

216
2 ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

“DESARROLLO DE UN SISTEMA DE LIBERACION
SOSTENIDA PARA ANDROGENOS”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE;

B I O L O G O

P R E S E N T A :

FERNANDO VEAYRA CABRERA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO D.F.

1990



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.

CONTENIDO

Página

I	CONTENIDO.....	1
II	RESUMEN.....	3
III	INTRODUCCION.....	4
IV	GENERALIDADES.....	8
	- Fisiología del Eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo....	8
	- Hipotálamo y la Hormona Liberadora de Gonadotrofinas.	9
	- Hipófisis y Células de Leydig.....	12
	- Hipófisis y Células de Sertoli.....	16
V	ANTECEDENTES.....	18
	- Terapia con andrógenos.....	18
	- Sistemas de Liberación Sostenida.....	20
VI	MATERIAL Y METODOS.....	22
	1. Estandarización del Método.....	22
	- Preparación de los cristales de Testosterona y 5 α -Dihidrotestosterona.....	23
	- Obtención de dos preparados inyectables.....	23
	- Control de calidad de los preparados experimentales..	23
	- Aprendizaje y estandarización de un método analítico para la cuantificación de Testosterona y hormonas relacionadas en fluidos y órganos biológicos.....	26
	2. Diseño Experimental.....	35
	- Efecto de la castración sobre la próstata y vesículas seminales y niveles plasmáticos de las hormonas circulantes en animales de laboratorio.....	37

- Evaluación de la actividad biológica de la formulación inyectable en ratas macho castradas, como terapia sustitutiva.....	37
VII RESULTADOS.....	39
VIII DISCUSION	55
IX CONCLUSIONES.....	60
X APENDICE.....	61
- Apéndice No. 1	62
- Apéndice No. 2	65
- Apéndice No. 3	66
- Apéndice No. 4	69
- Apéndice No. 5	71
- Apéndice No. 6	79
- Apéndice No. 7	85
- Apéndice No. 8	87
- Apéndice No. 9	89
- Apéndice No. 10	92
- Apéndice No. 11	94
- Apéndice No. 12	95
XI BIBLIOGRAFIA.....	96

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo principal, el diseñar una terapia sustitutiva para andrógenos, que tuviera la característica de liberación sostenida.

Las características farmacocinéticas de la formulación debían de ser tales que no produjeran "picos" de absorción y que el sistema de liberación del fármaco "in vivo" fuera del tipo "sostenido".

La tecnología empleada consistió en la producción de microcristales de andrógenos biológicamente activos, testosterona (T) y 5α -dihidrotestosterona (DHT), mantenidos en suspensión, en un vehículo de agua destilada. La evaluación de las características de disolución se hizo en modelos "in vitro" y en animales de experimentación (ratas macho castradas). La actividad biológica fue evaluada por bioensayo y por análisis de unión a proteínas transportadoras de hormonas sexuales en el plasma. La cuantificación de las concentraciones de las hormonas activas se hizo por radioinmunoanálisis específico.

El análisis de los resultados obtenidos permitió establecer que la aplicación de la formulación a dos tiempos diferentes (X_0 y X_1) mantenía o recuperaba las condiciones normales respectivamente y que las diferencias en los mismos se debieron a la dosis utilizada o a la reactividad de los órganos blanco, no obstante se demuestra la actividad biológica del esteroide. Se concluye en base a este estudio que es posible administrar T o DHT solas o en combinación a sujetos con una deficiente producción de andrógenos.

INTRODUCCION

Los andrógenos son un grupo particularmente complejo de hormonas esteroideas de estructura química variada, así como de diversos efectos biológicos. Se producen en diferentes glándulas endócrinas, siendo las principales los testículos, ovarios y las suprarrenales. Después de su secreción sufren diversas transformaciones metabólicas y los catabolitos son excretados fundamentalmente en la orina (1).

Los andrógenos cumplen un papel determinante en el desarrollo de las características sexuales masculinas, aún antes del nacimiento: la testosterona es responsable de la virilización de los conductos de Wolf, para formar el epidídimo, los conductos deferentes y las vesículas seminales (2).

La testosterona (T) es el andrógeno predominante y es producida y secretada por el testículo de la mayoría de las especies animales, incluyendo al hombre. En la actualidad se conoce el proceso de inducción, biosíntesis y mecanismo de acción de estas hormonas. En términos biológicos se define un andrógeno como aquella sustancia -natural o sintética, generalmente de estructura esteroide- capaz de producir el crecimiento del lóbulo ventral de la próstata en animales castrados.

De este conocimiento se deriva el concepto de órganos "blanco", que responden de manera específica y dependiendo de la dosis, a la acción de los andrógenos.

El efecto de estas hormonas es la inducción de la síntesis de proteínas específicas.

El mecanismo de acción de los andrógenos a nivel celular es mediado por una proteína específica denominada "receptor" que facilita la unión del esteroide al genoma celular y su consiguiente expresión (3). En la actualidad se considera que la fracción del esteroide no unido a estas proteínas del plasma, "libre", representa la porción del esteroide con actividad biológica (41).

El testículo de los mamíferos está compuesto de dos compartimientos anatómicos y funcionalmente bien caracterizados. Un compartimiento, el túbulo seminífero, es responsable de la espermatogénesis (función exócrina) y el segundo compartimiento, representado por las células de Leydig, es el encargado de la producción de los andrógenos (función endócrina). Aun cuando estos compartimientos están anatómicamente bien delimitados, existen una gran cantidad de interrelaciones bioquímicas entre ambos. El proceso de la espermatogénesis, solo puede iniciarse y mantenerse mediante la acción de los andrógenos, lo cual indica que el transporte de estas hormonas al compartimiento tubular es un prerrequisito para la producción ininterrumpida de las células germinales (4). La estimulación con andrógenos es particularmente importante para el desarrollo y mantenimiento de la capacidad fertilizante del espermatozoide en el epidídimo (5).

En los últimos años se ha demostrado que en estructuras periféricas dependientes de andrógenos, tales como la próstata, vesículas seminales, glándulas prepuciales, piel del área genital, etc., la testosterona (T) es transformada a 5α -dihidrotestosterona (DHT) para poder expresar su actividad biológica en forma completa. En el Sistema Nervioso Central, el hipotálamo y la hipófisis anterior son capaces de reducir la testosterona a DHT (6).

El mecanismo de control para la secreción de andrógenos por el testículo esta mediado por la concentración de T, Estradiol (E), DHT y por la aromatización de la T a E, en el hipotálamo y en la hipófisis, estructuras específicas que sintetizan y liberan las hormonas gonadotrópicas (LH y FSH) que tienen como función estimular las células de Leydig y Sertoli (7,8,9).

Este sistema de regulación por retroalimentación es sumamente complejo y aún a la fecha no se conocen exactamente todos los factores que influyen y participan en el proceso (10).

En el hombre, la deficiente producción de andrógenos se expresa por una serie de rasgos clínicos que varían dependiendo de la edad del individuo a la que ocurra la deficiencia y el tiempo de evolución del padecimiento. En general, los trastornos antes de la pubertad se expresan por una falta de desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y en el adulto por pérdida de las características sexuales ya adquiridas e infertilidad (11).

La andrógeno-dependencia sobre el comportamiento sexual es un fenómeno ubíquo entre los diferentes grupos de vertebrados. Estos principios interpolados al hombre son un reflejo de los conocimientos de la antigüedad, como el que la castración reducía la libido y la potencia sexual. En realidad, se producen respuestas variables en el hombre y en los animales (12) y en reportes aislados se han indicado las posibilidades de retener la actividad coital hasta los 16 años postcastración (13). En los estudios de Kinsey y col. (14) se niega el papel específico que tienen los andrógenos en el comportamiento sexual, relacionándose éste último a estímulos metabólicos específicos. Investigaciones más recientes han indicado que la testosterona tiene solo un papel subsidiario en la respuesta sexual (15). No obstante otros investigadores han estudiado la respuesta sexual en el humano a diferentes dosis de testosterona y han indicado una relación directa con las dosis utilizadas (16).

GENERALIDADES

FISIOLOGIA DEL EJE HIPOTALAMO

HIPOFISIS - TESTICULO

La interrelación hipotálamo-hipófisis-testículos es muy compleja, como lo demuestran estudios recientes. La interrelación del sistema se puede resumir en la figura 1 (17).

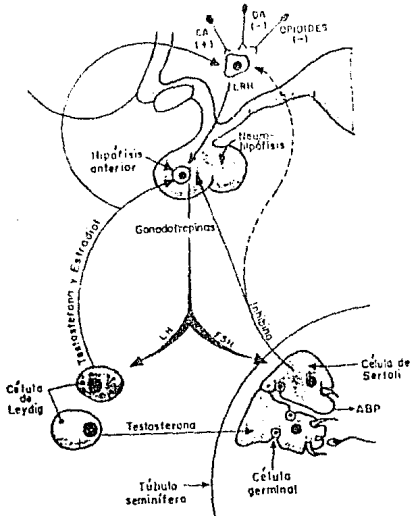


Figura 1. Representación esquemática del eje hipotálamo-hipófisis-testículo.

Componentes del sistema:

- 1.- Hipotálamo y la hormona liberadora de gonadotropinas.
- 2.- Hipófisis - células de Leydig.
- 3.- Hipófisis - células de Sertoli.

HIPOTALAMO Y LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS

Estudios recientes han resaltado la complejidad de las relaciones microvasculares entre el hipotálamo y la hipófisis. Los procesos neuroendócrinos permiten reconocer las señales internas y externas del medio ambiente para ser integradas por el cerebro y ser conducidas por vías neurohormonales, las cuales dirigen las secreciones de la hipófisis anterior, para las necesidades fisiológicas (18,19).

La circulación portal hipofisiaria permite una conexión entre el cerebro y la hipófisis; y la consiguiente transmisión de sustancias humorales. El neurotransmisor que controla la liberación de las hormonas gonadotrópicas (LH y FSH) es un decapeptido llamado Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH).

El hipotálamo es parte del diencefalo, localizado en la base del cerebro, formando el piso del tercer ventrículo y parte de la pared lateral. Dentro del hipotálamo se encuentran células neuro-peptidérgicas que promueven o inhiben la liberación hormonal.

Este proceso se conoce como neurosecreción. La GnRH es sintetizada en los ribosomas del citoplasma de las neuronas, empacada en gránulos hacia el Aparato de Golgi, transportada por flujo activo axonal hacia la neurona terminal y luego secretada hacia la circulación portal (Fig. 2) (19).

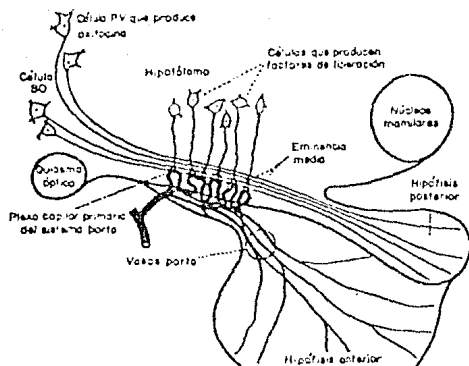


Figura 2. Relación entre el control nervioso y el control neurohormonal de la hipófisis anterior en la eminencia media del hipotálamo.

Hay varias vías a nivel del hipotálamo, por las cuales centros del cerebro pueden influir sobre la hipófisis. Estas vías incluyen los siguientes sistemas hipotalámicos:

- 1) El centro tónico a nivel del núcleo arcuato que controla la secreción de las hormonas gonadotrópicas.
- 2) Tanacitos, células neurales que conectan el sistema porta con el fluido cerebroespinal.
- 3) La vía de la hipófisis posterior.

El control del centro tónico, ubicado a nivel hipotalámico, está regulado por la testosterona, dihidrotestosterona y estradiol. Estas hormonas controlan los niveles de las gonadotropinas responsables de la retroalimentación negativa, sobre la liberación de la GnRH a nivel hipotalámico.

En el varón la célula blanco para la Hormona Luteinizante (LH) es la célula de Leydig del intersticio testicular, en tanto que para la Hormona Estimulante del Folículo (FSH) es la célula de Sertoli localizada en el túbulo seminífero.

La síntesis de estas gonadotropinas toma lugar a nivel del retículo endoplásmico rugoso. Las hormonas son empacadas y almacenadas en gránulos secretados por el Aparato de Golgi. La secreción requiere migración de los gránulos maduros hacia la membrana celular, donde se altera la permeabilidad y ocurre la salida de los gránulos por exocitosis; esto involucra cambios iónicos con Calcio y a nivel de AMPc en respuesta a la GnRH. Por lo tanto, esta hormona (GnRH) influye tanto en la secreción como en la reserva (19,20,21).

El mecanismo de retroalimentación negativo vía estradiol se debe a la aromatización de la testosterona a nivel hipotálamo por enzimas aromatasas (Fig.3) que actúan sobre un transmisor sináptico -la dopamina- que induce la producción de estos factores de liberación.

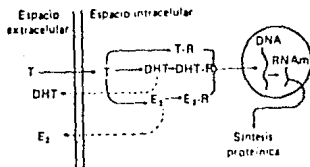


Figura 3. Mecanismo de acción de la Testosterona.

HIPOFISIS-CELULAS DE LEYDIG.

Cuando se descubrió la hormona en el macho, se le denominó hormona estimulante de las células intersticiales (ICSH), debido a su efecto sobre las células de Leydig. Actualmente se sabe que la LH y la ICSH son la misma hormona y son secretadas por las células basófilas PAS positivo en la hipófisis.

La LH como otras hormonas protéicas (FSH, TSH y HCG) contienen 2 cadenas, una alfa y otra beta. La subunidad alfa es idéntica a las otras hormonas, mientras la cadena beta es la que brinda las diferencias estructurales, funcionales y biológicas de cada una de estas hormonas (21,22).

La secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas al sistema portal hipofisiario es episódica y se relaciona con la liberación episódica de LH a la circulación, en una serie de pulsos de secreción que tienen amplitudes que oscilan entre 35 y 270 % de la línea de base; estos pulsos se producen con una frecuencia de 2 a 4 cada 6 horas. La acción principal de la LH es estimular la biosíntesis y secreción de testosterona en las células de Leydig.

Las células de Leydig son células poligonales de entre 15 y 30 μm , situadas en las áreas intersticiales, que constituyen el 5% del volumen testicular total. Estas células poseen una membrana plasmática que se caracteriza por sus pliegues y microvellosidades. Su organelo citoplasmático más prominente es el retículo endoplásmico liso (REL), formado por túbulos membranosos interconectados. Además, disperso entre el REL, aparecen RE rugoso y mitocondrias. El citoplasma contiene inclusiones de lípidos, cristales de Reinke y lisosomas (23).

La estimulación de LH para la síntesis y secreción de testosterona, se inicia con la unión de la LH a los receptores de membrana específicos a nivel de las células de Leydig (Fig.4). Las células de Leydig tienen también receptores para Prolactina los cuales potencian los efectos de la LH (23).

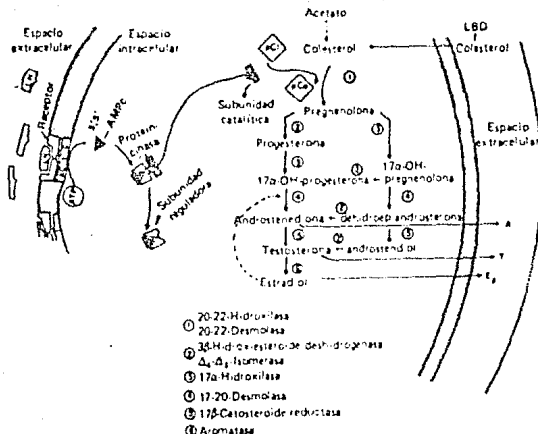


Figura 4. Mecanismo de acción de la LH y biosíntesis de andrógenos en la célula de Leydig.

La interacción de la LH con su receptor estimula la adenilato ciclasa ligada a la membrana, que cataliza la síntesis del Monofosfato Cíclico de Adenosina (AMPc) (24).

La adenilato ciclasa está formada por tres unidades: el receptor hormonal, que contiene el lugar específico para el reconocimiento de la LH; la unidad catalítica de adenil ciclasa, que convierte el ATP en AMPc y PP; y la subunidad reguladora guanil-nucléotido, que liga el GTP y une el receptor hormonal a la adenilato ciclasa.

Al liberarse el AMPc al citoplasma de la célula de Leydig se une a la subunidad reguladora de la proteína-quinasa que luego se disocia de la subunidad de esta enzima y la activa. Se cree que la subunidad catalítica de la proteína quinasa de la célula de Leydig activa un producto que, a su vez, facilita la conversión de colesterol a pregnenolona y la síntesis de andrógenos. (Fig. 5) (19,23,24). No obstante, la contribución del testículo como fuente de DHT es mínima, siendo sintetizada principalmente en tejidos periféricos como el hígado y la piel (22,25).

El metabolismo de la testosterona o de otro andrógeno se puede definir como su eliminación irreversible de la circulación como resultado de la modificación enzimática de su estructura esteroidea. Las reacciones enzimáticas más relevantes son la 5-alfa reducción y la aromatización, las cuales modifican la estructura de la testosterona (Fig.5).

El control o ritmo de síntesis y secreción de testosterona por las células de Leydig, depende fundamentalmente de la concentración de LH secretada a la circulación. La secreción de esta gonadotropina es recíprocamente controlada por la acción de los esteroides sexuales sobre el hipotálamo y la hipófisis.

Cuando los niveles de andrógenos aumentan en la sangre, disminuyen los niveles de LH, y cuando los niveles de andrógenos declinan, los niveles de LH aumentan. Fig-1 (17,21).

HIPOFISIS - CELULAS DE SERTOLI.

En la Fig. 1 se puede observar la relación de la hipofisis con la célula de Sertoli. La FSH, es producida y secretada a nivel de la hipófisis anterior en las células basófilas. Su producción, al igual que la de LH, depende de la GnRH, pero su liberación es solo una quinta parte de la de LH.

A diferencia de la LH, los niveles plasmáticos de FSH no fluctúan ampliamente a lo largo del día. Lo anterior se debe al aclaramiento metabólico más lento de la FSH.

El mecanismo de acción de la FSH es igual al de la LH: a nivel de membrana desencadena el sistema de la adenilato ciclasa (Fig. 3).

Al realizar una castración, se produce una elevación de la secreción de FSH, lo cual indica que un factor testicular controla la secreción de esta gonadotropina. Sin embargo, la administración de testosterona no produce mucho efecto sobre la secreción de FSH, lo que indica que es otro producto el responsable del control de su liberación. McCullagh fue el primero que nombró como "inhibina" a un producto testicular no esteroide encargado de la retroalimentación negativa de la FSH. Este producto es producido por las células de Sertoli, su lugar de acción es a nivel hipofisiario e hipotalámico, (21, 23, 26).

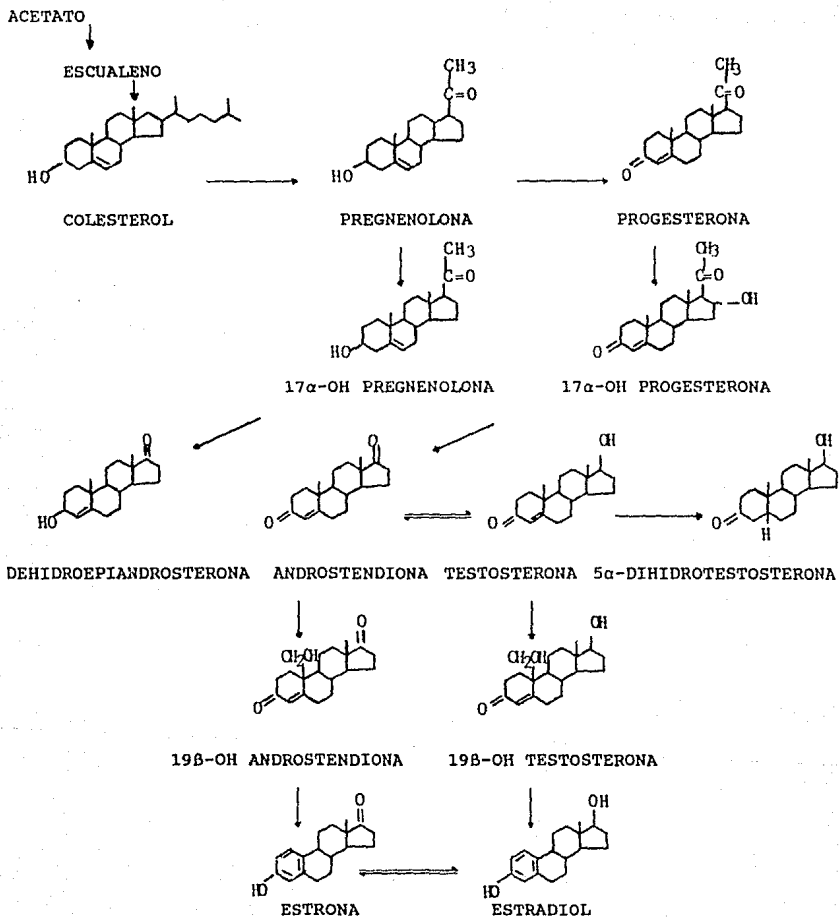


Figura 5. Síntesis de Testosterona en el testículo. Aparecen también la síntesis de 5 α -DHT y la aromatización a E₂.

ANTECEDENTES

TERAPIA CON ANDROGENOS.

El tratamiento sustitutivo con andrógenos se inició hace aproximadamente 40 años, después de que se logró la síntesis química de la testosterona. Sin embargo, el problema ha sido la vía de administración y la frecuencia con que se debe aplicar el tratamiento (27).

Debido a la gran capacidad metabólica del hígado, la testosterona pura administrada por vía digestiva es efectiva solo a dosis de 500 mg/día o mayores. Esta dosis es excesiva si se considera el hecho de que la producción diaria por un hombre adulto es de aproximadamente 7 mg (28).

Por este motivo otras vías de administración, así como modificaciones químicas a la estructura original del esteroide, han sido desarrolladas con objeto de proporcionar un sistema de liberación de la hormona que permita su aplicación como terapia sustitutiva crónica.

La 17 α -metiltestosterona fue la primera modificación estructural de la testosterona que manifestó un efecto androgénico a dosis bajas, cuando se administró por vía digestiva. Sin embargo, debido al grupo alquilo en la posición 17- α , este esteroide produjo manifestaciones tóxicas en el hígado, tales como colestasis, peliosis y en algunos casos hepatoma, cuando se

administró en forma crónica en animales de experimentación. Por este motivo su empleo en el humano no es recomendable. Existen algunos otros derivados sintéticos como la flumesterolona, con una gran potencia androgénica, pero al igual que la metiltestosterona es un 17-alquil derivado, con el mismo perfil toxicológico.

La mesterolona y el undecanoato de testosterona son dos compuestos con actividad hormonal que no producen efectos en el hígado de los sujetos tratados cuando se administran por vía digestiva. La máxima absorción de estos compuestos ocurre entre las 2 y 8 horas después de su ingestión, con una gran variabilidad en las concentraciones obtenidas en el plasma, por lo que deben darse de 2 a 3 dosis por día, lo cual los hace imprácticos para una terapia sustitutiva crónica (29).

La vía parenteral, en especial la intramuscular, es la que se emplea en forma más extensa. El compuesto que se administra es un éster de testosterona disuelto en un vehículo oleoso, a dosis de 100 a 250 mg para ser aplicado cada 10 a 14 días. Se han desarrollado varios ésteres, acoplado diversos ácidos grasos de cadena corta en la posición 17 del esteroide. El mecanismo de liberación del esteroide activo (Testosterona) esta condicionado por su velocidad de desesterificación y por el coeficiente de partición que se establece entre la solubilidad de la hormona en el vehículo oleoso y los fluidos biológicos.

Estas condiciones no se han podido controlar hasta la fecha, de tal forma que después de la aplicación de estos compuestos existe un "pico" de absorción temprana (12 a 14 hrs.), que generalmente excede a las concentraciones en plasma consideradas como fisiológicas. Este va decayendo en forma paulatina a una velocidad constante en función del tiempo (30).

Estos sistemas denominados de "depósito" no constituyen un enfoque racional a la sustitución hormonal debido a que no semejan la situación fisiológica buscada. Se han ideado otros sistemas de administración, como la aplicación percutánea de 5 α -dihidrotestosterona (125mg en 5g de gel), pero debido a su múltiple aplicación diaria (2 a 3 veces), se contraindica como un adecuado sistema de liberación sostenida de andrógenos (31, 32).

SISTEMAS DE LIBERACION SOSTENIDA

Los sistemas de liberación sostenida de fármacos representan en la actualidad una alternativa más apropiada para las terapias sustitutivas crónicas, ya que permiten la aplicación de dosis comparativamente menores a los sistemas de depósito, con una mayor cobertura de lo que se considera el nivel terapéutico del fármaco.

La ventaja de los sistemas de liberación sostenida es que son más eficientes en el mantenimiento de las concentraciones en el plasma de los sujetos tratados, evitando las fluctuaciones que se producen con los sistemas convencionales (33).

Se han desarrollado en otras áreas de la medicina, por ejemplo para el control de la fertilidad en la mujer, una serie de sistemas que tienden a proporcionar concentraciones constantes del fármaco en la circulación por períodos prolongados de tiempo, mediante el empleo de diversas técnicas, como implantes biocompatibles y polímeros biodegradables, principalmente (34). Estos sistemas tienen el inconveniente de que junto con el compuesto activo, se introduce un agente extraño al organismo, que aún cuando tenga las características de biocompatibilidad y degradación no deja de representar un riesgo toxicológico a largo plazo.

Un nuevo enfoque lo representan los cristales del esteroide puro, administrados en una suspensión acuosa, en un tamaño de partícula bien definido y con propiedades de disolución caracterizadas previamente (35,36). Este sistema aparenta ser una alternativa más racional para las terapias hormonales sustitutivas crónicas que las actualmente disponibles.

El objetivo principal del presente trabajo fue el diseñar una terapia sustitutiva para andrógenos que tuviera la característica de liberación sostenida y que las cualidades farmacocinéticas de su formulación fueran tales que no produjeran "picos" de absorción.

MATERIAL Y METODOS

El esquema de las actividades comprendidas en el presente trabajo se constituyó de acuerdo al siguiente orden:

1. ESTANDARIZACION DEL METODO.

- Preparación de los cristales de testosterona y de dihidrotestosterona.
- Obtención de dos preparados inyectables de testosterona y 5 α -dihidrotestosterona
- Control de calidad de los preparados experimentales:
 - a) Verificación del tamaño de las partículas
 - b) Disolución "in vitro".
 - c) Unión a proteínas transportadoras del plasma.
 - d) Control bacteriológico.
- Aprendizaje y estandarización de un método analítico para la cuantificación de testosterona y hormonas relacionadas en fluidos y órganos biológicos.

2. DISEÑO EXPERIMENTAL:

- Efecto de la castración sobre la próstata, vesículas seminales y niveles plasmáticos de las hormonas circulantes en animales de laboratorio.
- Evaluación de la actividad biológica de la formulación inyectable como terapia sustitutiva.

Preparación de los microcristales de
Testosterona y 5 α -Dihidrotestosterona

La preparación de los microcristales de Testosterona (T) y 5 α -Dihidrotestosterona (DHT), (Steraloids) fue mediante la fusión de los mismos y el posterior tamizaje sobre diversas mallas de acero hasta lograr el tamaño deseado; el procedimiento se encuentra referido en el Apéndice No. 1.

Obtención de dos preparados inyectables de
Testosterona y 5 α -Dihidrotestosterona

En base a los cristales ya purificados, se prepararon dos homogeneizados de T y DHT, y mediante técnicas de asepsia se introdujeron en jeringas para su aplicación intramuscular y después fueron enviadas a esterilizar. Apéndice No. 2.

Control de calidad de los preparados experimentales

Luego del proceso de esterilización de cada preparado experimental, se procedió al control de calidad consistente en:

- a) Verificación del tamaño de los microcristales de ambas hormonas, mediante técnicas de microscopía electrónica de transmisión, después del proceso de fusión-tamizaje.

b) Disolución "in vitro" de los microcristales.- El método consistió en la adición de 5 mg de cristales de esteroides de un tamaño ya definido a frascos de 100 ml que contenían una mezcla etanol-agua 50 % v/v para la disolución de (T). Se incubaron en un baño de agua a 37°C con agitación constante, para tomar muestras de 0.5 ml a los siguientes tiempos: 15, 30, 45, 60 y 90 minutos. La disolución de los cristales de andrógenos, fue analizada por espectrofotometría UV, utilizando una longitud de onda de 240 nm y los resultados se expresaron como \log_{10} del esteroide disuelto contra \log_{10} del tiempo. Técnica desarrollada por el grupo de investigación del Departamento de Biología de la Reproducción del INNSZ.

En el caso de los cristales de DHT, este método no pudo ser utilizado debido a la falta del doble enlace entre los carbonos 4 y 5 de su molécula.

c) Unión a SHBG.- La SHBG es una beta-globulina con un peso molecular entre 52,000 y 115,000. Esta proteína se une reversiblemente y con alta afinidad a la (T), principal andrógeno circulante biológicamente activo, entre un 97 y 99 %. Esta unión es de una alta afinidad (K , aproximadamente $10^8 M^{-1}$), es rápidamente reversible a 37°C y en el humano esta casi saturada, dado que la concentración molar de los sitios de unión de SHBG en el plasma de un hombre adulto es algo mayor que la concentración molar de T (37).

Se han reportado un gran número de estudios de la especificidad de esta unión en plasma diluido; y al igual que otras proteínas del plasma que se unen específicamente a esteroides, su afinidad es mayor a bajas temperaturas.

Entre los andrógenos existe una relación aparente entre su actividad biológica "in vivo" y su capacidad para unirse a la SHBG, esto es, entre más potente sea un andrógeno mayor será su unión a la SHBG. Es por ello que la DHT se une a la SHBG tres veces más que la T (37). Tomando en cuenta estas consideraciones sería posible concluir que la relación unido/libre de un esteroide será en última instancia el modulador periférico de su actividad biológica y la presencia de cualquier factor que lo altere repercutirá en los mecanismos de homeostasis hormonal.

El procedimiento seguido se encuentra desarrollado en el Apéndice No. 3.

- d) Control bacteriológico.- Prueba de esterilidad por método directo llevada a cabo por el Depto. de Control Analítico de la Facultad de Química, UNAM. Análisis: M-15-E-87.

Previo al ofrecimiento del preparado inyectable como terapia sustitutiva en humanos, el control de calidad debe incluir su bioensayo en animales de laboratorio (ratas), midiendo el efecto en el desarrollo de la próstata y vesículas seminales post-castración y post-aplicación.

En el presente trabajo se emplea exclusivamente la unión a la proteína transportadora de hormonas sexuales (SHBG) como bioensayo indirecto, dado que, como ya ha sido indicado previamente, existe una relación conocida entre la afinidad por esta proteína y la actividad biológica de los andrógenos, y por otro lado, el bioensayo en animales de laboratorio integra el cuerpo principal del presente trabajo, como primer paso experimental en el establecimiento de un sistema de liberación sostenida para andrógenos a ser aplicado en humanos con problemas hipogonádicos.

Aprendizaje y estandarización de un método analítico para la cuantificación de Testosterona, Dihidrotestosterona y hormonas Luteinizante y Estimulante del Folículo en suero sanguíneo.

La evaluación de las hormonas esteroides y gonadotrópicas fue llevada a cabo por Radioinmunoanálisis (RIA) de acuerdo al protocolo descrito por Fiet en 1981 (31) y se desarrolló de acuerdo a las siguientes fases:

- a) Purificación de las hormonas esteroides radiactivas.
- b) Marcaje de las hormonas protéicas por iodación.
- c) Caracterización del anticuerpo contra Testosterona.
- d) Obtención de una curva estándar para Testosterona y hormonas relacionadas.
- e) Obtención de un perfil de imprecisión para el RIA.
- f) Extracción de las hormonas esteroides del suero.
- g) Preparación de muestras para un programa de control de calidad interno del RIA.

PRINCIPIOS GENERALES EN RADIOINMUNOANALISIS (RIA)

El RIA es una técnica analítica que ha sido ampliamente utilizada desde su diseño por los doctores Berson y Yalow en 1959 (43). Los Radioinmunoensayos son ejemplos de ensayos estructurales dirigidos, en cuanto a que dependen de la interacción estereoquímica de una sección de la molécula a ser medida con otra molécula que reconoce específicamente dicha forma. Las moléculas de los anticuerpos son usadas generalmente como reactivos específicos ligantes en tales ensayos, pero otros agentes ligantes pueden ser también usados, como por ejemplo los receptores celulares (44).

Hay muchas variaciones en la metodología del RIA, pero el procedimiento básico es el siguiente:

A una muestra o extracto del fluido u órgano a ser analizado, que contenga una cantidad desconocida de la hormona a medir, se le agrega una cantidad conocida de hormona marcada. La mezcla se incuba con antisuero de capacidad de unión conocida, en un volumen que asegure que los sitios de unión en éste sean menores que la hormona marcada agregada; ésta es generalmente muy pequeña, comparada con la cantidad de hormona que se espera estará presente en la muestra.

Después de que la reacción ha alcanzado un equilibrio, las fracciones de hormona libre y hormona ligada al anticuerpo son separadas.

El trazador radiactivo permite que se pueda establecer una medición de la fracción de la hormona que se ha ligado. Debido a que la cantidad de anticuerpo presente en el tubo es fija, la masa de la hormona que se liga es también relativamente constante e independiente de la concentración de hormona a medir. La presencia de altas concentraciones de la hormona a medir en la muestra no puede aumentar la masa de la hormona ligada, porque la concentración de anticuerpos se mantiene constante. La presencia de concentraciones variables de la hormona a medir resulta por lo tanto, en una relación inversa de la hormona marcada agregada que se une al anticuerpo.

Si el trazador se comporta en la misma forma que la hormona fría, la distribución de hormona ligada y libre puede ser monitoreada, separando físicamente las dos fases y contando la radiactividad en cada una de ellas. La concentración de la hormona en una muestra puede ser obtenida comparando el trazador ligado al anticuerpo en la muestra con el trazador ligado al anticuerpo en soluciones estándar de la hormona que se está analizando.

Los pasos a seguir en la elaboración de un RIA pueden quedar ejemplificados en el siguiente diagrama de flujo (Fig.6) (44,45); y las técnicas empleadas en los radioinmunoensayos de T, DHT, LH y FSH están referidas en los Apéndices 2 y 3:

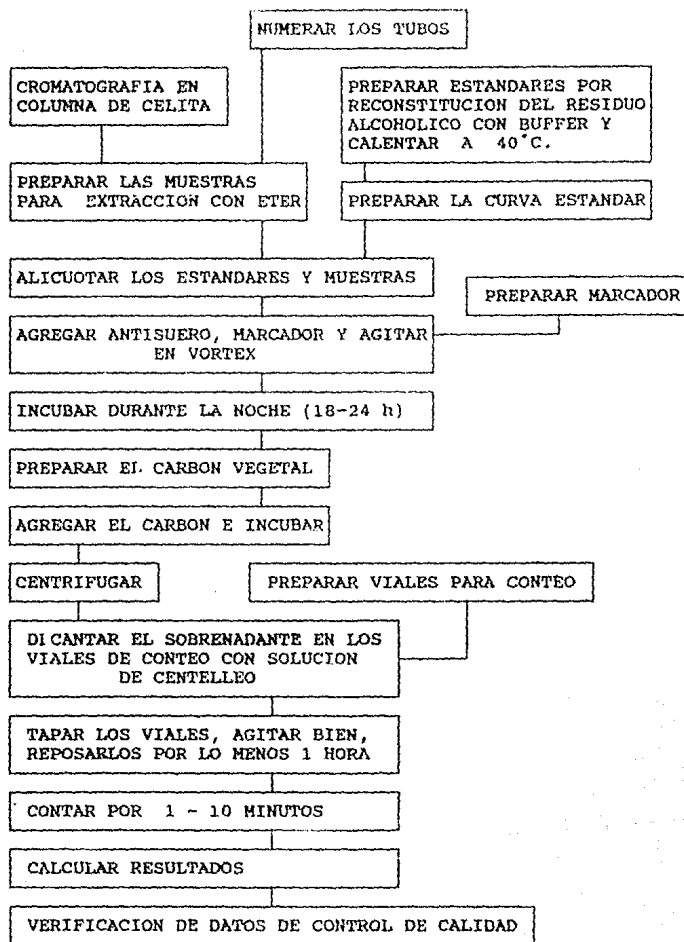


Figura 6. DIAGRAMA DE FLUJO DEL RADIOINMUNOANALISIS.

Los radioinmunoensayos son técnicas analíticas que reconocen conformaciones moleculares específicas; y no obstante su gran especificidad, es inevitable que por lo mismo, las moléculas que tengan formas similares puedan afectar el ensayo.

Frecuentemente sucede que antisueros producidos contra una hormona interactúan con otros compuestos relacionados en su conformación molecular, fenómeno conocido como "reacción cruzada". Un ejemplo es el caso de T con DHT, por lo que para evitar una alteración del resultado de la valoración, han de ser removidos los materiales que puedan interferir en el análisis. El grado en que una sustancia que ocasione una reacción cruzada altere el resultado final, será determinado por una serie de factores que influyen en el medio biológico, como sería el caso de sus concentraciones relativas y su afinidad por el antisuero (46,47). En el presente trabajo, este efecto fue contrarrestado mediante la previa separación cromatográfica de las hormonas.

PURIFICACION DE LAS HORMONAS RADIATIVAS POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA

El radioinmunoanálisis es una metodología que implica el uso de análogos radiactivos de los metabolitos que se quiera cuantificar. Una condición es que el análogo radiactivo sea estrictamente semejante y que no existan productos de descomposición interna (radiólisis). La forma de verificar esto es empleando la

cromatografía en columna, en la que se va a obtener un perfil determinado, de donde se tomará la fracción correspondiente al análogo radiactivo deseado (44,45,47). El proceso aparece en el Apéndice No.7.

MARCAJE DE LAS HORMONAS PROTEICAS POR RADIOIODACION

La iodación es una técnica mediante la cual se marca radiactivamente a una molécula (FSH o LH en nuestro caso). Consiste en adicionar uno o más átomos de yodo 125 (¹²⁵I) en los residuos de tirosina que contiene la hormona. Para conseguir dicho objetivo se empleó el método de Cloramina T - metabisulfito de sodio (48,49,50).

El desarrollo del método se expone en el Apéndice No. 8.

CARACTERIZACION DEL ANTICUERPO CONTRA TESTOSTERONA

El antisuero empleado fué el mismo utilizado en el programa de control de calidad externo del Departamento de Biología de la Reproducción del INNSZ promovido por el Programa Especial de Investigación en Reproducción Humana de la Organización Mundial de la Salud.

El antisuero fue desarrollado en conejo, empleando como inmunógeno Testosterona-BSA (T-3CHO-BSA). La especificidad del antisuero fue evaluada con experimentos de reacción cruzada empleando 6 diferentes ligandos no radiactivos (44).

El porcentaje de reacción cruzada se muestra en la Tabla 1, (calculado como U/U_0 al 50 %):

TABLA 1: PORCENTAJE DE REACCION CRUZADA DEL ANTISUERO CONTRA T.

Ligando	% Reacción Cruzada
Cortisol	0.0001
5 α -DHT	14.0
δ 4-Androstendiona	0.8
5 α -Androstendiol	6.0
δ 5-Androstendiol	2.1
Testosterona	100

OBTENCION DE UNA CURVA ESTANDAR

Considerando los datos reportados en la literatura referentes a los niveles plasmáticos de Testosterona en animales se decidió establecer un rango de 9.9 a 316.0 pg/tubo para construir una curva Dosis-Respuesta que al colocar 100 μ l de un extracto de suero cubriera los valores esperados por ml de muestra biológica que son de 1.55 ± 0.05 ng/ml para T y 0.074 ± 0.008 ng/ml para DHT en ratas macho adultas (51). El desarrollo de esta parte se encuentra referido en el Apéndice No. 9.

OBTENCION DE UN PERFIL DE IMPRECISION DEL ANALISIS

Uno de los parámetros de mayor utilidad en el control de calidad interno es el Perfil de Imprecisión, (Apéndice No. 10) que es una imagen de las características del radioinmunoanálisis y del intervalo útil de concentración de trabajo para la curva dosis-respuesta (44). El perfil de imprecisión permite:

- Determinar la dosis a partir de la cual la curva dosis-respuesta tiene una precisión aceptable, requerida por los objetivos clínicos o de investigación.
- Determinar la precisión con la cual se ha medido una muestra desconocida de acuerdo a su correspondiente dosis.
- Identificar muestras cuyo coeficiente de variación entre sus replicados sea dos o tres veces mayor que el observado a la dosis correspondiente y por lo tanto deba considerarse su posible rechazo.
- Evaluar las distintas condiciones del RIA, como dilución del anticuerpo, cantidad de trazador tiempo de incubación, etc.
- Controlar el efecto de cualquier cambio que se introduzca, ya sea en el método o en los reactivos de un inmunoanálisis, pues todo se verá reflejado en el Perfil de Imprecisión.

EXTRACCION DE LAS HORMONAS ESTEROIDES DEL SUERO

Las hormonas esteroides por su naturaleza hidrofóbica son muy poco solubles en agua. En el plasma viajan en un 95 % unidas a proteínas transportadoras y sólo una pequeña fracción se encuentra en forma "libre".

Cuando se intenta cuantificar una hormona esteroide en el plasma, es necesario realizar un proceso de extracción empleando solventes orgánicos del tipo del éter dietílico en proporción 10:1 v/v, como se refiere en el Apéndice No. 11 (44).

PREPARACION DE MUESTRAS PARA UN PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Para evaluar la precisión y la reproductibilidad de los ensayos se prepararon tres lotes de suero humano de aproximadamente 100 ml c/u a concentraciones de 2, 10 y 20 nmol/l. El proceso se encuentra referido en el Apéndice No. 12.

DISEÑO EXPERIMENTAL

EFFECTO DE LA CASTRACION SOBRE LA PROSTATA, VESICULAS SEMINALES Y NIVELES PLASMATICOS DE LAS HORMONAS CIRCULANTES EN ANIMALES DE LABORATORIO

Con el objeto de determinar el momento adecuado para la aplicación del preparado hormonal inyectable y valorar su funcionamiento como sistema de liberación sostenida, sin que sus efectos fueran enmascarados por acción de andrógenos nativos presentes, se evaluó el efecto de la castración sobre los órganos andrógeno-dependientes (Próstata y Vesículas Seminales) y las concentraciones hormonales circulantes en plasma. Para esto se seleccionó un lote de 109 ratas macho adultos jóvenes, de la cepa Wistar, con un peso promedio de 297 g (rango 250-350 g), sometidos a ciclos de 14 horas de luz por 10 horas de oscuridad, mantenidos a una temperatura de 23°C y con libre acceso al agua y al alimento.

Los animales fueron separados en dos grupos. El primer grupo (Controles Intactos) consistió de 17 animales, los cuales fueron mantenidos íntegros hasta el final del experimento.

El segundo grupo (Castrados Controles) consistió de 92 animales a los que se les realizó orquidectomía bilateral al inicio del estudio (día 0) y se fueron sacrificando por decapitación a los siguientes tiempos, Tabla 2:

TABLA 2: TIEMPOS DE SACRIFICIO POSTCASTRACION DEL GRUPO 2.

Días después de la castración	Número de animales
1	8
2	8
3	8
4	8
5	8
6	11
7	12
8	9
9	8
10	12

Debido a la selectividad de estas hormonas, sobre los órganos andrógeno-dependientes (próstata y vesículas seminales) (3), la evaluación de su influencia en dichos grupos se basó en los siguientes parámetros:

- 1) Determinación en suero de los andrógenos.
- 2) Determinación del peso de la próstata y vesículas seminales.
- 3) Cuantificación de proteínas en dichos órganos blanco. Para la obtención del suero, la sangre fue recolectada en tubos de ensayo de 13 x 100 cm y centrifugada a 3000rpm/15 min/4°C.

En los animales de 0 a 10 días post-castración se les cuantificó exclusivamente los niveles de T en sangre periférica. A todos los animales sacrificados al término de los 10 días, se les

cuantificaron además los niveles de DHT, LH y FSH. Los órganos andrógeno-dependientes fueron disecados inmediatamente después de la obtención de la sangre, y colocados en un recipiente a 4°C para valorar su peso fresco, y posteriormente almacenados a -70°C hasta la determinación de su contenido de proteínas que fue realizada de acuerdo al método de Lowry (52,53), referido en el Apéndice No. 4.

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LA FORMULACION INYECTABLE EN RATAS MACHO CASTRADAS COMO TERAPIA SUSTITUTIVA

Establecidas las condiciones experimentales para un adecuado modelo hipogonádico en ratas macho castradas, se procedió a la formación de 4 grupos de 10 animales cada uno, para la administración de los microcristales por vía intramuscular; a dos grupos se les administraron 10 mg de T 1M (IIa y IIIa) y a los dos restantes (Grupos IIb y IIIb) 12.5 mg de DHT, también en concentración 1 M.

Al primer grupo de tratamiento (IIa y IIb) se les aplicó la dosis de los esteroides (T 10 mg, o DHT 12.5 mg), inmediatamente después de la castración y al segundo (IIIa y IIIb) 4 días después de ésta, para evitar la atrofia de los órganos sexuales accesorios andrógeno-dependientes.

Al término del tiempo establecido fueron extraídos y pesados los órganos accesorios andrógeno-dependientes (próstata y vesículas seminales) y se obtuvo el suero para realizar todas las estimaciones necesarias de las hormonas. Los resultados obtenidos de los diferentes grupos experimentales (II, III, IV) fueron analizados por medio de las pruebas de "t" de student no pareada y de análisis de varianza (54,55) con respecto al Grupo I (controles intactos), comparando los siguientes parámetros:

- Peso Corporal / Peso Corporal.
- Peso de la Próstata / Peso de la Próstata.
- Peso de Vesículas Seminales / Peso de Vesículas Seminales.
- Concentración de proteínas por gramo de tejido para cada uno de estos órganos.
- Concentración de Andrógenos / Concentración de Andrógenos.
- Relación de Hormonas Esteroides / Hormonas Protéicas.

RESULTADOS

De acuerdo a los lineamientos establecidos al inicio del presente trabajo, a continuación se enlistan los siguientes resultados:

- 1.- Se prepararon los microcristales de T y DHT.
- 2.- Se obtuvieron dos preparados de T y DHT en concentración 1M que fueron envasados en jeringas de plástico.
- 3.- Se realizaron las pruebas de control de calidad de los microcristales obtenidos y de los preparados inyectables consistentes en:
 - a) Verificación del tamaño de las partículas.- Por medio de microscopía de luz, mostrando un rango de 150-212 μm .
Figuras 7 y 8.
 - b) Capacidad de disolución "in vitro".- Que demostró un comportamiento semejante de los cristales antes y después del proceso de fusión - tamizaje.
 - c) Unión a proteínas transportadoras del plasma.- Se observó que tanto la testosterona como la 5 α -dihidrotestosterona microcristalizadas, mostraron un adecuado desplazamiento al unirse la SHBG a diferentes concentraciones, en comparación a sus respectivos controles. Como se puede apreciar en las Tablas 3 y 4, y en la Figura 9.

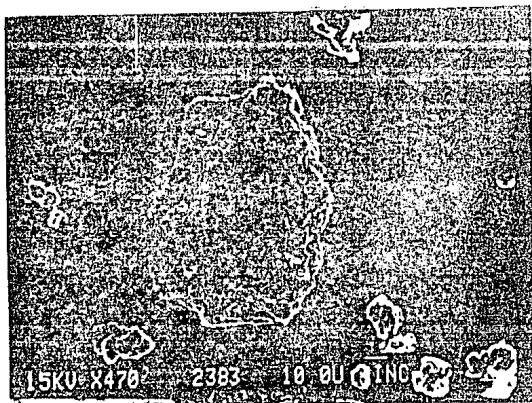
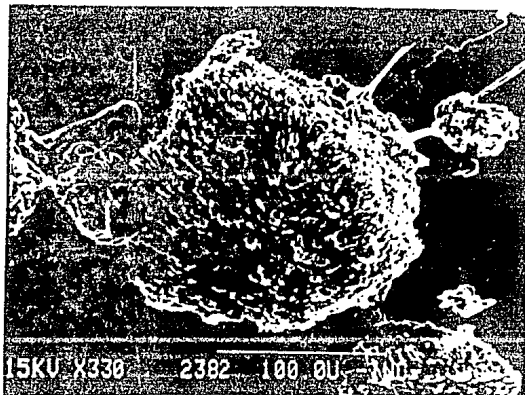


Figura 7. Micrografía electrónica de los microcristales de (T) después del proceso de fusión-tamizaje (150-212 μm).



Figuras 8. Micrografía electrónica de los microcristales de 5Q-DHT después del proceso de fusión-tamizaje (150-212 μm).

TABLA 3: ENSAYO DE UNION A PROTEINAS

TESTOSTERONA

Concentración	% DE UNION	
	T(Control)	T(Microcristalizada)
UNE	6.39	6.07
Bo	100.00	100.00
15 μ l*	71.47	63.22
50 μ l*	47.65	40.58

C.T. 9060.5 cpm B.C. 348.5 cpm

TABLA 4: ENSAYO DE UNION A PROTEINAS

5 α -DIHIDROTESTOSTERONA

Concentración	% DE UNION	
	DHT(Control)	DHT(Microcristalizada)
UNE	13.41	11.82
Bo	100.00	100.00
15 μ l*	41.13	48.13
50 μ l*	20.77	22.24

C.T. 10109.0 cpm B.C. 243.0 cpm

Donde: UNE = Unión no específica.

Bo = Unión total.

CT = Cuentas totales.

B.C. = Blanco del ensayo.

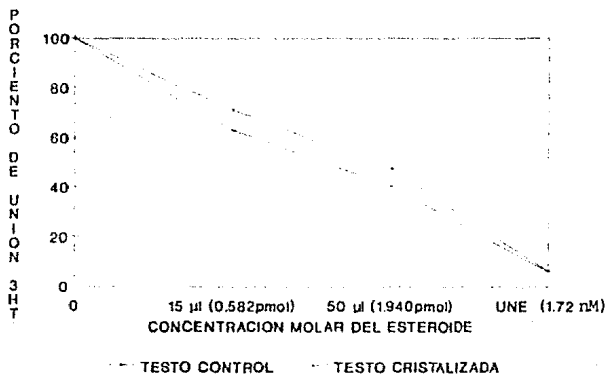
15 μ l = 0.582 pmol.

50 μ l = 1.940 pmol.

d) Control bacteriológico.- Realizada al producto terminado, consistente en una prueba de esterilidad por método directo a 3 muestras envasadas, de acuerdo a U.S.P.XX Pag. 1158.

Conclusión: Estéril.

CURVAS DE DESPLAZAMIENTO UNION A SHBG
TESTO. CONTROL - TESTO. CRISTALIZADA



DHT CONTROL - DHT CRISTALIZADA

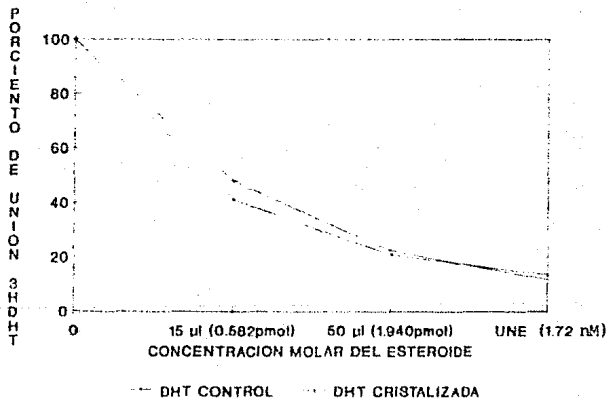


Figura 9. Unión a proteína transportadora (SHBG). T y DHT

4.- Fases de estandarización del RIA:

- a) Purificación de las hormonas esteroides radiactivas y obtención del "pico" de actividad de cada hormona. Figura 15.
- b) Marcaje por Iodación de las hormonas protéicas y la consiguiente obtención de sus respectivos "picos" de actividad. Figura 16.
- c) Caracterización del anticuerpo contra T de acuerdo a las especificaciones de la OHS, Tabla 1.
- d) Obtención y validación de una curva Dosis-Respuesta, para las distintas hormonas. Figura 17.
- e) Elaboración de un perfil de imprecisión de los radioinmunoensayos de T, DHT, LH y FSH. Figura 18.
- f) Extracción de las hormonas esteroides del suero, Tabla 15.
- g) Preparación de los "pooles" o referencias para el control de calidad interno, Tabla 16.

5.- Diseño Experimental.-

A. Efectos de la castración de acuerdo a:

- 1) Determinación en suero de los niveles hormonales del esteroide sexual. Tabla 5 y Figura 10.
- 2) Determinación del peso de próstata y vesículas seminales. Tabla 6 y Figura 11.

**ANÁLISIS DE LOS DATOS OBTENIDOS EN LOS DIFERENTES
GRUPOS DE ANIMALES ESTUDIADOS**

La Tabla 5 muestra la relación de la concentración de testosterona en animales íntegros y a diferentes tiempos después de la castración. La Figura No. 10 representa la desaparición de la hormona del suero después de la castración.

TABLA 5: RELACION DE LA CONCENTRACION DE TESTOSTERONA BASAL EN ANIMALES ÍNTEGROS Y CASTRADOS.

Tiempo Post-castración (días)	Concentración de Testosterona (pg/ml)*	Número de Individuos
0	973.0 ± 470.6	17
1	15.8 ± 12.3 ^c	8
2	22.0 ± 6.6 ^c	8
3	25.9 ± 13.1 ^c	8
4	21.5 ± 10.4 ^c	8
5	25.1 ± 19.9 ^c	8
6	39.4 ± 32.8 ^c	11
7	17.3 ± 14.1 ^c	12
8	15.3 ± 14.4 ^c	9
9	27.7 ± 23.1 ^c	8
10	32.2 ± 22.1 ^c	12

Los valores representan el valor promedio (\bar{X}) y la desviación estándar (s).

Los valores obtenidos para el nivel de significancia de la prueba "t" de student (p) son menores a 0.001 y están representados por la letra "c".

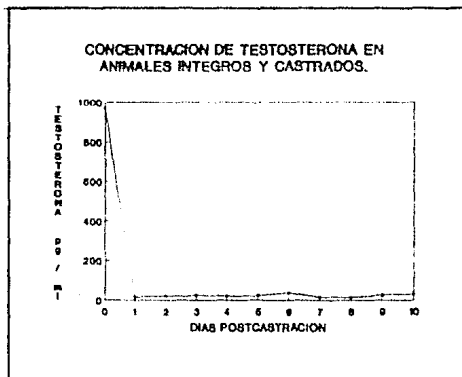


Figura 10. Concentración de la Testosterona basal en animales íntegros y castrados.

Una vez sacrificados los animales, los órganos sexuales accesorios andrógeno-dependientes fueron separados y pesados. La Tabla 6, muestra los valores promedio obtenidos con la dispersión correspondiente, así como el nivel de significancia estadística encontrado a diversos tiempos después de la castración con respecto al grupo control y la Figura No. 11, muestra la relación existente entre el peso corporal y el peso de la próstata y vesículas seminales en animales íntegros y castrados.

TABLA 6: RELACION DEL PESO CORPORAL, PESO DE LA PROSTATA Y PESO DE LAS VESICULAS SEMINALES EN ANIMALES INTEGROS Y CASTRADOS*

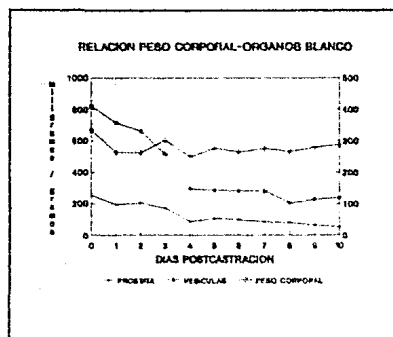
Días Post-Castración	Peso Corporal (gramos)	Peso Próstata (miligramos)	Peso Vesículas (miligramos)
Integros	333.2 ± 84.3	253.6 ± 140.0	818.6 ± 564.2
1	263.7 ± 45.2	196.7 ± 93.1	714.2 ± 154.9
2	262.7 ± 18.6	206.2 ± 89.9	660.9 ± 248.6
3	302.0 ± 78.0	173.5 ± 102.1 ^c	518.8 ± 444.9
4	249.3 ± 12.0	88.4 ± 34.3 ^c	296.2 ± 93.6 ^a
5	277.2 ± 23.2	107.8 ± 52.5 ^b	285.7 ± 56.8 ^a
6	265.8 ± 12.8	101.9 ± 36.1 ^b	282.3 ± 65.7 ^a
7	275.0 ± 30.2	85.5 ± 45.6 ^c	232.3 ± 60.2 ^b
8	266.2 ± 22.8	82.2 ± 35.3 ^c	206.6 ± 72.7 ^b
9	279.3 ± 31.5	65.6 ± 22.8 ^c	228.5 ± 44.8 ^c
10	288.3 ± 42.6	55.2 ± 25.7 ^c	239.0 ± 94.9 ^b

* Los valores representan el valor promedio (\bar{X}) y la desviación estándar (s).

Los valores de "p" están representados como :

a) p < 0.05; b) p < 0.01; c) p < 0.001

Figura 11. Relación del peso corporal con los órganos blanco.



En las pruebas estadísticas efectuadas a los datos obtenidos, se encontró lo siguiente:

Suero.- A partir del día 1 post-castración los resultados son significativamente diferentes de los registrados en los animales intactos, como se puede apreciar en la Tabla 5 y en la Figura 10. Lo que indica que el sitio de producción de testosterona es principalmente el testículo (dato ya conocido) y que la orquidectomía se realizó en forma completa.

Organos andrógeno-dependientes.- La Tabla 5 y Figura 11 muestran la relación del peso corporal con el peso de la próstata y peso de las vesículas seminales en animales íntegros y en animales castrados, y puede observarse en función de la prueba de "t" no pareada, que a partir de los días 3 y 4 post-castración para la próstata y vesículas seminales respectivamente, que los resultados son significativamente diferentes de los animales intactos.

Con esta primera fase se establecieron las condiciones experimentales para producir y caracterizar un modelo de hipogonadismo.

B. Evaluación de la actividad biológica de los cristales al aplicarse como terapia sustitutiva en ratas macho castradas.

El siguiente paso fue administrar a manera de terapia sustitutiva la preparación experimental de testosterona y dihidrotestosterona, respectivamente, a fin de lograr concentraciones de estos andrógenos en el suero semejantes a las de los animales intactos y evitar la atrofia de los órganos andrógeno-dependientes, los resultados se presentan en las Tablas y Figuras siguientes.

TABLAS COMPARATIVAS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

TABLA 7: (TESTOSTERONA MICROCRISTALIZADA)*
(10 mg)

Grupo	Peso corporal (gm) * ($\bar{X} \pm$ D.E.)	Peso próstata (mg) ($\bar{X} \pm$ D.E.)	Peso Ves.seminal (mg) ($\bar{X} \pm$ D.E.)
I	333.2 \pm 84.3	253.6 \pm 140	818.6 \pm 564.2
IIa	347.3 \pm 28.1*	499.6 \pm 223.4 ^b	1335.5 \pm 485.9 ^b
IIIa	345.5 \pm 27.5*	562.0 \pm 189.7 ^b	1551.7 \pm 186.3 ^b
IV	272.9 \pm 14.8*	116.3 \pm 55.1 ^b	366.5 \pm 190.9 ^b

Donde:

Grupo I Controlés, ratas sanas e intactas.

Grupo IIa Castradas e inyectadas inmediatamente con T (10 mg).

Grupo IIIa Castradas e inyectadas 4 días después con T (10 mg).

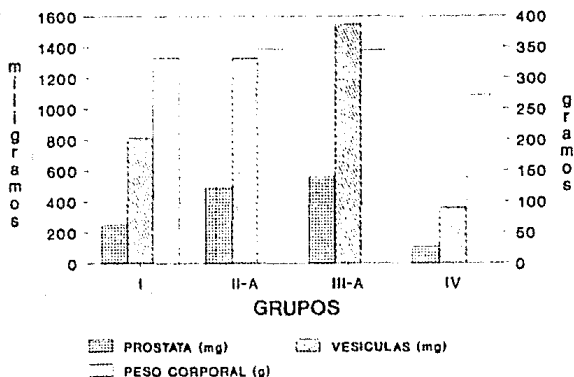
Grupo IV Castradas controles sacrificadas a los 10 días.

* Prueba de análisis de varianza de 1 vía:

a) $p = 0.91$ (ns); b) $p = 0.05$ (s);

El resto de las otras pruebas no fueron significativas.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA TESTOSTERONA



ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE 5α -DHT

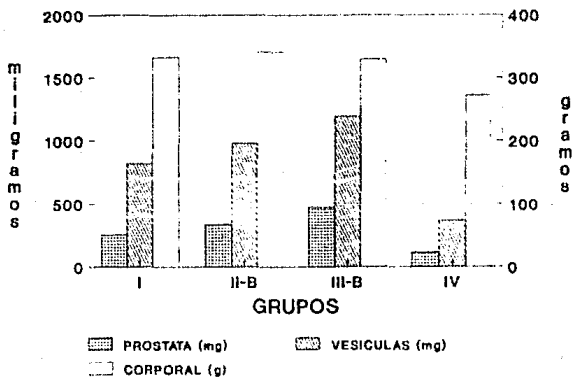


Figura 12. Gráficas de la actividad biológica de T y 5α -DHT

**TABLA 8: (DIHIDROTESTOSTERONA MICROCRISTALIZADA)*
(12.5 mg)**

Gpo.	Peso Corporal (g) *($\bar{X} \pm$ D.E.)	Peso Próstata (mg) ($\bar{X} \pm$ D.E.)	Peso Vesic.Seminal (mg) ($\bar{X} \pm$ D.E.)
I	333.2 \pm 84.3	253.6 \pm 140	818.6 \pm 564.2
IIb	341.3 \pm 26.3 ^a	337.2 \pm 159.3 ^b	982.1 \pm 485.8 ^c
IIIb	330 \pm 28.8 ^a	473.7 \pm 127.7 ^b	1197.5 \pm 448.7 ^c
IV	272.9 \pm 14.8 ^a	116.3 \pm 55.1 ^b	366.5 \pm 190.9 ^c

Donde:

- Grupo I Controles, ratas sanas e intactas.
(10 mg).
- Grupo IIb Castradas e inyectadas inmediatamente con
DHT (12.5 mg).
- Grupo IIIb Castradas e inyectadas 4 días después con
DHT (12.5 mg).
- Grupo IV Castradas controles sacrificadas a los 10
días.

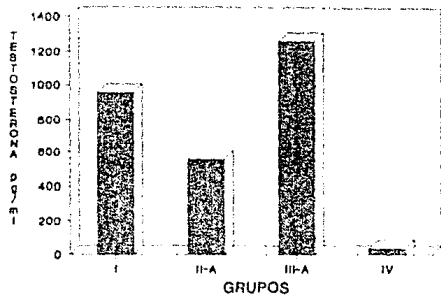
* Prueba de análisis de varianza de 1 vía:
a) p = 0.91 (ns); b) p = 0.01 (s); c) p = 0.19 (ns).

El resto de las otras pruebas no fueron significativas.

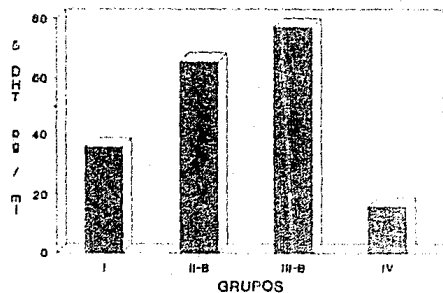
**TABLA 9: RELACION DE LOS DIFERENTES GRUPOS
EXPERIMENTALES DE ANIMALES.**

GRUPO	T (pg/ml)	DHT (pg/ml)	FSH (ng/ml)	LH (ng/ml)
I (CI)	939	36	44	72
II ₁ (X-T ₀)	529	-	139	187
III ₁ (X-T ₁)	1094	-	64	48
II ₂ (X-DHT ₀)	-	65	147	231
III ₂ (X-DHT ₁)	-	77	70	48
IV (X-C)	32	16	173	455

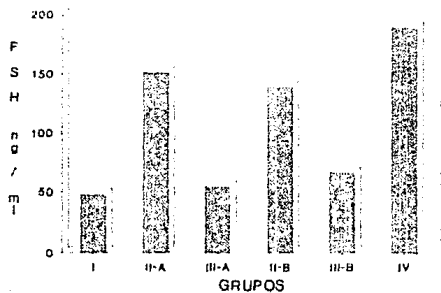
PERFIL HORMONAL DE TESTOSTERONA



PERFIL HORMONAL DE 5 α -DHT



PERFIL HORMONAL DE FSH



PERFIL HORMONAL DE LH

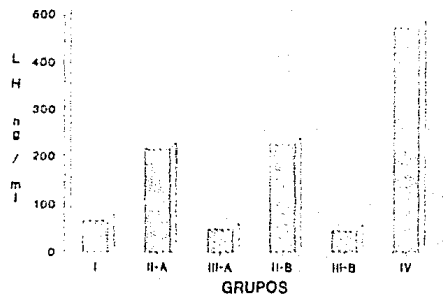
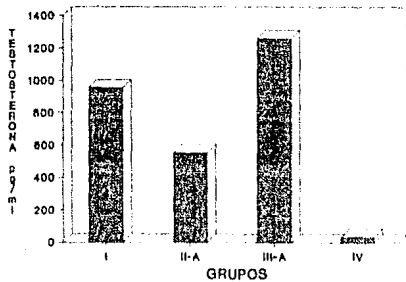
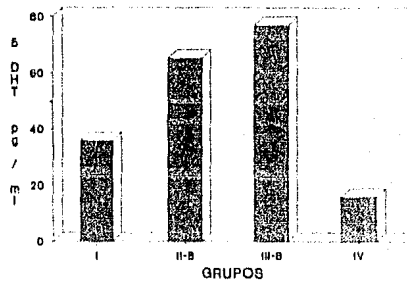


Figura 13. Gráficas de los Perfiles Hormonales en los distintos grupos

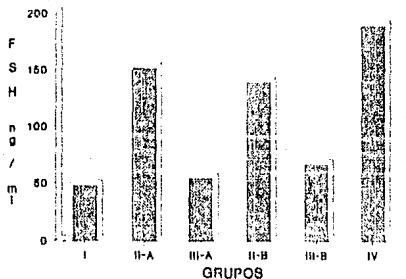
PERFIL HORMONAL DE TESTOSTERONA



PERFIL HORMONAL DE 5 α -DHT



PERFIL HORMONAL DE FSH



PERFIL HORMONAL DE LH

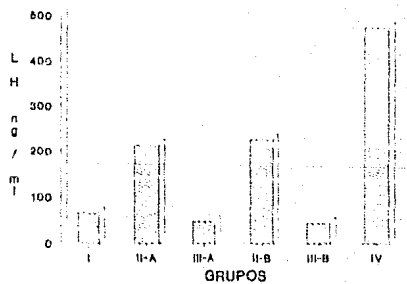


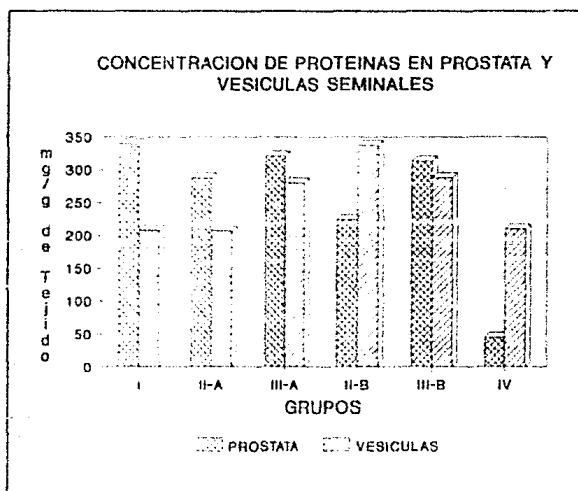
Figura 13. Gráficas de los Perfiles Hormonales en los distintos grupos

TABLA 10: CONCENTRACION DE PROTEINAS POR GRAMO DE TEJIDO EN LA PROSTATA Y VESICULAS SEMINALES EN LOS DIFERENTES GRUPOSEXPERIMENTALES.

GRUPO	PROSTATA (mg/g Tej.)	VESICULAS (mg/g Tej.)
I (CI)	341.5 ± 58.7	208.9 ± 70.6
II _a (X-T ₁)	287.7 ± 65.2 ⁿ	207.2 ± 29.2 ⁿ
III _a (X-T ₁)	321.8 ± 58.5 ⁿ	280.4 ± 55.7 ^a
II _b (X-DHT ₃)	224 ± 31 ^c	337.8 ± 82.8 ^a
III _b (X-DHT ₁)	313.4 ± 86.5 ⁿ	288.8 ± 61 ^c
IV (X-C)	46.8 ± 33 ^c	210.7 ± 68.3 ^a

* Los valores dados para el rango de significancia están dados por:
(a)= p< 0.05; (b)= p< 0.01; (c)= p< 0.001 y (n)= no significativo.

Figura 14. Comparación entre la concentración de proteínas de la próstata y de las vesículas seminales.



TABLAS DEL ANALISIS ESTADISTICO EFECTUADO A LOS PROMEDIOS DE LOS VALORES HORMONALES EN LOS DISTINTOS GRUPOS DE ANIMALES PRUEBA DE "t" DE STUDENT

TABLA 10: TESTOSTERONA (T)

GRUPO	X-T ₀	X-T ₁	X-C
I	a	ns	c
II ₀		ns	c
III ₀			c

TABLA 11: DIHIDROTESTOSTERONA (DHT)

GRUPO	X-DHT ₀	X-DHT ₁	X-C
I	ns	b	c
II ₀		ns	b
III ₀			c

TABLA 12: HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLICULO (ESH)

GRUPO	X-T _c	X-T _a	X-DHT _c	X-DHT _a	X-C
I	a	b	c	a	c
II _a		ns	ns	ns	ns
III _a			ns	ns	a
II _b				ns	ns
III _b					b

TABLA 13: HORMONA LUTEINIZANTE (LH)

GRUPO	X-T _c	X-T _a	X-DHT _c	X-DHT _a	X-C
I	a	ns	a	ns	c
II _a		ns	ns	ns	b
III _a			a	ns	c
II _b				a	ns
III _b					c

* Los valores dados para el rango de significancia están dados por:

(a) = $p < 0.05$; (b) = $p < 0.01$; (c) = $p < 0.001$ y

(ns) = no significativo.

DISCUSION

El presente trabajo tuvo como objetivo el diseñar una terapia sustitutiva para andrógenos, que tuviera la característica de liberación sostenida. Para su desarrollo, se dividió en diferentes secciones, en las que se trataron de manera particular los aspectos específicos de la materia. En este análisis crítico se agrupan las discusiones respectivas de acuerdo a como se desarrollaron las diferentes etapas y de manera similar a los incisos correspondientes en la sección de resultados.

La primera etapa consistió en la preparación y valoración de la calidad de los microcristales de Testosterona (T) y 5 α -DHT (DHT) obtenidos. De acuerdo a las pruebas de control de calidad aplicadas se demostró que no sufrieron cambios en su estructura y funcionalidad. Como se puede apreciar en las Figuras 7 y 8, ambos tipos de microcristales presentan el tamaño y uniformidad esperados después de ser sometidos al proceso de fusión-tamizaje.

La disolución "in vitro" empleando mezclas de disolventes orgánicos/agua para la eficaz evaluación de los porcentajes de disolución de los microcristales de T recristalizados demostró un comportamiento semejante a la cinética de disolución de la hormona antes del proceso de fusión y tamizaje. El hecho de que los microcristales de DHT posean una estructura similar a la de testosterona, nos permite suponer, que su capacidad de disolución tampoco fue alterada.

La actividad biológica de los microcristales fue evaluada por análisis de unión a la proteína transportadora de hormonas sexuales en el plasma (SHBG) y mostró que la afinidad de ésta hacia dichos cristales se manifestó prácticamente igual antes y después del proceso de fusión y tamizaje.

Una vez demostrada, mediante pruebas "in vitro", la funcionalidad de los esteroides recristalizados, se procedió a preparar una formulación para ser evaluada en un bioensayo "in vivo". Para esto se pesaron en una balanza analítica dosis individuales de 10 mg de T y 12.5 mg de DHT, las cuales fueron colocadas en forma individual en jeringas estériles desechables de 1 ml. Una vez preparadas las dosis, fueron esterilizadas con óxido de etileno. Se comprobó la esterilidad de las jeringas y su contenido mediante pruebas bacteriológicas y análisis de pirógenos.

El bioensayo se realizó empleando como modelo la rata macho castrada (56), evaluando el desarrollo de los órganos sexuales secundarios andrógeno dependientes y cuantificando los andrógenos por Radioinmunoanálisis.

El Diseño Experimental se estableció con base en:

- A. El efecto de la castración sobre los niveles hormonales en suero y la determinación del peso de los órganos "blanco" (Próstata y Vesículas Seminales).- Mediante estos

parámetros se determinó que a partir del 4º día posterior a su castración, la desaparición de los andrógenos en la sangre periférica era completa y que la disminución en el peso de los órganos "blanco" era significativa. Tablas 4 y 5; y Figuras 10 y 11.

- B. La evaluación de la actividad biológica de los cristales al aplicarse como terapia sustitutiva.- Una vez establecido el tiempo crítico; se fijó un tiempo "cero" (Gpo. II) para buscar mantener el tamaño de dichos órganos y un tiempo "uno" (Gpo. III) para recuperarlo. Tablas 6 y 7; y Figuras 12 y 13. (En donde también se observa el efecto anabólico de la Testosterona).

Aún cuando no todos los sujetos respondieron adecuadamente al tratamiento, por probables alteraciones en su metabolismo o por una mala absorción y/o distribución del fármaco, se comprobó que los cristales funcionaron adecuadamente como un sistema de "liberación sostenida", ya que mostraron un efecto en los órganos "blanco". Como puede observarse después de la restitución, los órganos conservaron su tamaño, Gpo. II; e incluso llegaron a aumentarlo más allá del promedio obtenido en los animales control Gpo. III, (Tabla 10). El aumento de tamaño ocurrió debido a la síntesis de nuevas proteínas y no a la retención de líquidos, como lo constató la concentración de las proteínas en estos tejidos (Figura 14).

Los efectos observados en los grupos II y III fueron mayores que los registrados en el grupo I, esto es explicable de acuerdo a lo reportado sobre los efectos de los sistemas de liberación sostenida. Además debe de considerarse que el tiempo transcurrido entre el inicio del estudio, la administración de la terapia y la colección de la sangre periférica difirió en cuatro días para los grupos de recuperación.

Aún cuando las concentraciones plasmáticas en los individuos varían considerablemente, el promedio grupal fué estadísticamente diferente para cada grupo. Estos resultados pueden servir de referencia para determinar el rango de la dosis para obtener los niveles fisiológicos de las hormonas.

Se observaron diferencias en la respuesta de los órganos blanco hacia las hormonas esteroides, mostrando la próstata un mayor reactividad hacia la T y las vesículas seminales hacia la DHT (Figuras 12 y 14), no obstante que el efecto previsto de la DHT sobre estos órganos debiera ser mayor al observado.

De los resultados presentados deducimos que se debe considerar la abundancia-efecto de los preparados para una mejor acción biológica en el diseño de una terapia sustitutiva para humanos.

Con esta primera fase se asentaron las bases para futuras investigaciones de carácter clínico, que puedan ofrecer una

terapia sustitutiva crónica, a pacientes con deficiencia en la producción de andrógenos, que permita mantener concentraciones plasmáticas de la hormona activa semejantes a las fisiológicas por un periodo mínimo de treinta días (57).

Por otra parte, conviene mencionar que una vez comprobado el efecto de la liberación sostenida en animales de laboratorio, y con el fin de desarrollar y optimizar un sistema de fármacos previamente a su aplicación clínica, se desarrollo un combinado inyectable de estas hormonas el cual fue aplicado a humanos voluntarios con problemas de hipogonadismo y se vigiló su evolución mediante el análisis hormonal en sangre periférica exclusivamente.

En términos generales cabe citar que esta terapia experimental ofreció resultados satisfactorios en los sujetos involucrados, obedeciendo la liberación de los andrógenos a un esquema de tipo sostenido (Orden "0") durante el tiempo en que se siguió este estudio, que fue por un periodo de 50 días.

CONCLUSIONES

- 1.- Se desarrolló la formulación de liberación sostenida de larga acción para andrógenos (T y DHT).
- 2.- La formulación producida es biológicamente activa.
- 3.- La administración de la formulación desarrollada produjo un patrón de liberación de tipo sostenido (orden "0").
- 4.- En base a este estudio se establece que es posible administrar T o DHT solas o en combinación a sujetos humanos con una deficiente producción de andrógenos.
- 5.- Dicha formulación resultante puede ofrecerse, una vez optimizada su dosis y frecuencia de administración, de tal manera que permita obtener concentraciones plasmáticas de andrógenos semejantes a las fisiológicas,

APÉNDICE

Los diferentes métodos empleados al igual que la preparación de todos los reactivos utilizados en el presente trabajo se encuentran descritos detalladamente en los siguientes apéndices:

- Apéndice 1.- Preparación de los microcristales de Testosterona y 5 α -Dihidrotestosterona (34).
- Apéndice 2.- Obtención de dos preparados inyectables de Testosterona y 5 α -Dihidrotestosterona.
- Apéndice 3.- Unión a proteínas plasmáticas (41).
- Apéndice 4.- Determinación de proteínas por el método de Lowry (52,53).
- Apéndice 5.- Radioinmunoanálisis de Testosterona (44).
- Apéndice 6.- Radioinmunoanálisis de las Hormonas Estimulante del Folículo (FSH) y Luteinizante (LH) (44).
- Apéndice 7.- Purificación de la hormona radiactiva (³H)-T por cromatografía en columna (44).
- Apéndice 8.- Iodación de las hormonas proteicas(48,49,50).
- Apéndice 9.- Otención de una curva estándar (44,51,59).
- Apéndice 10.- Obtención del perfil de imprecisión del análisis (44,59).
- Apéndice 11.- Extracción de la hormona del plasma (44).
- Apéndice 12.- Preparación de muestras para un programa de control de calidad interno (44,58,59).

PREPARACION DE LOS MICROCRISTALES DE
TESTOSTERONA Y DIHIDROTESTOSTERONA.

TESTOSTERONA

(17 B - hidroxí - 4 - androsten - 3 - ona)

Características:

punto de fusión: 153-154°C

rotación: + 102 Diox.

peso molecular: 288.4

presentación: viales de 5 g

PROCEDIMIENTO:

Se pesaron 2,600 mg de testosterona pura (Steraloids Inc.) en una balanza analítica. Estos se fundieron en pequeñas cantidades a una temperatura entre 153-154°C, en un mortero de material

termostable, bajo corriente de nitrógeno para evitar procesos de oxidación. La fusión se logró en 10 segundos. Inmediatamente después se recrystalizó colocando el mortero en un baño de hielo seco-acetona a -22°C .

Una vez recrystalizada la testosterona, se pulverizó parcialmente con un brazo de mortero y se tamizaron los microcristales hasta lograr el tamaño deseado ($150 - 212 \mu\text{m}$).

5 α -DIHIDROTESTOSTERONA

(17 β - hidroxí - 5 α - androstan - 3 - ona)

Características:

punto de fusión: $180 - 181^{\circ}\text{C}$

rotación: + 33 EtOH

peso molecular: 290.5

presentación: viales de 5 g

PROCEDIMIENTO

Se pesaron 1,800 mg de dihidrotestosterona pura (Steraloids Inc.) en la balanza analítica y se procedió a fundirlos en pequeñas cantidades a temperatura entre 180-181°C. La fusión, recristalización, pulverización parcial y tamizado se hicieron de acuerdo a las condiciones establecidas ya para la testosterona.

El equipo utilizado consistió en:

- Plato de calentamiento (Corning PC-351) termorregulable.
- Flujo de nitrógeno.
- Baño de hielo seco-acetona.
- Termómetro digital (Cole Parmer Instrument Inc. modelo 8535).
- Tamices metálicos (Arthur H. Thomas Co.), con rango de 500 - 125 μ m.

OBTENCION DE DOS PREPARADOS INYECTABLES DE
TESTOSTERONA Y DIHIDROTESTOSTERONA

PROCEDIMIENTO:

Se prepararon dos homogeneizados conteniendo uno 2000 mg de testosterona microcristalizada y el otro 1000 mg de 5 α -dihidrotestosterona de tamaño entre 150 - 212 μ m; con técnicas de asepsia se introdujeron 10 mg de Testosterona, pesados en balanza analítica, en cada jeringa de 3 ml para el Grupo sustituido con Testosterona (A), y 12.5 mg para el Grupo sustituido con 5 α -dihidrotestosterona (B).

Una vez preparada y empacada la formulación experimental, se enviaron las jeringas para su esterilización, según técnicas de la farmacopea USP (cortesía del Instituto Syntex S.A. de C.V.).

UNION A PROTEINAS PLASMATICAS.

ESTANDARES: Testosterona y Dihidrotestosterona Control (Sigma) en su presentación cristalina normal.

T y 5 α -DHT microcristalizadas.

SUERO:

Se obtuvo por centrifugación a 3000 rpm por 15 minutos de una muestra de 10 ml de sangre de un donador.

HORMONAS MARCADAS:

Obtenidas por medios comerciales, se utilizaron radionúclidos de (³H)-DHT; (³H)-T; (³H)-F.

CARBON Norit A, DEXTRAN T-70, SOLUCION AMORTIGUADORA DE TRIS (0.02M), SOLUCION AMORTIGUADORA T.G. (Preparadas en el laboratorio), GLICEROL (J.T. BAKER), INSTAGEL (Dupont).

PREPARACION DE REACTIVOS

ESTANDARES:

Dihidrotestosterona.- Se pesaron 10 mg de cristales de DHT control, se agregaron 10 ml de etanol para dar una concentración final de 1 mg/ml, y se le denominó Solución A. De la solución A, se tomaron 100 μ l, que se evaporaron bajo corriente de nitrógeno, y se le agregaron 10 ml de etanol; quedando una solución de 10 μ g/ml, solución B.

De la solución B, se tomaron 11.2 μ l y se agregaron 10 ml de etanol, para dar una concentración final de 38.82 pmol/ml, solución C. Siguiendo un procedimiento igual al anterior, se prepararon los estándares para DHT microcristalizada, Testosterona control y Testosterona microcristalizada.

SOLUCION T. G. Preparada con Trizma Base (Sigma) en concentración 0.02 M (2.42 g) y Glicerol (J.T. Baker) al 10 %. En un litro de agua desionizada con un pH de 7.4.

CARBON Norit A - DEXTRAN (En concentración al 0.25%)

Carbón Norit A (Sigma) 250 mg

Dextrán T-70 (OMS) 25 mg

Preparado en 100 ml de solución T.G.

PREPARACION DEL SUERO:

Se preparó la solución de carbón-dextrán al 0.25 % y se centrifugó inmediatamente a 2500 rpm por 15 minutos para obtener la cantidad necesaria para tener 1 mg de carbón/ml de suero.

Se incubaron alícuotas del suero del donador, para unir a la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) con el botón del carbón resuspendido y se mantuvo a 4°C con agitación continua por 1 h. Después se centrifugó, decantando el sobrenadante y tomando alícuotas de 200 μ l del suero (sin carbón).

Esta metodología nos brindó una dilución del suero de 1 : 10, adecuada para obtener un 50 % de unión en el ensayo, que por valoraciones anteriores demostró ser la óptima para el desarrollo de esta prueba.

MONTAJE DEL ENSAYO: Se incubaron las alícuotas del suero poniéndolas en equilibrio con concentraciones de 1 a 40 nM de (³H)-T y (³H)-DHT durante 1 h a 4°C, llevando la reacción a cabo en un volumen de 0.2 ml de la solución TG. Al finalizar el período de incubación se añadieron 800 µl de la solución de carbón-dextrán al 0.25 % centrifugando las muestras inmediatamente a 2500 rpm por 15 min, y decantándolas en viales. La determinación del contenido de radiactividad en el sobrenadante (fracción unida) se realizó utilizando un espectrofotómetro de centelleo líquido Packard, así como Instagel como solución de centelleo.

Las estimaciones de la unión no-específica en cada muestra se determinaron en incubaciones paralelas conteniendo un exceso molar de 250 veces del correspondiente al esteroide no radiactivo.

DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY.

REACTIVOS:

Albumina Sérica Bovina (ASB) al 0.1 % (en H₂O).
(Sigma Chemical Co.)

Na₂CO₃ al 2 % + NaOH 1N (9:1) Solución 1
Tartrato de Na y K al 2 % Solución 2
CuSO₄ al 1 % Solución 3
Sol. 1 (1 ml) + Sol. 3 (1 ml). Solución 4
Sol. 1 (50 ml) + Sol. 4 (1 ml) Solución 5
Fenol 1 N Solución 6

MONTAJE DEL ENSAYO

- 1.- Se tomaron diferentes alícuotas del preparado de ASB al 0.1% (0.1mg/ml) de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 0 µl en tubos de ensayo, numerados por duplicado, y se llevaron a un volumen final con agua destilada de 100 µl; lo que dió una concentración de: 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.00625 y 0 (Blanco) mg/ml para la curva estándar.
- 2.- Se tomaron muestras del extracto de los "órganos blanco" diluidas 1:50 en agua destilada en un volumen de 100 µl para el ensayo.

3.- A todas las muestras se les agregó 1 ml de la Solución 5, dejando reposar la mezcla por 10 minutos bajo las condiciones del laboratorio.

4.- Inmediatamente después se les agregaron 100 μ l de la Solución 6, incubándolas por 45 min en la oscuridad. Para después leer su Densidad Optica (D.O.) en un espectrofotómetro Beckman DU6 a 660 nm.

El ajuste de la curva estándar se realizó leyendo a 272 nm la Densidad Optica de la ASB 0.1 %, realizando la conversión debida.

RADIOINMUNOANALISIS DE TESTOSTERONA Y DIHIDROTESTOSTERONA*.

*Nota.- Considerando que los Radioinmunoensayos para T y para DHT coinciden en muchos de los puntos de su metodología, se puntualizó la metodología básica a seguir para un RIA de T, indicando oportunamente aquellos puntos en los que difieren ambas técnicas.

REACTIVOS:

ANTISUEROS:

Testosterona.- Proporcionado por la O.M.S. en forma liofilizada.

Dihidrotestosterona.- Desarrollado contra 5-alfa-DHT-15-CEMC-BSA*.

ESTANDARES:

Testosterona.- Proporcionado por la O.M.S. en forma etanólica.

Dihidrotestosterona.- Obtenido de Steraloids Inc.

HORMONAS MARCADAS:

Obtenidas por medios comerciales. Los radionúclidos fueron marcados con (³H), teniendo las siguientes actividades específicas:

T: 80 - 105 Ci/mmol

DHT: 51.6 Ci/mmol.

CARBON VEGETAL, DEXTRAN T -70, GELATINA, AGUA DEIONIZADA, SOLUCION AMORTIGUADORA "S" (preparado en el laboratorio), LIQUIDO DE CENTELLEO (preparado en el laboratorio), ETER DIETILICO.

EQUIPO REQUERIDO:

Contador Beta (Packard TRI-CARB.300); Pipetas manuales (para volúmenes de 50; 100; 200; 500 y 1000 μ l). También un dispositivo para administrar 5 ml de éter; Tubos de ensayo de 10x75 mm gradillas; agitador vortex, cronómetro, centrifuga, campana de extracción, baño de agua, anaquel para solventes.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS:

SOLUCION AMORTIGUADORA "S"

Fosfato Monobásico anhidro (NaH_2PO_4) (Sigma)	2.35 g
Fosfato dibásico anhidro (Na_2HPO_4) (J.T.Baker Analyzed)	11.6 g
Cloruro de Sodio (NaCl) (Sigma)	8.8 g
Thimerosal (Merthiolate) (Sigma)	0.1 g
Gelatina (Merck)	1.0 g

Aforar a 1 litro en agua deionizada hervida. Debe de tener un pH de 7.2 - 7.4.

MARCADOR:

Se toman 150 μ l de la solución stock en un tubo y se evapora el solvente redisolviéndose en 15 ml de buffer de fosfatos. Para tener un total de 10 000 cpm para el ensayo de T y 5 000 cpm para el ensayo de DHT.

ANTISUERO:

Se reconstituye el contenido de una botella de antisuero con 10 ml de solución amortiguadora "S". Se deja reposar la mezcla por 20 minutos y se mezcla cuidadosamente antes de usarse. El amortiguador debe estar a temperatura ambiente.

* El antisuero para DHT se resuspende en 7 ml de PBS.

CARBON-DEXTRAN (En concentración al 0.625 %):

Carbón activado lavado (Sigma)	0.625 g
Dextrán (O.M.S.)	0.0625 g

Se disuelve el dextrán en 100 ml de amortiguador S y se añade el carbón vegetal. El amortiguador debe estar a 4°C, igual que en el momento de la adición.

SOLUCION DE CENTELLEO:

Alcohol etílico absoluto (J. T. Baker Analyzed)	21 ml
Liquiflúor (PPO-POPOP) (NEN Research Products)	42 ml
Tolueno (J. T. Baker Analyzed) para aforar a	1 l

El mecanismo de acción de la solución de centelleo es:

- 1) Absorción de la energía nuclear por el solvente.
- 2) Excitación del solvente.
- 3) Transferencia de la energía del solvente al soluto.
- 4) Emisión luminosa por el soluto.

Por consiguiente lo que se cuantifica es la luz.

MONTAJE DEL ENSAYO:

PREPARACION DE MUESTRAS:

- 1.- Se transfiere una alícuota de 0.5 ml de suero a tubos de ensayo con volumen de 10 - 15 ml.
- 2.- Agregar 5 ml de éter dietílico para la extracción.
- 3.- A un último tubo se le agregan solamente los 5 ml de éter. Este será el "blanco de éter".
- 4.- Agitar en el vortex a cada tubo por un minuto, permitir que el éter se asiente.
- 5.- Se transfiere el éter a un tubo limpio para evaporarlo, colocando los tubos en una mezcla de "hielo seco" y acetona. La fase acuosa se congela y la capa de éter puede ser decantada.
- 6.- Se evapora el éter llevando los tubos a un baño de agua.
- 7.- Cuando los extractos estén secos, se agregan 2 ml de Amortiguador "S" a cada muestra. Se agitan en vortex, permitiendo que el amortiguador circunde todo el tubo, se incuban por 30 minutos a 37°C, se agitan nuevamente los tubos por un minuto a temperatura ambiente.

PREPARACION DE ESTANDARES:

- 1.- Se reconstituye el residuo de 100 μ l de solución etanólica, previamente evaporada, con 10 ml de amortiguador S. Se incuba a 40°C por 30 minutos. Se mezcla vigorosamente y se enfría a 4°C antes de usarse. Esta solución contiene T en una concentración de 2.5 nmol/l y es conocida como solución B.
- 2.- Colocar en una gradilla 6 viales de 10 ml de capacidad, marcarlos del 1 al 6.
- 3.- Usando la misma pipeta y punta, agregar cuidadosamente 5 ml de amortiguador a los 6 tubos.
- 4.- Continuando con la misma pipeta y punta, agregar 5 ml. de la solución 2.5 nmol/ml de T (solución B) al tubo No. 1, mezclar cuidadosamente.
- 5.- Usando nuevamente la misma pipeta y punta, agregar cuidadosamente 5 ml de la solución del tubo No. 1 al tubo No.2, mezclar éste cuidadosamente y repetir la operación sucesivamente hasta completar los 5 tubos.
- 6.- Agregar alicuotas por duplicado de 500 μ l de los tubos de prueba directamente a los tubos de ensayo.

PREPARACION DE ESTANDARES PARA DHT:

Se pesa 1 mg. del estándar de DHT fría (Steraloids) y se lleva a un volumen de 10 ml de etanol absoluto, reactivo analítico y a partir de este stock, con concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$, se preparan diluciones de la curva estándar de 400, 200, 50, 25 y 12.5 pg en 100 μl .

TUBOS PARA CUENTAS TOTALES:

Se mezclan 100 μl de la dilución de trabajo de (^3H)-T y 800 μl de amortiguador. A estos tubos no se les agrega la solución de carbón. Al tiempo de la separación, el contenido de estos tubos se agrega directamente a los viales. Esto da el total de radiactividad agregado a los tubos de ensayo. El amortiguador continuará con el mismo grado de amortiguamiento como en los otros tubos de ensayo.

* Para DHT son: 100 μl de (^3H)-DHT y 800 μl de amortiguador.

TUBOS DE UNION NO-ESPECIFICA:

Se utilizan 100 μl de la dilución de (^3H)-T y 600 μl de amortiguador. Estos tubos se llevan de manera normal hasta el fin del ensayo.

* Para DHT: 100 μl (^3H)-DHT y 200 μl de amortiguador.

TUBOS DE UNIONES TOTALES (Bo):

500 μ l de amortiguador; 100 μ l de marcador; 100 μ l de antisuero.

* DHT: 100 μ l de amortiguador; 100 μ l de (3 H)-DHT y 100 μ l de antisuero.

ESTANDARES Y DESCONOCIDOS:

500 μ l de la muestra o estándar; 100 μ l de la hormona marcada y 100 μ l de antisuero.

* DHT: 100 μ l de la muestra o estándar; 100 μ l de (3 H)-DHT y 100 μ l de antisuero.

BLANCO:

500 μ l de amortiguador del éter procesado; 100 μ l de marcador y 100 μ l de antisuero.

* DHT: 100 μ l de éter procesado, 100 μ l de (3 H)-DHT y 100 μ l de antisuero.

Después de los pasos anteriores se procede a la incubación de la T a 4°C durante 18-24 h: para separar la fracción libre de la unida, se hace mediante la adición de 200 μ l de solución de

carbón-dextrán al 0.625 ‰. Se deja reposar por 30 minutos, se centrifuga a 3000 rpm por media hora, se decanta, se le agregan 5 ml de la solución de centelleo, se agitan los frascos por un minuto, se limpian perfectamente con etanol y se dejan reposar en la oscuridad 24 h. Después de lo cual se estiman las cuentas por minuto (cpm) en un espectrofotómetro de centelleo líquido, calculándose los resultados mediante una interpolación a una curva estándar Logit Vs. Log10.

* La separación en la metodología para DHT se hace adicionando 500µl de carbón vegetal al 1 ‰, se deja reposar 15 minutos, se centrifuga a 3000 rpm por 15 minutos, decantándose el sobrenadante y adicionando la solución de centelleo.

APENDICE No. 6

RADIOINMUNOANALISIS DE LAS HORMONAS ESTIMULANTE DEL
FOLICULO (FSH) Y LUTEINIZANTE (LH)*.

*De la misma manera que en el RIA de T y DHT, los radioinmunoensayos de FSH y LH, coinciden en su mayoría, por lo cual, se señalaran solamente de manera oportuna aquellos puntos en los que difieran.

REACTIVOS

ANTISUEROS:

FSH: Proporcionado por NIADDK (National Institute of Arthritis, Diabetes & Digestive & Kidney Diseases). Líquido en viales de 1.0 ml en 2 % de suero normal de conejo (NRS) en amortiguador fosfosalino (PBS).

LH: NIADDK-anti-rLH. Líquido 0.5 ml en 2 % de NRS en amortiguador de fosfatos.

ESTANDARES:

FSH: NIADDK-rFSH-RP-1. En forma liofilizada, 1.0 mg.

LH: NIADDK-rLH-RP-2. Proporcionado en viales con 10/ug por vial, en forma liofilizada en 1 ml de de PBS, conteniendo 1 % de Albúmina Sérica Bovina.

HORMONA MARCADA.

FSH: NIADDK-rFSH-I-5, altamente purificada para iodación, liofilizada, en un vial de 1 ml conteniendo aprox. 0.1 mg/vial.

LH: NIADDK-rLH-I-6, altamente purificada para iodación, liofilizada, aprox. 0.1 mg/vial.

SEGUNDO ANTICUERPO.

La separación de las fracciones libre y unida se hizo mediante la administración de un segundo anticuerpo, que es una inmunoglobulina específica contra suero de conejo desarrollada en carnero, por el equipo de trabajo del Depto. de Biología de la Reproducción del INNSZ y que se almacena en viales con 1 ml por vial.

ALBUMINA SERICA BOVINA (BSA), AMORTIGUADORES DE FOSFATOS: PBS y EDTA (Preparados en el laboratorio).

EQUIPO REQUERIDO:

Contador Gamma (Packard Auto-Gamma 500), Pipetas manuales (para volúmenes de 10, 50, 100, 200 y 500 μ l) y una semiautomática para volúmenes de 100 y 200 μ l), tubos de ensayo de 10 x 75 mm, gradillas, vortex, centrifuga con regulador de temperatura a 4°C, cojines para decantar, recipiente de deshechos radiactivos y aplicadores.

PREPARACION DE REACTIVOS

"PBS" 0.05 M:

Fosfato dibásico de sodio (Na₂HPO₄) 11.6 g

(J. T. Baker Analyzed)

Fosfato monobásico de sodio (NaH₂PO₄)·H₂O 2.7 g

(Sigma)

Cloruro de sodio (NaCl) 17.6 g

(Sigma)

Azida de sodio (NaN₃) 0.2 g

(Fisher Scientific Co.)

Se lleva a un volumen final de 1 l con agua desionizada y se ajusta a un pH de 7.4.

"EDTA" 0.01 M:

EDTA (ácido etilen-diamino-tetraacético) 3.36 g

(Sigma)

Hidróxido de sodio (NaOH) 0.4 g

(J. T. Baker Analyzed)

Agua desionizada 80 ml. y se lleva a un pH de 7.2.

SOLUCION AMORTIGUADORA DEL ENSAYO: "PBS - GEL"

PBS 0.05 M y GELATINA (Merck) 0.1 %

* Para LH es PBS 0.01 M + EDTA 0.01 M + BSA 0.2 % +
gama-globulina de conejo al 0.005 %.

MARCADOR:

Se resuspende la cantidad de hormona marcada necesaria para cada ensayo, que tenga alrededor de 10,000 cpm por cada 100 μ l en el amortiguador del ensayo.

PRIMER ANTICUERPO:

Se reconstituye el contenido de un vial del stock en dilución inicial 1:62500 y se lleva a 10 ml con PBS 0.01 M + EDTA + SNC.

* LH se resuspende en PBS 0.01 M.

SEGUNDO ANTICUERPO:

Se reconstituye el contenido de un vial de antisuero en un volumen final de 10 ml en PBS 0.01 M.

MONTAJE DEL ENSAYO:

PREPARACION DE ESTANDARES:

La hormona destinada para la curva estándar se diluye en PBS-GEL para llegar a concentraciones de 4, 10, 20, 30, 40, 80, 120, 200, 400 y 800 ng/ml.

* Para LH la dilución se lleva a cabo con el amortiguador del ensayo (PBS 0.01 M), a concentraciones de 31.2, 62.5, 125, 250, 500 y 1000 ng/ml.

TUBOS PARA CUENTAS TOTALES:

Se tomaron 100 μ l de la hormona marcada con I¹²⁵ (FSH y LH respectivamente).

TUBOS DE UNION NO ESPECIFICA:

Conteniendo 300 μ l del amortiguador del ensayo y 100 μ l de la hormona marcada y 200 μ l de PBS + EDTA + SNC.

* Para LH son 300 μ l de PBS-EDTA y 100 μ l de marca.

TUBOS DE UNIONES TOTALES (Bo):

300 μ l del amortiguador del ensayo, 100 μ l de la hormona marcada y 200 μ l del antisuero específico.

* Para LH son 100 μ l del PBS-EDTA más 100 μ l de la hormona marca y 200 μ l del anticuerpo específico.

ESTANDARES:

Se tomaron las cantidades necesarias para tener las concentraciones antes mencionadas y se completaron con el amortiguador del ensayo, para llegar a un volumen de 300 μ l en el RIA de FSH y 100 μ l en el de LH; más 100 μ l de la hormona marcada y 200 μ l de anticuerpo.

POOLES DE CONTROL DE CALIDAD:

Obtenidos de ratas macho castradas, se tomaron 25, 50, 100 y 200 μ l para cada valor, respectivamente y se resuspendieron en el amortiguador del ensayo para completar un volumen de 300 μ l; 100 μ l de hormona marcada y 200 μ l del anticuerpo específico.

* Para LH, se toman 100, 50 y 25 μ l y se llevan a 100 μ l con el amortiguador del ensayo más 100 μ l de hormona marcada y 200 μ l de anticuerpo.

MUESTRAS:

150 μ l del suero del animal y 150 μ l del amortiguador del ensayo, para un volumen 300 μ l, 100 μ l de la hormona marcada y 200 μ l de anticuerpo.

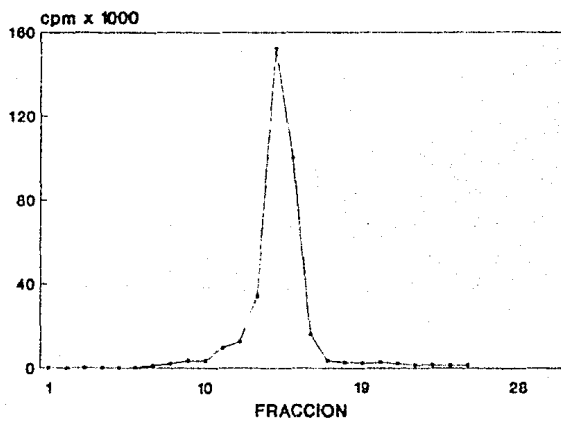
Una vez mezclados todos los reactivos se dejaron incubar a temperatura ambiente por 18-24 Hs. Transcurridas las cuales, se agregó el segundo anticuerpo en dilución 1:10, incubándose a temperatura ambiente por 18-24 Hs. Al finalizar éstas, se agregaron 2 ml. de agua fría para detener la reacción, centrifugándose a 3000 rpm/ 4°C. / 30 minutos. Se decantaron, secaron y contaron.

PURIFICACION DE LA TESTOSTERONA Y DIHIDROTESTOSTERONA*
RADIATIVAS POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA

*Nota.- Como se puntualizó en las metodologías anteriores para estas hormonas, ya que el procedimiento básico es el mismo, sólo se considerarán aquellos puntos relevantes para (³H)-DHT.

Procedimiento.- (³H)-Testosterona obtenida de Amersham International Limited, con una actividad específica de 92 Ci/mmol (58.4 Ci/nmol para DHT), se sometió a cromatografía de elución en una columna de Sephadex LH-20. Se pesaron 7 g de Sephadex LH-20, en un matraz Erlenmeyer se le adicionaron 100 ml de una mezcla de tolueno-metanol (benceno-etanol para DHT), (85:15 v/v), dejándose en reposo 24 h. Para empacar la columna se colocó fibra de vidrio como soporte del Sephadex y se transfirió a una columna de cromatografía permitiendo que se sedimentara gradualmente. Aproximadamente 30 µCi de T fueron resuspendidos en 2.5 ml de tolueno-metanol (benceno-etanol para DHT) en un tubo cónico y colocados en la columna de cromatografía con una pipeta Pasteur. Posteriormente se eluyó con la misma mezcla y se colectaron fracciones de 1.0 ml, en un total de 25 muestras. De cada una de las fracciones se tomaron 10 µl y se determinó la radiactividad presente. Se seleccionó el número de alícuota que demostró tener el mayor número de cuentas por minuto y esa fracción se consideró como la porción más "pura" de la Testosterona radiactiva. La Figura 15, muestra el perfil típico de purificación, para T y DHT.

PURIFICACION DE 3H-TESTOSTERONA



PURIFICACION DE 3H-DIHIOTESTOSTERONA

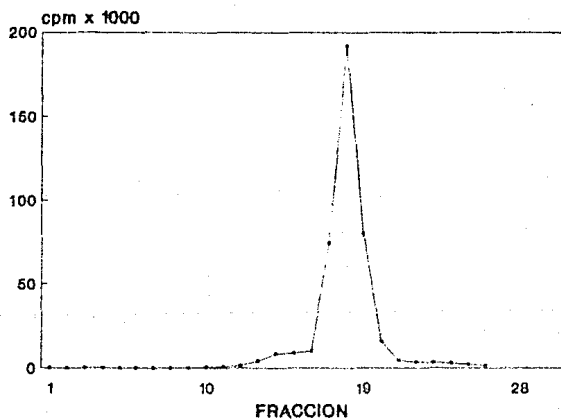


Figure 16. Purificación de 3H-T y 3H-DHT.

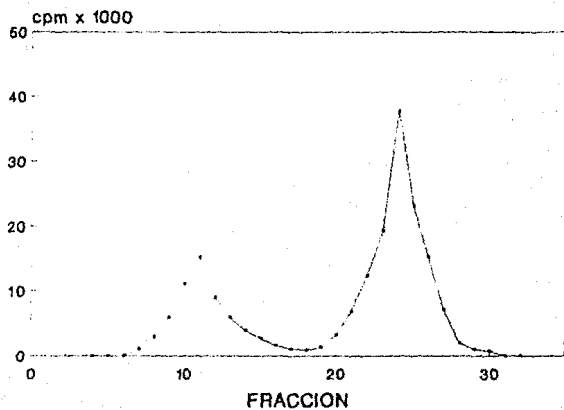
IODACION DE LAS HORMONAS PROTEICAS

El método consiste en mezclar los siguientes reactivos en el orden en que aquí aparecen:

- 1) 5 μ g de hormona en 50 μ l de PBS 0.01 M con pH de 7.4
- 2) 10 μ l de 125 I (equivalentes a 1 mCi).
- 3) 15 μ l de Cloramina T (a razón de 5 mg/3 ml de PBS 0.01 M) por 30 s con agitación en vortex.
- 4) 50 μ l de Metabisulfito de sodio (15 mg/ 5 ml de PBS 0.01 M), para finalizar la reacción, agitando en vortex por 10 seg.

Terminada la reacción, se separó la hormona marcada del 125 I no reaccionante por medio de cromatografía por exclusión, empleando una columna de Sephadex G-100 (Pharmacia Fine Chemicals A.D.). La mezcla, hormona marcada y yodo libre, se colocó sobre la superficie de la columna de cromatografía con pipeta Pasteur y se eluyó con PBS 0.01 M, pH 7.0, conteniendo 0.1 % de albúmina sérica bovina (ASB, Sigma Chemical Co. E.U.A.) y 0.02 % de azida de sodio. Durante la cromatografía se recolectaron 30 fracciones de 0.5 ml en tubos de 10 x 75 mm que contenían 200 μ l de PBS-BSA al 5 %. A cada una de éstas se les determinó el contenido de radiactividad en un contador para radiaciones gamma durante 15 segundos. La hormona marcada se colectó en las fracciones 9 a 10. De estas fracciones, se obtuvo una mezcla de donde se tomaron alícuotas de 100 μ l que se guardaron a -20°C hasta el momento del radioinmunoanálisis. En la Figura 16, podemos observar un perfil típico de iodación para estas hormonas.

IODACION DE FSH



IODACION DE LH

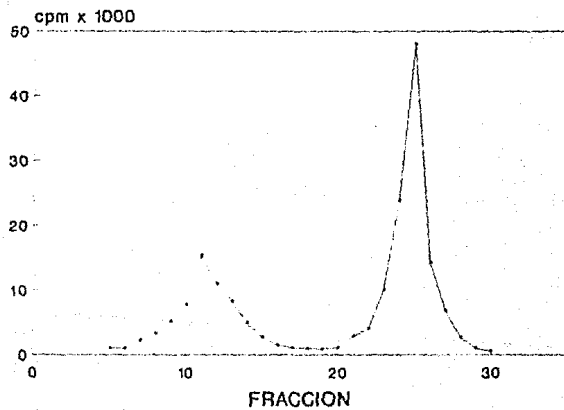


Figura 16. Perfil de iodación para FSH y LH.

OBTENCION DE UNA CURVA ESTANDAR.

Las diferentes concentraciones de los estándares fueron preparadas por doble dilución a partir de una solución concentrada de Testosterona con 24 nmol/l.

Una vez preparados los diferentes estándares se añadió a cada una de las diferentes diluciones la misma cantidad de ³H-T purificada (10,000 cpm) y un volumen constante de antisuero previamente caracterizado. Se permitió que llegara al equilibrio la reacción por incubación a 4°C durante 18 h; se separó la fracción de T libre del suero adicionando una suspensión de carbón-dextrán, centrifugando y decantándoles después. Se contó la radiactividad presente en la fracción de la (³H)-T unida al antisuero y se construyeron diferentes gráficas. La Figura 17 muestra una curva estándar normal para los ensayos de T, 5 α -DHT, LH y FSH.

La evaluación de la curva Dosis-Respuesta se realizó de acuerdo a los criterios ya establecidos de precisión, reproducibilidad, linealidad y correlación.

Se analizaron las siguientes representaciones gráficas:

a) Aritmética

Dosis / cpm

Dosis / % Unión

$$\text{donde } \% \text{ Unión} = \frac{\text{CPM (X)} - \text{CPM (UNE)}}{\text{CPM (UT)} - \text{CPM (UNE)}} \times 100$$

UT = Unión total

UNE = Unión no específica

(x) = Unión a cualquier dosis

b) Semilogarítmica Log dosis / % Unión

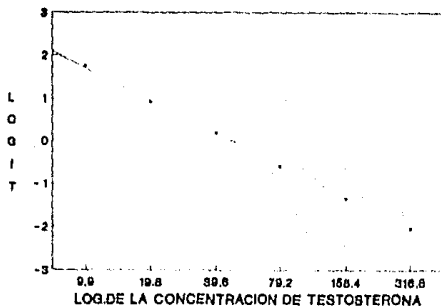
c) Logit / Log Log dosis / Logit Unión

donde: y = % Unión

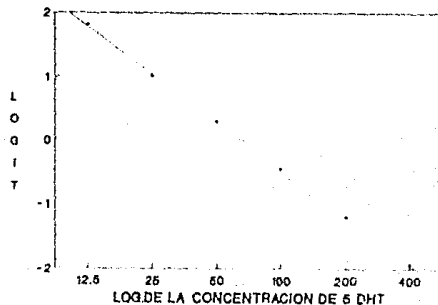
$$\text{Logit } y = \text{Ln } \frac{y}{100 - y}$$

Siendo la representación Logit / Log la que se seleccionó para la interpretación de todas las curvas generadas (44).

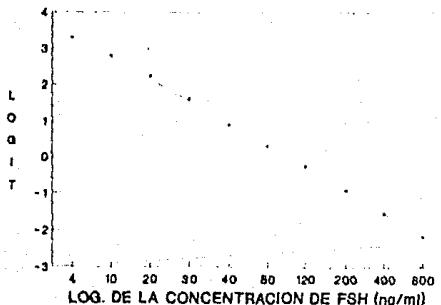
CURVA ESTANDAR DE TESTOSTERONA



CURVA ESTANDAR DE 5 α DHT



CURVA ESTANDAR DE FSH



CURVA ESTANDAR DE LH

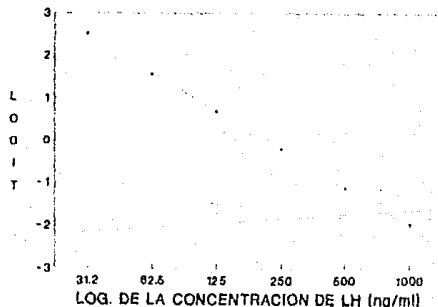


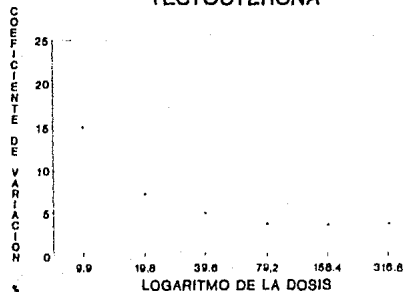
Figura 17. Curvas Patrón normales de cada ensayo.

OBTENCION DEL PERFIL DE IMPRECISION DEL ANALISIS.

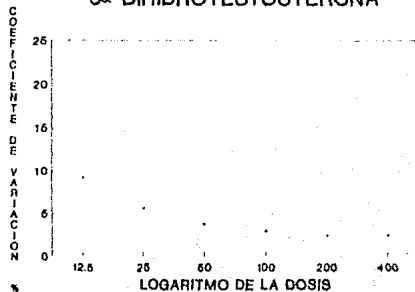
La forma más accesible en que se obtiene manualmente el Perfil de Imprecisión es construyendo la "envoltura del error" de la curva dosis-respuesta en base a las cuentas unidas vs. el logaritmo de la dosis.

De tal manera, en la Figura 18, podemos observar el perfil de Imprecisión para los Radioinmunoanálisis de las distintas hormonas empleadas en el presente estudio y en que puntos, éstas tienen una precisión aceptable, es decir un coeficiente de variación (C.V.) del 10 %.

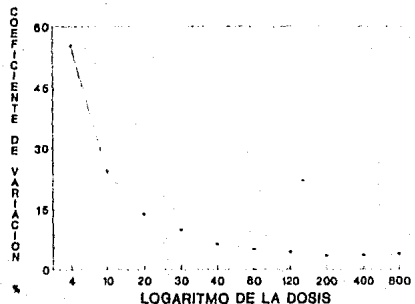
PERFIL DE IMPRECISION DEL RIA DE
TESTOSTERONA



PERFIL DE IMPRECISION DEL RIA DE
5 α -DIHIDROTESTOSTERONA



PERFIL DE IMPRECISION DEL RIA DE FSH



PERFIL DE IMPRECISION DEL RIA DE LH

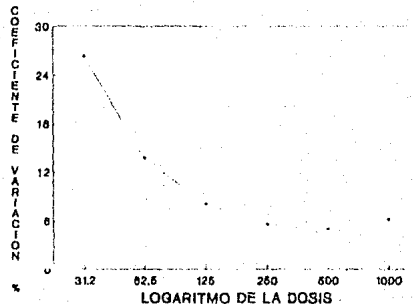


Figura 18. Perfil de Imprecisión para cada RIA.

EXTRACCION DE LA HORMONA (TESTOSTERONA) DEL PLASMA*.

La forma como se controló el proceso y la eficiencia de la extracción fué agregando a un "pool" de plasma humano, testosterona marcada con tritio a razón de aproximadamente 5000 cpm/ml. A un volumen del plasma se le adicionaron 10 vol. de éter dietílico frío y se agitó en vortex por 1 minuto. Una vez separadas las fases se congeló la fase acuosa, empleando un baño de acetona y anhídrido carbónico. El éter se decantó y evaporó a sequedad en una campana de extracción bajo corriente de nitrógeno. El extracto seco se resuspendió en 2 ml de buffer de fosfatos salino 0.1 M, pH 7.2 y se contó la radiactividad recuperada empleando una mezcla de centelladores en tolueno.

El resultado de 3 experimentos practicados en días diferentes se expresa en la Tabla 15:

TABLA 15: RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE RECUPERACION.

Experimento	Muestras	% Recuperación	C.V. %
1	30	93 + 6	6.4
2	30	91 + 4	4.2
3	30	95 + 3	3.1

En todos los experimentos llevados a cabo, la recuperación de la Testosterona radiactiva adicionada al plasma fue siempre superior a un 90 % lo que demuestra que el proceso es eficiente y reproducible.

* El procedimiento se aplicó también a DHT .

APENDICE No. 12

PREPARACION DE MUESTRAS PARA UN PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Para evaluar la precisión y la reproducibilidad de los ensayos se prepararon tres lotes de suero humano de aproximadamente 100 ml c/u a concentraciones de 2, 10 y 20 nmol/l.

Para tal efecto se colectaron los residuos de suero de las muestras procesadas en el laboratorio central de Endocrinología del INNSZ, se mezclaron y se hicieron cuantificaciones por radioinmunoanálisis de cada lote. Una vez obtenidos los valores promedio, se agregó la cantidad de hormona necesaria para obtener el valor deseado de cada lote. $\bar{x} - n$, los valores obtenidos fueron los siguientes:

Control de Calidad Bajo	0.21 nmol/l
Control de Calidad Medio	0.97 nmol/l
Control de Calidad Alto	2.02 nmol/l

La reproducibilidad de los datos obtenidos se evaluó calculando el coeficiente de variación intra e inter-análisis.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 16:

TABLA 16: RESULTADO DE LA VARIACION INTRA E INTERANALISIS DE LOS PCC.

	% De Variación	
	Intra-análisis	Inter-análisis
PCC Bajo	7.33	11.04
PCC Medio	2.25	3.51
PCC Alto	5.17	6.98

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

- 1.- Makin, H.L.J. (1975). Biochemistry of steroid hormones
Blackwell Scientific Publications. Oxford, England.

- 2.- Jost, A., Vigier, B., Prepin, J. and Perchellet, J. (1973).
Studies on sex differentiation in animals. Recent Progress in
Hormone Research (29), 1-41.

- 3.- Liang, T. (1977). Androgens action: Receptor and rapid
responses. In Androgens and antiandrogens Raven Press, New
York.

- 4.- Purvis, K. (1977). Intratesticular transport of androgens. In
Androgens and antiandrogens. Raven Press. New York.

- 5.- Turner, T. (1979). On the epididymus and its function.
Investigation in Urology 16: 311-321.

- 6.- Rosness, P., A. & Eik-Ness, K., B. (1977). Biosynthesis of
androgens. Androgens and antiandrogens Raven Press, New York.

- 7.- Santen, R., J. (1977). Is aromatization of testosterone to estradiol required for inhibition of luteinizing hormone secretion in men? Journal of Clinical Investigation (56), 1555-1563.
- 8.- Verjans, H., L. van der Moleu, H., J. & Elik-Nes, K., B. (1975). Relation between circulating levels of testosterone, LH and FSH in intact and castrated adult male rats after testosterone administration. Acta Endocrinologica 79 (1) 380-386.
- 9.- Agata, R., D. Gulizia, S., Andò, S. & Polosa, P. (1975). Effects of dihydrotestosterone on LH release induced by LH-RH in men. Acta Endocrinologica. 79 (1), 1-6.
- 10.- Schaison, G., Renoir, M., Lagoguey, M., & Mowszowicz, I. (1980). On the role of Dihydrotestosterone in regulating luteinizing hormone secretion in man. Journal of Clinical Endocrinology. (51), 5.
- 11.- Hafez, F.S.E. (1976). Parameters of sexual maturity in man. Sexual maturity physiological and clinical parameters. Ed. Hafez and Peluso ann Arbor. Science Mic. Chicago.

- 12.- Bermant, G. & Davidson, J., M. (1974). Biological basis of sexual behavior. Harper and Row. New York.
- 13.- Hamilton, J., B. (1943). Demonstrable ability of penile erection in castrate men with markedly low titers of urinary androgen. Proceedings, Society for Experimental Biology and Medicine. (54), 309.
- 14.- Kinsey, A., C. (1953). Sexual behavior in human female. Saunders, Philadelphia.
- 15.- Cooper, A., J. (1972). Diagnosis and management of "endocrine impotence". British Medical Journal. 2, 34-36.
- 16.- Davidson, J., M., Camargo, C. & Smith, E. (1979). Effects of androgen on sexual behavior in hypogonadal men. Journal of Endocrinology and Metabolism. 48 (6), 955-958.
- 17.- Bardin, W., Paulsen, A. (1981). Tratado de Endocrinología Williams R. H. México.

- 18.- Academia Nacional de Medicina (1988). Tratado de medicina interna. III. Enfermedades del Sistema Endócrino. pp 82-88. El Manual Moderno, México.
- 19.- Larrea, F., Oliart, R., M., Escorza, A., Valencia, X. y Ulloa-Aguirre, A. (1988). Mecanismo de acción de las gonadotropinas hipofisiarias y regulación de la esteroidogénesis. Revista de Investigación Clínica. (40), 33-45.
- 20.- Hall, P. (1979). Testicular hormones synthesis and control. Endocrinology 1 (119), 1511-1519. Grune & Stratton. New York.
- 21.- Uribe, M.E. (1988). Tratado de Medicina Interna I (77): Organización del sistema endócrino y mecanismos de acción hormonal. (87): Testículo. Ed. Médica Panamericana, México.
- 22.- Farreras-Rozmán. (1982). Medicina Interna II (9), Testículo: 587-744. Ed. Marín, México.
- 23.- Guevara, A. J. (1986). Hiperprolactinemia y el eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo Tesis de Posgrado. Facultad de Medicina. UNAM.

- 24.- O'Malley, W., B. & Schrader, T., W. (1976). The receptors of steroid hormones. Scientific American (234), 32-43.
- 25.- Strand, F., L. (1982). Fisiología humana 2: Regulación de los sistemas nervioso y endócrino. Interamericana, México. 694 p.
- 26.- Mooradian, A., D., Morley, J. & Koreman, S. (1987). Biological action of androgens. Endocrinology Review (8), 1-28.
- 27.- Nieschlag, E. (1982). Current status of testosterone substitution therapy. International Journal of Andrology (5), 225-228.
- 28.- Krieger, D., T. & Verdin, W., C. (1986). Therapy in Endocrinology and Metabolism Current Therapy Series Pub. the C.V. Mosby Company, Missouri.
- 29.- Franchimont P, Kicovic P, Matley A. and Roulier R. (1978). Effects of oral testosterone undecanoate in hypogonadal male patients. Clinical Endocrinology (9), 313-320.

- 30.- Schülte-Beerbüll M. and Nieschlag E. (1980). Comparison of testosterone, dihydrotestosterone, LH and FSH hormone in serum after injection of testosterone enanthate of testosterone or testosterone cypionate. Fertility and Sterility 33 (2), 201-203.
- 31.- Fiet, J., Morville, R., Chemama, D., Villette, J., M. Gourmel, B., Brerault, J., L. & Dreux, C. (1982). Percutaneous absorption of 5 α -DHT in man. I. Plasma androgen and gonadotrophin levels in normal adult men after percutaneous administration of 5 α -DHT. International Journal of Andrology (5), 586-594.
- 32.- Chemama, D., Morville, R., Fiet, J., Villete, J., M., Tabuteau, F., Brerault, J., L. & Passa, Ph. (1982). Percutaneous absorption of 5 α -DHT in man. II: Percutaneous administration of 5 α -DHT in hypogonadal men with idiopathic haemochromatosis, Clinical and hormonal effectiveness. International Journal of Andrology (5), 595-606.
- 33.- Sogmmegna, A. (1976). A new systems of drug delivery the changing pattern of therapeutics. Proceeding in drugs delivery systems. National Institute of Healt. Bethesda, M.D.

- 34.- Beck, L., R. (1980). Low acting steroidal contraceptive systems. Research Frontiers in Fertility Regulation (1), 1-16.
- 35.- Garza-Flores, J., Díaz-Sánchez, V., Jiménez-Thomas, S. & Rudel, H., W. (1984). Development of a low-dose monthly injectable contraceptive system: A Choice of compounds, dose and administration route. Contraception 30 (4), 371-379.
- 36.- Díaz-Sánchez, V., Garza-Flores, J., Rosales, M., D., C. & Thomas, S., J. (1985). Sustained release systems ethynil estrogens. Advances in Contraception Delivery Systems (1), 138-145.
- 37.- Anderson, D., C. (1974). Sex-hormone-binding globulin. Clinical Endocrinology (3), 69-96.
- 38.- Daughaday, W., H. (1958). Binding of corticosteroids by plasma protein. III: The binding of corticosteroid and plasma protein fractions as measured by equilibrium dialysis. Journal of Clinical Investigation (37), 511.

- 39.- Mercier, C., A. and Baulieu, E., E. (1966). A testosterone binding globulin. In: Proceedings of the second symposium on steroids hormone, Ghent. 1965. Excerpta Medica International Congress Series 101, 202.
- 40.- Hansson, V., L. & Reusch, E. (1972). Physicochemical properties of the 5 α -dihydrotestosterone binding protein in human serum. Steroids (20), 555.
- 41.- Larrea, F., Lince-Campillo, M. y Pérez-Palacios, G. (1983). Mecanismo de transporte e interacción de NET con proteínas plasmáticas. Revista de Investigación Clínica (35), 189-196.
- 42.- Westpal, U. (1980). Mechanics of steroid binding to transport proteins. Pharmacological Modulation of Steroid Action (23), 33-47.
- 43.- Yalow, R., S. & Berson, S., A. (1960): Immunoassay of androgens plasma insulin in man. Journal of Clinical Investigation (39), 1157-1175.

- 44.- W.H.O. Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction. Programme for the Provision of Matched Assay Reagents for the Radioimmunoassay of Hormone in Reproductive Physiology. Method Manual. (1984), 1-85. (Department of Endocrinology. Chelsea Hospital for Women).
- 45.- Abraham, G., E. (1975). Radioimmunoassay of steroids in biological fluids. Journal of Steroid Biochemistry (6), 261-270.
- 46.- Abraham, G. E., Manlimas, F., S. & Garza, R. (1977) Radioimmunoassay of steroids. In Handbook of Radioimmunoassay. Edited by G., E., Abraham and Marcel Dekker. New York. 591p.
- 47.- Barberia, J., M. and Thorneycroft, I. (1974). Simultaneous radioimmunoassay of testosterone and dihydrotestosterone. Steroids 23 (5), 757-766.
- 48.- Hunter, W. M. & Greenwood, F. C. (1962). Reproduction of Iodine 131 labelled growth hormone of high specific activity. Nature (194), 495-496.

- 49.- Greenwood, F., C. & Hunter, W., M. (1963). The preparation of ¹²⁵I-labeled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochemistry Journal (89), 114.
- 50.- Leidenberger, F. & Reichert, L. (1973). Species differences in luteinizing hormone as inferred from slope variations in a radioligand receptor assay. Endocrinology (92), 646-649.
- 51.- Frankel, A., I., Mock, E., J., Wright, W., W. & Kamel, P. (1975). Characterization and physiological validation of radioimmunoassay for plasma testosterone in the male rat. Steroids 25 (1): 73-98.
- 52.- Lowry, O., H. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent Journal of Biological Chemistry (103), 265.
- 53.- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Annals of Biochemistry (72), 248.

- 54.- Swinscow, T., D., V. (1978). Statistics at square one. British Medical Journal. London, England. 86 p.
- 55.- Wayne, W., D. (1979). Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud. Ed. Limusa, México. 485 p.
- 56.- Rodbard, D. & Hutt, M., D. (1974). Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassay and immunoradiometric assays. Clinical Chemistry (20), 1255.
- 57.- Bedolla, N., T., Ulloa-Aguirre, A., Landeros, J., V. y Pérez-Palacios, G. (1984). Análisis de datos y control de calidad en el radioinmunoanálisis. I. Guía para la evaluación de resultados. Revista de Investigación Clínica (36), 179-192.
- 58.- Goodman, L. & Gilman, A. (1970). The pharmacological basis of therapeutics. Mc Millan Publishing Co. Inc. New York, USA.
I, II, III.
- 59.- Cantrill, J., A., Dewis, P., Large, D., H., Newman, M. & Andreson, D., C. (1984). Which testosterone replacement therapy? Clinical Endocrinology (21). 97-107.