Tulchinsky, D., Hopper,K. and Odell, W. D. Radioimmunoassay of plasma 17-Hidroxiprogesterone. J.Clin.Endocrinol. 33:42-46 (1971).
37. Foster,L.B. and Dunn,R.T. Single-Antibody Technique for Radioimmunoassay of Cortisol in Unextracted Serum. Clin.Chem. 20:365-368 (1974).

