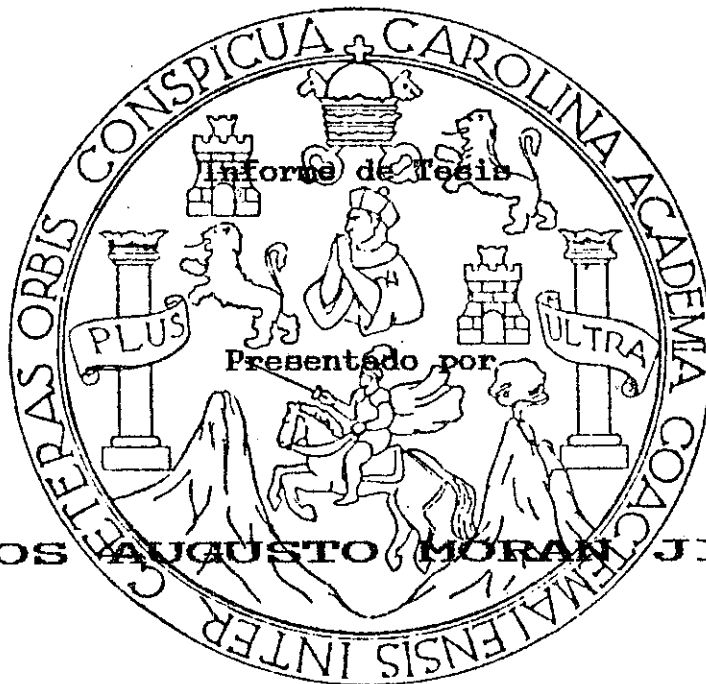


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

"EVALUACION DE RADIOINMUNOANALISIS CON HORMONAS TRITADAS
PARA DOSIFICACION DE PROGESTERONA, ESTRADIOL Y
TESTOSTERONA EN SUERO"



CARLOS AUGUSTO MORAN JIMENEZ

Para optar al titulo de

QUIMICO BIOLOGO

IMPRESO EN LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

Guatemala, febrero de 1996

A
OP
7(1703)
E.B

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANO	LIC.	JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR
SECRETARIA	LICDA.	ELEONORA GAITAN IZAGUIRRE
VOCAL I	LIC.	MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ
VOCAL II	LIC.	GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN
VOCAL III	LIC.	MIGUEL ORLANDO GARZA SAGASTUME
VOCAL IV	BR.	ANA MARIA RODAS CARDONA
VOCAL V	BR.	HAYRO OSWALDO GARCIA GARCIA

ACTO QUE DEDICO

- A DIOS Por su gran misericordia y porque toda sabiduria viene de El.
- A MI PADRE ROMULO AUGUSTO MORAN por su ejemplo de rectitud, responsabilidad y bondad.
- A MI MADRE ANA MARIA DE MORAN por brindarme su amor y apoyo en todo momento.
- A MI ESPOSA YOLANDA DE MORAN con amor, por haberme sabido comprender en mis momentos de flaqueza.
- A MIS HIJOS CARLOS AUGUSTO Y MARIAM por ser la inspiración de mi esfuerzo.
- A MIS HERMANOS ROMULO, LUIS y ANA MARIA con amor.
- A MIS COMPANEROS Todos aquellos con quienes compartimos momentos buenos y malos, GRACIAS.

AGRADECIMIENTOS

A la Licda. MARIA CECILIA SANCHEZ por su asesoria y consejos brindados en la elaboraci3n de 3sta tesis.

A la Licda. CLEMENCIA GALVEZ por sus sabios consejos y ayuda desinteresada.

Al Lic. JORGE BARAHONA por su amistad y gran ayuda en todo momento.

A la Direcci3n General de Energia Nuclear y al Depto. de Radioinmunoan3lisis del Hospital General San Juan de Dios por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo, en especial a la Licda. ROSSANA MAZARIEGOS.

A todas las personas que de una u otra forma contribuyeron a la finalizaci3n de esta tesis.

INDICE

1.	RESUMEN	01
2.	INTRODUCCION	02
3.	ANTECEDENTES	04
	3.1 Estradiol	04
	3.2 Señal del Estradiol	05
	3.3 Progesterona	08
	3.4 Testosterona	14
	3.5 Radioinmunoanálisis	18
	3.6 Métodos de detección	22
	3.7 Manejo de desechos con tritio	27
4.	JUSTIFICACIONES	30
5.	OBJETIVOS	31
6.	HIPOTESIS	32
7.	MATERIALES Y METODOS	33
	7.3 Procedimiento	38
	7.3.9 Diseño estadístico	44
8.	RESULTADOS	46
9.	DISCUSION DE RESULTADOS	51
10.	CONCLUSIONES	54
11.	RECOMENDACIONES	55
12.	REFERENCIAS	56
13.	ANEXOS	60

1. RESUMEN

El propósito de esta investigación fue desarrollar y validar ensayos para la determinación sérica de estradiol, progesterona y testosterona por radioinmunoensayo (RIA), empleando reactivos que utilizan tritio (^3H) como trazador.

Se usaron 7 soluciones patrón a diferentes concentraciones y 3 pools de control de calidad (todos procesados por duplicado).

Se determinó la sensibilidad y especificidad de cada una de las metodologías, se hizo una comparación entre métodos tritiados y aquellos que utilizan ^{125}I con el objeto de establecer cuál de ellos es el más adecuado para dosificar estradiol, progesterona y testosterona.

Se estudiaron dosis al 20%, 50% y 80% de enlace, se demostró que existe diferencia significativa ($p=0.0001$) con respecto a reproducibilidad entre los métodos con ^{125}I y ^3H a las dosis 20% y 50%.

Respecto a los controles, existe diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$) entre el ^{125}I y ^3H para el control C (concentración alta). No fue posible hacer un análisis estadístico de los datos con ^3H para la hormona progesterona, debido a un deterioro del estándar, lo cual no permitió que se diera un desplazamiento adecuado de la curva, por esta razón no se pudo comparar un método con otro. Si se va a usar indistintamente una u otra metodología se recomienda establecer rangos propios de referencia.

2. INTRODUCCION

El estradiol, progesterona y testosterona son en parte las hormonas responsables de regular cambios y funciones especiales, tanto en hombres como en mujeres, permitiendo así el desarrollo evolutivo de órganos y propiedades fisiológicas reproductivas acordes al sexo y etapa de desarrollo de la persona.

El ovario produce estrógenos, andrógenos y progesterona. El estradiol representa el principal producto de secreción de los folículos maduros y la progesterona es el principal producto de secreción del cuerpo amarillo.

En el hombre, los testículos producen una gran cantidad de testosterona en las células de Leydig (aproximadamente 5 a 12 mg/día).

La determinación sérica de estradiol, progesterona y testosterona suministra valiosa información acerca de la fisiología reproductiva, contribuyendo a la identificación y control de trastornos tales como infertilidad, hipogonadismo y otra serie de anomalías que pueden envolver niveles anormales de dichas hormonas.

Actualmente, en el laboratorio de Radioinmunoanálisis del Departamento de Medicina Nuclear del Hospital General San Juan de Dios se realiza la determinación sérica de estas hormonas, mediante el uso de juegos de reactivos comerciales elaborados fuera del país usando Yodo 125 (^{125}I) como trazador.

En el presente trabajo se desarrollaron y validaron ensayos para la determinación sérica de estradiol, progesterona y testosterona por radioinmunoanálisis, empleando reactivos a granel que utilizan al tritio (^3H) como trazador. Los reactivos utilizados provienen de un laboratorio de inmunodiagnóstico de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se pretendió validar estos reactivos, ya que los métodos tritiados para estas hormonas son los que describe OMS como procedimientos de referencia. Para cada radioinmunoensayo se determinaron las condiciones óptimas de trabajo.

Se determinó la sensibilidad y especificidad de cada una de las metodologías, se hizo una comparación entre métodos tritiados y aquellos que utilizan ^{125}I con el objeto de establecer cuál de ellos es el más adecuado para dosificar estradiol, progesterona y testosterona.

3. ANTECEDENTES

En los primeros meses del embarazo, los compuestos androgénicos que se utilizan para la síntesis de estrógenos proceden del torrente sanguíneo materno. Alrededor de la semana 20 del embarazo, la mayor parte de los estrógenos que se secretan en la orina derivan de andrógenos fetales (1).

Los estrógenos son esteroides que presentan un anillo aromático, que contienen 3 dobles enlaces no saturados (2).

3.1 ESTRADIOL

El estradiol representa el principal producto de secreción de los folículos maduros, y la progesterona es el principal producto de secreción del cuerpo amarillo. El estradiol, un esteroide C-18 se caracteriza por la presencia de un anillo fenólico y un grupo hidroxilo en la posición 17B mientras que la progesterona, un esteroide C-21, se caracteriza por la presencia de un grupo cetónico en el anillo aromático y una cadena lateral de 2 carbonos a nivel del C-17, con un grupo cetónico en la posición C-20 (3).

En el hombre los testículos secretan cantidades significativas de estradiol y pequeñas de estrona. Sin embargo, la secreción testicular probablemente solo representa un tercio de la producción total de estradiol en el hombre, y el resto proviene de la transformación extraglandular de la testosterona y estrona. Por ello, los testículos son indirectamente responsables de la mayor parte de la producción

de estrógenos en los hombres (2).

El estradiol se encuentra fijado a la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG), que es la misma proteína transportadora que fija la testosterona.

En la mujer la determinación de las concentraciones de estrógenos en suero y orina son importantes para la evaluación de afecciones del ciclo menstrual y para la monitorización de la ovulación (4,5).

Para la estimación de los estrógenos totales en suero, el método de Brown (método colorimétrico) suele ser poco sensible para la mayoría de los propósitos, por lo que a menudo se utiliza el radioinmunoensayo del estradiol (2,6).

Como sucede con otras hormonas esteroideas que se determinan por radioinmunoensayo, el estradiol suele cuantificarse luego de su extracción y purificación cromatográfica. El anticuerpo elaborado con proteína conjugada de estradiol en la posición C-3 o C-17 puede mostrar una reactividad cruzada de hasta el 30 o 50 % con otros estrógenos, mientras que el anticuerpo producido utilizando la conjugación en la posición C-6 es más específico (2).

3.2 SEÑAL DEL ESTRADIOL

Para poder medir los cambios apropiados a lo largo del ciclo, los niveles de estradiol deben subir y bajar sincrónicamente con otros cambios morfológicos. Dos posibilidades de mala función pueden suceder: los niveles de

estradiol pueden ser inadecuados para estimular la oleada ovulatoria de hormona luteinizante (LH) o los niveles de estradiol pueden no caer lo suficiente como para permitir la adecuada respuesta de hormona folículo estimulante (FSH) necesaria para la estimulación folicular (7).

Obviamente la paciente con disgenesia gonadal e insuficiencia ovárica se presentará a la consulta con amenorrea e infertilidad debida a una total falta de secreción de estrógenos. Comúnmente el problema que presenta la paciente es la imposibilidad de ovular a pesar de que haya ciertos niveles de gonadotropinas y de producción de estrógenos (8). Una adecuada estimulación por la LH no implica una falla absoluta en la producción gonadal de estrógenos. La capacidad de alcanzar el nivel crítico del estradiol necesario para desencadenar la oleada de LH en la mitad del ciclo puede deberse a una diferencia relativa en la producción de hormonas, probablemente asociada con la sincronía en el crecimiento y en la maduración folicular (9,10). Esto se observa normalmente en muchas adolescentes entre la menarquia y el inicio de las ovulaciones, y en la mujer premenopáusicas, la cual antes de que desaparezcan sus menstruaciones, pasan por un período en el que no se consiguen señales de estradiol que lleguen a los niveles críticos en los momentos apropiados del desarrollo del ciclo (7,11).

El segundo posible mecanismo en el que puede ocurrir una

mala función ocurre cuando las concentraciones sanguíneas de esteroides sexuales se encuentran en el nivel más bajo, lo que debe tener lugar para desencadenar el evento inicial del ciclo, o sea, el aumento en la FSH. Si existen niveles altos de estrógenos durante un período sostenido en esta fase, éstos evitarán la estimulación del crecimiento folicular y la maduración de los folículos por parte de la FSH. Una reducción apropiada y oportuna en los estrógenos de la sangre requiere que cese su secreción, que se produzca una depuración plasmática apropiada y un metabolismo periférico adecuado, y que no haya una contribución significativa a la producción de estrógenos por parte de las fuentes extragonadales que podrían introducirlos en la circulación (12,13). La depuración y el metabolismo de los estrógenos pueden dificultarse por condiciones patológicas como el hipotiroidismo o las enfermedades hepáticas (7).

La contribución extragonadal a los niveles sanguíneos de estrógenos solo se ha apreciado como un factor significativo en los tiempos recientes. Si bien la glándula suprarrenal no segrega cantidades apreciables de estrógenos, contribuye sin embargo, a los niveles totales circulantes de estrógenos. Esto se realiza por la conversión periférica extragonadal de los precursores de 19 carbonos androgénicos, como la androstenediona que se convierte en estrógenos (7).

De allí que el estrés psicológico o físico puede servir

para aumentar la contribución suprarrenal de precursores estrogénicos y su subsecuente conversión a estrógenos puede sostener los niveles sanguíneos de estrógenos durante una fase en la que se requiere que disminuyan para que el ciclo se efectúe (6). Datos recientes indican asimismo que el tejido adiposo es capaz de convertir androestenediona en estrógenos; esto puede explicar la asociación bien conocida, entre obesidad y anovulación (8,14).

Durante la menopausia las concentraciones de estradiol disminuyen gradualmente hasta alcanzar valores del orden del 15% de los niveles premenopáusicos (15).

En niños prepúberes, los valores normales para estradiol mediante RIA son de hasta 20 pg/ml. (4 pmol/l); en adultos varones se encuentra entre 10 y 80 pg/ml (36.7 a 293.7 pmol/l) (2).

3.3 PROGESTERONA

La progesterona es una hormona sexual femenina. Este compuesto en unión con los estrógenos, regula los órganos accesorios durante el ciclo menstrual (4,6). La importancia de esta hormona reside también en que prepara el útero para la implantación de blastocistos y para el mantenimiento del embarazo. En mujeres no embarazadas, la progesterona es secretada principalmente por el cuerpo lúteo (masa glandular amarilla en el ovario, formada por un folículo ovárico después de la descarga del óvulo), durante el embarazo, la placenta es

la mayor fuente de progesterona (8,16).

Los niveles de progesterona son bajos antes del pico gonadotropínico en la fase media del ciclo. Poco después del pico de gonadotropinas comienza a aumentar rápidamente, alcanzando su máximo durante la mitad de la fase luteínica (17).

A continuación se produce una disminución progresiva de sus niveles, no existiendo apenas concentraciones detectables de progesterona antes de la menstruación. Si bien la progesterona en cantidades significativas produce una retroacción negativa sobre la secreción de gonadotropinas, no constituye el componente principal en el sistema de retroacción negativa de los esteroides ováricos (17).

Las pequeñas cantidades de progesterona presentes en los varones y en las mujeres no menstruantes se derivan fundamentalmente de la conversión extraglandular de la pregnenolona suprarrenal y del sulfato de pregnenolona a progesterona y de la secreción de progesterona por las suprarrenales. En el suero aproximadamente el 18% de la progesterona se encuentra fijada a la globulina fijadora del cortisol, y el 79% a la albúmina, mientras que el resto aparece libre (no fijada) (2).

La producción de la progesterona por el cuerpo lúteo puede evaluarse indirectamente mediante la determinación de la temperatura corporal basal. Durante la fase luteínica se

produce un incremento de aproximadamente 0.5° C en la temperatura corporal que se prolonga durante 10 a 12 días (porción hipertérmica de la fase luteínica) y sigue un curso paralelo al incremento de la concentración de progesterona (2).

La función del cuerpo lúteo puede evaluarse mediante la determinación de la concentración sérica de progesterona. Si bien los radioinmunoensayos convencionales, que implican la extracción de la progesterona con solventes orgánicos, han sido empleados, los más recientes enfoques incluyen el desplazamiento de la progesterona de sus posiciones de fijación con danazol o cortisol, liberando la progesterona para su análisis sin necesidad de extracción (18). Con los métodos de radioinmunoensayo se detectan concentraciones séricas de progesterona inferiores de 1 ng/ml (3.2 nmol/l) durante la fase preovulatoria. En el momento del pico de LH, los niveles séricos de progesterona comienzan a aumentar y aproximadamente de 4 a 6 días después alcanzan un máximo entre 10 y 20 ng/ml (31.8 a 63.6 nmol/l). Tras permanecer más ó menos estables durante aproximadamente una semana las concentraciones de progesterona disminuyen con rapidez hasta valores próximos a 1 ng/ml (3.2 nmol/ml) poco después del inicio de la menstruación (2,19).

Una progesterona sérica en la mitad de la fase luteínica de 5 ng/ml (15.9 nmol/l) o superior, constituye un índice

satisfactorio de ovulación. En el varón adulto, los niveles de progesterona suelen ser inferiores a 1 ng/ml (3.2 nmol/l); los niveles son constantes y ligeramente inferiores a los detectados en las mujeres durante la fase folicular del ciclo menstrual. En los niños las concentraciones de progesterona son de aproximadamente 0.3 a 0.4 ng/ml (10.5 a 12.8 nmol/l) hasta la segunda mitad de la pubertad, momento en que se aumenta aproximadamente un 50% (2).

La mayor parte de la progesterona es producida por el cuerpo amarillo hasta alrededor de la 10 semana de gestación. Entre la semana séptima y la duodécima, la placenta emerge como la fuente más importante de progesterona. En consecuencia, la pérdida del cuerpo amarillo antes de la séptima semana de gestación es seguida invariablemente por un aborto. Al término del embarazo, los niveles de progesterona en plasma oscilan entre 100 y 200 mg/ml (7,20,21).

Estudios recientes indican que la progesterona puede ser importante en la supresión de la respuesta inmunológica materna con relación al feto. Es posible que el papel fundamental de la progesterona sea servir como el principal sustrato para la producción por parte de la glándula suprarrenal del feto, de glucocorticoides y de mineralocorticoides (22,23). La progesterona puede medirse de modo directo, mediante radioinmunoensayo empleando un anticuerpo altamente específico (18,24).

Los niveles de progesterona en las mujeres postpuberales o premenopáusicas varía según la fase del ciclo reproductor.

Los niveles de progesterona en los hombres y en las mujeres prepúberales o postmenopáusicas deben ser relativamente estables.

La detección de un nivel aislado de progesterona de aproximadamente 3 ng/ml obtenido entre 4 y 10 días de la aparición de la siguiente menstruación es un indicio presuntivo de ovulación (3).

3.3.1 AUMENTO DEL NIVEL DE PROGESTERONA

El incremento del nivel de progesterona puede detectarse en el embarazo o en casos de hiperfunción ovárica secundaria (3).

3.3.2 DISMINUCION DEL NIVEL DE PROGESTERONA

La disminución del nivel de progesterona se observa en los casos de hipofunción ovárica primaria o secundaria (3).

3.3.3 INTERACCION DE LA PROGESTERONA CON OTRAS HORMONAS DE LA HIPOFISIS ANTERIOR

Los estrógenos y la progesterona pueden influir sobre la respuesta de la hipófisis anterior a la hormona liberadora de gonadotropina (GNRH), tanto en su aspecto cualitativo como en el cuantitativo. Estos efectos de los esteroides sexuales son importantes en la preparación de una descarga ovulatoria de gonadotropinas (13).

La liberación prematura de gonadotropinas se evita por la

acción negativa inhibitoria del estradiol sobre la respuesta secretora hipofisiaria frente a la GNRH.

Los niveles bajos de progesterona en presencia de estrógenos, aumentan la secreción hipofisiaria de LH y producen la "oleada" de FSH en respuesta a la a la GNRH, en la mitad del ciclo (25).

Tan pronto como los niveles ascendentes de LH producen los cambios morfológicos correspondientes a la luteinización en el folículo destinado a ovular, la capa granulosa comienza a segregar progesterona directamente al torrente sanguíneo.

El proceso de luteinización se inhibe por la presencia de un ovocito, y, en consecuencia, la producción de progesterona es suprimida en alguna medida, lo que asegura que solo lleguen a la hipófisis niveles bajos de progesterona. Después de la ovulación, una luteinización rápida y completa se acompaña de un importante aumento en los niveles de progesterona, el cuál, en presencia de estrógenos, ejerce una intensa acción de retroalimentación negativa sobre el hipotálamo para inhibir la liberación de GNRH. Esta acción combinada de la progesterona y los estrógenos es el efecto básico que se utiliza en las píldoras anticonceptivas para evitar la ovulación (7,26).

En resumen puede decirse que los estrógenos (mayoritariamente el estradiol), inducen a la oleada de gonadotropinas a través de efectos inhibidores sobre la hipófisis e intensifican la respuesta secretoria de LH frente

a la GNRH; mientras que los niveles bajos de progesterona intensifican la respuesta receptora de FSH frente a la GNRH, y los niveles altos de progesterona inhiben la liberación hipotalámica de GNRH.

El aumento en el estradiol durante la fase folicular tardía es el gatillo que desencadena la oleada de gonadotropina. Existen dos requerimientos críticos para que el estradiol pueda estimular la liberación en oleada de GNRH.

El estradiol circulante debe llegar a un nivel de concentración superior a 200 pg/ml, y esta concentración debe mantenerse por un período crítico (alrededor de 50 horas) (27).

Los niveles altos de gonadotropinas persisten durante aproximadamente 24 horas, y luego los niveles de progesterona y de estradiol que segrega el cuerpo amarillo suprimen estos valores de gonadotropina hasta sus niveles más bajos (7).

3.4 TESTOSTERONA

Los testículos presentan dos funciones principales:

3.4.1 La espermatogénesis, es decir, la producción de células germinales.

3.4.2 La esteroidogénesis, es decir, la síntesis y posterior secreción de hormonas androgénicas (2).

Si bien todavía no está claro cuál es el papel de cada una de las diversas hormonas que controlan la espermatogénesis, en relación con las demás, así como los

lugares exactos en los que cumplen sus acciones, hay que reconocer que se han hecho muchos progresos al respecto (7).

En el varón la LH se fija a los receptores de las células de Leydig testiculares, facilitando la conversión del colesterol en testosterona. Una vez se forma ésta en la célula de Leydig, los capilares y las venas la transportan a la periferia o atraviesan las células mioides testiculares que penetran en los túbulos seminíferos en donde participan en la espermatogénesis (7).

Para iniciar la espermatogénesis en animales, la testosterona actúa en primer lugar sobre las espermatogonias, y luego estimula a los espermatocitos primarios para que complete la división meiótica que originen a los espermatocitos secundarios y espermátides jóvenes (1).

La FSH es responsable de la activación de los túbulos seminíferos, dando lugar a la producción de esperma y la conversión de testosterona en estradiol, la testosterona, que difunde de las células de Leydig a los túbulos seminíferos, aparece fijada a una proteína fijadora en concentraciones 20 veces superiores a las de la circulación periférica. En los túbulos seminíferos, la testosterona estimula los espermatocitos primarios para formar espermatocitos secundarios y finalmente espermatocitos jóvenes. La secreción testicular es responsable del 95% de la testosterona circulante en el varón. Además de la testosterona, el

testículo también secreta dihidrotestosterona, progesterona, 17-Hidroxiprogesterona y androstenodiona (2).

En la mujer, el ovario y las suprarrenales secretan pequeñas cantidades de testosterona, sin embargo, la mayoría de la testosterona en sangre deriva del metabolismo de la androstenodiona.

Aproximadamente el 60% de la testosterona circulante se fija intensamente a la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), betaglobulina sintetizada en el hígado, que también fija estradiol y otros esteroides que contienen el radical 17-Beta-Hidroxi. Se ha postulado que la testosterona libre tiene un efecto de retroacción sobre la LH en la hipófisis y en el hipotálamo, y los metabolitos de la testosterona pueden presentar efectos de retroacción similares (2).

Prácticamente el 40% de la testosterona se encuentra ligeramente fijada a la albúmina y un porcentaje del orden del 2% aparece libre (no fijada). Estudios recientes han indicado que no solo la fracción libre de la testosterona sino también la fracción fijada a la albúmina son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (2).

A pesar de las amplias oscilaciones de las concentraciones de la LH, los niveles séricos de testosterona permanecen relativamente constantes. En varones jóvenes existe un patrón circadiano de secreción de testosterona que muestra los máximos niveles aproximadamente al amanecer, si

bien este patrón desaparece a medida que aumenta la edad.

Durante períodos de estrés producidos eventualmente por enfermedad, los niveles de testosterona sérica se reducen, pero se desconoce el mecanismo de esta reducción. Aunque ciertos estudios han demostrado una reducción de la testosterona sérica con la edad en varones, es probable que los individuos sanos no muestren dicha reducción (2,9).

Los anticuerpos reactivos utilizados para la determinación de testosterona mediante radioinmunoensayo presentan una gran reactividad cruzada con la dihidrotestosterona. El danazol, andrógeno sintético empleado para el tratamiento de la endometriosis, también presenta reactividad cruzada con ciertos anticuerpos que se utilizan en la estimulación de la testosterona, elevando en consecuencia sus valores (2).

En ensayos en los que se produce reactividad cruzada se han descrito niveles bajos, por cuanto el danazol desplaza la testosterona de la SHBG. Otros esteroides sintéticos que desplazan la testosterona de la SHBG son la metiltestosterona, fluoximesterona y el norgestrel. Los valores normales para niños prepúberes son inferiores de 1 ng/ml (3.5nmol/l) para varones; e inferiores a 0.4 ng/ml (1.4 nmol/l) para mujeres.

En adultos, los valores normales suelen ser siempre superiores a 3 ng/ml (10.4 nmol/l) para varones, e inferiores a 0.8 ng/ml (2.8 nmol/l) para mujeres. Valores bajos en un

varón sugieren la posibilidad de un hipogonadismo similar al que se registra en el síndrome de Klinefelter. Con el fin de localizar la causa del hipogonadismo, es necesario realizar determinaciones de gonadotropinas. En la mujer adulta, los niveles de testosterona superiores a 1.6 ng/ml (5.5 nmol/l) generalmente dan lugar a virilización, si bien las pacientes virilizadas por tumores suprarrenales y ováricos productores de andrógenos generalmente presentan niveles séricos de testosterona superiores a 2.5 ng/ml (8.7/l), se han descrito ciertos casos de pacientes con concentraciones séricas inferiores (28,29).

Las determinaciones de testosterona sérica libre se correlacionan mejor con su actividad biológica que las de testosterona total. Se han utilizado múltiples métodos indirectos; de cuyos resultados se calcula la testosterona libre como un producto de la concentración sérica total y la fracción de testosterona libre en el suero, pero la mayoría de éstos métodos tienen más de alguna desventaja (2).

3.5 RADIOINMUNOANALISIS

La técnica de Radioinmunoanálisis (RIA) fue introducida inicialmente por Yalow y Berson en 1,959 para medición de insulina (30).

El RIA es un método inmunodiagnóstico que se basa en la competición o saturación de uniones protéicas específicas.

Esta unión es reversible y entra en juego un componente

marcado radiactivamente que es el antígeno caliente o trazador (Sxo) y uno no marcado o antígeno frío (Sx), así como anticuerpos específicos contra dichos antígenos. El antígeno frío en alta concentración inhibe la unión del antígeno caliente al anticuerpo y esto forma la base para la construcción de una curva estándar (30).

El RIA permite la cuantificación de hormonas y una gran variedad de sustancias en fluidos biológicos. El RIA ofrece varias ventajas sobre otro tipo de metodologías, siendo éstas, su sensibilidad que permite la medición de muy pequeñas cantidades de muestra, su especificidad la cuál se refiere a la habilidad del sistema para medir solamente la sustancia de interés. Otra ventaja importante del RIA es su exactitud, que permite determinar la cuenta real de una sustancia presente.

Una característica más del RIA constituye su precisión ya que permite reproducibilidad del ensayo (31,32).

La obtención de resultados se realiza al construir una curva dosis-respuesta, teniendo en las abcisas el logaritmo de la concentración y en las ordenadas la función logit de la respuesta, ($\text{logit} = \ln B/B_0 / 1 - B/B_0$) (33).

Existen varios ajustes de la curva, sin embargo el más utilizado es el logit log y el de 4 parámetros logísticos el cual implica mayor cálculo matemático (30,34,35).

El RIA consiste en tres componentes y un sistema de separación; que se describen a continuación:

3.5.1. ANTISUERO

Esta molécula es la encargada de fijar la sustancia a ser medida presente en la muestra o el estándar así como también al trazador. Los antisueros generalmente pertenecen a las clases de inmunoglobulinas IgG, la cual corresponde al 80% de la fracción de inmunoglobulinas en el suero. Esta es capaz de reaccionar con gran afinidad y especificidad con el antígeno.

Las características que posee un antisuero son: especificidad, afinidad y título. La primera indica la posibilidad de que un antígeno y un antisuero se unan con exclusividad; cuanto mayor es ésta posibilidad, mayor será la especificidad de la unión. La afinidad expresa la fuerza de atracción de dicha unión. El título del antisuero se relaciona con la concentración de antisuero con una dada especificidad que fijarán a el antígeno en una concentración óptima. La afinidad y especificidad de la reacción condiciona la sensibilidad y especificidad del RIA. Los antisueros utilizados para RIA se producen por inmunización de animales como por ejemplo conejos, ovejas y otros (30,35).

3.5.2. ANTIGENO

3.5.2.1. Antígeno Caliente:

Antígeno marcado radiactivamente altamente purificado (trazador), con actividad específica suficiente para que tengan que añadirse pequeñas cantidades de trazador

en cada análisis.

La inmunoreactividad del antígeno marcado no debe ser alterada por los reactivos utilizados en la reacción de incorporación radiactiva. El radionúclido utilizado frecuentemente para el RIA es el ^{125}I , debido a la energía gamma 35 Kiloeléctron voltios (Kevs) y su período de semidesintegración (60 días). Sin embargo, para dosificación de hormonas esteroideas aún se emplea el tritio como trazador, con una energía de 18.6 Kevs y período de semidesintegración de 12.3 años.

3.5.2.2. Antígeno Frío:

Antígeno no marcado (estándar de referencia): Esta sustancia debe de estar presente en la forma más pura posible.

Dicho estándar de referencia permitirá la interpolación de las muestras desconocidas. Debe poseer la característica de ser estable ya que son usados durante todo el desarrollo del ensayo.

La muestra del paciente que es realmente el antígeno no marcado que va a ser medido en el suero o plasma y es análogo o idéntico al estándar (31,34,36,37).

En el sistema de RIA la concentración del antígeno marcado y del anticuerpo son fijas. Para que se lleve a cabo la reacción los elementos son incubados juntos para permitir que interaccionen entre sí. La competición entre ambos antígenos marcado y no marcado, ocurre simultáneamente, hasta

alcanzar el equilibrio de la reacción. Debido a esto el RIA es a menudo referido como un equilibrio de saturación. Muchos ensayos de unión competitiva son del tipo de equilibrio (37).

El sistema de separación de las fases unida y libre, es un paso fundamental en todo radioinmunoanálisis, dicho sistema debe de ser capaz de separar rápida, completa y fácilmente el antígeno libre de aquél otro que ha sido unido por el anticuerpo.

Los diferentes métodos existentes para la separación de los compuestos incluyen la electroforesis en papel, precipitación del complejo antígeno anticuerpo con un método físico como el carbón dextran o bien inmunológico utilizando un segundo anticuerpo, intercambio iónico, sistema de fase sólida y otros. Actualmente las más aplicables son las que utilizan un segundo anticuerpo mas aceleración con polietilenglicol (PEG), que funciona como agente precipitante.

Estos métodos ya optimizados son simples y eficientes y su uso es aceptable para ensayos automatizados (30,35,37,38).

3.6. METODOS DE DETECCION

Uno de los más antiguos métodos de detección de basa en los destellos luminosos producidos por la radiación nuclear en ciertos materiales.

Rutheford usó esta técnica para el conteo de partículas alfa en sus experimentos de dispersión.

Aunque los principios básicos son los mismos, las

técnicas han avanzado enormemente.

En 1,947 se reportó la utilidad de un tubo fotomultiplicador para contar los destellos luminosos producidos por la radiación; desde entonces se han perfeccionado los sistemas hasta ser capaces de detectar conteos muy elevados con tiempos de resolución muy cortos; esto ha hecho posible la espectrometría.

La absorción de energía por una sustancia y su remisión cercana a la visible, se conoce como luminiscencia.

En la luminiscencia el proceso de excitación inicial puede provenir de muchos orígenes, varios de estos son: luz, esfuerzo mecánico, reacción química y calentamiento. El centelleo que produce la radiación nuclear se debe a ionización y excitación.

3.6.1. CENTELLADORES LIQUIDOS

Para la medición de emisores Beta de baja energía como el Tritio es necesario utilizar centellografía líquida; uno de los problemas en la emisión de éstos radionúclidos es la absorción y dispersión con el material que se encuentra a su paso.

La absorción disminuye notablemente si se disuelve la muestra con el centellador en un solvente adecuado. Al medir la muestra en solución se logra tener a los átomos radiactivos completamente rodeados de moléculas centelladoras, es decir, se tiene prácticamente una geometría 4 . De aquí que una de

las ventajas de los centelladores líquidos sea la mayor eficiencia y sensibilidad para medir emisores beta de baja energía.

La muestra que va a ser medida en un contador de centelleo líquido debe ser considerada como el conjunto de cuatro factores: a) el solvente b) el centellador c) el material radiactivo d) el recipiente (39).

3.6.1.1. El solvente

Tiene dos funciones: Disolver el material fluorescente y la muestra, y transmitir la energía de la partícula radiactiva al centellador. Los materiales más comúnmente usados son Tolueno y Xileno, los cuales disuelven muchos compuestos orgánicos (39).

En el caso de muestras acuosas es necesario encontrar la manera de solubilizarlas, afectando lo menos posible la transferencia de energía, agregando para ello un solvente secundario, como el dioxano, que permite la adición de mayor cantidad de sustancias acuosas. Si el solvente absorbe en gran medida los fotoelectrones producidos por el centellador, existe una reducción en el tamaño de los pulsos. Se dice, entonces, que produce un apagamiento de color (39).

Por otro lado, si el solvente absorbe energía de las partículas beta y no la entrega a las moléculas centelladoras, se produce también disminución en el tamaño de los pulsos. En este caso, se dice que se produce apagamiento químico o

térmico (39).

3.6.1.2. El centellador

Este convierte la energía de las partículas beta en energía luminosa, o sea, luz visible o ultravioleta, siendo el número de fotones emitidos proporcional a la energía absorbida. El centellador más usado es el P.P.O. (2-5 difeniloxasol) y el P-terfenilo (39).

Generalmente se agrega una sustancia fluorescente secundaria para llevar la longitud de onda de los fotoelectrones producidos, a una región donde el fotomultiplicador posee mayor sensibilidad. El más usado es el dimetil POPOP (2-2' p-fenilen, bis-4 metil-5 feniloxasol).

3.6.1.3. El material radiactivo

Los radionucleidos que se miden con mayor frecuencia en los contadores de centelleo líquidos, son los emisores beta de baja energía. Algunos de ellos son ^3H (B máx.= 18.6 Kev.), ^{14}C (B máx.= 156 Kev), ^{35}S (B máx.= 167 Kev.) etc.

Es importante señalar que la medición de partículas alfa se puede realizar con una eficiencia cercana al 100% .

Desafortunadamente, la naturaleza química de los emisores alfa, los cuáles son de elevado peso atómico los hace insolubles en los solventes orgánicos utilizados en centelleo líquido, lo que complica la preparación de las muestras.

La radiación gamma de energía media y alta se detecta con poca eficiencia, ya que la densidad y el peso atómico de

las soluciones centelladoras son bajos. Sin embargo algunos emisores de gamma de baja energía, como el ^{125}I (35 Kev), sí se pueden medir en formas conveniente (39).

3.6.1.4. El recipiente

Este debe ser transparente a la radiación emitida por los centelladores. Cuando los recipientes son de vidrio contienen ^{40}K , isótopo radiactivo de potasio natural; este hecho aumenta considerablemente el fondo. Pueden utilizarse recipientes de cuarzo, pero resultan costosos. Los recipientes de polietileno menos costosos, pueden ser solubles en los solventes empleados, en cuyo caso no deben usarse. Así que la elección del recipiente más adecuado, queda a criterio del usuario, quien debe considerar el trabajo a realizar.

El uso de compuestos marcados con tritio ha adquirido gran importancia en la investigación biológica y médica, así como en estudios de farmacología. En medicina clínica su uso es aún restringido en alguna forma, pero se espera que se desarrolle en el futuro (39).

El tritio tiene la gran ventaja de no alterar las características químicas de las moléculas orgánicas, es una propiedad que permite un análisis más detallado de los procesos metabólicos. Un punto que debe ser tomado en cuenta, es sin embargo el hecho de que los marcados con tritio son algunas veces inestables, particularmente en ciertas posiciones en moléculas orgánicas, el uso de estos

radionucleidos presenta ciertos problemas.

Es difícil detectar y medir los trazadores en el cuerpo (especialmente el tritio), y la evaluación de las dosis que resulta actualmente de la administración de moléculas complejas marcadas no es nada fácil.

Debido a su habilidad para intercambiarse con hidrógeno en el agua, el tritio se puede diseminar ampliamente.

Dado a que éste radionucleido es emisor beta puro, la detección externa no es posible y las mediciones tienen que ser hechas completamente sobre especímenes biológicos. Estas mediciones entrañan, asimismo, dificultades debido a la baja energía de la radiación beta (muy baja para el tritio, 18 Kev) lo cuál requiere aplicación de técnicas y equipos especiales (40).

3.7. MANEJO DE DESECHOS CON TRITIO

3.7.1. Desechos radiactivos:

Los desechos radiactivos se clasifican de acuerdo a su estado físico en líquidos sólidos y gaseosos.

3.7.1.1. Líquidos: estos consisten en restos que quedan en un vial, sobrenadantes de los estudios *in vitro*, excretas, vómitos de pacientes sometidos a terapia metabólica o bien agua que resulta de lavar ropa de cama o productos contaminados, líquidos de centelleo.

3.7.1.2. Sólidos: estos consisten en viales contaminados, algodones, papel absorbente, jeringas, viales y tubos de RIA,

productos contaminados por terapia metabólica, como ropa de cama, pijamas sábanas, guantes desechables, fuentes decaídas.

3.7.2. Desechos líquidos:

3.7.2.1. Los desechos líquidos de tipo orgánico (aceites, disolventes etc.) no se mezclarán con los residuos de tipo acuoso.

3.7.2.2. Los desechos líquidos que contengan tritio deberán separarse del resto.

3.7.2.3. El nivel de radiación de la superficie de la unidad de contención no podrá ser superior a los 2 mSv/h.

3.7.2.4. Los desechos líquidos se deben entregar en recipientes de capacidad máxima de 25 litros, con boca ancha preferiblemente (para facilitar ser vertidos y así evitar contaminación) y rotulados de la siguiente forma: nombre del radionucleido, actividad, período de semidesintegración y fecha en que fueron generados los desechos (41).

Los desechos radiactivos líquidos deberán almacenarse y separarse según su grado de actividad, tipo de emisor, vida media y composición química, de la forma siguiente: cuando se trate de líquidos alcalinos o acuosos se utilizarán recipientes plásticos, en el caso de ácidos se utilizarán recipientes de vidrio (40,41).

Desechos sólidos:

Los recipientes se deberán tener dentro de contenedores metálicos para que los protejan y en caso de derrame puedan

contener el volumen total del líquido (40).

Los recipientes que se utilicen para el almacenamiento provisional de los desechos radiactivos, deberán tener características tales que proporcionen al personal ocupacional expuesto (POE), una protección adecuada contra los posibles riesgos de irradiación externa y de contaminación, ocasionada por la fuga y dispersión del material contenido (40,41).

4. JUSTIFICACIONES

Actualmente, en nuestro país, ningún laboratorio utiliza la metodología con extracción y tritio como trazador para medición sérica de progesterona, testosterona y estradiol; a pesar de ser éste el método de referencia propuesto por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Se pretendió en este estudio optimizar el método propuesto por la OMS y compararlo con las metodologías radioinmunométricas que se utilizan mas frecuentemente en Guatemala.

Se determinó cuál es la mas conveniente para nuestro medio de acuerdo a sensibilidad, especificidad, facilidad de metodología, etc.

5. OBJETIVOS

5.1. General:

Comparar las metodologías que utilizan ^{125}I en Guatemala con el método de referencia de la OMS para dosificación de las hormonas esteroideas (progesterona, testosterona y estradiol).

5.2. Específicos:

5.2.1. Optimizar las condiciones de ensayo de los juegos de reactivos para la determinación sérica de hormonas esteroideas por RIA utilizando tritio.

5.2.2. Evaluar la reproducibilidad y sensibilidad de los juegos de reactivos diseñados para la determinación sérica de hormonas esteroideas.

6. HIPOTESIS

No existe diferencia significativa en cuanto a la reproducibilidad y sensibilidad de las metodologías que emplean tritio y ^{125}I como trazador en la medición de niveles séricos de progesterona, testosterona y estradiol.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1. Universo de trabajo

Se realizaron tres ensayos de cada hormona (progesterona, testosterona y estradiol) para determinar la reproducibilidad y sensibilidad en cada una. Para cada ensayo se utilizaron siete soluciones patrón a diferentes concentraciones y tres pooles de control de calidad (todos procesados por duplicado).

7.2. Recursos

7.2.1. Recursos humanos

Tesista Br. Carlos Augusto Morán Jiménez.

Asesora Licda. María Cecilia Sánchez Rosal.

Personal profesional y técnico del departamento de Medicina Nuclear de la Dirección General de Energía Nuclear del Ministerio de Energía y Minas.

7.2.2. Recursos institucionales

Sección de Bioquímica y Radiofármacos de la Dirección General de Energía Nuclear del Ministerio de Energía y Minas.

Hospital General San Juan de Dios (Departamento de Medicina Nuclear, laboratorio de Radioinmunoanálisis).

7.2.3. RECURSOS MATERIALES

Equipo

- Centrífuga Damon IEC Division modelo HN-SII
- Contador para centelleo líquido marca Packard.
- Mezclador tipo vortex Thermolyne modelo 16700 mixer.
- Centrífuga refrigerada con fuerza mínima de 1500 gravedades Damon IEC Division modelo DPR 6000.
- Congelador a -20°C marca Fisher Scientific.
- Refrigeradora Lab. Line modelo 3552-10.
- Campana para extracción de vapores, Labconco.
- Baño maría Precisión modelo 186.
- Plancha agitadora magnética Will Gyratherm modelo II.
- Balanza analítica Mettler modelo AE 100.

7.2.4. Reactivos

7.2.4.1. Estradiol

- Suero antiestradiol (liofilizado). Cada frasco contiene reactivo suficiente para 100 tubos. En su presentación original es estable por varios años. Debe almacenarse a 4°C .
- Estándar de estradiol (solución en etanol).
- Trazador de estradiol: ^3H -estradiol con una actividad específica de 106 uCi/mmol, disuelto en tolueno/metanol 85: 15v/v.
- Carbón vegetal tipo Norit-A.
- Dextrán tipo T-70.

- Tolueno/metanol.
- Solución de centelleo líquido PPO(2,5 difeniloxasole);POPOP (1,4bis [2,(5 Feniloxazolil)] benceno); Tritón X 100, tolueno.
- Eter dietílico (libre de peróxidos).
- Solución amortiguadora.
- Agua destilada y deionizada.
- Gamma globulina de ratón antiprogesterona (liofilizada).
- Estándar de progesterona (solución en etanol). Cada ampolla de 2 ml contiene 250 nmol/l. debe almacenarse a 4°C.
- Trazador de progesterona. ³H-progesterona con una actividad específica de 65 uCi/nmol.
- Suero antitestosterona liofilizado. Cada frasco contiene reactivo suficiente para 50 tubos. En su presentación original es estable por varios años, debe almacenarse a 4°C.
- Estándar de testosterona (solución en etanol). Cada ampolleta de 2 ml contiene 220 nmol/l. Debe almacenarse a 4°C.
- Trazador de testosterona. ³H-testosterona con una actividad específica de 82 uCi/nmol, adicione al vial 200 UL de tolueno/metanol 85: 15v/v.
- Gradillas para tubos.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

- Pipetas repetidoras Eppendorf.
- Guantes.
- Punteras para pipetas automáticas.
- Viales para espectrofotómetro de centelleo líquido.
- Algodón.
- Papel parafilm.
- Pipetas serológicas.
- Antisueros.

Los antisueros a utilizar en el presente estudio presentan las siguientes características:

Estradiol:

Origen: Suero de conejo.

Antígeno inoculado al conejo: Estradiol-3
carboximetiloxima: Albúmina sérica bovina.

Unión Máxima: 40-50%

Dilución final en el tubo de ensayo: 1:105,000

Especificidad: los porcentajes de reacción cruzada se han calculado a un U/Bo de 50% .

ANALITO	% REACCION CRUZADA
Estradiol 17 B	100.00
Estrona	1.92
Estriol	0.32
Etinilestradiol	0.01
Estradiol 17	0.01
Cortisol	0.01

7.2.4.2. Progesterona

Origen: Anticuerpo monoclonal producido en ratón. donado por la Dra. Fortuna Kohen (Weizmann Institute of Science. Rehovot, Israel).

Antígeno inoculado al ratón: Progesterona 11 hemisuccinato: albúmina sérica bovina.

Unión máxima: 30-40%

Dilución final en el tubo de ensayo: 1: 700,000.

Especificidad: Los porcentajes de reacción cruzada se han calculado a un U/Bo de 50% .

ANALITO	% REACCION CRUZADA
Progesterona	100.00
5B Pregnan-3,20 diona	100.00
5 Pregnan-3,20 diona	18.00
11 Hidroxiprogesterona	100.00
Pregnenolona	0.01
17 Hidroxiprogesterona	0.80
20 Hidroxiprogesterona	0.01
Testosterona	0.01
Cortisol	0.01

7.2.4.3. Testosterona

Origen: Suero de conejo.

Antígeno inoculado al conejo: Testosterona-3

carboximetiloxima: Albúmina sérica bovina.

Unión máxima: 25-40%

Dilución final en el tubo de ensayo: 1: 105,000.

Especificidad: Los porcentajes de reacción cruzada se han calculado a un U/Bo de 50% .

ANALITO	% REACCION CRUZADA
Testosterona	100.00
5 dihidrotestosterona	11.56
Androstendiona	4.36
Androstendiol	0.09
Cortisol	0.01

7.3. PROCEDIMIENTO

7.3.1. Colección y almacenamiento de las muestras.

Se puede realizar un análisis en suero o plasma humano. No se requiere preparación especial antes de la toma de la muestra. Es recomendable de que ésta se realice por la mañana y se obtengan 5 ml de sangre venosa. El suero o el plasma debe de separarse del paquete celular en un período menor de

60 minutos después de la colección de la muestra y almacenarse a -20°C , hasta el momento del análisis. No es recomendable congelar y descongelar varias veces una misma muestra. Si se planea hacer mediciones repetidas de la misma muestra en diferentes ensayos, se deben de preparar alícuotas antes de congelarlas. El volumen de la muestra que se emplea para el análisis es:

- Estradiol 0.3 a 0.5 ml según sea el caso (fase del ciclo menstrual, sujetos prepúberes, hombres).
- Progesterona 0.05 a 0.2 ml según sea el caso (fase del ciclo menstrual, sujetos prepúberes, hombres).
- Testosterona: 0.1 ml para hombres adultos y 0.5 para hombres prepúberes, hipogonádicos y para mujeres.

7.3.2. Preparación de las muestras problema

Transferir 0.2 ml de suero o plasma a un tubo de vidrio de 20 ml, adicionar 5 ml de éter dietílico previamente enfriado a 4°C . Agitar en vortex durante 1 minuto (todo este procedimiento deberá hacerse dentro de la campana de extracción). Dejar reposar los tubos durante 1 minuto para que se separen las fases acuosa y orgánica. Congelar la fase inferior (acuosa), colocando los tubos en una mezcla dióxido de carbono sólido y acetona (hielo seco-acetona). Decantar la fase superior (éter) en una serie de tubos previamente numerados. Evaporar el éter a sequedad en un baño de agua a 37°C . Resuspender el extracto en 2 ml de solución

amortiguadora S. Calentar a 37°C durante 30 minutos. Agitar en vortex durante 1 minuto. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Transferir por duplicado 0.5 ml del extracto a tubos para RIA.

7.3.3. Preparación de los blancos de éter

A un par de tubos de 20 ml, adicionar 0.5 ml de solución amortiguadora S (en lugar de suero o plasma problema), proceder en la misma forma como se describe en la sección anterior. La preparación de estos tubos tiene por objeto identificar si los residuos del disolvente orgánico que quedan en la alícuota del extracto interfieren en la cuantificación de las hormonas por radioinmunoanálisis.

7.3.4. RESUMEN DEL CONTENIDO DE TUBOS Y METODOLOGIA

	BO*	UNE**	ESTANDARES	PROBLEMAS
Amortiguador	0.5 ml	0.6 ml	-----	-----
Trazador	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
Antisuero	0.1 ml	-----	0.1 ml	0.1 ml
Estándar	-----	-----	0.5 ml	-----
Extracto	-----	-----	-----	0.5 ml

INCUBAR DURANTE 18 HORAS A 4° C

Carbón-Dextrán	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
----------------	--------	--------	--------	--------

INCUBAR DURANTE 30 MINUTOS A 4° C

CENTRIFUGAR A 500g DURANTE 15 MINUTOS A 4° C

DECANTAR EL SOBRENADANTE A VIALES DE CENTELLEO

AGREGAR LIQUIDO DE CENTELLEO Y CONTAR

* BO = Enlace máximo.

** UNE = Enlace no específico

7.3.5. Conteo

A cada sobrenadante agregar 5 ml de líquido de centelleo antes de que los viales sean colocados en el contador. Agitar en vortex durante 30 segundos y dejar los viales de conteo en reposo durante 60 minutos protegidos de la luz.

7.3.6. Cálculo de resultados

Con las cuentas por minuto (cpm) obtenidas de los tubos correspondientes a la curva estándar graficar una curva dosis-respuesta. Si se realizan los cálculos a mano es recomendable que se utilicen algunas de las transformaciones que tienden a linealizar la curva dosis-respuesta (logit-log).

Si se emplea un programa de computación asegurarse de obtener todos los datos de evaluación de la curva dosis-respuesta.

Realizar el proceso de interpolación para conocer el resultado de las muestras desconocidas. Los valores leídos en la curva estándar deben ser multiplicados por el factor de dilución correspondiente (1:20) para ser expresados en fmol/ml, que es lo mismo que pmol/l.

7.3.7. Control de calidad del ensayo

Es indispensable que cada laboratorio incluya muestras de control de calidad interno preparadas en el mismo laboratorio u obtenidas de fuentes comerciales. Todos los ensayos deberán ser adecuadamente documentados y la calidad debe ser juzgada antes de enviar los resultados de las muestras desconocidas.

7.3.8. Valores de referencia

Los valores aquí señalados sólo son una guía para el ensayo. Cada laboratorio debe de establecer sus propios valores de referencia.

Estradiol:

Sujetos prepúberes.....	44 - 120 pmol/l
Pico pre-ovulatorio.....	500 - 1400 pmol/l
Post-menopausia.....	50 - 150 pmol/l
Hombres adultos.....	70 - 190 pmol/l

Progesterona:

Sujetos púberes.....	0.4 - 1.2 pmol/l
Fase folicular.....	1.1 - 4.1 pmol/l
Fase lútea.....	11 - 56 pmol/l
Hombres.....	0.4 - 1.2 pmol/l

Testosterona:

Sujetos prepúberes.....	0.4 - 1.2 pmol/l
Hombre adulto.....	13 - 33 pmol/l
Mujer adulta.....	0.8 - 2.9 pmol/l

7.3.9. Diseño estadístico

Se hizo una comparación del método tritiado con los que usa ¹²⁵I. Para cada metodología se utilizaron 7 soluciones patrón a diferentes concentraciones; la curva se ajustó con el método logit-log, es decir se obtuvo el log, de la concentración y se ploteó en el eje de las abscisas, y la función logito de la respuesta se ploteó en el eje de las ordenadas.

Cada curva se realizó 3 veces procesando cada solución patrón por duplicado. Con los datos de cada patrón en sextuplicado (3 repeticiones en duplicado), se calculó la ecuación lineal entendiéndose como X el log. de la concentración y Y el logito de la respuesta.

Respuesta = % unión de cada patrón en relación con la unión máxima.

$$\% = U/U_0 = \text{Ene}/-\text{Ene}$$

La unión de cada solución patrón y la unión máxima fue corregida restándoles el Ene. Donde U es unión de cada estándar y U₀ es la unión máxima.

Se realizó una correlación lineal entre logit de la respuesta para cada punto de solución patrón procesado con ¹²⁵I y con tritio. Se calculó la ecuación de la línea recta y se determinó la existencia de sesgo al evaluar la

pendiente, y la sensibilidad al evaluar el intercepto en Y.

Para evaluar la sensibilidad de ambas metodologías se realizó la prueba de paralelismo y se determinó la dosis mínima. Esta última se calculó como el valor de la concentración correspondiente al enlace máximo de la curva menos 3 desviaciones estándares.

Para evaluar la reproducibilidad de cada método se efectuó un análisis de varianza de dos vías para un diseño de bloques, poniendo como tratamientos al 20%, 50%, 80% de unión, así como las concentraciones obtenidas para cada uno de los controles.

Los bloques fueron las dos metodologías, tanto con ^{125}I como con tritio. Se hicieron 6 repeticiones por bloque.

T R A T A M I E N T O S						
BLOQUE	D 20%	D 50%	D 80%	C1	C2	C3
^{125}I	n=6					
tritio	n=6					

8. RESULTADOS

En el presente estudio se hizo una evaluación de radioinmunoensayos con tritio vs radioinmunoensayos con yodo para las hormonas estradiol, testosterona, y progesterona. Lo anterior, con el objeto de determinar si ambas metodologías son comparables ya que los radioinmunoensayos con tritio son los propuestos por la OMS, y en nuestro medio la mayoría de laboratorios utilizan los métodos yodados. Los reactivos que se utilizaron para el análisis con ^3H provienen de centros colaboradores de la OMS para inmunoensayos en Cuba y México, los usados con ^{125}I son juegos de reactivos comerciales.

Los ensayos fueron realizados tres veces procesando siete soluciones patrón en cada uno. Tanto las soluciones patrón como los sueros control fueron procesados por duplicado. Las curvas se ajustaron con el método logit-log que consiste en obtener el logaritmo de la concentración y la función logit de la respuesta. Entendiéndose como respuesta la proporción obtenida entre el enlace de cada estándar (B) con respecto al enlace máximo (B_0). Con los valores anteriores se construyó una curva dosis respuesta ploteando en el eje de las abcisas el logaritmo de la concentración y en las ordenadas el logit de la respuesta. (Gráficas 1, 2, 3, 4, 5 y 6)

En las tablas 1, 2, 3, 4 y 5 se presentan los valores logit-log obtenidos para cada curva.

Se evaluó la sensibilidad de cada ensayo a través de la dosis mínima detectable y el valor de la pendiente de la curva dosis-respuesta.

Para evaluar reproducibilidad cada metodología fue realizada en tres oportunidades. Se obtuvo el coeficiente de variación de las dosis interpoladas al 20% 50% 80% de unión y las concentraciones de tres sueros de control de calidad. Luego de analizar individualmente cada ensayo en cuanto a sensibilidad y reproducibilidad se procedió a hacer una comparación de los métodos tritiados con los yodados. Para tal propósito se realizó una comparación de pendientes por medio de la prueba de paralelismo y además un análisis de varianza de una vía poniendo como tratamientos las dosis al 20%, 50% y 80% de unión así como las concentraciones calculadas para cada uno de los controles.

8.1 ESTRADIOL

8.1.1 Reproducibilidad: los coeficientes de variación para las dosis 20%, 50% y 80% de enlace, así como los de las concentraciones de los controles de calidad tanto en los métodos tritiados como los métodos yodados se presentan en la (tabla 6).

Como puede observarse no existe diferencia estadísticamente significativa entre réplicas de cada ensayo, sin embargo, los coeficientes de variación evidencian una regular reproducibilidad para los métodos yodados y una mejor

reproducibilidad para los métodos con tritio.

8.1.2 Sensibilidad: considerando la dosis mínima detectable como parámetro para evaluar la sensibilidad del ensayo se puede observar que el método con yodo detecta concentraciones más bajas que con el método con tritio (tabla 7).

8.1.3 Pendiente: el valor de la pendiente se utiliza como parámetro de sensibilidad para determinar la capacidad del ensayo de diferenciar dos dosis cercanas. El valor óptimo de pendiente para RIA es de -2.34 , en la tabla 8 se presentan los valores obtenidos para los ensayos de estradiol con yodo y tritio. En este caso el método con tritio se acerca mas al valor ideal de la pendiente con una diferencia de -0.37 , mientras que con el método con yodo la diferencia fue -0.61 .

Con el objeto de comparar la pendiente obtenida para los ensayos yodado y tritiado, se efectuó una prueba de paralelismo (gráfica 7, tabla # 15), en la cual puede observarse que las pendientes no son comparables, no existe paralelismo entre ambas metodologías.

8.2 TESTOSTERONA

8.2.1 Reproducibilidad: se calculó el coeficiente de variación para las dosis de 20%, 50% y 80% de enlace, también las concentraciones de los controles de calidad tanto en los métodos tritiados como con los métodos yodados. Los resultados se pueden observar en la tabla 9.

Estadísticamente no hay diferencia significativa entre

las réplicas de cada ensayo, aunque los coeficientes de variación indican que hay una regular reproducibilidad en los ensayos realizados con yodo y una mejor reproducibilidad en los realizados con tritio.

8.2.2 Sensibilidad: para esta prueba se evaluó la dosis mínima detectable ya que esta indica que tan sensible es el ensayo, como se puede observar en la tabla 10 el método con yodo detecta concentraciones menores que lo que se detecta con el método con tritio.

8.2.3 Pendiente: el valor de la pendiente determina la sensibilidad que tiene el método para poder diferenciar entre dos dosis cercanas. Como ya se mencionó, en RIA el valor ideal de la pendiente es -2.34 , en la tabla 11 se presentan los valores obtenidos para los ensayos con yodo y con tritio.

Como se puede observar, la pendiente que mas se acerca a la ideal es la del método con tritio que dio una diferencia de -0.21 , mientras que la del método con yodo dio -0.91 .

Al igual que el estradiol, para los ensayos de testosterona la prueba de paralelismo demostró que las pendientes obtenidas en los ensayos yodados y tritiados no son comparables entre si (gráfica 8, tabla # 16).

8.3 PROGESTERONA

En este ensayo se presentan únicamente los resultados de reproducibilidad y sensibilidad de la prueba con ^{125}I ya que como puede observarse en la gráfica 6 los tres ensayos procesados con tritio presentaron un mal desplazamiento de la

curva.

Se calculó el coeficiente de variación para las dosis 20%, 50% y 80% de enlace y para los controles de calidad (tabla 12). Como puede observarse el coeficiente de variación evidencia una mala reproducibilidad a dosis bajas (dosis al 80% de enlace); y una regular reproducibilidad a dosis altas (dosis al 20% de enlace) y dosis normales (dosis al 50% de enlace).

8.3.1 Sensibilidad: la dosis mínima detectable (tabla 13) es un parámetro que indica la sensibilidad del método en cuanto a la menor dosis que es capaz de detectar. Como se observa en la tabla 13 esta tiene un valor de 0.106 ng/ml. El coeficiente de variación para esta dosis es bajo (2.28).

8.3.2 Pendiente: con el valor de la pendiente se determinó la sensibilidad que tuvo el método para poder diferenciar entre dos dosis cercanas. Como se puede observar en la tabla 14 el promedio de la pendiente para los métodos con yodo es de -3.2 lo cual evidencia que no es el ideal, sin embargo es un valor bastante reproducible.

9. DISCUSION DE RESULTADOS

La reproducibilidad fue evaluada mediante la determinación del coeficiente de variación entre ensayos para las concentraciones de los sueros control y las dosis obtenidas al 20%, 50% y 80% de unión (tabla 6,9). El coeficiente de variación para los métodos con tritio es menor que el obtenido con los ensayos yodados, lo cual evidencia una mayor precisión de éstos. Así mismo, se determinó que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las réplicas de cada solución patrón y sueros control tanto de los métodos con ^{125}I como los que utilizan ^3H . Posteriormente, al hacer una comparación de reproducibilidad (métodos tritiados vs. métodos yodados), se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0001$) a dosis altas (20% de unión) y dosis normales (50% de unión). La reproducibilidad es igual en ambas metodologías a dosis bajas (80% de unión). Lo anterior evidencia que la precisión es comparable a dosis bajas (80% de unión) para ensayos yodados y tritiados.

Al evaluar los sueros control únicamente se encontró diferencia significativa en la reproducibilidad del control con concentraciones altas (control C) ($p<0.05$).

La dosis mínima detectable (tablas 7, 10) indica que los métodos con ^{125}I tienen la capacidad de detectar concentraciones menores que las que detectan los métodos con ^3H para ambas hormonas. Otra forma de determinar sensibilidad de los inmunoensayos es a través de la evaluación del valor de

la pendiente de la curva estándar, para RIA el valor ideal como ya se mencionó anteriormente es de -2.34, los ensayos que presentan valores de pendiente cercana a ésta tienen una adecuada sensibilidad para discernir entre dos dosis. En el presente estudio, los métodos con ^3H se acercan mas a la pendiente ideal, es decir, estos métodos presentan un adecuado cambio en la dosis para cada cambio en la respuesta de la curva.

Para la hormona progesterona no fue posible hacer un análisis estadístico de los datos con ^3H , debido a un deterioro en el estándar, lo cual no permitió que se diera un adecuado desplazamiento de la curva dosis-respuesta, por esta razón no se pudo analizar un método con respecto al otro.

Un análisis global de ambas metodologías para testosterona y estradiol se realizó por medio de la prueba de paralelismo (gráfica 7,8)(tabla # 15,16) y ANDEVA de dos vías, en el cual se puso como tratamientos las dosis obtenidas al 20%, 50% y 80% de enlace, estas pruebas demostraron que los métodos no son comparables ($p < 0.05$).

A pesar de que el método con ^3H es mas reproducible, tiene mejor pendiente y los métodos con ^{125}I tienen mayor capacidad para detectar dosis menores, es importante considerar el aspecto de facilidad metodológica de ambos ensayos. Según la experiencia del presente trabajo, los ensayos con ^{125}I son mas recomendables debido a que el

trazador que se utiliza tiene un rango de contaminación menor (período de semidesintegración menor que el ^3H), se requiere equipo menos sofisticado y el procedimiento de trabajo involucra menos pasos.

10. CONCLUSIONES

1. Los métodos con ^{125}I y con ^3H presentan una adecuada reproducibilidad intraensayos.
2. La precisión de ambas metodologías es comparable únicamente a dosis bajas (80%).
3. Los métodos con ^3H presentan mejor precisión que los métodos con ^{125}I .
4. Los métodos con ^{125}I detectan concentraciones mas bajas que los métodos con ^3H .
5. Los métodos con ^3H presentan mejor pendiente (más cercana a la pendiente ideal) que los métodos con ^{125}I .
6. Las curvas de calibración obtenidas con las metodologías de ^{125}I y ^3H no presentan paralelismo de pendientes, por lo que ambas metodologías no son comparables.

11. RECOMENDACIONES

1. Si se va usar indistintamente una u otra metodología, se recomienda establecer rangos propios de referencia.
2. Se sugiere para completar la evaluación de las metodologías, hacer prueba de sesgo pero con mayor número de muestras y mas repeticiones, ya que en el presente estudio sólo se evaluaron soluciones patrón y no se puede evaluar la concentración de cada estándar como respuesta analítica.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

14. Sherman BM, Koreman SG. Measurement of plasma LH FSH estradiol and progesterone in disorders of the human cycle, the short luteal phase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1974; 25: 79-89
15. Bergquist C, Nillius SJ, Wide L. Human gonadotropin therapy: 1 Serum estradiol and progesterone patterns during conceptual cycles. *J. Fert Esteril.* 1983; 39: 761-765
16. Mach CM, Goebelsmann RM, Nakamura DR. Roles of estradiol and progesterone in initiating the midcycle luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone surges. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 1979; 59: 507-13.
17. Engle ET, Smith PE, Shelesnyak MS. Role on estrin and progesterone in experimental menstruation. *J. Clin. Amer. Obstet. Gynec.* 1935; 29: 787-792.
18. Fonseca ME, Salazar EL, Zarate A. Métodos inmunoenzimáticos para medir progesterona mediante anticuerpos marcados con fosfatasa alcalina. *Ach. Invest. Med.* 1980; 19: 63-72.
19. Fleming M, Dailey R. Longitudinal study of the surge of gonadotropins induced by exogenous hormones in prepuberes girls. *J. Endocrinol.* 1985; 116: 1893-98.
20. Moore KL. *Embriología clínica.* 4a. ed. México: Interamericana Mc. Graw-Hill, 1986. 1919 p.
21. Csapo AL, Pulkkinen M, West WG. Effects of luteectomy and progesterone replacement in early pregnant patients. *AM. J. Obstet. Gynecol.* 1973; 35: 115-179.
22. Suteri PK, *et al.* Immunosuppressive properties of progesterone. 58th. Annual Meeting. The endocrine society. 1976: Abstract.
23. Aufreere MB, Benson H. Progesterone and overview and recent advances. *J. Pharm Sciences.* 1976; 65:783-800.
24. Ratcliffe WA. *et al.* A general approach to the direct-assay of progesterone in inestrated serum using a heterologous bridge sistem and a 125 I radioligand. *J. Clin. Chem.* 1982; 28: 1314-1318.
25. Chang RJ, Jaffe RB. Progesterone effects on gonadotropin release in women pretreated with estradiol. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1978; 119: 89-98.

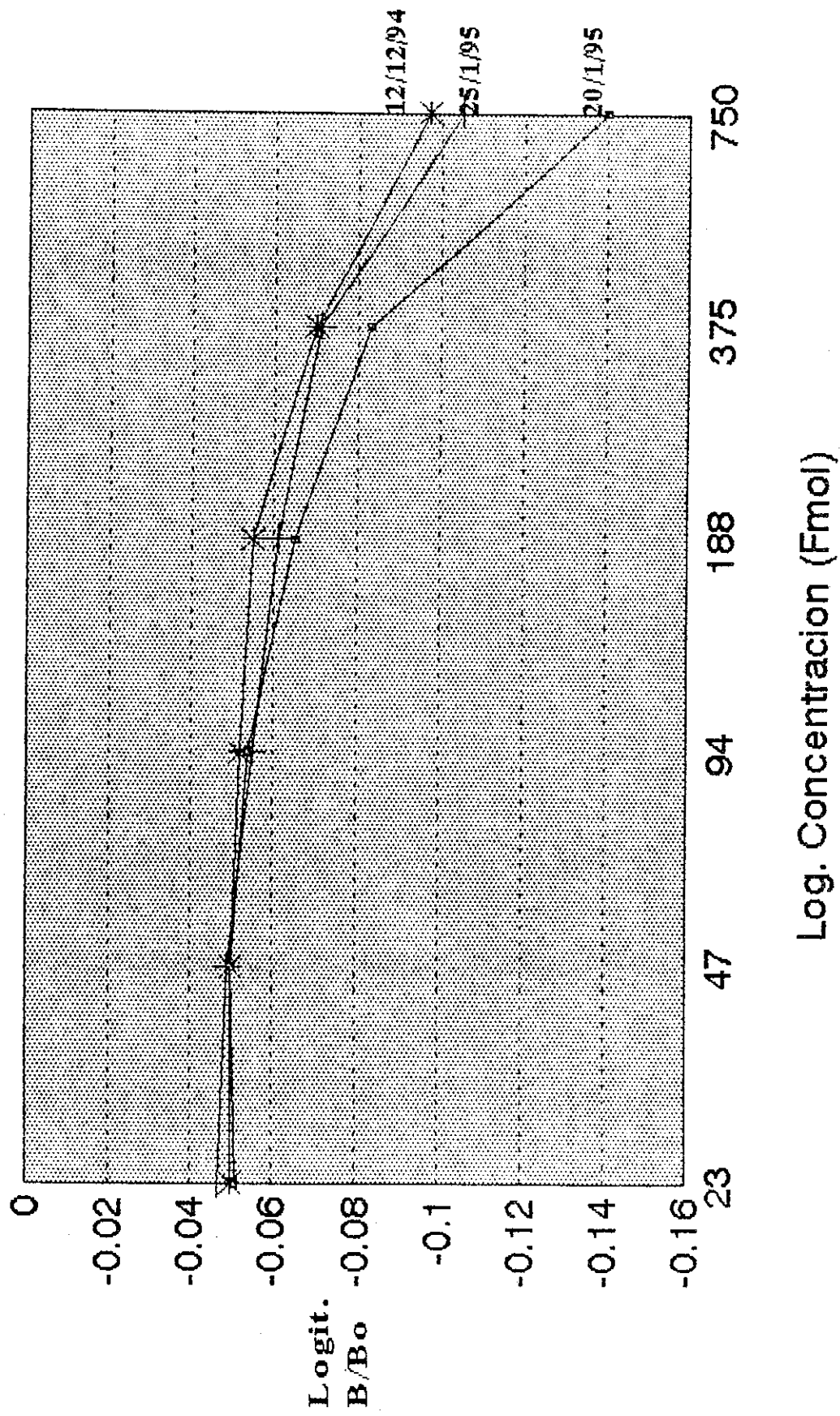
26. Romana VD, Walters WA. Ovarian stromal and luteal tissue prostaglandins, 17 β -estradiol and progesterone in relation to the phases of the menstrual cycle in women. *J. Obs. Gynecol.* 1987; 85: 947-51.
27. Young JR, Jaffre RB. Strength duration characteristics of estrogen effect on gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in women. 11 effects of varying concentrations of estradiol. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1976; 42: 432-440.
28. Ismail AA, et al. The role of testosterone measurements in the investigation of androgen disorders. *Ann Clin. Biochem.* 1986; 23: 113-34.
29. Barranco E, et al. Valores de los niveles plasmáticos de testosterona. *Arch. Venez. Pueric. Pediatr.* 1985; 48: 131-134.
30. Lietrum C. Radioinmunoanálisis. 3a. ed. Buenos Aires: Libreros JRL, 1980. 332 p.
31. Midgley A, Jaffe R. Human luteinizing during the menstrual cycle determination by radioimmunoassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1966; 26: 1375-81.
32. Greenwood F, Hunter GJ. The preparation of ¹²⁵I Labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *J. Biochem.* 1963; 89: 114-23.
33. Tietz N. Textbook of clinical chemistry. 2a. ed. USA: WB. Saunders Company, 1986. 1919 p.
34. Felig P, et al. Endocrinología y metabolismo. 2a. ed. México: Mc Graw-Hill, 1983. 1469 p.
35. Raith L. Introduction of radioimmunoassay methods. Germany: Bik-Mallinckrodt Radiopharzeitika Diagnostika, 1975; 114 p.
36. Fleming M, Dailey R. Longitudinal study of the surge of gonadotropins induced by exogenous hormones in prepuberes gilts. *J. Endocrinol.* 1985; 116: 1893-98.
37. Hunter W, Corrie J. Immunoassay for clinical chemistry. 2a. ed. London: Churchill Livingstone, 1983. 701 p.
38. Moss A, Dabryumple G, Boyd C. Practical radioimmunoassay. 2a. ed. USA: The CV. Mosby Company, 1976. 158 p.

39. Curso Nacional sobre Metodología de Radioisótopos y Radioinmunoanálisis Arca VIII. México: Universidad Autónoma de Coahuila. Junio-Julio 1993.
40. Reglamento de Seguridad Radiológica. México: Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ). 1993.
41. Criterios de Seguridad Radiológica en la gestión de residuos radiactivos. Argentina. 1992.

13. ANEXOS

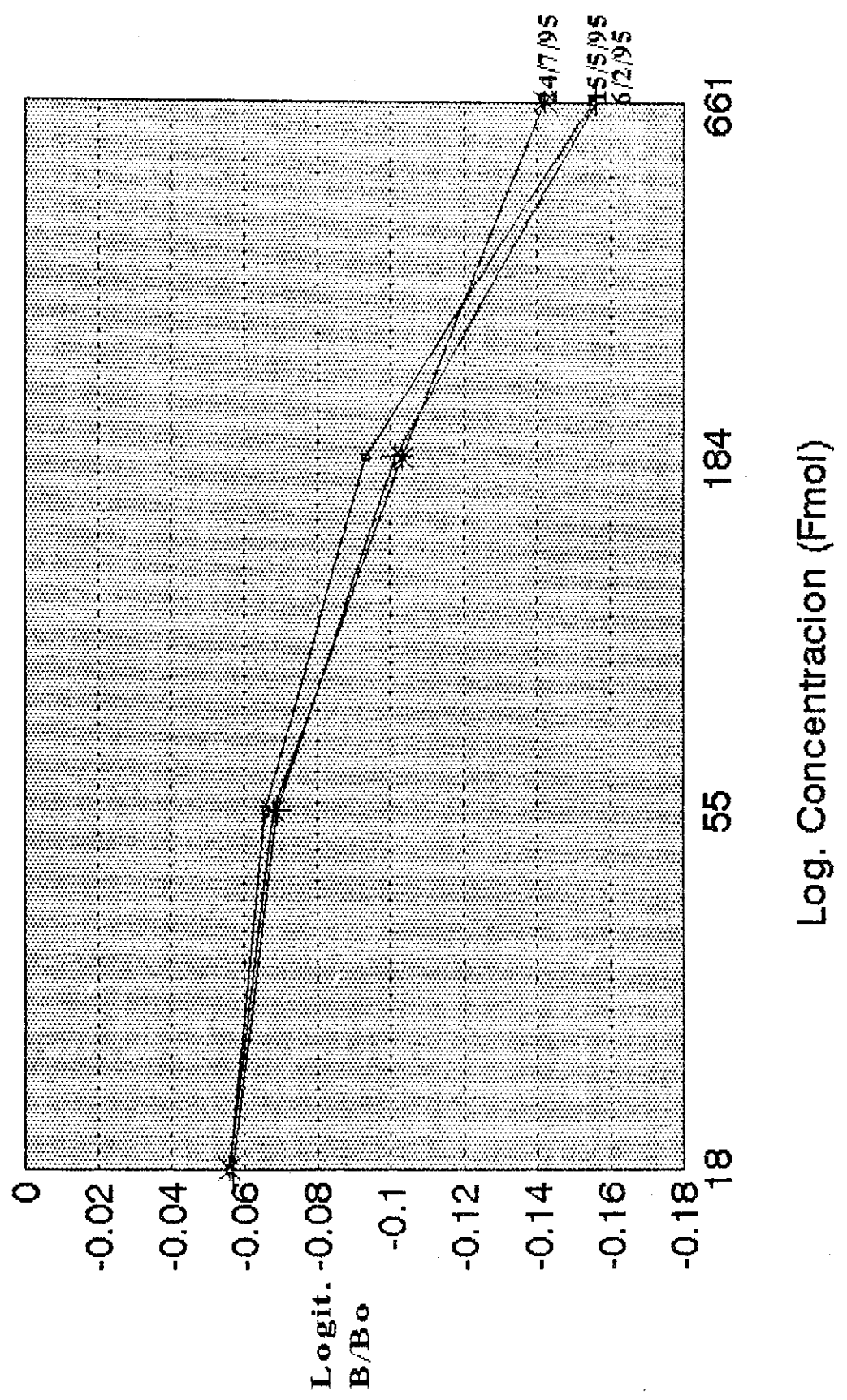
Grafica # 1

Curva Dosis - Respuesta Estradiol (Tritio)



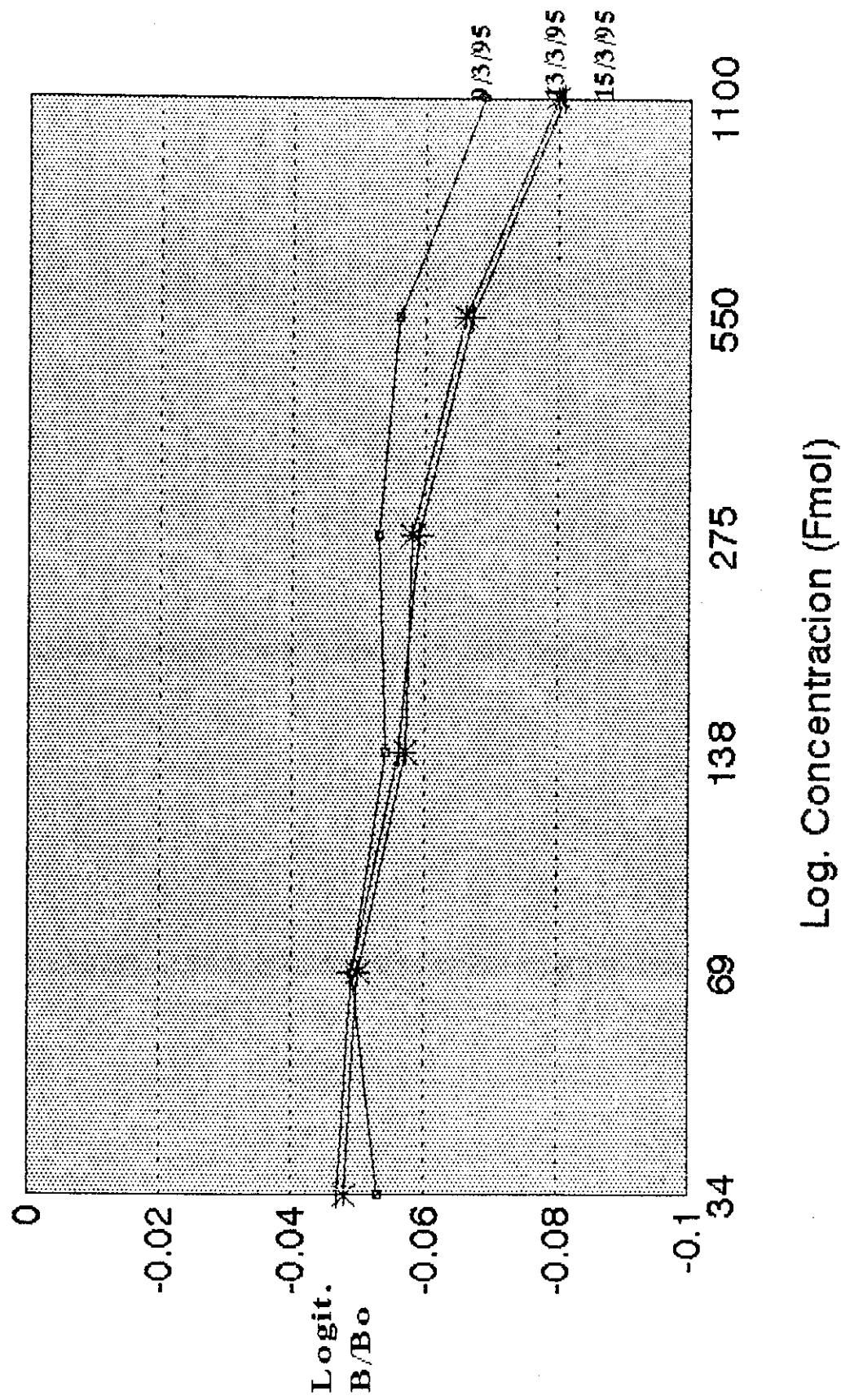
Grafica # 2

Curva Dosis - Respuesta Estradiol (I-125)



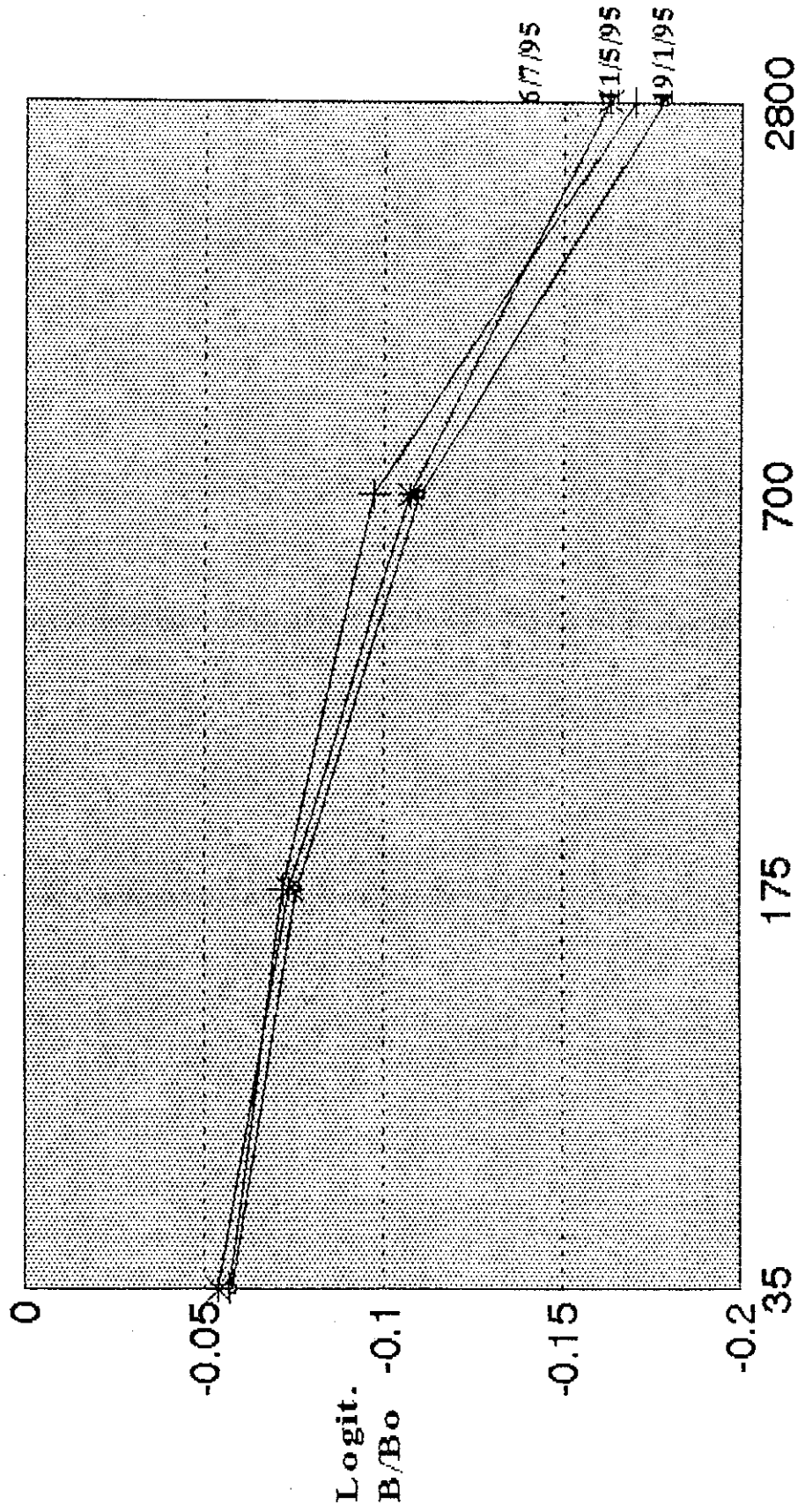
Grafica # 3

Curva Dosis - Respuesta Testosterona (Tritio)



Grafica # 4

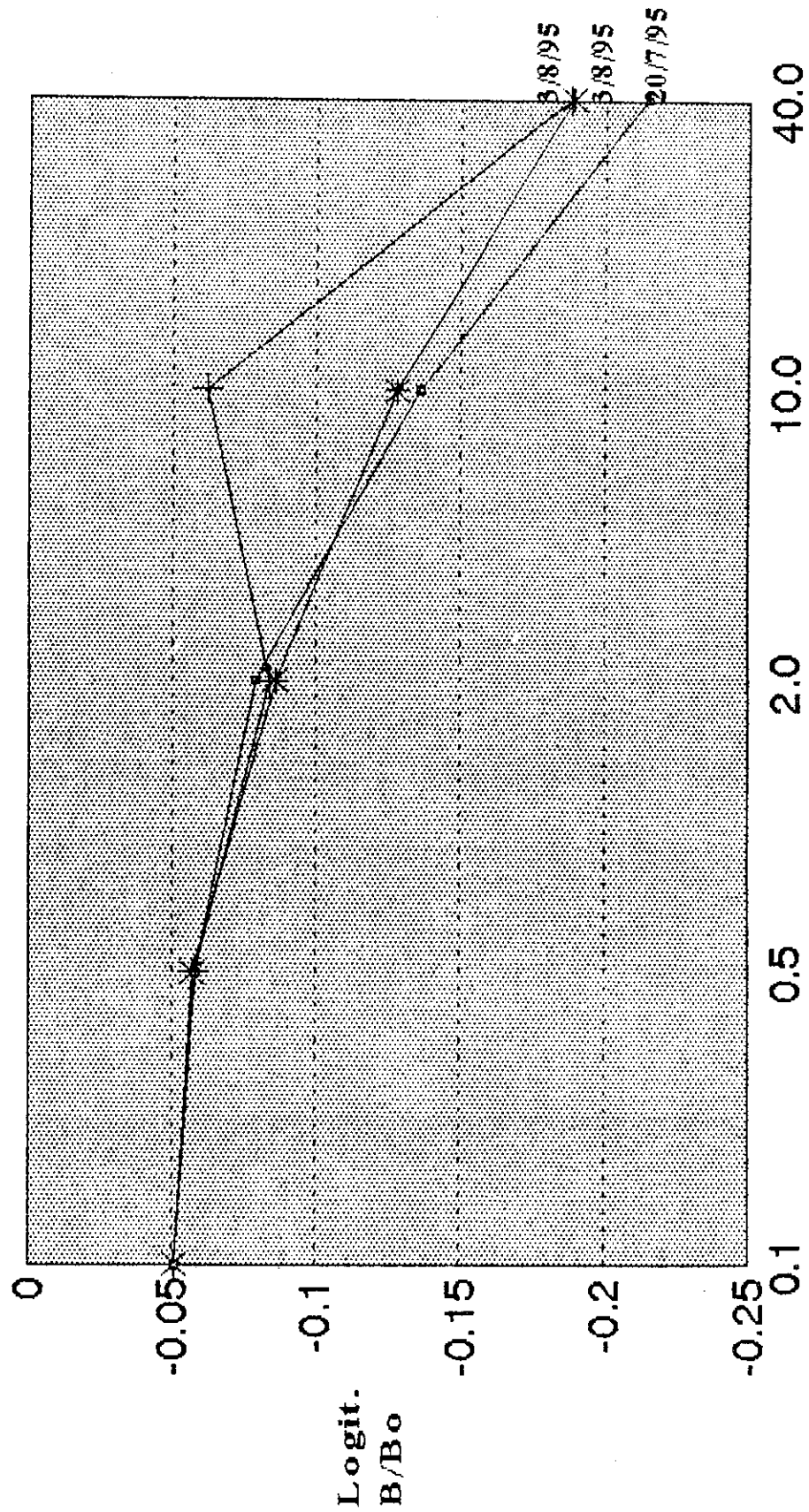
Curva Dosis - Respuesta Testosterona (I-125)



Log. Concentration (Fmol)

Grafica # 5

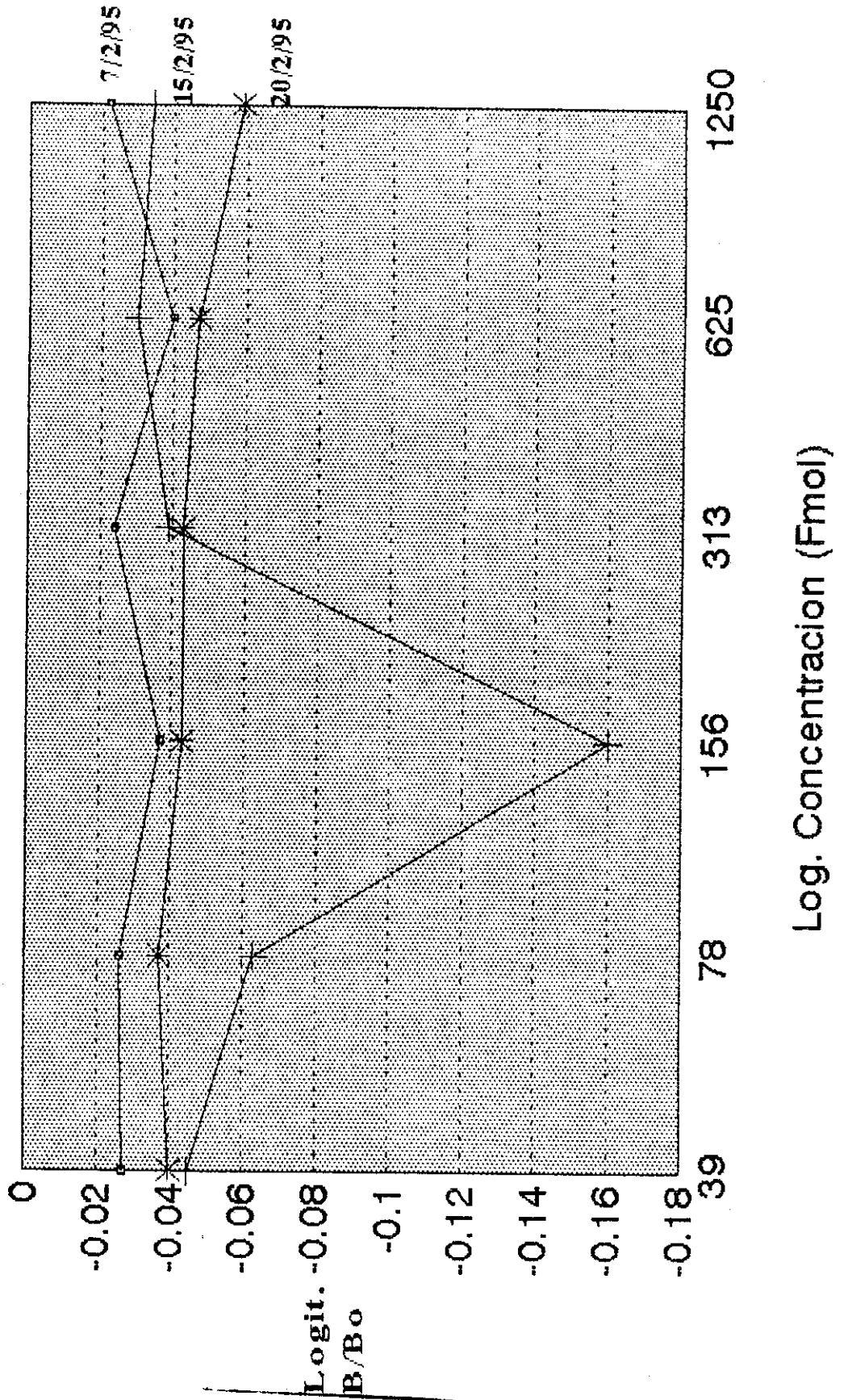
Curva Dosis - Respuesta Progesterona (I-125)



Log. Concentration (ng/ml)

Grafica # 6

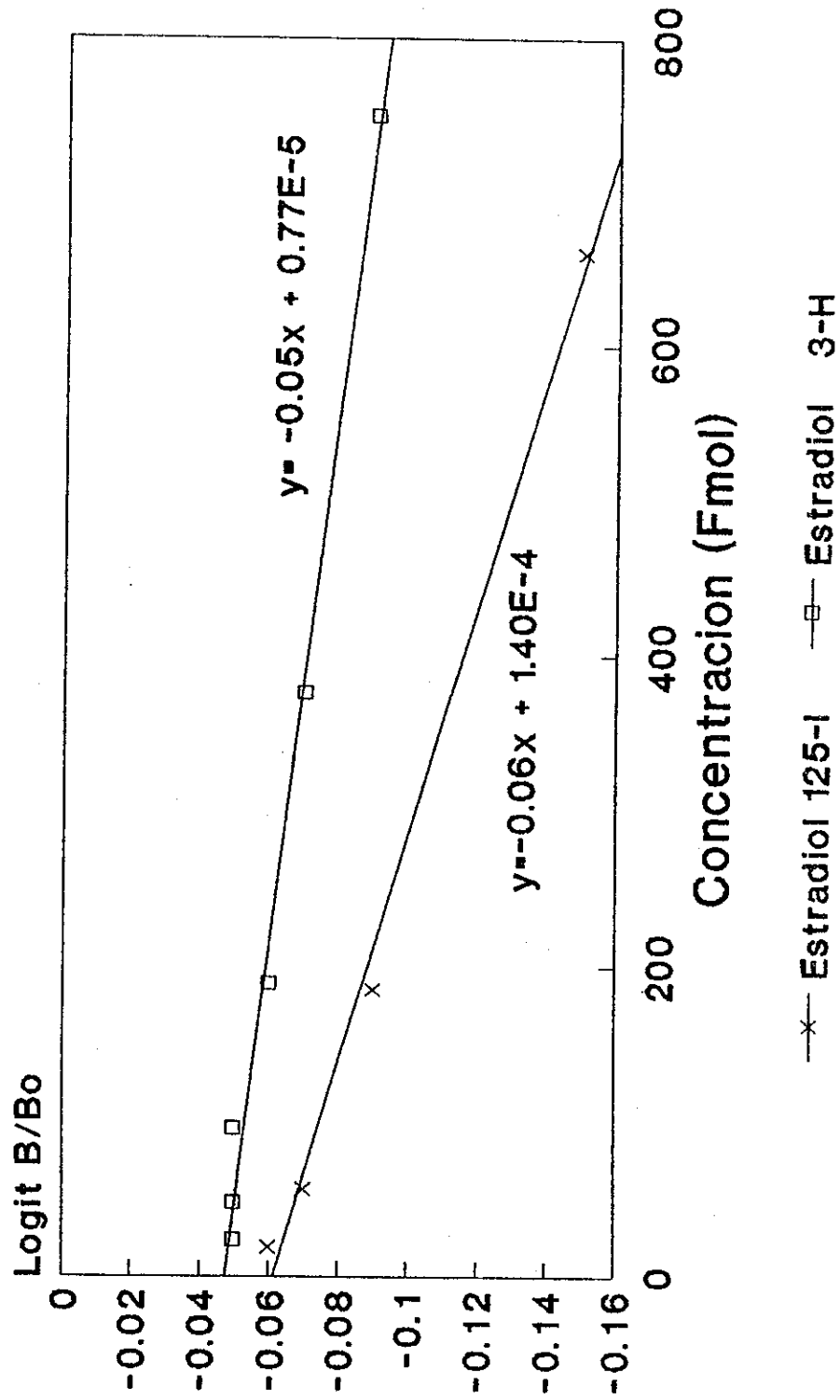
Curva Dosis - Respuesta Progesterona (Tritio)



BIBLIOTECA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

GRAFICA #7

Comparacion de pendientes ESTRADIOL



GRAFICA # 8

Comparacion de Pendientes TESTOSTERONA

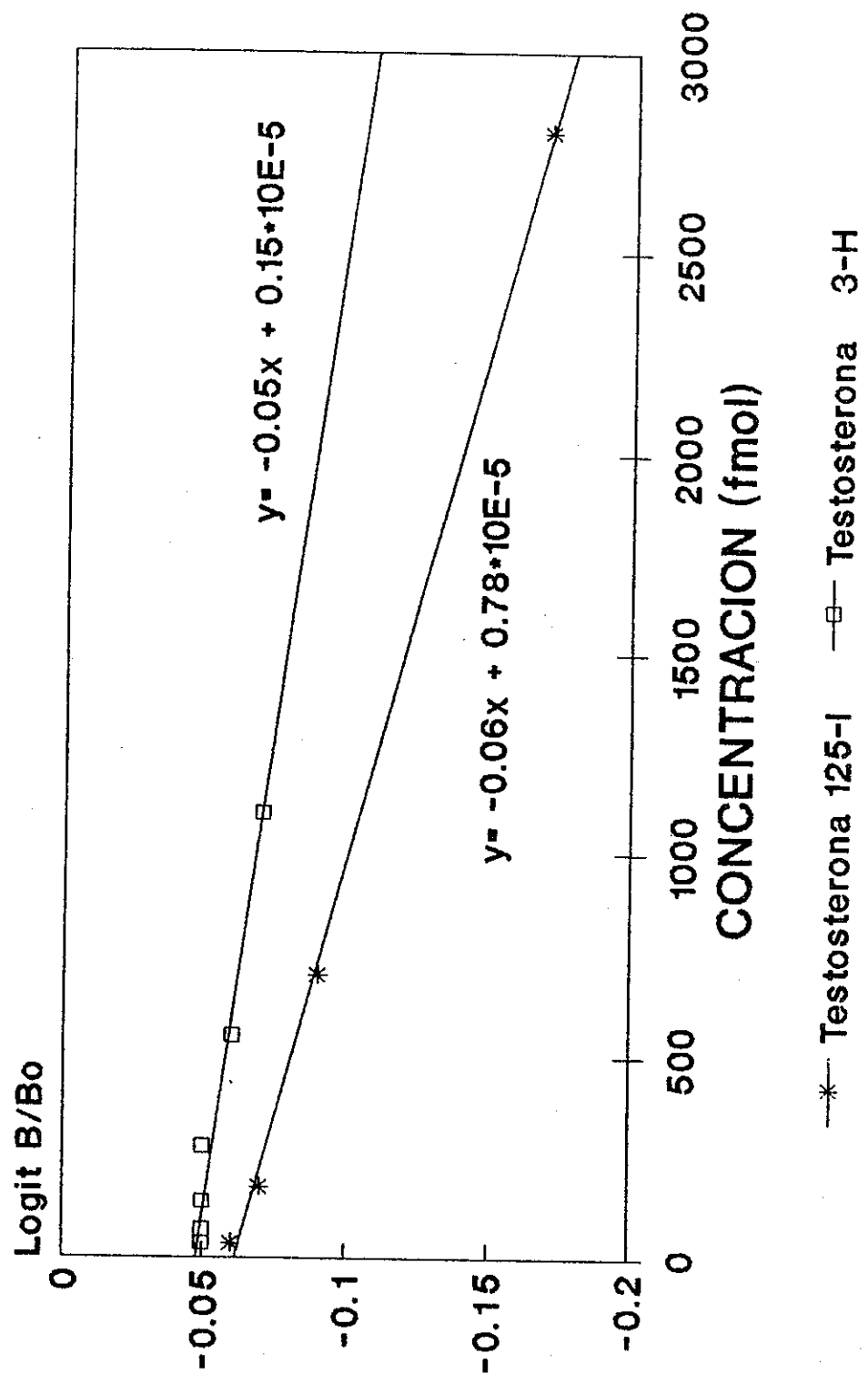


TABLA # 1

ESTRADIOL (³H)
(20/01/95)

Estandar/fmol	Log.	B/Bo.	LogiT B/Bo.
23	1.36	94 - 88	-0.049/-0.053
47	1.67	90 - 85	-0.051/-0.048
94	1.97	85 - 80	-0.053/-0.055
188	2.27	70 - 76	-0.062/-0.068
375	2.57	50 - 55	-0.080/-0.085
750	2.88	30 - 38	-0.120/-0.150

ESTRADIOL (³H)
(25/01/95)

Estandar/fmol	Log.	B/Bo.	LogiT B/Bo.
23	1.36	96 - 90	-0.048/-0.046
47	1.67	93 - 88	-0.049/-0.048
94	1.97	85 - 90	-0.053/-0.056
188	2.27	74 - 79	-0.059/-0.062
375	2.57	60 - 65	-0.069/-0.073
750	2.88	36 - 40	-0.102/-0.107

ESTRADIOL (³H)
(12/12/94)

Estandar/fmol	Log.	B/Bo.	LogiT B/Bo.
23	1.36	96 - 101	-0.048/-0.051
47	1.67	93 - 98	-0.049/-0.050
94	1.97	85 - 80	-0.053/-0.051
188	2.27	78 - 76	-0.057/-0.053
375	2.57	58 - 55	-0.071/-0.068
750	2.88	40 - 43	-0.095/-0.099

TABLA # 2**ESTRADIOL (1.ª I)**
(06/02/95)

Estandar/fmol	Log.	B/Bo.	LogiT B/Bo.
18	1.26	76.61 - 72.50	-0.057/-0.055
55	1.74	64.59 - 60.59	-0.066/-0.065
184	2.26	42.87 - 42.87	-0.090/-0.096
661	2.82	21.39 - 21.39	-0.150/-0.160

ESTRADIOL (1.ª I)
(15/05/95)

Estandar/fmol	Log.	B/Bo.	LogiT B/Bo.
18	1.26	81.33 - 85.40	-0.055/-0.058
55	1.74	64.34 - 67.34	-0.066/-0.071
184	2.26	38.11 - 41.00	-0.098/-0.103
661	2.82	20.95 - 23.00	-0.152/-0.160

ESTRADIOL (1.ª I)
(24/07/95)

Estandar/fmol	Log.	B/Bo.	LogiT B/Bo.
18	1.26	82.69 - 87.50	-0.054/-0.057
55	1.74	64.88 - 69.30	-0.065/-0.070
184	2.26	34.46 - 32.60	-0.106/-0.100
661	2.82	22.52 - 21.00	-0.145/-0.138

TABLA # 3**TESTOSTERONA (°H)**
(9/03/95)

Estandar/fmol	Log.	B/Bo.	LogiT B/Bo.
34	1.53	97 - 93	-0.048/-0.058
69	1.84	96 - 90	-0.048/-0.050
138	2.14	95 - 90	-0.048/-0.060
275	2.44	90 - 93	-0.051/-0.054
550	2.74	79 - 74	-0.056/-0.055
1100	3.04	63 - 67	-0.067/-0.071

TESTOSTERONA (°H)
(13/03/95)

Estandar/fmol	Log.	B/Bo.	LogiT B/Bo.
34	1.53	96 - 91	-0.048/-0.046
69	1.84	92 - 88	-0.050/-0.048
138	2.14	86 - 90	-0.052/-0.060
275	2.44	78 - 83	-0.057/-0.061
550	2.74	65 - 70	-0.065/-0.068
1100	3.04	50 - 55	-0.080/-0.082

TESTOSTERONA (°H)
(15/03/95)

Estandar/fmol	Log.	B/Bo.	LogiT B/Bo.
34	1.53	94 - 91	-0.049/-0.047
69	1.84	88 - 82	-0.051/-0.049
138	2.14	83 - 90	-0.054/-0.060
275	2.44	77 - 82	-0.057/-0.059
550	2.74	66 - 70	-0.064/-0.068
1100	3.04	52 - 57	-0.077/-0.082

TABLA # 4**TESTOSTERONA (¹²⁵I)**
(19/01/95)

Estandar/fmol	Log.	B/Bo.	LogiT B/Bo.
35	1.54	80.00 - 85.00	-0.055/-0.060
175	2.24	55.00 - 59.00	-0.074/-0.078
700	2.85	31.00 - 30.00	-0.114/-0.105
2,800	3.45	18.00 - 19.00	-0.170/-0.185

TESTOSTERONA (¹²⁵I)
(11/05/95)

Estandar/fmol	Log.	B/Bo.	LogiT B/Bo.
35	1.74	80.82 - 85.05	-0.055/-0.058
175	2.24	60.63 - 64.32	-0.069/-0.075
700	2.85	40.18 - 43.00	-0.094/-0.099
2,800	3.45	19.03 - 20.35	-0.163/-0.176

TESTOSTERONA (¹²⁵I)
(06/07/95)

Estandar/fmol	Log.	B/Bo.	LogiT B/Bo.
35	1.54	85.94 - 90.00	-0.052/-0.056
175	2.24	57.47 - 61.73	-0.072/-0.076
700	2.85	33.23 - 35.00	-0.109/-0.104
2,800	3.45	18.84 - 17.84	-0.165/-0.160

TABLA # 5**PROGESTERONA (¹²⁵I)
(20/07/95)**

Estandar.ng/ml	Log.	B/Bo.	LogiT B/Bo.
0.1	-1.00	90.4 - 88.2	-0.050/-0.051
0.5	-0.30	74.9 - 76.0	-0.058/-0.058
2.0	0.30	49.4 - 53.5	-0.081/-0.076
10.0	1.00	23.1 - 26.0	-0.142/-0.130
40.0	1.60	10.8 - 15.8	-0.243/-0.186

**PROGESTERONA (¹²⁵I)
(03/08/95)**

Estandar.ng/ml	Log.	B/Bo.	LogiT B/Bo.
0.1	-1.00	91.36 - 87.20	-0.050/-0.052
0.5	-0.30	73.21 - 78.10	-0.059/-0.056
2.0	0.30	44.73 - 50.00	-0.087/-0.080
10.0	1.00	24.82 - 30.20	-0.135/-0.012
40.0	1.60	13.35 - 18.80	-0.210/-0.165

**PROGESTERONA (¹²⁵I)
(10/08/95)**

Estandar.ng/ml	Log.	B/Bo.	LogiT B/Bo.
0.1	-1.00	89.50 - 92.0	-0.051/-0.050
0.5	-0.30	75.41 - 78.5	-0.058/-0.056
2.0	0.30	48.44 - 42.5	-0.082/-0.090
10.0	1.00	24.14 - 30.0	-0.138/-0.117
40.0	1.60	13.41 - 18.1	-0.209/-0.169

TABLA # 6

Coefficientes de variación para RIA . Estradiol

Dosis	¹²⁵ I			³ H		
	X	S.D.	C.V. %	X	S.D.	C.V. %
D20 %	738.9	90.20	12.20	1503.3	350.81	23.34
D50 %	130.6	10.80	8.27	431.7	50.78	11.80
D80 %	21.6	1.63	7.53	128.5	4.23	3.30
Cont A	19.9	2.30	11.55	66.8	16.24	24.31
Cont B	138.2	60.22	43.58	103.0	12.66	12.30
Cont C	249.4	60.37	24.20	167.0	20.44	12.22

TABLA # 7

Dosis mínima detectable
(Estradiol)

	X	D.S. %	C.V.
Tritio	78.08	8.77	11.23
Iodo	7.73	4.92	63.60

TABLA # 8

Valor de la pendiente
(Estradiol)

	b	D.S. %	C.V.
Tritio	-2.71	0.24	-9.1
Iodo	-1.73	0.08	-4.8

TABLA # 9

Coeficientes de variación para RIA . Testosterona

	125I			3H		
Dosis	X	S.D.	C.V. %	X	S.D.	C.V. %
D20 %	2575.8	818.87	31.79	6050.0	1037.30	17.15
D50 %	246.8	12.55	5.08	1391.7	241.70	17.37
D80 %	27.6	8.29	30.02	413.0	154.64	37.44
Cont A	184.6	57.57	31.18	110.6	35.26	31.88
Cont B	940.7	178.12	18.93	879.2	40.55	4.61
Cont C	3373.3	1554.77	46.09	1931.7	246.77	12.77

TABLA # 10

Dosis mínima detectable
(Testosterona)

	X	D.S. %	C.V.
Tritio	143.0	92.6	64.8
Iodo	14.1	7.1	50.4

TABLA # 11

Valor de la pendiente
(Testosterona)

	b	D.S. %	C.V.
Tritio	-2.13	0.31	-14.6
Iodo	-1.43	0.23	-16.1

TABLA # 12**PROGESTERONA (¹²⁵I)**

Dosis (ng/ml)	X	S.D %	C.V.
D20 %	14.00	2.97	21.19
D50 %	2.38	0.39	16.47
D80 %	0.48	0.28	58.06
Control DPC ₄	1.23	0.19	15.14
Control DPC ₅	4.21	0.73	17.26
Control DPC ₆	16.22	0.96	5.92

TABLA # 13**Dosis mínima detectable
(Progesterona)**

	X	S.D. %	C.V.
Iodo	0.106	2.42×10^{-3}	2.28
Tritio	--	--	--

TABLA # 14**Valor de la pendiente
(Progesterona)**

	b	S.D. %	C.V.
Iodo	-3.2	0.207	-6.47
Tritio	--	--	--

TABLA # 15

Valores obtenidos de la regresión lineal para el logit de B/Bo de los ensayos de Estradiol.

¹²⁵ I		³ H	
Estandar/fmol	Y logit B/Bo	Estandar/fmol	Y logit B/Bo
18	-0.06	23	-0.05
55	-0.07	47	-0.05
184	-0.09	94	-0.05
661	-0.15	188	-0.06
---	----	375	-0.07
---	----	750	-0.09

TABLA # 16

Valores obtenidos de la regresión lineal para el logit de B/Bo de los ensayos de Testosterona.

¹²⁵ I		³ H	
Estandar/fmol	Y logit B/Bo	Estandar/fmol	Y logit B/Bo
35	-0.06	34	-0.05
175	-0.07	69	-0.05
700	-0.09	138	-0.05
2800	-0.17	275	-0.05
---	----	550	-0.06
---	----	1100	-0.07

AMORTIGUADOR DE RIA (FOSFATOS 0.1 M)

Reactivos requeridos para preparar 1 litro de solución:

REACTIVO	CANTIDAD EN GRAMOS
Fosfato monobásico anhidro	2.35
Fosfato monobásico hidratado	2.79
Fosfato dibásico anhidro	11.60
Cloruro de sodio	8.80
Thimerosal	0.10
Gelatina	1.00

METODO:

1. Todo se prepara con agua destilada hervida y deionizada.
2. Disolver las sales de fosfato dibásico en agua caliente (60° C.) en seguida agregar el cloruro de sodio y el fosfato monobásico y disolver.
3. Agregar mas o menos 300 ml de agua fría; agregar y disolver el thimerosal.
4. La gelatina se disuelve por separado en 100 ml de agua caliente (60° C.), ya disuelta se agrega a los demás reactivos.
5. Dejar reposar hasta temperatura ambiente, aforar a 1 lt y medir el pH, debe obtenerse una lectura entre 7.2 y 7.4, sino se obtiene el pH correcto revise el procedimiento y prepare nuevamente la solución. (NO AJUSTE pH)

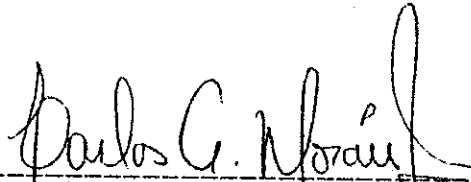
SUSPENSION DE CARBON DEXTRAN

Reactivos requeridos para 100 ml de solución:

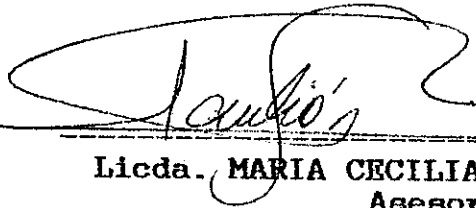
REACTIVOS	CANTIDAD EN GRAMOS
Carbon activado (SIGMA)	0.6250
Dextran T - 70	0.0625
Amortiguador de RIA (0.1 M) 4° C.	100 ml

METODO:

1. disolver el Dextran en aproximadamente 25 ml de amortiguador de RIA.
2. Agregar el carbón y amortiguador hasta 100 ml y mezclar suavemente por agitación.



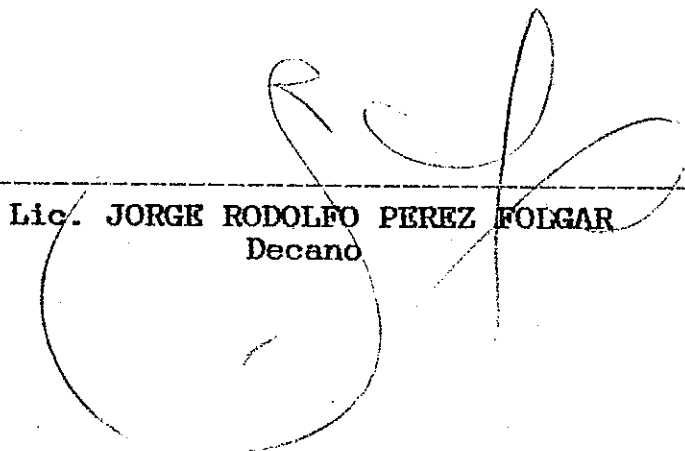
Br. CARLOS AUGUSTO MORAN JIMENEZ
Tesista



Licda. MARIA CECILIA SANCHEZ ROSAL
Asesor



Lic. GERARDO ARROYO
Director



Lic. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR
Decano