

2ej  
115



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA

"APLICACION DE LOS METODOS DE RADIOINMUNOANALISIS  
EN FASE SOLIDA PARA LA CUANTIFICACION DE LA FRACCION  
LIBRE DE HORMONAS ESTEROIDES"

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A  
JUAN SALOMON ANDONIE



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

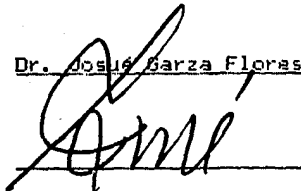
Presidente	Prof.:	VICTORIA VALLES SANCHEZ
Vocal	Prof.:	MA. DOLORES LASTRA AZPILICUETA
Secretario	Prof.:	HOMERO HERNANDEZ MONTES
1er. Suplente	Prof.:	JOSE SULIVAN LOPEZ GONZALEZ
2do. Suplente	Prof.:	MAGDALENA CARRILLO SANTIN

Sitio donde se desarrolló el tema: Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de la Nutrición, Salvador Zubirán.

Asesor del tema: Dra. Victoria Valles Sánchez

  
\_\_\_\_\_

Supervisor Técnico: Dr. José Garza Flores

  
\_\_\_\_\_

Sustentante: Juan Salomón Andonie

  
\_\_\_\_\_

## INDICE

### CAPITULO I      INTRODUCCION

- 1.1 ANTECEDENTES
- 1.2 OBJETIVOS

### CAPITULO II      GENERALIDADES

- 2.1 ANTECEDENTES DEL RADIOINMUNOANALISIS
- 2.2 PRINCIPIO GENERAL DEL METODO
- 2.3 FUNDAMENTO DEL RADIOINMUNOANALISIS
- 2.4 EL RADIOINMUNOANALISIS EN FASE SOLIDA
- 2.5 TRANSPORTE DE LAS HORMONAS ESTEROIDES EN LIQUIDOS BIOLOGICOS
- 2.6 METABOLISMO DE LA TESTOSTERONA
- 2.7 HIRSUTISMO

### CAPITULO III      MATERIAL Y METODOS

- 3.1 REACTIVOS
- 3.2 MATERIALES
- 3.3 PREPARACION DE SOLUCIONES
- 3.4 METODOS
- 3.5 VALIDACION DEL RADIOINMUNOANALISIS EN FASE SOLIDA
- 3.6 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DESCONOCIDAS
- 3.7 ANALISIS DE DATOS

### CAPITULO IV      RESULTADOS

- 4.1 RESULTADOS DEL DESARROLLO Y OPTIMIZACION DEL RADIOINMUNOANALISIS EN FASE SOLIDA
  - 4.1.1 ELECCION DEL MATERIAL MAS ADECUADO
  - 4.1.2 ESTABILIZACION DE LA UNION DEL ANTISUERO A LA MATRIZ SOLIDA
  - 4.1.3 RESULTADO DE LA REUTILIZACION Y DE LA VARIACION DE LA CONCENTRACION DEL ANTISUERO
  - 4.1.4 RESULTADO DE LOS ESTUDIOS SOBRE LA SENSIBILIDAD DEL METODO

- 4.1.5 RESULTADO DE LA VARIACION DEL VOLUMEN DE ACTIVACION
- 4.1.6 LA ESTABILIDAD DEL ANTISUERO

#### 4.2 VALIDACION DE LA METODOLOGIA DESARROLLADA

- 4.2.1 RESULTADO DE LA EVALUACION DE LAS CONDICIONES DE INCUBACION DE LA CURVA DOSIS-RESPUESTA
- 4.2.2 RESULTADO DE LA VARIACION DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA HORMONA TRITIADA
- 4.2.3 ESPECIFICIDAD DEL ANTISUERO UNIDO A LA MATRIZ SOLIDA
- 4.2.4 CONTROL DE CALIDAD DEL ANALISIS
- 4.2.5 CORRELACION ENTRE LOS VALORES DE TESTOSTERONA OBTENIDOS EN HOMBRES Y EN MUJERES NORMALES POR RADIOINMUNOANALISIS EN FASE LIQUIDA Y EN FASE SOLIDA
- 4.2.6 RESULTADO DE LA CUANTIFICACION DE LA FRACCION LIBRE DE TESTOSTERONA EN SUERO
- 4.2.7 CORRELACION ENTRE LOS VALORES DE TESTOSTERONA EN SALIVA Y TESTOSTERONA TOTAL EN EL SUERO DE MUJERES NORMALES Y MUJERES HIRSUTAS

### CAPITULO V                      DISCUSION

#### 5.1 EVALUACION DEL DESARROLLO Y OPTIMIZACION DEL RADIOINMUNOANALISIS EN FASE SOLIDA

- 5.1.1 MATERIALES
- 5.1.2 INCREMENTO Y ESTABILIZACION DE LA UNION DEL ANTISUERO A LA MATRIZ SOLIDA
- 5.1.3 EL EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL ANTISUERO
- 5.1.4 LA SENSIBILIDAD DEL METODO
- 5.1.5 LA VARIACION DEL VOLUMEN DE ACTIVACION
- 5.1.6 LA ESTABILIDAD DEL ANTISUERO

#### 5.2 VALIDACION DE LA METODOLOGIA DESARROLLADA

- 5.3 CUANTIFICACION DE LA FRACCION LIBRE DE TESTOSTERONA EN SUERO
- 5.4 APLICACION DEL METODO DESARROLLADO EN LA CUANTIFICACION DE TESTOSTERONA EN SALIVA DE MUJERES NORMALES Y MUJERES HIRSUTAS, LA CORRELACION ENTRE ESTOS VALORES Y LOS OBTENIDOS DE TESTOSTERONA TOTAL EN SUERO POR RADIOINMUNOANALISIS EN FASE LIQUIDA

### CAPITULO VI                      CONCLUSIONES

### BIBLIOGRAFIA

## CAPITULO I

### INTRODUCCION

#### 1.1 ANTECEDENTES

Hasta antes de 1960, no era común la cuantificación de hormonas en líquidos biológicos. Los bioensayos eran la única técnica disponible. Requerían de grandes volúmenes de sangre u otros fluidos biológicos como la orina. Posteriormente, y aunque el bioensayo continúa siendo una técnica empleada, las hormonas esteroides pudieron ser determinadas con una adecuada precisión mediante métodos espectrofotométricos, pero se necesitaban grandes cantidades de muestra ya que estas hormonas normalmente se encuentran en cantidades muy pequeñas [1]. En 1960 se reportaron los primeros métodos para la cuantificación de insulina y tiroxina. Ambos métodos estaban basados en un nuevo principio descrito como "análisis por saturación", por R. Ekins [2] y "radioinmunoanálisis" por Yalow y Berson [3]. El trabajo de Ekins con tiroxina estaba basado en consideraciones teóricas y aplicaba las propiedades de la globulina acarreadora de tiroxina [2], que reaccionaba específicamente con hormonas tiroideas marcadas endógenamente con radioyodo, elemento utilizado para el tratamiento de pacientes con cáncer del tiroides.

Estos dos grupos de trabajo estaban interesados en la cuantificación de hormonas, de ahí que la Endocrinología haya sido una de las áreas más beneficiadas por el nuevo principio que llevó a la determinación de cantidades mínimas (nanomolares) en forma

específica de alguna sustancia en una mezcla tan heterogénea como el plasma sanguíneo.

Tanto el Radioinmunoanálisis (RIA) como los otros análisis por saturación han tenido un gran impacto en los últimos años, no sólo en la Endocrinología moderna, sino también en muchas otras áreas de la Medicina, la Química y la Biología, donde es importante realizar la cuantificación de compuestos de bajo peso molecular en concentraciones nanomolares [4].

El principio del análisis por saturación fue aplicado independientemente en dos centros: el "Veterans Administration Hospital" en el Bronx, NY, y en "The Middlesex Hospital Medical School" en Londres. En 1960, Yalow y Berson, que durante varios años habían realizado estudios acerca de las propiedades inmunológicas de la insulina [3], publicaron su artículo referente al RIA de dicha hormona, empleando como reactivo "clave" anticuerpos específicos para insulina, obtenidos del suero de pacientes diabéticos que recibían insulina como tratamiento. En el mismo año de 1960, Ekins describió un método para la cuantificación de tiroxina sérica [2], basado en el mismo principio, pero empleando, en lugar de anticuerpos, una proteína que existe naturalmente en el suero, la globulina acarreadora de tiroxina (TBG). Ekins estaba interesado en desarrollar una metodología universal aplicable a una gran variedad de compuestos; de hecho, había efectuado estudios en otras sustancias como la insulina, la vitamina B-12 y la aldosterona, pero no pudo lograrlo debido a la falta de marcadores radioactivos adecuados [4].

En la década siguiente, el RIA tuvo un gran auge que fue incrementando el número de compuestos a los que se podía aplicar

este tipo de análisis por saturación. Sin embargo, aún existía la limitación de no contar con marcadores radiactivos adecuados, es decir, puros y de alta actividad específica. En 1963 se desarrolló el método para la radioyodación de proteínas usando cloramina-T como agente oxidante para la incorporación de radioyodo a los residuos de tirosina de estas [4]. La técnica permitió preparar hormonas proteicas de alta actividad específica empleando cantidades relativamente seguras de radiactividad en un gran número de laboratorios alrededor del mundo, ampliando la gama de reactivos que se podían utilizar en el diseño de nuevos análisis. En el caso de las hormonas esteroideas fue necesario un poco más de tiempo para obtener hormonas tritiadas de alta actividad específica, dando así acceso al desarrollo de un gran número de métodos analíticos para prácticamente cualquier esteroide.

El empleo de enzimas como reactivo saturable fue introducido por Rothenberg en 1965 [5], y posteriormente, en los 70's, tanto la membrana celular como los receptores intracelulares (citoplasmáticos y nucleares), fueron empleados de la misma manera con la esperanza de obtener una mayor especificidad en algunos sistemas (como para algunas hormonas proteicas) para los cuales los métodos inmunológicos no eran satisfactorios.

Probablemente el desarrollo más importante que tuvo el inmunoanálisis, fue el lograr aplicarlo a compuestos que no son antigénicos por sí mismos (haptenos) como las hormonas tiroideas y esteroideas, nucleótidos cíclicos y prostaglandinas, entre otros. Este desarrollo aumentó aún más el logrado anteriormente. En la actualidad es posible cuantificar con gran precisión y exactitud



casi cualquiera de los compuestos de interés biológico, lo cual ha representado un gran avance en todas las ramas de la investigación científica básica y aplicada [4].

Este trabajo está orientado al desarrollo de una metodología de radioinmunoanálisis en fase sólida, con el objeto de poder cuantificar, de una manera más simple, la concentración tanto sérica total, como la de la fracción libre de las hormonas esteroides en el suero y en la saliva. Es conveniente aclarar, sin embargo, que no se desarrolló dicha metodología para todas las hormonas esteroides, sino que se tomó como ejemplo a la Testosterona (T). Se escogió esta hormona en particular considerando la disponibilidad de reactivos y la factibilidad de la aplicación práctica del método a desarrollar.

### 1.2 OBJETIVOS

1) El desarrollo de una metodología dentro del RIA en fase sólida para la cuantificación de T total y T libre. Esta metodología deberá incluir:

a) La unión del antisuero (As) a la fase sólida. Se planea un estudio comparativo entre diversos materiales con el objeto de encontrar el mejor soporte para la fase sólida. Se evaluarán también diversas condiciones de la reacción como el empleo de glutaraldehído como agente acoplante, el tiempo y la temperatura de incubación, el pH, etc.

b) Una vez acoplado el As, se evaluará la unión del antígeno específico (testosterona) a este sistema. Se observará la estabilidad del As unido a la fase sólida a través del tiempo, cuantificando la unión máxima específica en intervalos regulares

de tiempo, durante el estudio.

2) Otro objetivo será el establecer una metodología para el procesamiento de muestras desconocidas, para lo cual, se evaluará una curva dosis-respuesta, constituida por diferentes diluciones de un reactivo patrón de T. Se evaluarán también las diferentes variables que puedan tener algún efecto en dicha curva dosis-respuesta como lo sería el tiempo y la temperatura de incubación, el intervalo útil de la curva, y su sensibilidad.

3) Una vez establecidas las condiciones óptimas de la curva estándar, se aplicará esta metodología en el procesamiento de muestras desconocidas de suero y saliva, se prepararán muestras conocidas y controles de calidad de los mismos fluidos, y se cuantificarán muestras desconocidas. Se hará un estudio comparativo con el RIA para T en fase líquida, con el objeto de correlacionar ambos métodos. También se determinará la reacción cruzada que presente el As unido a la fase sólida contra estructuras similares a la testosterona, como la 5-alfa-Dihidrotestosterona y la delta-4-Androstendiona.

4) Otro objetivo importante será la cuantificación de la fracción libre presente tanto en el suero como en la saliva, para lo cual se evaluará la capacidad de la metodología desarrollada para cuantificar directamente dicha fracción en ambos tipos de muestra biológica.

5) Finalmente, se aplicará la metodología desarrollada en la investigación de mujeres que cursen clínicamente con hirsutismo comparándolas con un grupo de mujeres normales.

## CAPITULO II

### GENERALIDADES

#### 2.1 ANTECEDENTES DEL RADIOINMUNOANALISIS

Como se mencionó en el capítulo previo, a través del tiempo, los análisis que han llevado a la cuantificación de la concentración sérica de las hormonas en general, han sufrido muchas modificaciones. Las técnicas que se emplean en la actualidad son capaces de cuantificar cantidades insignificantes de casi cualquier sustancia con una gran exactitud y precisión. El presente trabajo constituye un esfuerzo por lograr un avance dentro de la serie de modificaciones que han sufrido dichas técnicas inmunoanalíticas.

Una de las metodologías que ha tenido una gran difusión y que ha sido empleada en innumerables laboratorios en el mundo, es el Radioinmunoanálisis (RIA). El RIA proporcionó la sensibilidad, especificidad y confiabilidad que hicieron posibles los estudios de regulación hormonal "in vivo" que de otra manera no hubieran podido realizarse [6]. Entre las ventajas y desventajas que presenta el RIA pueden mencionarse las siguientes [7-10]:

Ventajas:

- 1) La muy alta sensibilidad que presentan los sistemas que emplean reactivos marcados radioisotópicamente.
- 2) La relativa invulnerabilidad que presentan las marcas radiactivas en la emisión de sus señales al medio, es decir, la desintegración radiactiva no se ve afectada por factores físicos

o químicos.

3) Las muestras que se emplean en las diferentes determinaciones (fluidos biológicos) usualmente no contienen radiactividad contaminante.

Desventajas:

- 1) El costo del equipo para la determinación de la radiactividad es muy elevado.
- 2) Existen posibles peligros biológicos asociados con el empleo de sustancias radiactivas.
- 3) La vida media de algunos de los radioisótopos empleados es muy corta, y algunos otros de vida media mayor deben ser purificados en períodos regulares de tiempo.

## 2.2 PRINCIPIO GENERAL DEL METODO

El RIA o el análisis por saturación empleados por Yalow y Berson [3] y por Ekins [2] respectivamente, se puede describir con un modelo muy simple [4]: una jarra con agua y un vaso. Suponemos que hay más agua en la jarra; si tratamos de vaciar todo el contenido de la jarra al vaso, llegará el momento en que el recipiente no pueda contener más y se empiece a derramar. La proporción entre el agua que quedó en la jarra y la que se derramó depende y refleja la cantidad inicial de agua en la jarra. Dicho de otra manera, el concepto distintivo del análisis por saturación es que, permitiendo que la sustancia a ser cuantificada (P) reaccione con un reactivo específico (Q) que tiene una capacidad limitada, la sustancia P (al saturar a Q) queda en dos variedades, libre y unida, de tal manera que la relación que existe entre las dos varía de acuerdo a la cantidad inicial de P. La concentración de P puede ser determinada comparando su distribución con otras,

obtenidas a partir de soluciones estándar a las cuales se les conoce de antemano la concentración de P [4].

La figura 1 nos muestra como el reactivo P reacciona con el reactivo Q, que tiene una capacidad limitada y conocida; de tal manera que al quedar Q saturado, habrá un excedente de P (P libre). Conociendo la cantidad excedente de P y la capacidad de Q podemos llegar a la cantidad inicial de P.



FIGURA 1. El concepto distintivo del análisis por saturación.

Todo esto implica que es necesario poder distinguir las dos variedades del analito (P), lo que se puede lograr mediante la adición de un reactivo idéntico al analito (que en el caso del RIA se trata de un marcador radiactivo) y que reaccionará de la misma manera (ver la figura 2). Posteriormente se separan las variedades libre y unida obteniéndose así la relación entre ambas, reflejando también la concentración inicial del analito.

### 2.3 FUNDAMENTO DEL RADIOINMUNOANÁLISIS

El fundamento del RIA es la inhibición competitiva de la unión de un antígeno marcado  $Ag^*$  a un anticuerpo Ac por una hormona no marcada contenida en estándares o muestras desconocidas [6,8]. Como podemos observar en la figura 2, la reacción entre



unión AgAc, como sucede en los sistemas de precipitación o utilizando carbón, Por lo tanto no hay necesidad de examinar u optimizar cada sistema para minimizar este efecto.

2) Los materiales son costeables y las manipulaciones químicas requeridas son simples y pueden ser llevadas a gran escala.

3) Los materiales activados son muy estables y la preparación de estos puede llevarse a cabo con mucho tiempo de anticipación.

4) El trabajo implícito es mínimo ya que la separación se puede llevar a cabo por simple decantación o aspersión en algunos sistemas y por centrifugación ligera y decantación en otros [15].

5) La separación es rápida, y por lo tanto el sistema es susceptible de ser automatizado [10,11,16-19]. (De hecho, se ha desarrollado un instrumento capaz de realizar automáticamente todas las operaciones necesarias para un RIAFS [20]).

6) El sistema no es afectado por diferencias en la concentración plasmática de proteínas, y por lo tanto no implicaría la necesidad de efectuar el análisis de esteroides en suero extraído.

Por otra parte, el principal problema que se presenta cuando se plantea el empleo de una fase sólida, es la pérdida tanto de antisuero (As) como de la sensibilidad del análisis [8,21]. Esto se debe en gran parte a que en algunos sistemas es necesario utilizar grandes cantidades de As al acoplarlo a la matriz sólida, y una cantidad elevada de As puede provocar un impedimento estérico, disminuyendo la posibilidad de que el Ag tenga acceso a los sitios de unión del Ac [19]. No obstante esta situación, se han reportado casos en los que esto no sucede [8,10,22], por ello el RIA en fase sólida tiende cada día a ser más utilizado, ya sea con Ac o Ag inmovilizados [23].

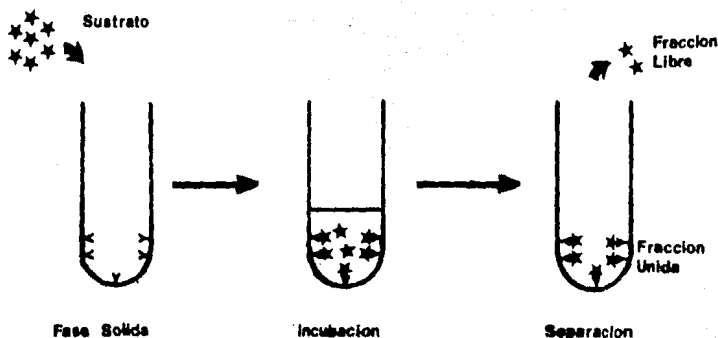


FIGURA 3. El RIAFS y la separación de las fracciones libre y unida.

Existen varios métodos para la inmovilización del As en la matriz sólida [23,24], desde la simple adsorción (ya que las proteínas se adhieren inespecíficamente a algunas superficies [11]), hasta el empleo de agentes acoplantes. Siempre será más adecuado el método de acoplamiento en el que la inmovilización sea a través de un enlace covalente [8,23] aunque es necesario hacer notar que no existe un método "ideal". Algunos métodos son tardados y complejos. El método que emplea el bromuro de cianógeno es simple y rápido, pero implica un cierto peligro en su manejo debido a su elevada toxicidad [24].

Un método sencillo es el que utiliza al glutaraldehído (GA) [17,25]. El GA reacciona con los grupos alfa amino de aminoácidos, amino-N terminales de algunos péptidos y con el sulfhidrilo de la cisteína; en la albúmina sérica bovina, ovoalbúmina e inmunoglobulinas, reacciona con los grupos épsilon amino de la lisina (ver figura 4) y en menor grado con otros aminoácidos como la tirosina e histidina [26].



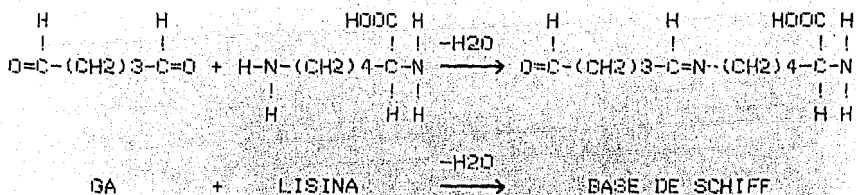


FIGURA 4. Reacción del glutaraldehído con la lisina.

El GA incrementa notablemente la unión del As a un gel de fosfato de calcio, al polipropileno, poliestireno y a otros sólidos [23]. Provee una superficie estable y consistente para inmovilizar proteínas [17]. Se piensa que la activación se debe a revestimiento de la superficie a ser activada. Sin embargo el GA es un reactivo variable en cuanto al grado de polimerización de diferentes lotes [23].

El GA no sólo se ha empleado en el acoplamiento de proteínas, sino que también se ha recomendado para el acoplamiento de membranas celulares, con las que se han preparado placas para microtitulación de proteínas y otras moléculas que interactúan con estas [27].

## 2.5 TRANSPORTE DE LAS HORMONAS ESTEROIDES EN LIQUIDOS BIOLÓGICOS

Es bien sabido que algunas hormonas, como las hormonas tiroideas y las esteroides, se encuentran parcialmente unidas a proteínas acarreadoras; por una parte la albúmina, y por otra, una o más proteínas séricas "específicas" caracterizadas por una alta afinidad por la hormona en particular [28-30]. Existe también una fracción de la hormona que viaja libre y que se encuentra en equilibrio con la fracción unida. La fracción libre usualmente

constituye un porcentaje muy pequeño del total de la hormona. En el caso de las hormonas esteroides es del 1 al 10% del total [28]. La figura 5 nos muestra esquemáticamente la distribución de la testosterona en el plasma sanguíneo. El 44% corresponde a la Globulina Acarreadora de Testosterona (TeBG), el 54% corresponde a la albúmina y el 2% restante viaja en forma libre.

Aunque no ha sido bien establecida la función de las proteínas acarreadoras [28], es parcialmente aceptado que el efecto fisiológico de una hormona es consecuencia de la concentración sérica de la fracción libre [28-32], ya que sólo esta fracción es accesible a las células de la mayoría de los tejidos "blanco", además de que la velocidad con la que pasan de la sangre al compartimiento extravascular es mucho mayor que el de las proteínas acarreadoras [28,29]. Se supone, por lo tanto, que la fracción unida a su proteína acarreadora es "inactiva" [33]. De todo esto se desprende que el valor de la concentración total de la hormona con fines de diagnóstico puede ser insuficiente para algunos casos [32].

Se ha demostrado la presencia de hormonas esteroides en saliva [14,34-37]. La fracción libre de las hormonas esteroides liposolubles (que no se encuentran conjugadas) como cortisol, estriol, testosterona, progesterona, etc., entran en saliva en su mayor parte a través de la vía intracelular, es decir, estos compuestos difunden del medio intravascular hacia el interior de las células acinares gracias a su carácter altamente liposoluble; posteriormente difunden por el otro lado hacia los conductos por donde es excretada la saliva [34]. La concentración de estas

hormonas en saliva no depende del flujo de la misma [34], y además, esta concentración es aproximadamente igual a la concentración de la fracción libre correspondiente en el plasma [14,34-36]. Gracias a esto, la concentración de dichas hormonas en saliva puede proveer un índice clínico útil en la evaluación de la función endócrina [34-37].

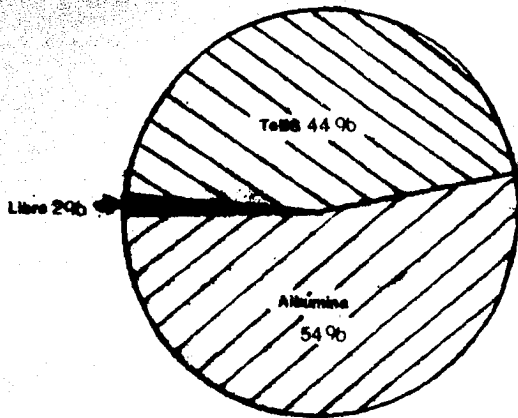


FIGURA 5. Distribución del transporte de la testosterona en el plasma.

## 2.6 METABOLISMO DE LA TESTOSTERONA

La función principal de la testosterona (T) es la regulación del desarrollo de la vida sexual masculina (ver figura 6). En el hombre, el testículo es el órgano principal encargado de su producción, la cual está regulada por un complejo sistema de retroalimentación en el eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo [38] (ver figura 7). Las células de Leydig son las responsables directas de la síntesis de T (ver figura 8). En la rata, el

colesterol sintetizado en estas células es la fuente más importante de sustrato [39], pero en el humano, el colesterol procedente del plasma tiene la misma importancia [40] (ver figura 9).

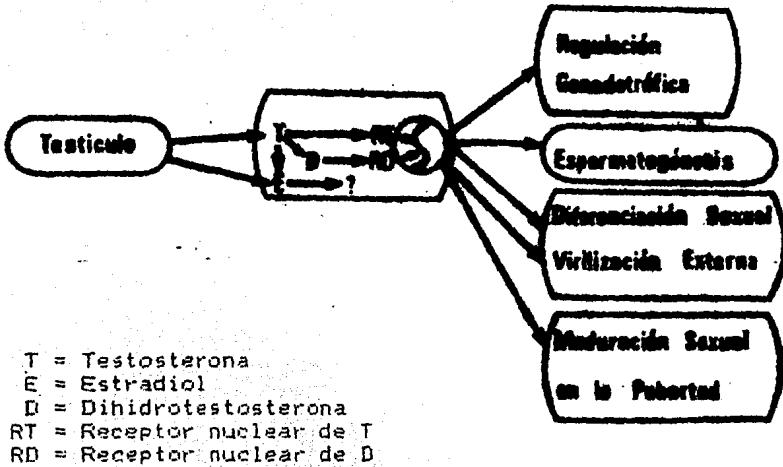


FIGURA 6. Diagrama de la fisiología androgénica normal.\*[38]

La figura 9 nos muestra las vías a través de las cuales es sintetizada la T. La velocidad de síntesis depende de la conversión de de colesterol a pregnenolona. Este paso está regulado por la concentración de la hormona luteinizante (LH) [39]. Se puede llegar a la T a través de dos vías, lo cual estará regulado por la actividad de la 3-beta-OH-Deshidrogenasa, que puede actuar en cualquier punto de la síntesis.

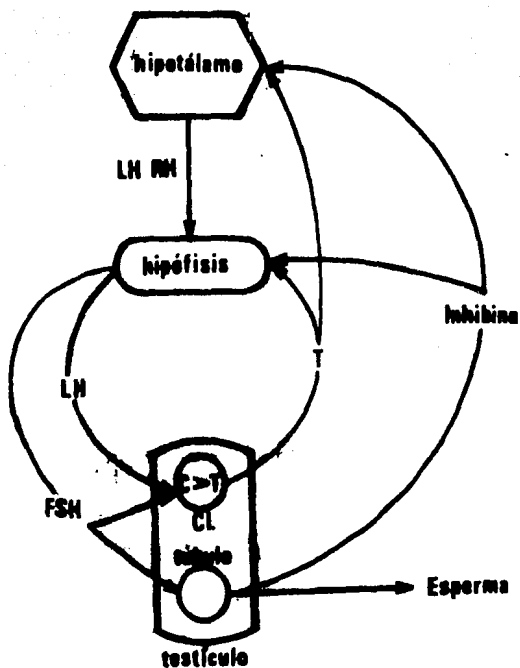


FIGURA 7. El eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo. LH RH = Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante, LH = Hormona Luteinizante, FSH = Hormona Folículo Estimulante, C = Colesterol, T = Testosterona. \*[38]

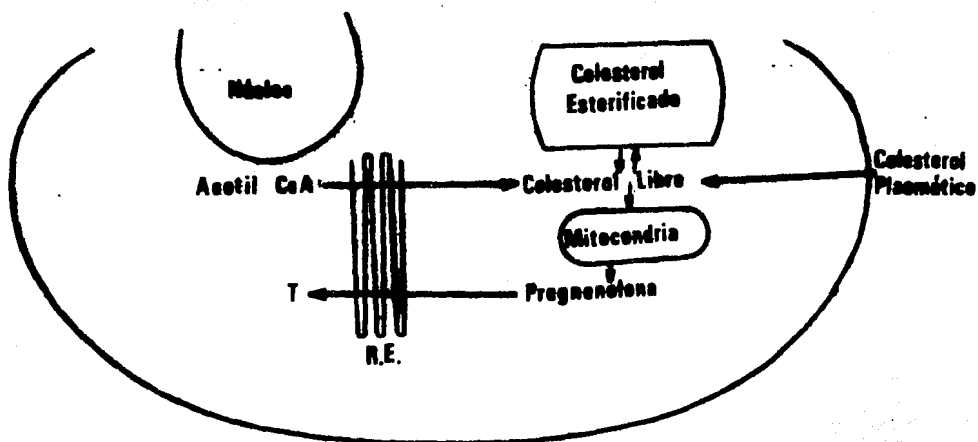


FIGURA 8. La biosíntesis de testosterona en la célula de Leydig. T = Testosterona, R.E. = Reticulo Endoplásmico.\*[38]

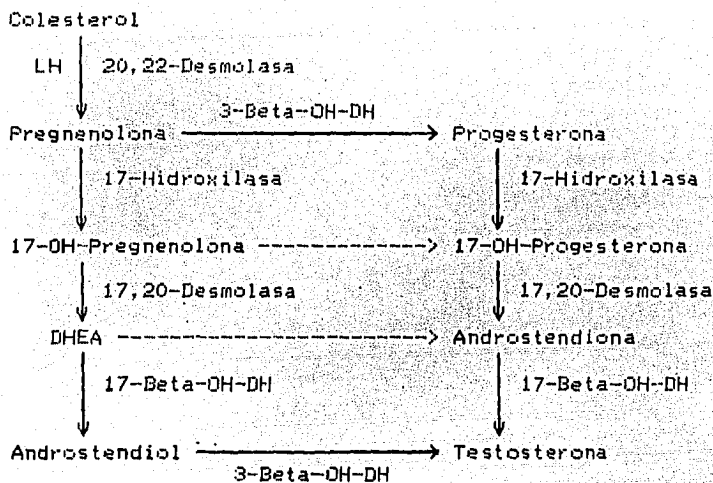


FIGURA 9. La biosíntesis de testosterona.\*[38]

La T puede dar lugar tanto a sus metabolitos activos, como la 5-alfa-dihidrotestosterona (DHT) y el 3-beta, 5-alfa-androstadiol, como también puede convertirse en metabolitos inactivos de excreción como los 17-ceto-esteroides y metabolitos polares (dioles, trioles y conjugados). Una vez conjugados, estos metabolitos de excreción se eliminan en más del 90% a través de la orina, y se consideran inactivos [41].

En la mujer, la T puede ser secretada por el ovario y las glándulas suprarrenales, pero la mayoría proviene del metabolismo de la delta-4-androstendiona. Sus fluctuaciones durante el ciclo menstrual son mínimas [42].

## 2.7 HIRSUTISMO

Uno de los padecimientos en la mujer debidos a un metabolismo anormal de la T es el Hirsutismo; manifestación de la sobreproducción de andrógenos, la cual produce el crecimiento excesivo de vello en las zonas andrógeno sensibles. Es difícil distinguir entre casos idiopáticos y genéticos en los cuales existe el hirsutismo como única señal de sobreproducción de andrógenos [43-45]. Por la misma razón, es también difícil establecer una clasificación del crecimiento de vello como normal o anormal, debido a las variaciones entre los miembros sanos de la población femenina [45,46].

En mujeres con una producción normal de andrógenos, debe considerarse que el hirsutismo puede ser debido a la conversión periférica de T a DHT a nivel de órgano blanco, como en el caso del síndrome de ovarios poliquísticos [47-50].

Los signos clínicos de sobreproducción de andrógenos se correlacionan de la mejor manera con las concentraciones de T libre. La sobreproducción de T puede deberse a la secreción excesiva del ovario o de las suprarrenales, pero con mayor frecuencia es el resultado de la conversión periférica de las prohormonas tales como la de androstendiona a T [51].

Se ha reportado que el 40-60% [31,37] de las mujeres clínicamente hirsutas presentan concentraciones elevadas de T plasmática, con posibilidad de mostrar también su fracción libre elevada, sin embargo esto sólo se ha comprobado en el 55% de los casos [37].

Ya que la actividad biológica de las hormonas esteroides esta estrictamente relacionada a la concentración de la fracción libre



[14,34-37], y debido a que existe una buena correlación entre los valores de la fracción libre del plasma y la concentración de la hormona correspondiente en saliva, estos análisis se emplean con mayor frecuencia en la actualidad [36]. Se han descrito algunos métodos para la cuantificación de la concentración de T en saliva [32], entre los cuales destaca la diálisis en equilibrio, el inmunoensayo enzimático, y la adsorción y precipitación directa de la fracción libre con carbón. En este trabajo se pretende desarrollar una metodología capaz de cuantificar no sólo la concentración de T total, sino también la de la fracción libre directamente del suero y la de su equivalente en la saliva.

## CAPITULO III

### MATERIAL Y METODOS

3.1 REACTIVOS: En este estudio se utilizaron reactivos de diferente naturaleza y procedencia, todos estos de la mas alta pureza química. Los reactivos empleados fueron agrupados en: 1) sales. 2) solventes orgánicos, 3) reactivos biológicos y 4) reactivos diversos.

1) Sales: Bicarbonato de Sodio, Carbonato de Sodio Anhidro, Cloruro de Sodio, obtenidos de J.T. Baker, México; Fosfato Dibásico de Sodio, Fosfato Monobásico de Sodio, obtenidos de Merck-México; y Metabisulfito de Sodio, obtenido de J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, NJ.

2) Solventes orgánicos: Etanol Absoluto, Eter Etilico, Tolueno, obtenidos de J.T. Baker, México; y Metanol, obtenido de Merck-México.

3) Reactivos biológicos: Albúmina Sérica Bovina, obtenida de Sigma Chemical Company, St. Louis MO; Gelatina y estándares de Testosterona, proporcionados por el Programa de Reactivos (WHO Matched RIA Reagent Programme) Ginebra, Suiza. El suero Antitestosterona fue obtenido de Radioassay Systems Laboratories, Carson, CA; Suero Normal de Conejo, obtenido en el Instituto Nacional de la Nutrición, S. Zubirán (INNSZ) a partir de un conejo sano de aproximadamente 2.5 Kg de peso; [1,2,6,7-<sup>3</sup>H] Testosterona, en solución de Tolueno/Etanol 9:1, a.e. 80-105 Ci/mmol, obtenida de Amersham, UK; y [1,2,6,7,16,17-<sup>3</sup>H] Testosterona, en solución

de Benceno/Etanol 9:1, a.e. 135-180 Ci/mmol, obtenida de New England Nuclear, Boston, Mass.

4) Los reactivos diversos empleados incluyeron: Carbón Activado, grado clínico, Dextrans, proporcionados por el Programa de Reactivos (WHO Matched RIA Reagent Programme) Ginebra, Suiza; Glutaraldehído al 25%, Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan) Monolaurato, obtenidos de Sigma Chemical Company, St. Louis MO; Hidróxido de Sodio, obtenido de J.T. Baker, México; y Liquifluor PPD-POPOP Toluene, obtenido de New England Nuclear, Boston, Mass.

3.2 MATERIALES: Los materiales empleados en este estudio, de uso común en el laboratorio, incluyeron: vasos de precipitado, matraces, matraces aforados, pipetas, pipetores, gradillas, tubos de ensayo, termómetro, baño de incubación, espátula, balanza analítica Mettler, etc. Además se utilizaron micropipetas semiautomáticas (Oxford Sampler System) de 0.01 a 1.0ml, frascos viales de vidrio de 20ml con tapón de rosca, tubos de vidrio de 12 x 75 mm, y tubos de poliestireno y polipropileno de 13 x 100 mm proporcionados por Biomex, México.

3.3 PREPARACION DE SOLUCIONES: El agua que se utilizó en la preparación de las soluciones de este estudio fue agua desionizada y hervida.

1) Solución Amortiguadora de Bicarbonatos, "Buffer de Bicarbonatos":

NaHCO <sub>3</sub> .....	7.90 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (anhidro).....	0.63 g
H <sub>2</sub> O.....	cbp 1000 ml

El pH se ajustó a 9.0 con una solución 1.0 N de NaOH

2) Solución Amortiguadora Fosfosalina (PBS):

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O.....2.79 g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....11.6 g  
NaCl.....8.80 g  
H<sub>2</sub>O.....cbp 1000 ml

El pH se ajustó a 7.2-7.4 con una solución 1.0 N de NaOH

3) Solución Reductora de Metabisulfito de Sodio (MBS):

Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.....0.50 g  
Albúmina Sérica Bovina (ASB).....0.10 g  
Tween 20.....0.05 ml  
PBS pH 7.4.....cbp 100 ml

4) Albúmina Sérica Bovina al 1% (ASB 1%):

ASB.....1.0 g  
PBS pH 7.4.....cbp 100 ml

5) Líquido de centelleo:

Liquifluor.....42 ml  
Etanol Absoluto.....21 ml  
Tolueno.....cbp 1000 ml

6) PBS con Gelatina al 1% (PBS + G 1%):

Gelatina.....1.0 g  
PBS pH 7.4.....cbp 100 ml

7) Carbón Dextrán:

Carbón Activado.....0.6250 g  
Dextrán.....0.0625 g  
PBS + G 1%.....cbp 100 ml

8) Hidróxido de Sodio 1.0 N (NaOH 1.0 N):

NaOH.....4.0 g  
H<sub>2</sub>O.....cbp 100 ml

\* cbp: cuanto baste para (aforar a)

3.4 MÉTODOS: En esta sección se describen los pasos que se siguieron en el desarrollo y la optimización del RIA en fase sólida para testosterona. Para el diseño de experimentos, se tomaron de inicio algunas condiciones citadas en la literatura [17,52,53]. Dichas condiciones fueron modificándose según el resultado de los experimentos.

Para poder aprovechar las ventajas que implica el empleo de la fase sólida, es necesaria la selección de una matriz sólida adecuada y de un método confiable para inmovilizar el antisuero en dicha matriz [24].

Primeramente se evaluó la capacidad de diferentes materiales para acoplar covalentemente el antisuero. Para esto se estudiaron comparativamente tubos de vidrio, poliestireno y polipropileno, los cuales se activaron con 0.5ml de una solución de glutaraldehído al 2% en buffer de bicarbonatos. Esta solución permaneció en los tubos durante toda la noche (16-18hrs). Al día siguiente se sustrajo el glutaraldehído aspirando con vacío, y se hizo un enjuague con 0.5 ml de buffer de bicarbonatos. El enjuague consiste en depositar la solución y retirarla aplicando vacío. Después de la activación se procedió a acoplar el antisuero contra testosterona a la pared interior de los tubos. Para esto se adicionó 0.5ml de suero antitestosterona (As) diluido 1:20000 [17,49], y se incubó 2 hr a 37°C. El Ac se retiró aplicando vacío y se enjuagó con 0.5ml de PBS. Con el anticuerpo ya acoplado los tubos se guardaron tapados en refrigeración a 4°C hasta su empleo.

Además de los tubos a los que se les acopló el Ac, era necesario contar con tubos para determinar la unión no específica,

los cuales se prepararon de la misma manera, excepto el del acoplamiento del antisuero, que se sustituyó por una dilución de suero normal de conejo (SNC) al 1% en PBS, con el objeto de revestir las paredes de los tubos de tal manera que se evitara en lo posible la adsorción inespecífica de la hormona marcada al tubo. Se realizó un experimento empleando diferentes concentraciones de SNC y se llegó a la conclusión de que empleando la concentración del 1% se tendría una unión no específica menor al 3%.

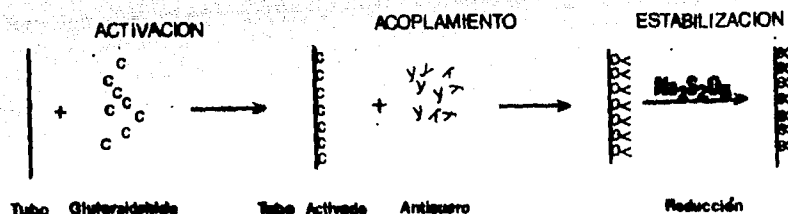


FIGURA 10. Esquema que muestra la activación, acoplamiento y estabilización del antisuero a la pared interior de tubos de poliestireno.

Una vez activados los tubos y con el antisuero revistiendo sus paredes, se llevó a cabo el RIA en fase sólida siguiendo las condiciones descritas [17], en síntesis: se adicionaron a los tubos 0.4ml de buffer de bicarbonatos y 0.1ml (10000cpm) de [1,2,6,7-<sup>3</sup>H] Testosterona (3HT) con a.e. de 80-105 Ci/mmol, equivalentes a 0.979 pmol/ml. Se incubó por espacio de 1 hr a 37°C y 0.5 hr a 4°C. Después de la incubación se retiró (siempre aspirando con vacío) el contenido de los tubos y se enjuagaron

con 0.5ml de PBS. Finalmente, se adicionó 0.5 ml de metanol, con el objeto de remover la hormona marcada que permaneció unida al tubo después de la incubación (fracción unida al antisuero). El metanol se decantó en frascos viales de vidrio de 20 ml con tapón de rosca y se añadieron 5ml de solución de centelleo. Se agitaron con vortex durante 30-60 segundos y se dejaron reposando durante cuando menos 4hrs. La radioactividad unida se contó en un espectrofotómetro Packard Tricarb 300.

Una vez seleccionado el material mas adecuado, el siguiente paso fue decidir la concentración óptima de glutaraldehído, ya que se observó que al aumentar la concentración de glutaraldehído, aumentó también el porcentaje de unión. Para el siguiente experimento se planteó la posibilidad de dar mayor estabilidad a la unión del anticuerpo con el glutaraldehído mediante la inclusión de una incubación, posterior al acoplamiento del antisuero, con una solución reductora de metabisulfito de sodio (MBS) (ver figura 11).

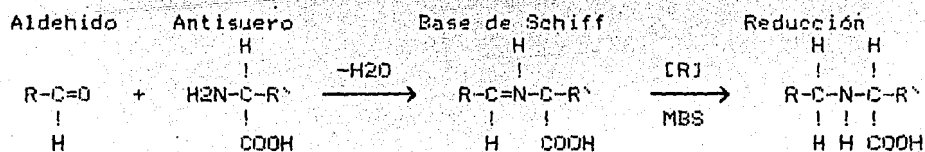


FIGURA 11. Esquema de la estabilización de la unión entre el antisuero y el glutaraldehído.

Al reducirse la doble ligadura de la base de Schiff, la unión gana estabilidad, la cual se reflejaría como un aumento en el

porcentaje de unión.

Para este experimento se emplearon las siguientes concentraciones de glutaraldehído: 1, 5, 10 y 15%. A los tubos así activados se les acopló el antisuero y se formaron dos grupos; al primero se le incubó durante 15 minutos con la solución reductora de MBS, y al segundo grupo (control) no se le dió este tratamiento.

El paso siguiente consistió en evaluar si la dilución 1:20000 del antisuero era adecuada para ser reutilizada [53]. Se activaron tubos con glutaraldehído al 5%. Por una parte, se acopló el antisuero a un primer grupo de tubos, empleando la dilución 1:20000, la cual fue reutilizada para el acoplamiento del antisuero a un segundo grupo de tubos. Por otra parte, se preparó una curva de dilución del anticuerpo, acoplando a los tubos diluciones del Ac que variaron desde 1:4000 hasta 1:64000.

Mejorar la sensibilidad ha sido una de los mayores retos en el RIA [23]. Por lo tanto, con el objeto de obtener mayor sensibilidad en el análisis, disminuyendo la UNE, se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

1) Se evaluó la influencia que podrían tener uno o más enjuagues con PBS en los tubos después de la incubación con la hormona marcada. Para cumplir este objetivo, se utilizaron tubos activados con glutaraldehído al 5% a los que se les acopló el As diluido 1:20000. Al llevar a cabo el RIA, después de la incubación con la hormona tritiada, se formaron cuatro grupos de tubos, a los que se les hicieron 0, 1, 2, y 3 enjuagues con PBS.

2) Se varió la concentración de la hormona tritiada, con el propósito de disminuir la UNE relativa a las cuentas totales. Se



utilizaron 12000, 24000, 36000, 48000 y 60000cpm/0.1 ml en tubos activados en la forma anteriormente descrita.

Finalmente, se evaluó el efecto que produciría la variación del volumen de activación. Se activaron tubos con 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 ml, tanto de glutaraldehído al 5% como de Ac diluido 1:20000, con el propósito de encontrar una relación entre el volumen empleado y la superficie activada, de tal manera que un cambio en el volumen de activación no se reflejara como un aumento significativo en el porcentaje de unión.

Una vez concluida esta etapa inicial, en la que se evaluaron las condiciones que llevaron al desarrollo de la fase sólida, se llegó a la siguiente metodología para la activación y el acoplamiento del antisuero a los tubos (se preparó un "lote maestro" de tubos de poliestireno; empleando suero antitestosterona diluido 1:20000 para la unión específica y SNC 1% para la UNE). El esquema fue el siguiente:

- 1) Añadir a tubos de poliestireno 0.5 ml de una solución de glutaraldehído al 5% en buffer de bicarbonatos.
- 2) Incubar durante la noche a temperatura ambiente (TA).
- 3) Aspirar el glutaraldehído con vacío.
- 4) Enjuagar con 0.5 ml de PBS.
- 5) Añadir 0.5 ml de la dilución 1:20000 del Ac (o de SNC 1%).
- 6) Incubar 2 horas a 37°C en baño de agua.
- 7) Aspirar el contenido de los tubos con vacío.
- 8) Añadir 0.5 ml de la solución reductora de MBS.
- 9) Incubar 15 min a TA.
- 10) Aspirar el MBS con vacío.
- 11) Enjuagar con 0.5 ml de PBS con ASB 1%.
- 12) Mantener los tubos bien tapados y en refrigeración a 4° C hasta que sean empleados.

### 3.5 VALIDACION DEL RIA EN FASE SOLIDA

Primero se evaluó una curva estándar, poniendo en competencia testosterona tritiada contra estándares de testosterona. Se corrieron comparativamente dos curvas dosis-respuesta, cada una con 7 estándares, variando la temperatura y el tiempo de incubación. La primera curva se incubó durante 1 hr a 37°C y 0.5 hr a 4°C, y la segunda se incubó 18 hr a 4°C. Los estándares se prepararon haciendo dobles diluciones con PBS a partir de una solución madre que contenía 316.8pg de testosterona en 0.5ml de PBS.

Posteriormente, ya que la sensibilidad en los procedimientos como el RIA dependen en gran parte de la obtención y utilización de antígenos marcados con elevada actividad específica (a.e.) [54], se evaluó el efecto de la variación de la actividad específica de la testosterona tritiada. Se prepararon dos curvas dosis-respuesta, una empleando 0.1ml de [1, 2, 6, 7-3H] Testosterona a.e. 92 Ci/mmol equivalentes a 0.0979 pmol de T, y la otra empleando 0.1ml de [1, 2, 6, 7, 16, 17-3H] Testosterona a.e. 135 Ci/mmol, equivalentes a 0.0667 pmol de T. Como se esperaba, aumentó ligeramente la sensibilidad del análisis (disminuyendo la dosis al 50% [55]) al incrementarse la a.e. de la hormona marcada, por lo que en los experimentos siguientes se utilizó la hormona de mayor a.e.

Una vez evaluada la curva estándar, se procedió a procesar muestras biológicas desconocidas: tanto sueros como saliva y controles de calidad, los cuales se evaluaron también por RIA en fase líquida. Se hicieron algunas modificaciones en la metodología, ya que los resultados que se obtuvieron con dichas

modificaciones presentaron una mayor eficiencia en la recuperación de la fracción de la hormona radiactiva unida al tubo y una menor dispersión entre los duplicados. A continuación se presenta el RIA en fase sólida para testosterona; con las modificaciones efectuadas en base a los resultados obtenidos:

- 1) Depositar 0.4ml de la muestra (desconocidos, estándar o control de calidad) en los tubos previamente preparados
- 2) Añadir 0.1ml de  $^3\text{H}$ Testosterona a.e. 135 Ci/mmol (10000cpm/0.1ml)
- 3) Incubar los tubos 1 hr a 37°C y 0.5 hr a 4°C
- 4) Aspirar el contenido de los tubos con vacío
- 5) Enjuagar los tubos 1 vez con PBS
- 6) Añadir 0.3 ml de metanol
- 7) Agitar los tubos con vortex
- 8) Decantar el metanol en frascos viales
- 9) Repetir los pasos 6, 7 y 8
- 10) Añadir a los frascos viales 5 ml de solución de centelleo
- 11) Agitar los frascos viales de 30-60 seg. con vortex
- 12) Desengrasar los frascos viales con alcohol
- 13) Determinar la radiactividad después de por lo menos 4 hr.

Para los tubos de UNE se adicionan 0.1 ml de  $^3\text{H}$ T y 0.4 ml de PBS. Se procesan de la misma forma que los demás. Para las cuentas totales se depositan 0.1 ml de  $^3\text{H}$ T, 0.6 ml de metanol y 5 ml de solución de centelleo directamente en los frascos viales.

El RIA de testosterona en fase líquida se llevó a cabo de la siguiente manera:

UNE	0.6ml PBS + 0.1% + 0.1ml 3HT
Unión Máxima (Bo)	0.5ml PBS + 0.1% + 0.1ml Ac + 0.1ml 3HT
Estándares	0.5ml de c/dil + 0.1ml Ac + 0.1ml 3HT
Muestras	0.5ml de c/ext + 0.1ml Ac + 0.1ml 3HT
Cuentas Totales	0.6ml PBS + 0.1% + 0.1ml 3HT

Una vez que se ha depositado el contenido de cada tubo, se agitan en vortex y se incuban de 18 a 24 hr a 4°C.

Se adicionan 0.2ml de una suspensión de carbón dextrán y se agitan. Se incuban 30 min a 4°C y se centrifugan a esa misma temperatura a 3000 rpm/15 min. El sobrenadante se decanta en frascos viales y se adicionan 5 ml de solución de centelleo. Se agitan durante 30-60 seg en vortex y la radiactividad se cuenta después de por lo menos 4 hr.

### 3.6 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DESCONOCIDAS

En la cuantificación de las hormonas esteroideas en el suero, se requiere de un proceso anterior a su análisis [8,56]. Es necesario eliminar la presencia de las proteínas acarreadoras ya que estas compiten con el As por la hormona [8,28,29]. Este procesamiento se lleva a cabo mediante la extracción con algún solvente, de los cuales el más empleado es el éter [8]. En el caso de las hormonas esteroideas presentes en la saliva no es necesario realizar la extracción, ya que los valores encontrados con y sin extracción no muestran diferencias significativas [34].

El procedimiento de extracción se realiza de la siguiente manera:

El volumen de suero a extraer depende de la condición clínica

se desea cuantificar, empleándolo además, a una concentración a la cual no más del 1% del total de la hormona sea "secuestrado" por los sitios de unión al final de la primera incubación [28].

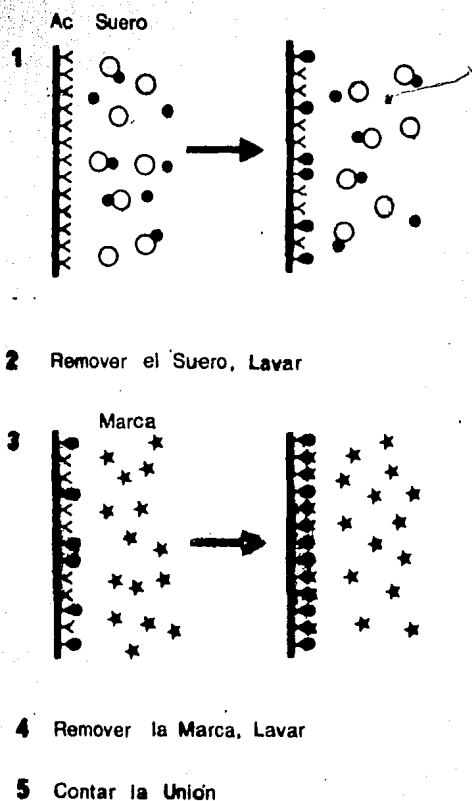


FIGURA 12. Método propuesto para la cuantificación de la fracción libre de una hormona presente en el suero [28,29].

Finalmente se cuantificó la testosterona presente en la saliva de mujeres normales y mujeres hirsutas, correlacionándose los valores obtenidos, con la concentración de T total (cuantificada por RIA en fase líquida).

### 3.7 ANALISIS DE DATOS

Durante la etapa del desarrollo y optimización de la fase sólida, se utilizó como criterio principal el porcentaje de unión máxima específica (%U/T), que se calcula de la siguiente manera:

$$\%U/T = \text{cpm "unidas"} - \text{cpm UNE} \times 100 / \text{Ct} - \text{cpm UNE}$$

Posteriormente, para el análisis de los datos obtenidos en la cuantificación de muestras desconocidas, se utilizó un programa de control de calidad desarrollado en el Departamento de Biología de la Reproducción del INNSZ para una calculadora de mesa Hewlett-Packard, modelo 97. Otras pruebas estadísticas empleadas fueron la prueba de "t" de Student (no pareada), y la variación inter e intraanálisis se calcularon en base a la metodología descrita por D. Rodbard et al en Statistical Quality Control of Radioimmunoassays [55].

## CAPITULO IV

### RESULTADOS

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en los experimentos realizados según se describió en el Capítulo III.

#### 4.1 RESULTADOS DEL DESARROLLO Y OPTIMIZACION DEL RIA EN FASE SOLIDA

##### 4.1.1 ELECCION DEL MATERIAL MAS ADECUADO

En la tabla 1 se muestra el resultado del primer intento por acoplar el As a las paredes de los tubos activados con la solución de glutaraldehído al 2%. Como podemos observar, el vidrio fue el material que presentó la menor capacidad de acoplamiento del Ac, seguido del polipropileno, y finalmente, el material que presentó la mayor capacidad de acoplamiento del Ac, empleando una solución de glutaraldehído al 2% fue el poliestireno.

Tabla 1: Capacidad de acoplamiento del Ac a tubos de diferentes materiales.

MATERIAL	VIDRIO	POLIPROPILENO	POLIESTIRENO
XU/T	2.2	12.5	15.9
UNE	1.1	1.2	1.1

Tomando en cuenta que la capacidad de acoplamiento que presentaron el poliestireno y el polipropileno fue similar, se

realizó un segundo estudio comparativo, en el cual se evaluó la capacidad de acoplamiento variando la concentración del glutaraldehído. En la figura 13 observamos que el poliestireno tiene una mayor capacidad de acoplamiento que el polipropileno. Por esta razón se emplearon tubos de poliestireno en los ensayos siguientes.

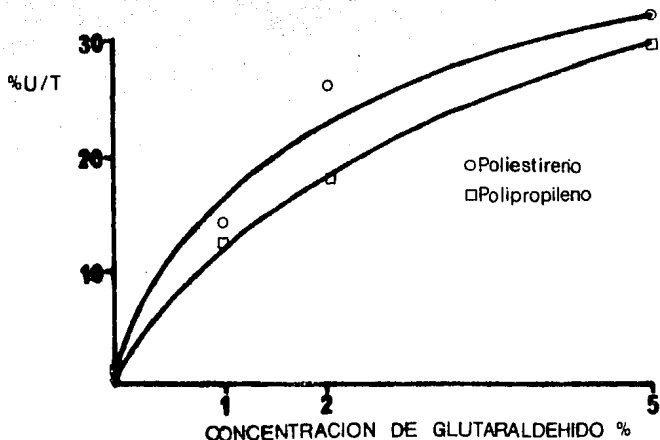


FIGURA 13: El efecto de la variación de la concentración del glutaraldehído en la capacidad de acoplamiento del Ac a la superficie interna de tubos de poliestireno (círculos) y polipropileno (cuadrados).

#### 4.1.2 ESTABILIZACIÓN DE LA UNIÓN DEL ANTISUERO A LA MATRIZ SÓLIDA

En este experimento se observó también que al aumentar la concentración del glutaraldehído se incrementó el porcentaje de unión, por lo que en el siguiente experimento, además de estudiar el efecto que tendría la solución de metabisulfito de sodio después del acoplamiento del antisuero, se emplearon mayores



concentraciones de glutaraldehído, con el objeto de encontrar su concentración óptima. En la figura 14 se observa que a partir de la concentración del 5% hay una "meseta de activación", es decir, no hay un aumento notable en el porcentaje de unión aunque siga incrementándose la concentración del glutaraldehído. Por otra parte, también se observó que la LINE en concentraciones a partir del 10% de glutaraldehído aumentaba a más del 5%. A partir de este ensayo, se empleó el glutaraldehído al 5% y se efectuó una incubación de 15 min con la solución reductora de MBS.

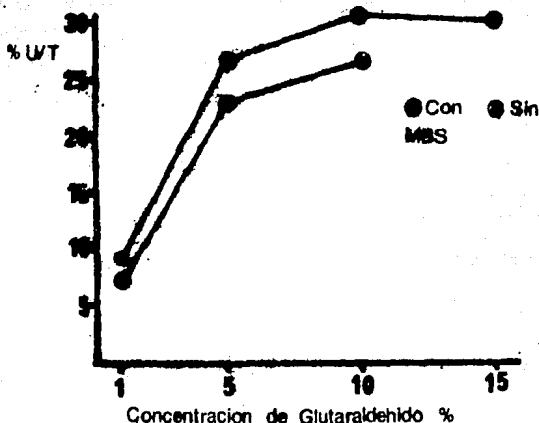


FIGURA 14: El efecto de la variación de la concentración del glutaraldehído en presencia (puntos) o ausencia (estrellas) de metabisulfito de sodio.

#### 4.1.3 RESULTADO DE LA REUTILIZACIÓN Y DE LA VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL ANTISUERO

Una vez determinada la concentración óptima de glutaraldehído, se evaluó el efecto de la variación de la

concentración del antisuero, para lo cual se hizo una curva de dilución del mismo. Al aumentar la concentración del antisuero, se incrementó el porcentaje de unión, sin embargo, se siguió empleando la concentración de 1:20000 ya que esta dilución demostró ser adecuada para reutilizarse en la activación de tubos sin que hubiera una diferencia notable en el porcentaje de unión. (1a activación, 17.9%. 2a activación, 16.7%).

#### 4.1.4 RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS SOBRE LA SENSIBILIDAD DEL METODO

Los experimentos que se realizaron con el objeto de aumentar la sensibilidad del análisis mostraron los siguientes resultados: En la tabla 2 se puede observar que a medida que se aumenta el número de enjuagues disminuye tanto el porcentaje de unión como la UNE.

**Tabla 2: El efecto de uno o más enjuagues a los tubos después de la incubación con la hormona tritiada.**

Enjuagues	0	1	2	3
%U/T	41.0	38.3	36.7	34.5
UNE	4.9	3.2	3.0	2.9

Por otra parte, el aumento en la concentración de la hormona tritiada no reflejó ninguna disminución en la UNE, y el porcentaje de unión disminuyó notablemente como lo podemos observar en la tabla 3.

Tabla 3: El efecto de la variación de la concentración de la hormona tritiada.

Ct	11915	23830	35745	47660	59575
XU/T	19.3	14.1	10.6	8.7	7.8
UNE	3.0	2.9	3.1	3.2	3.2

#### 4.1.5 RESULTADO DE LA VARIACION DEL VOLUMEN DE ACTIVACION

Como se observa en la figura 15, al aumentar el volumen de activación hay un incremento en el porcentaje de unión. El mayor volumen que se empleó fue el de 0.5 ml ya que un mayor volumen implicaría un mayor gasto de todos los reactivos. Por lo que se observa en la figura 15, este volumen no es el que presentaría el mayor porcentaje de unión, es decir, si hubiéramos seguido aumentando el volumen de activación, el porcentaje de unión seguiría incrementándose hasta llegar a un límite en el que con la concentración de hormona tritiada que se utilizó ya no habría aumento en dicho porcentaje de unión.

#### 4.1.6 LA ESTABILIDAD DEL ANTISUERO

Después de que el antisuero fue acoplado a la superficie interna de los tubos de poliestireno, estos se guardaron tapados en refrigeración a 4°C. Como se observa en la figura 16, se realizaron análisis en un periodo de 18 meses después de su preparación, y el antisuero no perdió ni su sensibilidad, ni su capacidad de unión. El promedio de unión durante los 18 meses fue superior al 20%.

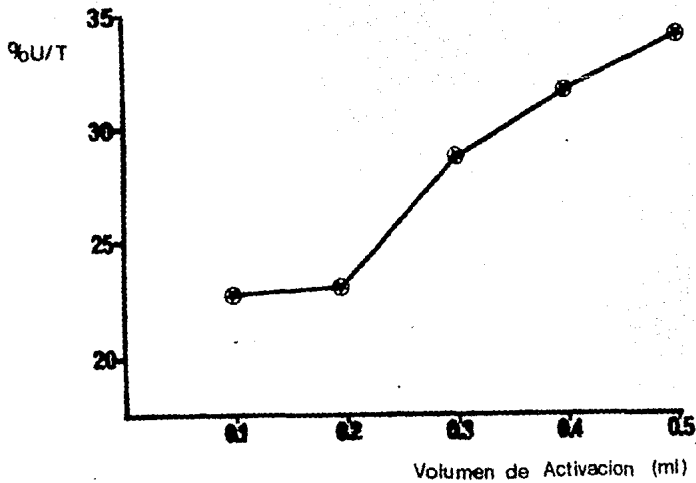


FIGURA 15. El efecto de la variación del volumen de activación (superficie activada) en el porcentaje de unión en fase sólida.

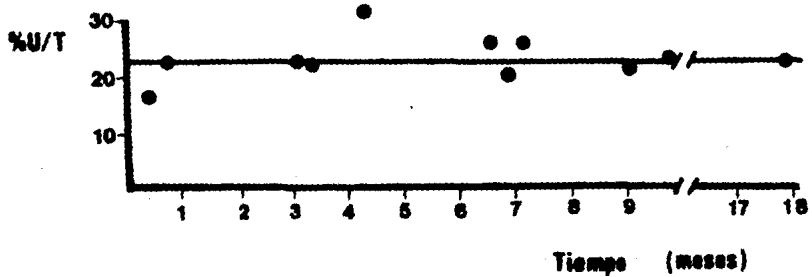


FIGURA 16. La estabilidad del antisuero unido a la matriz sólida a lo largo del tiempo.

## 4.2 VALIDACION DE LA METODOLOGIA DESARROLLADA

### 4.2.1 RESULTADO DE LA EVALUACION DE LAS CONDICIONES DE INCUBACION DE LA CURVA DOSIS-RESPUESTA

Después de evaluar las condiciones que llevaron al desarrollo de la fase sólida, las curvas dosis-respuesta que se evaluaron empleando diferentes condiciones de incubación no mostraron diferencias, por lo que se empleó 1 hr a 37°C y 0.5 hr a 40°C.

### 4.2.2 RESULTADO DE LA VARIACION DE LA A.E. DE LA HORMONA TRITIADA

La figura 17 muestra el resultado del aumento en la actividad específica de la hormona tritiada. Al aumentar la a.e. se observa un corrimiento de la curva dosis-respuesta hacia la izquierda, esto nos indica que la curva es capaz de registrar dosis menores que con la hormona de menor a.e., aumentando por lo tanto la sensibilidad del método. La figura 18 muestra el perfil de imprecisión de las mismas dos curvas.

### 4.2.3 ESPECIFICIDAD DEL ANTISUERO UNIDO A LA MATRIZ SOLIDA

La reacción cruzada que presentó el antisuero después de ser acoplado a la matriz sólida contra 5-alfa-DHT fue del 10.3% y contra delta-4-androstendiona fue de 3.2%. La reacción cruzada en fase líquida para el mismo antisuero fue de 14.0% y 0.8%, respectivamente para las mismas dos sustancias.

### 4.2.4 CONTROL DE CALIDAD DEL ANALISIS

Los resultados obtenidos en el control de calidad del análisis se muestran en la tabla 4. Tanto en el control de calidad interanálisis como en el intraanálisis se emplearon pools de sueros preparados y valorados en el laboratorio por RIA en fase líquida.

Tabla 4. Control de calidad intra e interanálisis de la fase sólida. (Expresados como coeficiente de variación %CV)

DOSIS	BAJA	MEDIA	ALTA
%CV INTRAANALISIS	9.64	6.98	8.83
%CV INTERANALISIS	14.86	8.32	13.18

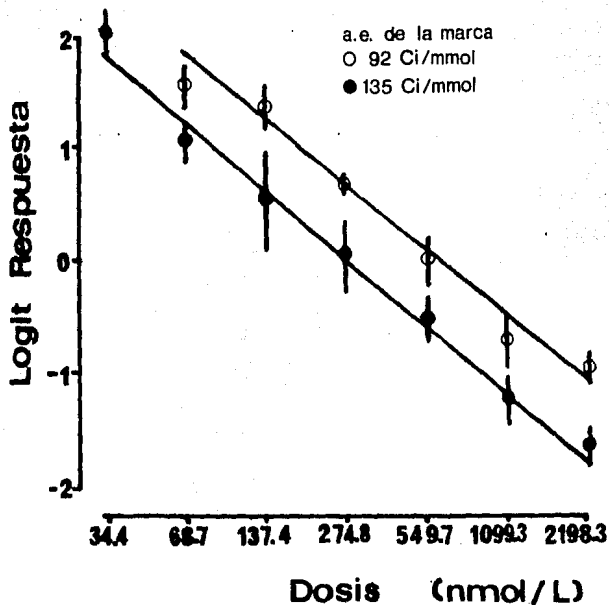


FIGURA 17: Curvas dosis-respuesta empleando hormonas de diferente actividad específica (círculos claros: 92 Ci/mmol, círculos oscuros: 135 Ci/mmol). Se observa una menor dosis al 50% en la curva en la que se empleó la mayor actividad específica, demostrando así un aumento en la sensibilidad del análisis.

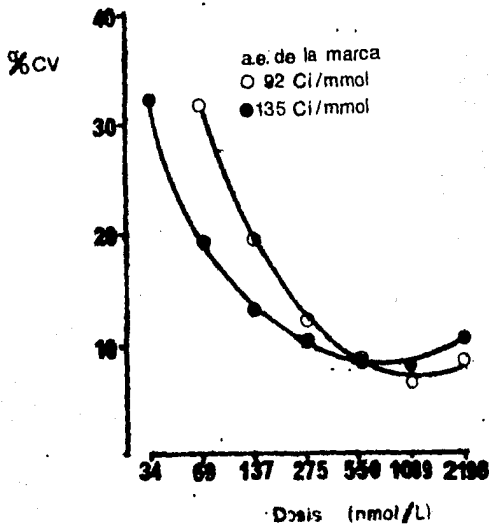


FIGURA 18: Perfil de imprecisión de las curvas dosis-respuesta empleando testosterona de diferentes actividades específicas.

#### 4.2.5 CORRELACION ENTRE LOS VALORES DE I OBTENIDOS EN HOMBRES Y EN MUJERES NORMALES POR RIA EN FASE LIQUIDA Y EN FASE SOLIDA

Los resultados de la cuantificación de testosterona total en el suero de mujeres y hombres normales, tanto por RIA en fase sólida, como por RIA en fase líquida se muestran en la figura 19, donde se grafican en las abscisas los valores obtenidos en el RIA en fase líquida y en las ordenadas los valores obtenidos para las mismas muestras en el RIA en fase sólida. Se obtuvo un coeficiente de correlación de  $r=0.95$  y una recta cuya ecuación fue  $y=1.11x + 0.07$  para un grupo de 38 muestras.



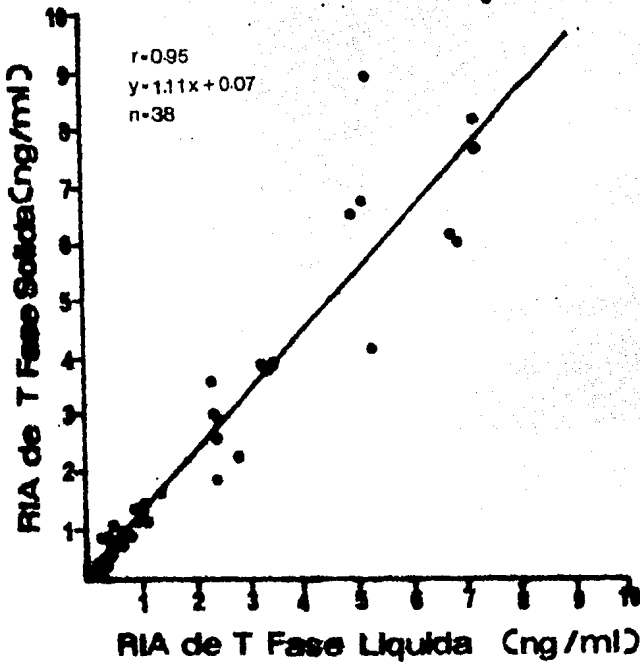


FIGURA 19: Correlación entre los valores de testosterona total en suero obtenidos por RIA en fase sólida y en fase líquida.

4.2.6 RESULTADO DE LA CUANTIFICACION DE LA FRACCION LIBRE DE T EN SUERO

Los resultados obtenidos en la cuantificación de la fracción libre de T en suero se muestran en la tabla 5. Se observa que al incrementarse el tiempo de incubación, los valores teóricos que

corresponderían a la fracción libre de T aumentan. Por ello se decidió calcular el valor de la constante de equilibrio del antisuero, con el objeto de encontrar si este era adecuado para el estudio. Para el cálculo de dicha constante se utilizó la gráfica de Scatchard (ver figura 20) [57], mediante la cual se obtiene el valor de las constantes de afinidad ( $K_a$ ) y disociación ( $K_d$ ). La constante de equilibrio del antisuero ( $K$ ) es la relación entre ambas ( $K_a/K_d$ ) [28].

Tabla 5. Valores de T "libre" (pg/ml) en 4 muestras de suero variando el tiempo de la primera incubación.

MUESTRA		1	2	3	4
TIEMPO					
1	minuto	181	36	25	45
3	minutos	103	50	29	147
5	minutos	86	73	30	99
15	minutos	355	95	334	510
30	minutos	548	61	266	1172
60	minutos	259	458	720	270

#### 4.2.7 CORRELACION ENTRE LOS VALORES DE I EN SALIVA Y I TOTAL EN EL SUERO DE MUJERES NORMALES Y MUJERES HIRSUTAS

La cuantificación de T en la saliva tanto en mujeres normales como en mujeres hirsutas se muestra en la figura 21. Se puede apreciar una ligera diferencia entre la media de ambos grupos, aunque en los dos casos, esta diferencia no es estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ). Los valores obtenidos en saliva por el

método en fase sólida, corresponden a los reportados en la literatura [32].

En la figura 22 observamos la correlación que se encontró entre los valores de T obtenidos en suero y en saliva, tanto en pacientes normales, como en pacientes hirsutas. Como lo muestra la figura, sólo 2 de los valores obtenidos por ambos métodos sobrepasan los valores normales superiores (líneas punteadas). El coeficiente de correlación fue de  $r=0.62$ , y la ecuación de la recta obtenida fue  $Y = 6.01X + 62.65$ , para  $n = 19$  muestras.

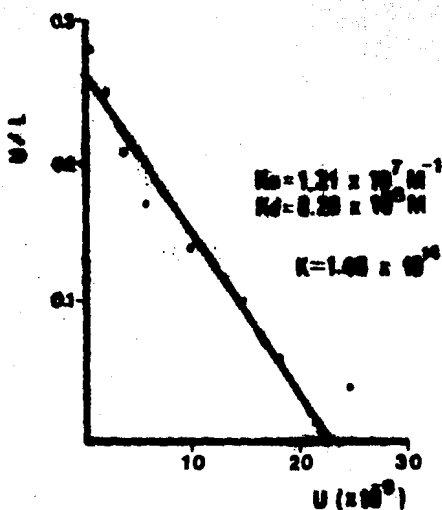


FIGURA 20. Gráfica de Scatchard mediante la cual se calculan los valores de las constantes de afinidad ( $K_a$ ) y disociación ( $K_d$ ) del antisuero. La constante de equilibrio ( $K$ ) resulta de la relación entre ambas ( $K = K_a/K_d$ ).

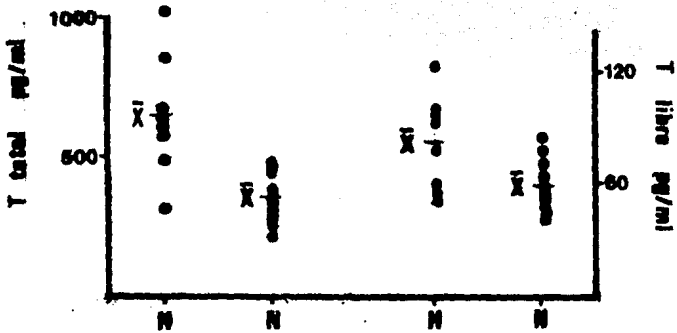


FIGURA 21. Concentración de T en suero y en saliva de mujeres normales (N) y mujeres hirsutas (H). La concentración de T total en suero fue cuantificada por RIA en fase líquida, y la concentración de T en saliva por RIA en fase sólida.

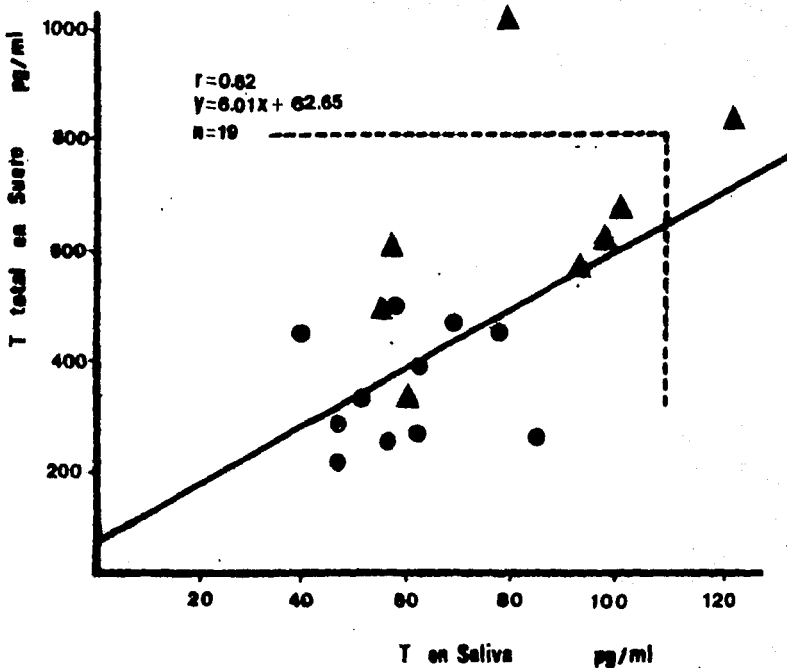


FIGURA 22. La correlación que existe entre los valores de T total en suero y en saliva de mujeres normales (círculos) y mujeres hirsutas (triángulos)  $r=0.62$ ,  $n=19$ ,  $Y=6.01X+62.65$ .

## CAPITULO V

### DISCUSION

#### 5.1 EVALUACION DEL DESARROLLO Y OPTIMIZACION DEL RIA EN FASE SOLIDA

##### 5.1.1 MATERIALES

Al comparar los valores de unión máxima obtenidos para los tres materiales empleados (tabla 1), se observó que la capacidad de acoplamiento del As que presentó el vidrio fue muy inferior a la que presentaron el poliestireno y el polipropileno. Por esta razón, el empleo del vidrio como matriz sólida se descartó del estudio. La capacidad de acoplamiento del As del poliestireno y el polipropileno resultaron ser semejantes en ese mismo experimento, por lo que se realizó una segunda comparación entre estos materiales. El poliestireno mostró tener una mayor capacidad para unir al As que el polipropileno (fig. 13), además de que los valores de los duplicados en los tubos de poliestireno presentaron una menor dispersión que los duplicados en los tubos de polipropileno. Se seleccionó por lo tanto el poliestireno como el material más adecuado para el acoplamiento del As.

##### 5.1.2 INCREMENTO Y ESTABILIZACION DE LA UNION DEL AS A LA MATRIZ SOLIDA

Una vez que se contó con la matriz sólida más adecuada, se planteó la posibilidad de incrementar la unión del As mediante el empleo de soluciones más concentradas de GA. Por otra parte, en el

mismo experimento, se buscó dar mayor estabilidad a dicha unión (fig. 4) mediante la adición de un agente reductor como el metabisulfito de sodio (MBS). Se observó un aumento notable en la unión máxima (fig. 14) hasta la concentración de GA al 5%. Por otra parte, en concentraciones mayores, el aumento de la UNE fue considerable. Por lo tanto, se decidió emplear una solución de GA al 5% en la activación de los tubos. Se observó también un aumento en la unión máxima en los tubos a los que se les adicionó la solución reductora, lo cual implica la estabilización de la unión del As a la matriz sólida debido a la reducción de la doble ligadura de la base de Schiff.

### 5.1.3 EL EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL AS

Una de las variables más difíciles de manejar es la del título del As después de su acoplamiento a la matriz sólida. En este caso, al aumentar el título del As empleado en el acoplamiento, se elevó también la unión máxima. Se consideró que la dilución de 1:20000 sería adecuada, ya que el porcentaje de unión que permitió esta dilución, proporcionaría un intervalo adecuado para el desplazamiento de la curva dosis-respuesta. Un exceso de As se podría haber reflejado en una pérdida tanto de título "real", como de la sensibilidad del análisis. Por otra parte, el As en esta dilución demostró ser adecuado para reutilizarse en una segunda activación.

### 5.1.4 LA SENSIBILIDAD DEL METODO

Las condiciones experimentales que se evaluaron con el objeto de mejorar la sensibilidad del método, se enfocaron principalmente a la disminución de la UNE, con el objeto de incrementar el intervalo de la curva dosis-respuesta. A este respecto, se ha

reportado que es posible disminuir la UNE efectuando enjuagues repetidos, y empleando las menores concentraciones de antígeno marcado (que posea la mayor a.e. posible)[28,29]. En este estudio, un enjuague probó ser lo ideal, y la concentración de T tritiada que se empleó fue la de 10000cpm/0.1ml, equivalentes a 0.0667 pmol de T con a.e. de 135 Ci/mmol, la cual demostró dar mayor sensibilidad a la curva dosis-respuesta, reconociendo una menor dosis al 50% (fig. 17).

#### 5.1.5 LA VARIACION DEL VOLUMEN DE ACTIVACION

El volumen de activación ideal será aquel en el cual, para la cantidad de hormona tritiada que se esté utilizando, un aumento en el volumen de activación no implique un aumento en el porcentaje de unión máxima. En este estudio no se llegó a este volumen, ya que con los volúmenes empleados el porcentaje de unión continuó elevándose significativamente (fig. 15).

#### 5.1.6 LA ESTABILIDAD DEL ANTISUERO

El As unido a la matriz sólida mostró tener la misma capacidad de unión aún después de 18 meses de preparada la fase sólida (fig. 16). Mantuvo también su especificidad, ya que la reacción cruzada que presentó en contra de dos analitos similares a la T fue muy parecida a la reportada por RIA en fase líquida.

#### 5.2 VALIDACION DE LA METODOLOGIA DESARROLLADA

Los criterios que se emplearon para la validación de la metodología desarrollada fueron el control de calidad y la correlación que mostró el método en fase sólida con un método de rutina en fase líquida. Los coeficientes de variación que presentó el método para los controles de calidad, tanto intra, como



interanálisis, se encuentran dentro de los límites permisibles en este tipo de análisis (para el intraanálisis menores al 10% y para el interanálisis menores al 15%). La correlación que mostró el RIA en fase sólida, con el RIA de rutina en fase líquida fue de  $r = 0.95$  para 38 muestras, lo cual da un elevado índice de confiabilidad a los resultados obtenidos por el RIA en fase sólida.

### 5.3 LA CUANTIFICACION DE LA FRACCION LIBRE DE T EN SUERO

La concentración obtenida de T libre en el suero no fue constante en los tiempos de incubación planteados, lo cual nos indica que lo que se cuantificó no corresponde a los valores de la fracción libre (al menos comparados con los reportados en la literatura [32]), sino que se sobreestimaron. No se ha establecido la razón de esta circunstancia, sin embargo, se mencionan a continuación dos factores que pudieron interferir en esta cuantificación: 1) El efecto que pudieron ejercer los lípidos u otros elementos presentes en el suero, es decir; si alguno de estos elementos se uniera inespecíficamente al As, bloqueando sus sitios de unión, impediría que la hormona tritiada se uniera al mismo, provocando una sobreestimación de la fracción libre. 2) La constante de equilibrio del As fue de  $K = 1.46 \times 10^{14}$ , mientras que, como se había mencionado anteriormente, la constante de equilibrio esperada (el inverso de la concentración de la hormona a ser cuantificada) sería del orden de  $10^{12}$ . La elevada afinidad del As no sólo promueve la unión de la fracción libre a este, sino que también provoca un desequilibrio entre la fracción libre y la fracción unida a las proteínas acarreadoras, lo cual nos llevaría también a una sobreestimación.

#### 5.4 APLICACION DEL METODO DESARROLLADO EN LA CUANTIFICACION DE T EN SALIVA DE MUJERES NORMALES Y MUJERES HIRSUTAS, LA CORRELACION ENTRE ESTOS VALORES Y LOS OBTENIDOS DE T TOTAL EN SUERO POR RIA EN FASE LIQUIDA

Los resultados obtenidos de T en saliva se pueden correlacionar con los reportados en la literatura [32]. En el caso de las mujeres con hirsutismo, no se pudo demostrar en todas un exceso en la producción de T, por ninguno de los dos métodos, lo cual nos hace pensar que el hirsutismo se debe a causas genéticas, o a un exceso en la conversión de T a DHT a nivel de órgano blanco. La correlación que se encontró entre los valores en suero y en saliva fue buena,  $r = 0.62$ , y es similar a la reportada en la literatura  $r = 0.73$ .

## CAPITULO VI

### CONCLUSIONES

6.1 MEDIANTE LA EVALUACION DE DIVERSAS CONDICIONES EXPERIMENTALES, SE LLEGO AL DESARROLLO DE UN RADIOINMUNOANALISIS EN FASE SOLIDA, EL CUAL POSEE CARACTERISTICAS DE SENSIBILIDAD, PRECISION, ESPECIFICIDAD Y REPRODUCIBILIDAD SIMILARES A LAS REPORTADAS PARA EL RADIOINMUNOANALISIS EN FASE LIQUIDA.

6.2 EL RIA EN FASE SOLIDA DESARROLLADO ES CAPAZ DE CUANTIFICAR TANTO LA T TOTAL EN EXTRACTOS DE SUERO, COMO LA T EN SALIVA (EQUIVALENTE A LA FRACCION LIBRE DEL PLASMA).

6.3 QUEDA ABIERTA LA POSIBILIDAD DE QUE POR MEDIO DE ESTA METODOLOGIA, EMPLEANDO TANTO LOS REACTIVOS, COMO LAS CONDICIONES ADECUADAS, SE PUEDA LLEGAR A LA CUANTIFICACION DE LA FRACCION LIBRE DE LAS HORMONAS ESTEROIDES DIRECTAMENTE EN EL SUERO.

6.4 EL AS ADOPLADO A LA MATRIZ SOLIDA PRESENTA UNA ESTABILIDAD MUY PROLONGADA, LO CUAL NOS PERMITE PENSAR TANTO EN SISTEMAS AUTOMATIZADOS, COMO EN LA PREPARACION DE LOTES QUE PUEDAN SER EMPLEADOS A LARGO PLAZO, SIN EL DETERIORO DE LAS CARACTERISTICAS DEL METODO.

6.5 ESTE RIA EN FASE SOLIDA ES APLICABLE A SITUACIONES CLINICAS ESPECIFICAS QUE REQUIERAN RESULTADOS CONFIABLES EN UN MINIMO DE TIEMPO.

6.6 LA METODOLOGIA DESARROLLADA ES SUSCEPTIBLE DE SER APLICADA TAMBIEN A OTROS SISTEMAS QUE PRETENDAN LA CUANTIFICACION DE OTRAS MOLECULAS DE BAJO PESO MOLECULAR.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) NABARRO, J.D.N, METHODS, BRITISH MEDICAL BULLETIN, 30 (1974) 1,2.
- 2) EKINS, R.P., CLIN. CHIM. ACTA, 5 (1960) 453-459.
- 3) YALOW, R.S. & BERSON, S.A., J. CLIN. INVEST., 39 (1960) 1157-1175.
- 4) EKINS, R.P., BASIC PRINCIPLES AND THEORY, BRITISH MEDICAL BULLETIN, 30 (1974) 3-11.
- 5) ROTHENBERG, S.P., NATURE (LOND.), 206 (1965) 1154-1156.
- 6) YALOW, R.S., RADIOIMMUNOASSAY OF HORMONES. IN: WILLIAMS TEXTBOOK OF ENDOCRINOLOGY, 7TH ED., W.B. SAUNDERS COMPANY, PHILADELPHIA (1985) pp. 123-132.
- 7) EKINS, R.P., CURRENT CONCEPTS AND FUTURE DEVELOPMENTS. IN: ALTERNATIVE IMMUNOASSAYS, JOHN WILEY & SONS, LTD, USA (1985) pp. 219-237.
- 8) NIESCHLAG, E., AND WICKINGS, E.J., A REVIEW OF RADIOIMMUNOASSAY FOR STEROIDS, Z. KLIN. CHEM. KLIN. BIOCHEM. (1975) 261-271.
- 9) NAKAO, T., PRACTICAL PROCEDURE FOR ENZYME IMMUNOASSAY OF PROGESTERONE IN BOVINE SERUM, ACTA ENDOCRINOLOGICA, 93 (1980) 223-227.
- 10) WIDE, L., SOLID PHASE RADIOIMMUNOASSAYS. IN: RADIOIMMUNOASSAY AND RELATED PROCEDURES IN MEDICINE, INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, VIENNA, 1 (1977) 143-154.
- 11) CATT, K., TREGEAR, G.W., SOLID PHASE RADIOIMMUNOASSAY IN ANTIBODY-COATED TUBES, SCIENCE, 158 (1967) 1570-1571.
- 12) GOLDSTEIN, D.P., FACS, F., PASTORFIDE, G.B., OSATHANONDH, R., AND KOSASA, T.S., A RAPID SOLID-PHASE RADIOIMMUNOASSAY SPECIFIC FOR HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN IN GESTATIONAL TROPHOBLASTIC DISEASE, OBSTET. GYNECOL., 45 (1975) 527-530.
- 13) DIGHE, K.K., AND HUNTER, W.M., A SOLID-PHASE RADIOIMMUNOASSAY FOR PLASMA PROGESTERONE, BIOCHEM. J., 143 (1974) 219-231.
- 15) TURKES, A., TURKES, A.O., JOYCE, B.G., READ, G.F. AND RIAD-FAHMY, D., SENSITIVE SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY FOR TESTOSTERONE IN PLASMA AND SALIVA, STEROIDS, 33 (1979) 347-359.

15) EADY, R.P., CHAPPLE, J.C., HOUGH D.W. AND STEVENSON, G.T., THE SPECIFICITY OF A SOLID PHASE RADIOIMMUNOASSAY FOR HUMAN IMMUNOGLOBULINS, JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, 7 (1975) 179-186.

16) SALOMON-ANDONIE, J. Y GARZA-FLORES, J., HACIA LA AUTOMATIZACION DEL RADIOIMMUNOANALISIS. EN: XXV REUNION ANUAL DE LA SOCIEDAD NACIONAL DE NUTRICION Y ENDOCRINOLOGIA, MAZATLAN, SIN., (1985) p. 2.

17) GARZA-FLORES, J. AND STAFFORD, J.E.H., SOLID-PHASE RADIOIMMUNOASSAY FOR NORETHISTERONE, CLIN. CHIM. ACTA, 93 (1979) 269-277.

18) KALMAKOFF, J., PARKINSON, A.J., CRAWFORD A.M., AND WILLIAMS, B.R.G., SOLID PHASE RADIOIMMUNOASSAYS USING LABELLED ANTIBODIES: A CONCEPTUAL FRAMEWORK FOR DESIGNING ASSAYS, JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, 14 (1977) 73-84.

19) HUNTER, W.M., SIMPLIFIED SOLID-PHASE RADIOIMMUNOASSAY WITHOUT CENTRIFUGATION, ACTA ENDOCRINOLOGICA, 85 (1977) SUPPL. 212, 260.

20) PAINTER, K., STONECIPHER, T.E., THE DEVELOPMENT OF A FULLY AUTOMATED RADIOIMMUNOASSAY INSTRUMENT BASED UPON SOLID-PHASE, ANTIBODY-COATED TUBES. IN: RADIOIMMUNOASSAY AND RELATED PROCEDURES IN MEDICINE, INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, VIENNA, 1 (1977) 211-220.

21) ANSARI, A.A., BAHUGUNA L.M. AND MALING, H.V., COMPARISON OF DOUBLE ANTIBODY AND SOLID-PHASE RADIOIMMUNOASSAYS, JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, 23 (1978) 219-226.

22) BODLEY, F.M., CHAPDELAINE, A., FLICKINGER, G., MIKHAIL, G., YAVERBAUM, S., ROBERTS, K.D., STEROIDS, 21 (1973) 1.

23) von KLITZING, L., SCHULTEK, T., STRASBURGER, C.J., FRICKE, H., WOOD, W.G., COMPARISON BETWEEN ADSORPTION AND COVALENT COUPLING OF PROTEINS TO SOLID PHASES. IN: RADIOIMMUNOASSAY AND RELATED PROCEDURES IN MEDICINE, INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, VIENNA, 1 (1982) 57-68.

24) CHAPMAN R.S., AND RATCLIFFE, J.G., COVALENT LINKAGE OF ANTISERA TO PARTICULATE CELLULOSE USING 1-1'-CARBONYLDIIMIDAZOLE, A RAPID, PRACTICAL METHOD WITH POTENTIAL USE IN SOLID PHASE IMMUNOASSAY, CLIN. CHIM. ACTA, 118 (1982) 129-134.

25) BARRET, M.J., LeMAT, B. AND CHOW, S., ANTIBODIES COUPLED TO THE INSIDE OF PLASTIC TEST TUBES AND THEIR USE IN A RADIOIMMUNOASSAY FOR SERUM THYROXINE, CLINICAL CHEMISTRY, 21 (1975) 1011.

26) HABEEB A.F.S.A. AND HIRAMOTO, R., REACTIONS OF PROTEINS WITH GLUTARALDEHIDE, ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, 126 (1968) 16-26.

27) ADLES, G., RUF, J., BENKIRANE, M. et al, CELL MEMBRANE COATING WITH GLUTARALDEHYDE: APPLICATION TO A VERSATILE SOLID-PHASE ASSAY FOR THYROID MEMBRANE PROTEINS AND MOLECULES INTERACTING WITH THYROID MEMBRANES, ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 148 (1985) 320-327.

28) EKINS, R., THE PHYSIOLOGICAL SIGNIFICANCE AND MEASUREMENT OF FREE HORMONES IN BLOOD. IN: RADIOIMMUNOASSAY AND RELATED PROCEDURES IN MEDICINE, INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, VIENNA, 1 (1982) 191-219.

29) EKINS, R., FREE HORMONES IN BLOOD: THE CONCEPT AND THE MEASUREMENT, JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOASSAY, 7 (1984) 163-180.

30) NISULA, B.C. AND DUNN, J.F., MEASUREMENT OF THE TESTOSTERONE BINDING PARAMETERS FOR BOTH TESTOSTERONE-ESTRODIOL BINDING GLOBULIN AND ALBUMIN IN INDIVIDUAL SERUM SAMPLES, STEROIDS, 34 (1979) 771-791.

31) MNANJEE AND WHEELER, M.J., PLASMA FREE TESTOSTERONE-IS AN INDEX SUFFICIENT?, ANN. CLIN. BIOCHEM., 22 (1985) 387-390.

32) LUISI, M., et al, RADIOIMMUNOASSAY FOR FREE TESTOSTERONE IN HUMAN SALIVA, JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY, 12 (1980) 513-516.

33) ANDERSON, D.C., SEX HORMONE-BINDING GLOBULIN, CLIN. ENDOCRINOL., 3 (1974) 69-96.

34) VINNING, R.F., MCGINLEY, R.A. AND SYMONS, R.G., HORMONES IN SALIVA: MODE OF ENTRY AND CONSEQUENT IMPLICATIONS FOR CLINICAL INTERPRETATION, CLIN. CHEM., 29 (1983) 1752-1756.

35) KHAN-DAWOOD, F.S., CHOE J.K. AND DAWOOD, Y., SALIVARY AND PLASMA "FREE" TESTOSTERONE IN MEN AND WOMEN, AM. J. OBSTET. GYNECOL., 148 (1984) 441-445.

36) CHEARSKUL, S., RINCON-RODRIGUEZ, I., SUFI, S.B., DONALDSON, A., JEFFCOATE, S.L., SIMPLE DIRECT ASSAYS FOR MEASURING OESTRADIOL AND PROGESTERONE IN SALIVA. IN: RADIOIMMUNOASSAY AND RELATED PROCEDURES IN MEDICINE, INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, VIENNA, 1 (1982) 265-274.

37) WU, C.H., PLASMA FREE AND PROTEIN BOUND TESTOSTERONE IN HIRsutISM, OBSTETRICS AND GYNECOLOGY, 60 (1982) 188-194.

38) GRIFFIN, J.E. AND WILSON, J.D., DISORDERS OF THE TESTES AND MALE REPRODUCTIVE TRACT. IN: WILLIAMS TEXTBOOK OF ENDOCRINOLOGY, 7TH ED., W.B. SAUNDERS COMPANY, PHILADELPHIA, (1985) pp. 259-311.

39) EIK-NES K.B., BIOSYNTHESIS AND SECRETION OF TESTICULAR STEROIDS. IN: HANDBOOK OF PHYSIOLOGY, WILLIAMS AND WILKINS, BALTIMORE, (1975) pp. 95-116.

- 40) MORRIS, M.D., CHAIKOFF, I.L., THE ORIGIN OF CHOLESTEROL IN LIVER, SMALL INTESTINE, ADRENAL GLAND AND TESTIS OF THE RAT: DIETARY vs. ENDOGENOUS CONTRIBUTIONS, J. BIOL. CHEM., 234 (1959) 1095-1097.
- 41) BROOKS, R.V., ANDROGENS, CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 4 (1975) 503-520.
- 42) JUDD, H.L., YEN, S.S.C., SERUM ANDROSTENEDIONE AND TESTOSTERONE LEVELS DURING THE MENSTRUAL CYCLE, J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 36 (1973) 475-481.
- 43) SANTEN, R.J., PAULSEN, C.A., HYPOGONADOTROPIC EUNUCHOIDISM II. GONADAL RESPONSIVENESS TO EXOGENOUS GONADOTROPINS, J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 36 (1973) 55-63.
- 44) WANG, C., PAULSEN, C.A., HOPPER, B.R., et al, ACUTE STEROIDGENIC RESPONSIVENESS TO HUMAN LUTEINIZING HORMONE IN HYPOGONADOTROPIC HYPOGONADISM, J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 51 (1980) 1269-1273.
- 45) JOHNSON, S.G., MAINTENANCE OF SPERMATOGENESIS INDUCED BY HMG TREATMENT BY MEANS OF hCG TREATMENT IN HYPOGONADOTROPIC MEN, ACTA ENDOCRINOL., 89 (1978) 763-769.
- 46) BARANESKY, N., CARLSON, H.E., PERSISTENCE OF SPERMATOGENESIS IN HYPOGONADOTROPIC HYPOGONADISM TREATED WITH TESTOSTERONE, FERTIL. STERIL., 34 (1980) 477-482.
- 47) ROWE, R.C., SCHROEDER, M.L., FAIMAN, C., TESTOSTERONE INDUCED FERTILITY IN A PATIENT WITH PREVIOUSLY UNTREATED KALLMANN'S SYNDROME, FERTIL. STERIL., 40 (1983) 400-401.
- 48) JARAMILLO, C.J., CHARRO-SALGADO, A.L., PEREZ INFANTE, V., et al, CLINICAL STUDIES WITH D-TRP<sup>6</sup>-LUTEINIZING HORMONE-RELEASING HORMONE IN MEN WITH HYPOGONADOTROPIC HYPOGONADISM, FERTIL. STERIL., 30 (1978) 430-435.
- 49) GUITELMAN, A., MANCINI, A.M., APARICIO, N.J., et al, D-LEUCINE-6-LUTEINIZING HORMONE-RELEASING HORMONE ETHYLAMIDE IN PATIENTS WITH HYPOGONADOTROPIC HYPOGONADISM WITH ANOSOMIA, FERTIL. STERIL., 32 (1979) 308-311.
- 50) SMITH, R., DONALD, R.A., ESPINER, E.A., et al, NORMAL ADULTS AND SUBJECTS WITH HYPOGONADOTROPIC HYPOGONADISM RESPOND DIFFERENTLY TO D-SER(TBU)6-LH-RH-EA10, J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 48 (1979) 167-170.
- 51) CROWLEY, W.F. Jr., BERTINS, I.Z., VALE, W., et al, THE BIOLOGIC ACTIVITY OF A POTENT ANALOGUE OF GONADOTROPIN-RELEASING HORMONE IN NORMAL AND HYPOGONADOTROPIC MEN, N. ENG. J. MED., 302 (1980) 1052-1057.
- 52) ABRAHAM, G.E., SOLID-PHASE RADIOIMMUNOASSAY OF ESTRADIOL 17-B, J. CLIN. ENDOCR., 29 (1969) 866-870.



- 53) STEINER, M. AND SPRATT, J.L., SOLID-PHASE RADIOIMMUNOASSAY FOR MORPHINE, WITH USE OF AN AFFINITY-PURIFIED MORPHINE ANTIBODY, CLINICAL CHEMISTRY, 24 (1978) 339-342.
- 54) MOCTEZUMA, O., VILLANUEVA, C., GARZA-FLORES, J., OLART R.M. Y LARREA, F., IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE LOS PRODUCTOS DE RADIOYODACION DE LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS. I., REV. INVEST. CLIN. (MEX.) 36 (1984) 31-38.
- 55) RODBARD, D., RAYFORD, P.L., COOPER J.A. AND ROSS, G.T., STATISTICAL QUALITY CONTROL OF RADIOIMMUNOASSAYS, J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 28 (1968) 1412-1418.
- 56) KUBASIK, N.P., HALLAUER, G.D. AND BRODOWS, R.G., EVALUATION OF A DIRECT SOLID-PHASE RADIOIMMUNOASSAY FOR PROGESTERONE, USEFUL FOR MONITORING LUTEAL FUNCTION, CLIN. CHEM., 30 (1984) 284-286.
- 57) SCATCHARD, G., THE ATTRACTIONS OF PROTEINS FOR SMALL MOLECULES AND IONS, ANN. N.Y. ACAD. SCI., 51 (1949) 660-672.