

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

**DISEÑO Y VALIDACION DE ENSAYOS INMUNORRADIOMETRICOS
EN FASE SOLIDA PARA LA CUANTIFICACION DE HORMONA
GONADOTROPINA CORIONICA**



KARLA JOSEFINA LANGE CRUZ

Previo a optar el título de:

QUIMICA BIOLOGA

Guatemala, septiembre de 1998

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

06
7(1893)
C.4

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

DECANA	Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta
SECRETARIO	Lic. Oscar Federico Nave Herrera
VOCAL I	Dr. Oscar Manuel Cobar Pinto
VOCAL II	Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda
VOCAL III	Lic. Rodrigo Herrera San José
VOCAL IV	Br. Herberth Raúl Arévalo Alvarado
VOCAL V	Br. Manola Anleu Fortuny

DEDICO ESTE ACTO

A Dios y a la Virgen María por ser mi guía, mi fuerza.

A mi padre Alberto Federico Lange Rivera, a quien recuerdo y llevo siempre conmigo.

A mi madre Josefina Cruz de Lange, gracias por su amor, por ser un modelo a seguir, este triunfo es suyo.

A mis hermanos Ana Ingrid, Karin, Federico, Wilhem, Rosana, Marco Antonio, quienes más que hermanos han sido apoyo y ejemplo en mi vida.

A mis sobrinos Karin Lucía, Ana Lucía, Ana Carolina, Andrea Isabel, Laura Nicté, Federico Guillermo, son mi alegría.

A mis abuelitos Arturo Cruz Toledo y Albertina Salguero de Cruz.

A mis amigos Gudrid, Héctor, Francisco, Rosarito de León, especialmente a Anna Gabriella, Ana Cecilia, Elizabeth, por estar conmigo brindandome su ayuda en todo momento

A Ervin gracias por hacer bello cada día.

AGRADEZCO A

Licenciada Mayra Barrondo de Sánchez, por su asesoría y apoyo a lo largo de mi trabajo de tesis.

Laboratorio de Radioinmunoanálisis del Departamento de Medicina Nuclear del Hospital General San Juan de Dios, Marco Antonio López, Mauricio Telón, Lourdes Bravo, Licenciada Cecilia Sánchez y Licenciada Claudia Quintero especialmente a Licenciada Julla Mendoza de Montejo, por toda su colaboración y apoyo.

Dirección General de Energía, del Ministerio de Energía y Minas por el apoyo brindado en la realización de este trabajo.

Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, especialmente a los catedráticos que me enseñaron a amar la Carrera.

INDICE

	PAGINA
1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Antecedentes	
3.1. Generalidades	5
3.2. Formas moleculares de hGC	6
3.3. Ensayos para determinación y cuantificación de hGC	8
3.4. Diagnóstico del embarazo normal	14
3.5. Diagnóstico del embarazo ectópico	15
3.6. Evaluación del aborto	18
3.7. Diagnóstico y evaluación de la enfermedad trofoblástica gestacional	19
3.8. Administración de hGC para la inducción de la ovulación durante la fertilización <i>in vitro</i>	21
3.9. Evaluación de los tumores testiculares	22
3.10. Producción de hGC en tumores no trofoblásticos	23
4. Justificaciones	24
5. Objetivos	25
6. Hipótesis	26
7. Materiales y métodos	27
8. Resultados	38
9. Discusión de resultados	51
10. Conclusiones	56
11. Referencias	57
12. Referencias	58
13. Anexos	64

1. RESUMEN

La hormona gonadotropina coriónica es una glicoproteína, útil no sólo para diagnóstico y seguimiento de embarazo normal, embarazo ectópico, mola hidatiforme, sino también como marcador tumoral en enfermedades trofoblásticas, cancer testicular, tumores ováricos y otros tumores no trofoblásticos que incluyen neoplasias de mama, páncreas, cérvix, gástricas y hepáticas.

El objetivo primordial de este trabajo fue el diseño y validación de ensayos inmunorradiométricos de fase sólida para la cuantificación sérica de hormona gonadotropina coriónica, en el Laboratorio de Radioinmunoanálisis del Departamento de Medicina Nuclear en el Hospital General San Juan de Dios, con el fin de producir localmente estos reactivos y con ellos reducir el costo de la prueba, tanto para el uso con pacientes como para fines de investigación.

Para ello se marcó con Iodo-125 el anticuerpo monoclonal anti hGC total 5006 (Bioproduct, donado por el Organismo Internacional de Energía Atómica) según la técnica de óxido reducción con cloramina T y metabisulfito de sodio, recolectándose 4.9 mL de anticuerpo marcado con una actividad específica de 12.18 uCi/ug. Se acopló anticuerpo monoclonal anti hGC total 5009 (Bioproducts) a dos diferentes fases sólidas (tubos de poliestireno y partículas magnéticas carboxiladas), se analizaron las condiciones óptimas de acoplamiento en estos ensayos, siendo para el ensayo de tubos de poliestireno una concentración de anticuerpo de 0.5ug/300uL en tampón de ensayo y 18 horas de incubación. Para el de fase magnética carboxilada se estableció una concentración de anticuerpo 0.025mg/50uL en tampón MES(morfolino etanosulfónico), 2 horas de incubación. Se evaluó para ambos ensayos especificidad, linealidad, sensibilidad, límite de detección y cuantificación, precisión, reproducibilidad, y exactitud, comparados con un juego de reactivos de origen comercial, para validar dichos ensayos.

Referente a la especificidad, el ensayo con tubos recubiertos presenta mejor especificidad, determinándose que no posee interferencia o reacción cruzada con la

hormona folículo estimulante ni luteinizante, y 1.86% de interferencia con la hormona estimulante de la tiroides, valor que puede desprejarse de acuerdo a sus valores normales circulantes en un paciente normal. El ensayo con fase magnética carboxilada se descarta estadísticamente al ser comparado con el juego de reactivos de origen comercial.

La linealidad de ambos ensayos es aceptable, siendo el valor $r=0.996$ para el ensayo con tubos de poliestireno y $r=0.8968$ para el ensayo con fase magnética carboxilada.

La sensibilidad de ambos ensayos es aceptada estadísticamente. La concentración mínima cuantificable para el ensayo de tubos de poliestireno es de 1.25 mUI/ml y de 1.04 mUI/mL para el ensayo con fase magnética carboxilada, considerándose que los valores normales de hGC son de 0-5 mUI/mL en hombres y en mujeres no embarazadas, ambos en condiciones normales, por lo cual los dos ensayos son aceptables.

A través del análisis estadístico se estableció que ambos ensayos son precisos, reproducibles y exactos para determinación de hGC por IRMA.

Debido a que el ensayo con tubos de poliestireno cumple mejor las condiciones requeridas por este tipo de ensayo y al realizar su validación contra el juego de reactivos comercial, se obtuvieron resultados aceptables para el método con tubos de poliestireno, concluyéndose que se escoge este método, el cual además es el más económico y cuyos materiales son de obtención más factible.

2. INTRODUCCION

La hormona gonadotropina coriónica es una glicoproteína, secretada principalmente por el tejido placentario que proviene de la implantación del trofoblasto y sirve de soporte al cuerpo lúteo durante las primeras semanas del embarazo. También es considerada como un potencial marcador tumoral en enfermedades trofoblásticas, como coriocarcinomas, mola hidatiforme y cáncer testicular no seminomatoso, jugando un papel importante en la detección y monitoreo terapéutico de estas malignidades, así como de otras neoplasias no trofoblásticas o también con la cuantificación de alfa fetoproteína y estradiol libre en el tamizaje de trisomía 21(1).

Su cuantificación es empleada tanto para el diagnóstico y monitoreo del embarazo (principalmente durante el primer trimestre), así como marcador tumoral de neoplasias que producen elevación sérica en la concentración de hormona gonadotropina coriónica.

En Guatemala, se utilizan varios tipos de Inmunoensayos para su cuantificación, ya sea aplicando principios fluorométricos, radioinmunométricos, enzimáticos o quimioluminiscentes, todos ellos con un costo elevado ya que son juegos de reactivos de origen comercial elaborados en el extranjero.

En la actualidad en el laboratorio de Radioinmunoanálisis del Departamento de Medicina Nuclear del Hospital General San Juan de Dios, la determinación de esta

hormona se realiza a través de un radioinmunoensayo comercial en fase líquida, el cual utiliza un segundo anticuerpo para la precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo, necesitando una centrifugación posterior.

La producción de ensayos inmunoradiométricos de doble captura, que involucran el acoplamiento de anticuerpos específicos a fase sólida a nivel local, permitirá disminuir su costo económico, y obtener una mayor sensibilidad y precisión en la determinación de la hormona.

3. ANTECEDENTES

3.1. Generalidades

La hormona gonadotropina coriónica humana es una glicoproteína formada por dos subunidades polipeptídicas diferentes: una subunidad alfa con peso molecular de 14,500 daltons, y una subunidad beta con peso molecular de 22,200 daltons, constituida por 145 aminoácidos. Este heterodímero se halla íntimamente relacionado con otras tres hormonas glicoproteicas hipofisarias: la hormona foliculo estimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH), así como con la hormona estimulante de la tiroides (TSH), las subunidades alfa de estas cuatro hormonas son prácticamente idénticas y están formadas por 92 aminoácidos de la misma secuencia. Las diferencias en la secuencia de aminoácidos de la subunidad beta confieren propiedades inmunológicas y biológicas únicas a cada una de estas hormonas. No obstante, aún así existe una homología significativa entre la subunidades beta de las cuatro hormonas. Las subunidades separadas no manifiestan actividad biológica, mientras que la actividad biológica de las moléculas híbridas está determinada por la subunidad beta(2,3).

Desde el descubrimiento de la hormona gonadotropina coriónica humana (hGC) por Hirose Asheim y Zondek hace 50 años, sus mediciones han servido de base para el diagnóstico del embarazo y, coincidentemente como un marcador para

varios tumores trofoblásticos y no trofoblásticos incluyendo algunos tumores testiculares(4). En 1938 Boycott y Rowlands fueron los primeros en describir los patrones cuantitativos de la hGC en suero, las primeras determinaciones se realizaron tomando como base su actividad biológica, la cual era restringida a la detección de la molécula intacta. El advenimiento de los inmunoensayos en 1960 permitió no solo la cuantificación de los patrones moleculares completos sino también diferenciar la estimación de las subunidades libres y sus fragmentos, iniciándose una amplia extensión en sus aplicaciones clínicas.(1,4).

3.2 Formas moleculares de hGC

Desde hace dos décadas, la producción de hGC en el cuerpo humano y sus moléculas relacionadas han sido ampliamente investigadas y relacionada en varios procesos fisiopatológicos, adicionalmente a su uso en el diagnóstico de embarazo. Sin embargo la amplia cantidad de información concerniente a su estructura, metabolismo y significancia clínica a dado lugar a complicación debido a las diferentes formas moleculares de hGC presentes en fluidos biológicos y sus rangos, los cuales dependen grandemente de la naturaleza del fluido biológico y la situación clínica del paciente.

La subunidad α de hGC aparentemente tiene actividad biológica durante el

embarazo, notándose en ellas la presencia de estructuras con enlace oxhidrilos y azúcares con uniones en la región N terminal que previenen su combinación con la subunidad beta.

La hormona gonadotropina coriónica proviene de un grupo de hormonas glicoproteicas cuyas miembros (TSH, LH y FSH)) difieren estructuralmente en la subunidad beta, la cual determina la especificidad de esta hormona y le permite su reconocimiento por el tejido blanco receptor. La subunidad beta está compuesta de 145 residuos de aminoácido, es una subunidad simple glicosilada, que ha sido importante en el diagnóstico y seguimiento de enfermedades trofoblásticas o de cánceres testiculares, así como en la detección de tumores no placentarios y no gonadales(5-8).

El fragmento β core es una molécula pequeña, cuya estructura corresponde a los residuos 6-40 y 55-92 de la subunidad beta. Es principalmente un producto de la degradación renal de la subunidad beta cuyo material presenta una conformación de epítopes similar a la región core de hGC- β pero carece de los epítopes de hGC α , cambia en la estructura de carbohidratos, tanto en residuos de ácido siálico como en galactosamina presentes en hGC β . El fragmento core se origina de la placenta, constituyéndose en el fragmento de hGC β más abundante en la orina de mujeres embarazadas o de pacientes con neoplasias trofoblástica gestacional y con neoplasias no trofoblásticas, quienes presentan niveles indetectables de concentración sérica y urinaria de hGC total y de la subunidad beta, aunque poseen niveles elevados del

fragmento core en el suero y orina de pacientes constituyense en un potencial marcador de cáncer asociado a neoplasias de ovario, cérvix, endometrio, testículos, pulmón, hígado, senos, páncreas, próstata, recto y sistema linfático (9).

3.3. Ensayos para determinación y cuantificación de hGC

El primer bioanálisis clínicamente útil para la determinación de hGC fue introducido por Aschelm en 1927 y Zondek en 1931, y se caracterizó por el aumento de tamaño y la luteinización del cuerpo lúteo del ratón inmaduro, tras la inyección de orina de una mujer con embarazo normal. Zondek en 1931 observó resultados similares cuando se utilizó orina procedente de mujeres con un coriocarcinoma o neoplasia de ovario o de varones con neoplasias testiculares. A continuación de estos experimentos, apareció la prueba de Friedman en 1931 y la de *Xenopus laevis* diseñada por Shapiro en 1934 que utilizaban orina procedente de mujeres embarazadas, que producía la ovulación en el conejo y en el sapo sudafricano, respectivamente. Dos pruebas posteriores, documentadas en 1948 la de la *Rana pipiens* por Witberger en 1948 y del sapo de Galli-Mainini en el mismo año, determinaban la liberación de espermatozoides procedentes de la rana y el sapo machos respectivamente, de 2 a 4 horas tras la inyección de orina de una mujer embarazada. A pesar de que eran pruebas relativamente rápidas, presentaban muy baja sensibilidad(10).

Debido a factores como la baja sensibilidad, el largo tiempo de realización, la necesidad de suministros de animales y el elevado costo, los bioanálisis han sido reemplazados por otras pruebas. Los bioanálisis presentan diversos problemas asociados, que limitan significativamente su utilidad como "pruebas de embarazo" de rutina. Estas incluyen la necesidad de poseer una estandarización relativamente estricta de los animales utilizados en la prueba, incluyendo regímenes ambientales y dietéticos constantes, dificultades técnicas, un costo relativamente elevado y la interferencia provocada por la presencia de la hormona luteinizante. Por consiguiente, los bioanálisis han sido reemplazados para el estudio rutinario, a pesar de que algunos todavía las utilizan en laboratorios de investigación, en los que se pretende diseñar metodologías(11-12).

Hasta estos últimos años, las pruebas de aglutinación en portaobjetos habían gozado de popularidad porque eran rápidas, económicas, y pueden interpretarse rápidamente (minutos), pero poseen una sensibilidad relativamente baja, con un índice de falsos negativos del 5 al 10%, incluso cuando la hGC se encuentra a su nivel máximo (60 a 80 días después de la fecundación, durante el embarazo). Las causas de resultados falsos positivos incluyen: errores en la realización de la prueba, una lectura poco exacta de los resultados de la prueba, las proteinurias de 1 g/24 horas, fármacos como la metadona y antipsicóticos y la hematuria(9).

3.3.1. Inmunoanálisis

Los bioanálisis han sido ampliamente reemplazados por los inmunoanálisis, el primero de los cuales se documentó en 1960 por Wide. La concentración de hGC puede expresarse del siguiente modo: Unidades de actividad biológica/mililitro de orina o suero o en nanogramos/mililitro de orina o suero, existiendo para tal motivo la siguiente relación

$$1 \text{ ng/mL de hGC} = 9 \text{ mUI/mL}$$

La unidad internacional (UI) se basa en los bioanálisis de Storring en 1980, siendo el estándar la actividad gonadotrópica de una gonadotropina urinaria en polvo(13).

Los inmunoanálisis son rápidos y económicos y constituyen pruebas de embarazo relativamente fidedignas. No obstante, algunos carecen de sensibilidad y no se prestan por sí mismos a una cuantificación simple de la cantidad de hGC de la muestra. Se han descrito seis tipos básicos de inmunoanálisis: fijación del complemento, inmunoanálisis de partículas de solución coloidal, inhibición de la hemaglutinación, inhibición de la aglutinación con látex, aglutinación directa, enzimoimmunoanálisis y radioimmunoanálisis(1).

3.3.1.1. Radioimmunoanálisis

Los radioimmunoanálisis (RIA) son análisis de unión competitiva en los que tanto la hGC en el suero de prueba como la hGC marcada con un radioisótopo

compiten para la unión con un anticuerpo anti-hGC. Por tanto, existe una correlación inversa entre el número de recuentos radiactivos en el complejo anticuerpo y cantidad de hGC del suero de la paciente. Las determinaciones cuantitativas de la hGC pueden obtenerse por RIA. El RIA que utiliza anticuerpos frente a las subunidades α y β manifiesta una reacción cruzada significativa tanto con la LH como con la FSH y TSH. Los antisueros producidos únicamente contra la subunidad β producen como consecuencia un RIA que es mucho más específico para la hGC. Sin embargo, incluso estos análisis, como los RIA que utilizan antisuero de conejo generado frente a la subunidad β , presentan cierta reacción cruzada con la LH, hecho que puede provocar unos valores falsamente altos de hGC(13,14).

3.3.1.2. Análisis con radiorreceptor

Los análisis con radiorreceptor (RRA) utilizan tejido blanco de gonadotropina, como los testículos de rata o de cerdo, los ovarios de rayas hiperovuladoras y los cuerpos lúteos de ovarios de vacas preñadas. Los receptores en las preparaciones de membrana plasmática de estos órganos son la fuente de unión para la hGC, en lugar de los anticuerpos anti-hGC utilizados en los RIA. El RRA puede ser más rápido (1 hora), pero es menos específico que el RIA de la subunidad β , y ello es debido a las reacciones cruzadas con la LH, como ocurre con el pico a mitad del ciclo menstrual o en el estado posmenopáusic. Los RRA se llevan a cabo con suero y su sensibilidad es de 20 a 50 mUI/ml, aproximadamente(15).

3.3.1.3. Análisis inmunométricos

Los análisis inmunométricos son ensayos tipo "sandwich" en los que existe un anticuerpo específico a una fracción del analito, acoplado a una fase sólida y otro anticuerpo específico hacia otra porción de la misma fracción del analito marcado para emitir una señal que permita su detección y cuantificación, incluyen el análisis inmunoradiométrico (IRMA), el inmunoenzimático (IEMA) y el de inmunoadsorbencia enzimática (ELISA). Se les denomina ensayos de doble captura, ya que emplean dos anticuerpos dirigidos hacia la molécula de hGC. Uno de estos anticuerpos de captación, dirigido hacia un epítopo de la molécula está acoplado a la fase sólida, la cual sirve de soporte para que se lleve a cabo el ensayo, esta fase puede estar constituida por polímeros tales como celulosa, partículas magnéticas carboxiladas, tubos o pozos de poliestireno, a la cual se une uno de los anticuerpos por medio de enlaces químicos o de adsorción molecular. El otro de los anticuerpos es marcado con un radioisótopo o una enzima y es dirigido hacia un epítopo diferente del epítopo blanco del anticuerpo unido a la fase sólida. A diferencia de los análisis de competencia, en estas pruebas tanto el anticuerpo de captación acoplado a la fase sólida como el de detección son añadidos en exceso. Siendo por tanto la unión Ac-Ag-Ac directamente proporcional a la cantidad de hormona presente, y puesto que uno de los anticuerpos está marcado ya sea radiactiva o enzimáticamente, la cantidad de radiación emitida o de sustrato que emita señal será por tanto directamente proporcional a la cantidad de hormona presente en la muestra.

La producción de anticuerpos monoclonales y el subsecuente desarrollo de inmunoensayos de doble sitio han hecho que sea factible la especificidad y sensibilidad de los ensayos de hGC y las formas moleculares relacionadas (7).

El ELISA tiene la ventaja de no utilizar material radioactivo y de ser relativamente rápido, con una sensibilidad de 50 mUI/mL, sin embargo no alcanza la sensibilidad de un IRMA la cual puede llegar a 5 mUI/ml. Un inmunoanálisis no competitivo de fase sólida, inmunocentrado utiliza superficies revestida de anticuerpos con una proporción más elevada de área de superficie frente al volumen de muestra, minimizando los problemas cinéticos que se asocian a otros inmunoanálisis competitivos de fase sólida(16).

Existen múltiples estándares de referencia lo cuales son utilizado para la cuantificación de hGC. Por tal motivo la Organización Mundial de la Salud los ha clasificado para que, se unifiquen criterios y se especifique el tipo de molécula de hGC empleada como referencia. El segundo estándar internacional (WHO 61/6 2nd IS) referido en 1964 es una mezcla equimolar de moléculas intactas y libres de β -hGC. El primer estándar internacional (WHO 75/589 1st IS) autorizado en 1978 está compuesto únicamente por moléculas intactas de hGC pura. El tercer estándar internacional (WHO 3rd IS) es esencialmente igual al primero pero está formado por moléculas de hGC total y proporciona similar actividad biológica que el primero, variando en la afinidad inmunológica(17).

El valor de hGC puede variar considerablemente dependiendo del tipo de especificidad del anticuerpo empleado en el ensayo, del estándar de referencia empleado y de la forma de hGC presente en la muestra.

Los ensayos de hormona gonadotropina coriónica que detectan únicamente hGC total son fáciles de estandarizar y generalmente son los métodos que presentan mejor precisión y exactitud. En un embarazo normal el ensayo que determina hGC intacta es generalmente adecuado porque la mayoría de la hormona circulante está intacta, sin embargo isoformas de hGC también están presentes durante el mismo. Cuando la hGC es usada como un marcador tumoral para enfermedad trofoblástica o tumores de células germinales es preferible emplear ensayos que determina hGC total y además incluir ensayos de hGC- β libre ya que algunos tumores producen hGC total, otros únicamente la fracción libre de hGC- β y otros producen una combinación de ambos (17).

3.4. Diagnóstico del embarazo normal

En el ciclo menstrual normal sin embarazo, el cuerpo lúteo es viable durante 14 días hasta que ya no es sensible al estímulo ofrecido por la hormona luteinizante. Sin un embarazo que produzca hormona gonadotropina coriónica, el cuerpo lúteo involuciona, convirtiéndose en cuerpo *albicans*. Como resultado se produce descamación endometrial, demostrada clínicamente por la menstruación. No

obstante, si hay fecundación, el sincitiotrofoblasto produce hormona gonadotropina coriónica, que es responsable del rescate y mantenimiento del cuerpo lúteo más allá de su duración normal de 14 días. Así la hormona gonadotropina coriónica rescata al cuerpo lúteo de la luteólisis y por ello se le denomina hormona luteotrópica. La progesterona producida por el cuerpo lúteo es esencial para dar soporte a la viabilidad de la gestación hasta aproximadamente las 7-10 semanas de la misma. En este momento, la placenta en desarrollo puede producir las suficientes cantidades de progesterona, que inicialmente suplementan y en último término reemplazan la producción de progesterona por parte del cuerpo lúteo(18-20).

En un embarazo normal, el sincitiotrofoblasto segrega una cantidad detectable de hormona gonadotropina coriónica casi inmediatamente después de la implantación, que ocurre de 6 a 8 días después de la fecundación. Los niveles de hGC aumentan rápidamente, con un tiempo de duplicación de 1.4 a 3.5 días, hasta que alcanzan un pico de unas 100,000 mUI/ml en suero, tras 60 a 80 días de la fecundación. Los niveles de hGC declinan desde su máximo hasta una meseta de 10,000 a 20,000 mUI/ml a las 15 a 16 semanas, nivel que se mantiene durante el resto de la gestación. Se ha observado una leve elevación en los niveles durante el tercer trimestre lo cual se explica por la secreción de un tipo de hGC inmunológicamente activa pero biológicamente inactiva por la degradación que sufren que provoca la escisión de la molécula completa. La presencia de hGC- β libre en una etapa temprana del embarazo y de hGC- α libre en las etapas posteriores,

cuando se codeterminan con la hGC total, puede contribuir a la evaluación general de la función placentaria y al diagnóstico de amenaza de aborto y embarazo ectópico. Tras el parto de un embarazo a término la hormona gonadotropina coriónica regresa a niveles no detectables al cabo de unas 2 semanas (10, 21).

3.5. Diagnóstico del embarazo ectópico

La incidencia de embarazo ectópico se ha cuadruplicado en Estados Unidos desde 1970. Representa un pronóstico reservado con respecto a la supervivencia de la mujer y su futuro potencial reproductivo. Aproximadamente el 10% de toda la mortalidad materna es el resultado de un embarazo ectópico. Solamente un tercio de mujeres que han mantenido un embarazo ectópico llegarán a dar a luz un niño, nacido vivo. El riesgo observado de recurrencia de un embarazo ectópico oscila entre el 4 y el 27% (22).

La mayor incidencia de embarazos ectópicos puede atribuirse a distintos factores, que incluyen un aumento de la tasa de enfermedad pélvica inflamatoria, la cual es iniciada frecuentemente por una patología infecciosa cuyos agentes causales más importantes son *Neisseria gonorrhoeae* y *Clamidia trachomatis*(23).

Otras causas son la introducción de técnicas de microcirugía para el tratamiento de las alteraciones de la trompa de Falopio, el gran número de esterilizaciones electivas llevadas a cabo y la gran popularidad de las técnicas de

reproducción asistida (por ejemplo fertilización *in vitro*, transferencia de gametos dentro de la trompa de Falopio) (24).

El mayor desafío clínico con respecto al embarazo ectópico reside en establecer su diagnóstico lo más rápido posible e intervenir inmediatamente para evitar la rotura, la hemorragia y la destrucción de la trompa de Falopio. Las técnicas diagnósticas incluyen los ultrasonidos de alta resolución y más importantes, los análisis que utilizan anticuerpos monoclonales para la subunidad β de la hormona gonadotropina coriónica, cuyos niveles se encuentran significativamente elevados, en comparación con un embarazo normal(22,26).

Como se ha expuesto previamente, la hGC- β duplica su concentración aproximadamente cada 2 días hasta las 10 semanas de gestación durante un embarazo normal. Si este "tiempo de duplicación" no se produce, puede indicar un embarazo patológico. El diagnóstico diferencial incluiría una posible gestación ectópica, en caso de no poder demostrar mediante ecografía un embarazo intrauterino a los 42 días desde el último período menstrual, (si el título de hGC que corresponde a los 42 días de gestación es de 6,500mUI/ml, se asocia con embarazo ectópico en el 87% de casos). Por consiguiente, la "zona discriminatoria" de hGC para diferenciar un embarazo ectópico de una gestación intrauterina se determinó el valor sérico inicialmente como 6,500 mUI/ml. Sin embargo, la utilidad clínica de dicho criterio queda limitada al 40% de mujeres con sospecha de embarazo ectópico en el que presentan un título de hGC por encima de 6,500 mUI/ml. Los

radioinmunoanálisis han demostrado ser ensayos muy sensibles para determinar la presencia de hGC, con una sensibilidad de 5 a 10 mUI/ml. Esto ha tenido como consecuencia una tasa de falsos negativos menor del 1% para los embarazos ectópicos y se puede disponer de los resultados al cabo de 3 horas(27).

Incluir la utilización de la ecografía transvaginal es un esfuerzo para mejorar el valor pronóstico de la utilización combinada de ultrasonidos con la determinación cuantitativa de hGC sérica. Se ha observado una "zona discriminatoria" de hGC de aproximadamente 1,400 mUI/ml que corresponde a un saco gestacional visualizado mediante ecografía transvaginal, que corresponde a los 35 días posteriores al último período menstrual(22).

Posterior a la extirpación quirúrgica de un embarazo ectópico, el tiempo necesario para la desaparición de la hGC en la sangre oscila entre 1 y 31 días, con una media de 8.5 días. Se ha recomendado que las pacientes que sean sometidas a cirugía convencional del embarazo ectópico (por ejemplo salpingostomía), sean monitoreadas con determinaciones seriadas de las concentraciones de hGC- β séricas, hasta que los títulos regresen a los niveles anteriores al embarazo para excluir tejido trofoblástico ectópico persistente no detectado, el cual debe ser extirpado totalmente para evitar recidivas posteriores que puedan originar complicaciones a la paciente (28).

3.6. Evaluación del aborto

Investigaciones realizadas en Estados Unidos en 1988 demostraron que la cifra de incidencia de la pérdida precoz de la gestación ha sido documentada en un 31%. El diagnóstico diferencial incluye amenaza de aborto y aborto fallido, inevitable, incompleto o completo. Cada tipo de aborto está definido clínicamente por el estado del orificio interno del cérvix (abierto frente a cerrado) y por la posibilidad de que los productos de la fecundación hayan sido expulsados de la cavidad uterina. A menudo, el clínico debe incluir la posibilidad de un embarazo ectópico, una mola hidatiforme o un coriocarcinoma en el diagnóstico diferencial. La combinación de la historia de la paciente, el examen físico, la ecografía pélvica y los títulos cuantitativos seriados de hGC- β ofrece la información necesaria para un diagnóstico y tratamientos correctos(24).

Los títulos cuantitativos seriados de hGC- β indicativos de un embarazo patológico vienen sugeridos por una "meseta" o una "caída" a partir del "tiempo de duplicación" esperado, que se observa en el embarazo intrauterino normal. Tras un aborto espontáneo, la hGC- β sérica llega a ser indetectable al cabo de 9 a 35 días, con una media de 19 días. Esto contrasta con el aborto inducido, en el cual los títulos llegan a ser no detectables al cabo de 16 a 60 días con una media de 30 días. Los investigadores atribuyen esta diferencia de la velocidad de regresión de la hGC- β a la cantidad de tejido trofoblástico vital residual que persiste tras la evacuación del útero(25-27).

3.7. Diagnóstico y evaluación de la enfermedad trofoblástica gestacional

La enfermedad trofoblástica gestacional (ETG) se produce en aproximadamente 1 de cada 1,000 embarazos. La mola hidatiforme es la manifestación más frecuente de enfermedad trofoblástica gestacional. En Estados Unidos, cada año hay unos 3,500 nuevos casos de mola hidatiforme. El pronóstico referente a la supervivencia es bueno si el diagnóstico es precoz y si el tratamiento se inicia con rapidez. En Estados Unidos, el 82% de mola hidatiforme se resuelven completamente tras la evacuación del útero, mientras que el 15% progresan hasta un corioadenoma *destruens* y el 3%, hasta un coriocarcinoma(28).

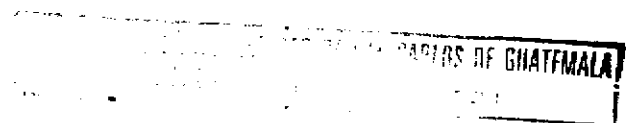
La presentación clínica puede incluir una hemorragia vaginal tras un período de amenorrea, una discrepancia entre el tamaño uterino y la edad gestacional, náuseas, vómitos, preeclampsia, tirotoxicosis, síntomas neurológicos y, en el 25% de casos quistes tekaluténicos bilaterales. Un ejemplo clásico de ETG se observa en una mujer con el útero aumentado de tamaño y una cuantificación positiva de hGC, con ausencia de latido cardíaco fetal y un patrón característico en la ecografía pélvica(17).

Las mujeres con ETG, característicamente, producen concentraciones de hGC iguales o niveles superiores a los producidos en la gestación normal para una edad gestacional similar. Cuando se efectúa un seguimiento de los niveles de hGC previos al tratamiento, los niveles caen a una meseta al final del primer trimestre y continúan aumentando en proporción al incremento de la masa de células

trofoblásticas. Tras la evacuación del útero, debe efectuarse un seguimiento de los títulos cuantitativos de hGC con carácter semanal, hasta que no se detecten niveles durante 3 semanas, y después con carácter mensual durante 1 año(29-31).

Estudios más recientes han indicado que el cociente subunidad hGC- β libre sérica/hGC total puede ser valioso en la evaluación de la ETG. La subunidad β libre se encuentra en el embarazo normal y, como promedio, es menor del 4% de la hGC total hasta el momento del pico de hGC. El cociente hGC- β :hGC es más elevado en la ETG y se correlaciona extraordinariamente con el tipo de ETG. Se ha demostrado que la proporción más baja se presenta en las pacientes con mola hidatiforme, la proporción intermedia, en la mola invasiva y la más elevada, en el coriocarcinoma, correlacionándose con el grado de Inmadurez o diferenciación de la célula trofoblástica. Este cociente también puede ser valioso para pronosticar a las pacientes con mola hidatiforme que presentarán una remisión espontánea (cociente más bajo) frente a las pacientes en las que persistirá la enfermedad (cociente más elevado). Así mismo, un ensayo *inmunorradiométrico* (IRMA) muy específico para cuantificación de hGC puede predecir de manera muy precoz la recidiva tumoral en pacientes con coriocarcinoma gestacional(10, 21)

El estudio en busca de metástasis puede permitir establecer el pronóstico. Los factores asociados con un mal pronóstico incluyen títulos de hGC sérica superiores a 40,000 mUI/ml, que se presentan a los 4 meses desde el término del último embarazo, e indican fracaso de la quimioterapia previa, metástasis cerebrales o



hepáticas(32).

Los pacientes con metástasis exitosamente tratada, tienen una supervivencia a los 5 años del 100%, comparada con la tasa de supervivencia del 66 al 90% de las que pertenecen al grupo con enfermedad metastásica de mal pronóstico. Tras un tratamiento con éxito, las pacientes deben evitar los embarazos durante 1 año. El riesgo de desarrollar un tumor trofoblástico durante el segundo año de seguimiento es menor del 1%(31).

3.7.1. Seguimiento de los tumores ováricos de las células germinales

Las concentraciones cuantitativas seriadas de hGC pueden contribuir a monitorizar a las pacientes en busca de pruebas de persistencia o recidiva de tumores ováricos de células germinales, tras la quimioterapia o la cirugía inicial. Los niveles absolutos de hGC probablemente poseen menos valor práctico que las tasas de incremento o disminución a partir de los niveles basales Iniciales que se obtienen antes del tratamiento.

La hGC puede servir como marcador tumoral para diversos tumores ováricos de células germinales, que incluyen coriocarcinoma, tumor del seno endodérmico, carcinoma embrionario y disgerminoma(30).

3.8. Administración de la hGC para la inducción de la ovulación durante la fertilización *in vitro*

La administración de hGC constituye una parte integral de la inducción y el ajuste del momento de la ovulación para la fertilización *in vitro*. Tras haber administrado los fármacos seleccionados para aumentar la fertilidad y favorecer el desarrollo de folículos múltiples, se administran de 5,000 a 10,000 UI de hGC. La hGC estimula un aumento espontáneo de la hormona luteinizante, que suele normalmente ocurrir durante un ciclo natural y, de este modo, desencadena la reanudación de la meiosis. El oocito originalmente detenido en la profase de la primera división meiótica puede ser procesado para desarrollarse hasta la metafase II de la segunda división meiótica, y de este modo llega a ser receptivo para la fertilización. La ovulación se produce de una manera predecible a las 36-38 horas, tras la administración de HGC, momento en el cual puede iniciarse la recuperación del oocito(32).

3.9. Evaluación de los tumores testiculares

Los títulos de β hGC son extremadamente útiles tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de los tumores testiculares. Han contribuido enormemente al diagnóstico, a la clasificación Inmunohistoquímica, a la clasificación por estadios y al seguimiento de tumores. Los tumores de células germinales se clasifican histológicamente como seminomas (40%) o no seminomas (60%). Más del 40% de

varones con tumores testiculares presentan hGC sérica. Además cuando se estudia la hGC junto con la α 1-fetoproteína (AFP), del 50 al 90% de varones con tumores testiculares no seminomatosos presentan niveles elevados(33).

Tradicionalmente, el tratamiento de elección para el seminoma testicular en estadio inicial es la orquiectomía radical, seguida de radioterapia. Las tasas de supervivencia a los 5 años para los pacientes con un seminoma oscilan entre el 80 y el 97%. Los tumores de células germinales no seminomatosos son menos radiosensibles y, por tanto, más difíciles de tratar.

El nivel de los títulos de hGC puede ser un factor que influya en el tratamiento recomendado. Los pacientes con seminoma y hGC elevada pueden tener un pronóstico menos favorable que aquellos que presentan un seminoma y títulos normales. Por consiguiente, se ha sugerido que estos tumores deben tratarse de una manera más agresiva, incluyendo la linfadenectomía retroperitoneal con quimioterapia, según el estadio patológico. Tras la quimioterapia de las neoplasias avanzadas de células germinales, se ha observado que la magnitud del declive de los títulos de hGC es pronóstica de una respuesta favorable a largo plazo(34-36).

3.10. Producción ectópica de hGC en tumores no trofoblásticos

Existen diversos tumores no trofoblásticos e incluso tejidos no neoplásicos, asociados a la presencia de una inmunorreactividad tipo hGC en el suero y en los

extractos hísticos de los pacientes. Los tumores no trofoblásticos que producen inmunorreactividad de tipo hGC, en orden de frecuencia decreciente, incluyen neoplasias de mama, de ovario, de páncreas, de cérvix, gástricas y hepáticas.

Actualmente no se utiliza la hGC como un marcador tumoral no trofoblástico debido a el bajo porcentaje de casos con niveles detectables de hGC y con títulos bajos asociados (1-10 mUI/ml), lo que ha limitado considerablemente su utilización para la detección y seguimiento del tratamiento de pacientes con estas neoplasias. Además no hay una evidencia sustancial de que la tendencia de los títulos de hGC se correlacione con el tratamiento clínico de este tipo de tumores(2,10).

4. JUSTIFICACIONES

La determinación de los niveles séricos de hormona gonadotropina coriónica es de gran utilidad para diagnóstico y seguimiento tanto de embarazo normal como patológico (embarazo ectópico, aborto espontáneo), así también al ser utilizado como un marcador tumoral en casos de cáncer trofoblástico (coriocarcinomas, mola hidatiforme) y no trofoblásticos (testicular, gastrointestinal, ovárico, pulmonar y de vejiga).

Actualmente en el Departamento de Medicina Nuclear del Hospital General San Juan de Dios se utilizan juegos de reactivos comerciales para esta cuantificación, lo que implica un alto costo de las pruebas. Debido a lo anterior es de gran utilidad diseñar ensayos inmunoradiométricos que determinen los niveles séricos de hormona gonadotropina coriónica total (la cual incluye la determinación de hGC intacta y hGC- β) ampliando así su valor predictivo como marcador tumoral, presentando una alta sensibilidad y especificidad, que al ser producidos localmente disminuyen su costo por prueba, lo que permitirá ampliar la cobertura en atención a pacientes en este Departamento.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Producir un ensayo inmunorradiométricos de fase sólida para la determinación de hormona gonadotropina coriónica total en el Departamento de Medicina Nuclear del Hospital General San Juan de Dios.

5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

5.2.1. Determinar las condiciones de ensayo óptimas en el diseño de dos ensayos inmunorradiométricos de fase sólida para cuantificar los niveles séricos de hormona gonadotropina coriónica total.

5.2.2. Comparar los 2 ensayos diseñados para la cuantificación de hormona gonadotropina coriónica en cuanto a especificidad, sensibilidad, linealidad, recuperación y reproducibilidad.

5.2.3. Validar el ensayo que cumpla mejor las características anteriores, con un ensayo de fase sólida para determinación de hormona gonadotropina coriónica total de origen comercial.

6. HIPOTESIS

Uno de los ensayos Inmunorradiométricos en fase sólida para la determinación de los niveles séricos de hormona gonadotropina coriónica total diseñados en el Departamento de Medicina Nuclear del Hospital General San Juan de Dios es validado al compararlo con un ensayo inmunorradiométrico de origen comercial en fase sólida para la determinación de hormona gonadotropina coriónica.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1. Universo de trabajo

Se determinaron las condiciones de trabajo óptimas para el acoplamiento de anticuerpos monoclonales específicos anti hGC total a 2 ensayos inmunorradiométricos en fase sólida, los cuales utilizan como soporte tubos de poliestireno o partículas carboxiladas magnetizables, siendo los parámetros a evaluar, la concentración del anticuerpo acoplado a la fase sólida y tiempo de incubación para el acoplamiento del anticuerpo a dichas fases sólidas.

Para ello se realizaron 5 repeticiones de cada ensayo inmunorradiométrico que permitieron la validación mediante su comparación con un juego de reactivos comerciales referente a especificidad, sensibilidad, linealidad, recuperación y reproducibilidad.

7.2. Medios

7.2.1. Recursos humanos

Autor: Karla Josefina Lange Cruz

Asesor: Licenciada Mayra Lizeth Barrondo Lima de Sánchez

Personal profesional y técnico que labora en el Departamento de Medicina Nuclear en el Hospital General San Juan de Dios.

7.2.2. Recursos Institucionales

Laboratorio de Radioinmunoanálisis del Departamento de Medicina Nuclear en el Hospital General San Juan de Dios.

Departamento de Medicina Nuclear de la Dirección General de Energía Nuclear del Ministerio de Energía y Minas.

7.2.3. Recursos materiales

7.2.3.1. Equipo

- Balanza analítica, marca Mettler modelo AE 100.
- Placa agitadora magnética, marca Wili Gyratherm modelo II,
- Contador de centelleo Gamma, marca Berthold Multicrystal LB 2104,
- Agitador rotatorio, marca Netria
- Congelador (-20°C), marca Lab Line, 3552-10,
- Refrigeradora (4°C),
- Mezclador tipo vortex, marca Thermolyne, 16700 mixer,
- Campana de flujo laminar, marca Labconco.
- Placa con campo magnético, marca Serono.
- Potenciómetro marca Fischer
- Colector de fracciones marca Buchler

7.2.3.2. Reactivos

- Tampón carbonato pH 9.2
- Tampón fosfato salino 0.5 M pH 7.5 (PBS)
- Albúmina bovina sérica (BSA)
- Solución de timerosal al 1% P/V
- Tween 20
- Solución de azida de sodio al 10% P/V
- Fase magnética (óxido férrico, recubierto con partículas carboxiladas con celulosa)
- Tampón MES (ácido morfolino etanosulfónico) 0.05M pH 5.5
- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodlimida (EDAC)
- Juego de reactivos de origen comercial marca DPC para cuantificación de hGC total por ensayo Inmunorradimétrico.
- Sephadex G100
- Anticuerpo monoclonal anti hGC 5006 marca Bioproduct
- Anticuerpo monoclonal anti hGC 5009 marca Bioproduct
- Solución I 110-hGC Cruda obtenida de orina humana marca Bioproduct
- Solución de referencia de hGC Bloproducts, calibrada contra el 1º estándar internacional
- Cloramina T
- Solución de Iodo 125 Nordion

- Metabilsulfito de sodio
- Yoduro de potasio
- Solución de hidróxido de sodio 0.01N pH 9-10
- Solución de almacenaje (tampón fosfato 0.05M con 0.1% de BSA y 0.4% de manitol)
- Tampón Netria
- Tampón de lavado Netria

7.2.3.3. Materiales

- Pipetas Pasteur
- Columnas de vidrio para purificación de hormonas
- Pipetas automáticas de 10-50uL,
- Pipetas automáticas de 40-200uL
- Gradillas para tubos de poliestireno
- Pipetas repetidoras Eppendorf
- Pipetas serológicas
- Tubos de poliestireno de 12x5 mm
- Tubos de polipropileno de 12x4 mm
- Guantes
- Papel adsorbente
- Papel parafilm

- Tubos de vidrio de 12x5 mm
- Algodón
- Puntas para pipetas automáticas
- Tubo de fondo cónico de poliestireno

7.3. Métodos

7.3.1. Marcación de anti hGC monoclonal 5006 con Iodo-125 (16)

Se equilibró una columna de sephadex G100 con tampón fosfato 0.1M con 1% de BSA, dos días antes de la marcación.

El procedimiento se llevó a cabo en campana de flujo laminar, en ausencia de luz:

Se agregó en un tubo de fondo cónico:

50 ug de anticuerpo monoclonal ([1mg/ml])

10 ul de tampón fosfatos 0.5 M

1 mCi de Iodo 125, resbalado en las paredes del tubo cónico

10 ug de cloramina T ([1mg/mL] en tampón fosfato 0.05M)

Se agitó durante 60 segundos, evitando aumento de temperatura

10 ug de metabisulfito de sodio ([1mg/ml] en tampón fosfato 0.05M)

se incubó 15 segundos en hielo

100 ug de yoduro de potasio ([1mg/ml] en tampón fosfato 0.05M)

Se trasladó la solución a una columna de sephadex G 100 con una pipeta Pasteur.

Se eluyó la columna con tampón fosfato 0.01M con 1% de seroalbúmina bovina (BSA) se colectaron las fracciones de 1 ml en tubos de polipropileno.

Se determinó la actividad específica de la hormona marcada, alicuotandola y almacenandola a -4°C en tampón fosfato 0.05M con BSA al 1% y manitol al 0.4%.

7.3.2. Acoplamiento de anticuerpo monoclonal 5009 a tubos de poliestireno (tubos recubiertos)

Se agregó a cada tubo 300 ul de solución de anticuerpo monoclonal preparada en tampón carbonato 0.2M, pH9.2.

Ensayándose con las siguientes concentraciones:

- A. 0.5 ug/300ul
- B. 5.0 ug/300ul
- C. 50.00 ug/300ul

Se incubaron los tubos en un agitador rotatorio durante los siguientes tiempos (para evaluar el tiempo de acoplamiento):

- toda la noche
- durante 2 horas

a temperatura ambiente, se taparon con papel parafilm para evitar evaporación de la solución proteica.

Se tomaron alícuotas de remanentes para determinar concentración de proteínas, determinándose por diferencia la concentración de proteínas acopladas a los tubos recubiertos por adsorción.

Se lavó cada tubo con 1.0 ml de la siguiente solución: PBS 0.025M, Tween 20 0.5% V/V. Esperando mínimo 1 minuto y eliminando el sobrenadante de los tubos.

Se agregó a cada tubo 2.0 ml de la siguiente solución: PBS 0.025M, BSA al 5% P/V, Timerosal al 0.01% V/V. Se incubó 2 horas con esta solución sin rotar a temperatura ambiente. Se descartó la solución.

Se lavaron los tubos con 1.0 ml de solución de PBS y Tween 20 y se eliminó el sobrenadante.

Se lavaron con 1.0 ml de solución que contenga PBS 0.025M, Tween 20 al 0.5% y timerosal al 0.01% V/V.

Se eliminó el sobrenadante y por inspección visual se determinó la sequedad de los tubos, luego se almacenaron con desecante los tubos a -20°C hasta su uso en bolsas herméticas.

7.3.4. Acoplamiento de anticuerpo monoclonal 5009 a fase magnética carboxilada (BANGS)

Se sometió la fase magnética carboxilada (FM) en solución a agitación vigorosa y constante por 10 minutos para resuspender las partículas.

Se Tomó 0.1 ml de FM en tubo de vidrio , lavando 2 veces con 0.1 ml de NaOH (pH 9-10) fresco. Entre cada lavado se separó la FM con soporte magnético, absorbiendo con papel el remanente.

Se agregó 1 ml de solución protéica en tampón MES con las siguientes concentraciones,

0.5 mg/mL de anticuerpo monoclonal 5009

Se agregó 0.1 ml de solución de EDAC ([10mg/ml])

Para elegir el mejor tiempo de acoplamiento se incubó a temperatura ambiente en agitador rotatorio en los siguientes tiempos: 2 y 18 horas.

Se separó con soporte magnético, recolectando el remanente que no fue acoplado para determinación de proteínas.

Se lavó 2 veces con 1 ml de tampón TPG (tampón fosfato-gelatina). Se separó y resuspendió en 1 ml de dicho tampón. Para su uso se hicieron diluciones con el fin de evaluar las siguientes concentraciones de anticuerpo:

-0.050 µg/mL

-0.025 µg/mL

-0.0125 µg/mL

7.3.5. Protocolo de ensayo para determinación de hGC

7.3.5.1. Tubos recubiertos

Se trabajaron por duplicado las muestras y las siguientes concentraciones de estándar de hGC calibrada frente al 1º estándar internacional: 0, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0 y 400.0 mUI/ml

Se agregó a los tubos ya acoplados:

100 ul de muestra o estándar

50 ul de anticuerpo hGC marcado con Iodo 125

150 ul de tampón Netría

Los tubos se incubaron 18 a 24 horas a temperatura ambiente en agitador rotatorio.

Se lavaron los tubos con 2 ml de tampón de lavado Netría. Esperando 3 minutos y decantando.

Se lavaron los tubos con 2 ml de agua destilada. Esperando 3 minutos y decantando.

Se contó actividad de los tubos en 180 segundos en contador gamma.

7.3.5.2. Fase Magnética Carboxilada

Se trabajó por duplicado las muestras y las siguientes concentraciones de estándar de hGC calibrados frente al 1º estándar internacional: 0.0, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0 y 400.0 mUI/ml.

Se agregó a tubos de poliestireno:

100 ul de estándar o muestra

50 ul de fase magnética acoplada

50 ul de anticuerpos hGC marcados con Iodo 125

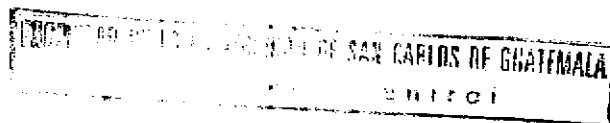
300 ul de tampón Netria.

Los tubos se incubaron de 18 a 24 horas a temperatura ambiente en agitador rotatorio.

Se lavó con 2 ml de tampón de lavado Netria, esperando 3 minutos, se separó con soporte magnético.

Se lavó con 2 ml de agua destilada. Se esperaron 3 minutos, separando con soporte magnético.

Se contó actividad en 180 segundos en contador gamma.



7.3.6. Análisis estadístico

7.3.6.1. Análisis de especificidad

Se evaluó 15 veces la concentración del estándar 0.0 mUI/mL para determinar el enlace no específico, tanto en el ensayo que emplea como fase sólida tubos de poliestireno como en el que usa partículas magnéticas carboxiladas.

Se realizaron 5 repeticiones del estándar 0.0 mUI/mL con el juego de reactivos de origen comercial, cuyo valor medio se analizó por medio de una "t de student" con cada ensayo a evaluar.

7.3.6.2. Linealidad

Se realizaron 3 repeticiones de curvas estándar de cada ensayo determinando el coeficiente de determinación para establecer la linealidad tanto del ensayo con tubos recubiertos, como en el ensayo con fase magnética carboxilada.

7.3.6.3. Sensibilidad

Se determinó por t de student aplicada a las pendientes la sensibilidad en cada uno de los ensayos evaluados.

7.3.6.4. Límite de detección y cuantificación

Se realizaron 5 repeticiones del estándar cero para establecer el rango de señal que se detecta que no corresponda a este estándar, para ello se sacó un valor medio más menos dos desviaciones estándar. Se diluyeron estándares conocidos y por t de student se determinaron estos límites, para evaluar estos límites de manera empírica

7.3.6.5. Precisión

Se realizó como mínimo 5 determinaciones de cada estándar para establecer un perfil de repetibilidad y determinar el límite permisible de coeficiente de variación, en una curva de Levy-Jennings.

7.3.6.6. Reproducibilidad

Se escogió como mínimo 4 estándares y por medio de un cuadrado latino se introdujeron 2 fuentes de variación a analizar (personal que monta el ensayo, hora durante el día de trabajo). Se analizó por medio de un ANDEVA de 3 vías.

7.3.6.7. Exactitud

Se realizaron 3 repeticiones de cada estándar de origen comercial. Por medio de una t de student se determinó el rango al cual es exacto el ensayo según los límites permisibles del coeficiente de variación.

7.3.8. Comparación de métodos

Se realizó una colinealidad entre los ensayos producidos localmente (tubos recubiertos, partículas magnéticas carboxiladas), comparándolos con el juego de reactivos de origen comercial, el cual se empleará como método de referencia.

Se realizaron 5 repeticiones de cada estándar contenido dentro del juego de reactivos comercial, para comparar y evaluar cada aspecto analizado estadísticamente con los ensayos producidos localmente.

8. RESULTADOS

Se realizó la marcación de 50 ug de anti hGC monoclonal (5006) con 1mCi de Iodo 125 en campana de flujo laminar, utilizando la técnica óxido-reducción con Cloramina T y metabisulfito de sodio, eluyéndose en columnas empacadas con Sephadex G100.

En el perfil de elución, según se observa en la gráfica 1, presenta 2 picos, siendo el primero (pico A), el correspondiente al anticuerpo monoclonal de hGC marcado con Iodo 125 y el segundo (pico B) el Iodo 125 no acoplado, se recolectaron 4.9mL de anticuerpo hGC marcado con Iodo 125 que corresponde a una actividad específica de 12.18uCi/ug y a un porcentaje de transferencia de Iodo 125 acoplado al anticuerpo de 35.50% .

Se alicuotó el anticuerpo marcado en fracciones, las cuales tienen una actividad aproximada de 20 uCi/mL, para ser almacenados hasta su utilización en tampón fosfato 0.05M con 1% de BSA y 0.4% de manitol a 4°C .

Se evaluó la concentración óptima de anticuerpo monoclonal hGC 5009 acoplado por adsorción a tubos de poliestireno con las siguientes concentraciones (0.5 ug/300uL, 5.0 ug/300uL y 50.0 ug/300uL), 5 veces por triplicado cada repetición. La concentración óptima seleccionada fue 0.5 ug/300uL, por presentar mejor radio (67.80), el cual es obtenido por la relación de las cuentas por minuto del enlace máximo que corresponde al estándar mayor (estándar 400 mUI/mL) entre las cuentas por minuto detectadas en el enlace no específico, estándar 0.

TABLA N°1
Variación de concentraciones de anticuerpo monoclonal
acoplado a tubos recubiertos

	[0.5 ug/300uL]	[5.0 ug/300uL]	[50.0 ug/300uL]
Enlace no específico	73.33 cpm	94.5 cpm	122.3 cpm
Enlace máximo	4972.10 cpm	5005.2 cpm	875.3 cpm
Radio	67.80	52.96	39.86
[hGC acoplada]	0.35 ug/300uL	2.15 ug/300uL	2.23 ug/300uL

1 cpm: cuentas por minuto

Para determinar el tiempo de incubación más adecuado para que el anticuerpo monoclonal(5009) se acople a los tubos de poliestireno se corrieron 5 ensayos por triplicado con tiempos de acoplamiento de 2 y 18 horas, con una concentración 0.5ug/300 uL de anticuerpo monoclonal, observándose que el mejor acoplamiento se obtiene con una incubación de 18 horas (toda la noche), con un radio de 67.80, según se muestra en la siguiente tabla

TABLA N°2
Variación de tiempo de incubación
para el acoplamiento de anticuerpo monoclonal
a tubos recubiertos

	2 horas	18 horas
Enlace máximo	2547.20 cpm	4972.10 cpm
Enlace no específico	44.55 cpm	73.33 cpm
Radio	57.17	67.80
[hGC acoplada]	0.10 ug/300uL	0.35 ug/300uL

Se evaluó 5 veces por triplicado el tiempo de acoplamiento óptimo del anticuerpo monoclonal 5009 en concentración de 50mg/mL a la fase magnética previamente activada.

Los tiempos evaluados fueron 2 y 18 horas rotándose a temperatura ambiente, obteniéndose con 2 horas de incubación un mejor acoplamiento con un radio de 18.84, según se muestra en la siguiente tabla.

TABLA N°3
Variación de tiempo de incubación
para el acoplamiento de anticuerpo monoclonal
a fase magnética carboxilada:

	2 horas	18 horas
Enlace máximo	3030.90 cpm	997.36 cpm
Enlace no específico	160.90 cpm	130.54 cpm
Radio	18.83	7.64
[hGC acoplada]	0.31 ug/uL	0.23 ug/uL

Se evaluó la concentración de fase magnética carboxilada acoplada óptima para el ensayo, para lo cual se evaluó 5 veces por triplicado dicha fase en una concentración de 0.05ug/mL, 0.025 ug/mL y 0.0125 ug/mL con tampón MES, con un tiempo de incubación de 2 horas, obteniéndose mejor radio (18.83) con la concentración de 0.025ug/mL.

TABLA N° 4
Variación de concentración
de fase magnética carboxilada acoplada

	0.05ug/mL	0.025 μ g/mL	0.0125ug/mL
Enlace no específico	198.13 cpm	160.9 cpm	83.46 cpm
Enlace máximo	1424.32 cpm	3030.9 cpm	995.23 cpm
Radio	7.18	18.83	11.92
[hGC acoplada]	0.24 ug/uL	0.31 ug/uL	0.32 ug/uL

8.1. VALIDACION DE LOS ENSAYOS

Se determinó que las condiciones adecuadas para el ensayo que emplea tubos recubiertos como fase sólida son 18 horas de incubación para el acoplamiento del anticuerpo con una concentración de 0.5 ug/300uL. Para el ensayo con fase magnética carboxilada se estableció dichas condiciones como 2 horas de incubación, empleando una concentración 0.025ug/mL de la fase magnética ya acoplada con el anticuerpo.

8.1.1. Especificidad

Para determinar la especificidad de los ensayos se realizaron 15 repeticiones del estándar 0, los resultados se analizaron por medio de una "t de student" comparándolos con los datos obtenidos con el juego de reactivos de origen comercial.

Para el ensayo con tubos recubiertos se obtuvo un valor medio de 72.87 y desviación estándar de 4.00. Con fase magnética el valor medio fue de 160.88 y desviación estándar de 6.25.

Los resultados obtenidos con el juego de reactivos de origen comercial fue un valor medio de 158.0.

Al realizar el análisis con "t de student" para un valor crítico de t 0.05 corresponde a 1.75, teniendo en cuenta que:

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{\sigma/\sqrt{n}} \quad \text{y}$$

Ho: $u > 158$ cuando $t < 0.5$

Los resultados para tubos recubiertos fueron de -1.03 y para la fase magnética de 1.78. Debido a que el ensayo con tubos recubiertos presenta un resultado menor que el valor crítico se acepta, no así el ensayo con fase magnética que presenta un resultado mayor que el valor crítico establecido.

Se determinó el porcentaje de interferencia o reacción cruzada que presentan la hormona folículo estimulante, la hormona luteinizante y la hormona estimulante de la tiroides, las cuales son las hormonas que presentan mayor similitud con la subunidad alfa de la hormona gonadotropina coriónica. Para ello se corrieron estándares de éstas hormonas en altas concentraciones, los cuales fueron previamente analizados y presentaron 0.0mUI/mL de hGC, las concentraciones de estos estándares fueron 50mUI/mL de FSH y 50mUI/mL de LH y 60mUI/mL de TSH en un ensayo de cuantificación de hormona gonadotropina coriónica, de las cuales las dos primeras no presentan interferencias, aunque la hormona estimulante de la tiroides presenta una interferencia de 1.86% ya que presentó un resultado de 1.12mUI/mL de hGC. Se evaluó en concentraciones normales 4.2mUI/mL de TSH y no presentó interferencia.

8.1.2. Linealidad.

La linealidad de las pruebas se determinó por medio de un análisis de ANDEVA. Según la hipótesis:

Ho: Las variables x,y no se relacionan linealmente (modelo $y = a + bx$ no se ajusta a los datos).

Usando para ello 3 repeticiones de la curva de 8 estándares, según se muestra en las siguientes tablas.

TABLA N°5
 Repeticiones de la curva de estándares en el
 Ensayo de Tubos Recubiertos

Estándar (mUI/mL)	1º Repetición (cpm)	2º Repetición (cpm)	3º Repetición (cpm)	Valor promedio (cpm)
0.00	74.0	78.0	68.0	73.3
6.25	109.2	120.4	111.2	113.6
12.50	144.6	139.5	141.6	141.9
25.00	201.4	210.6	189.8	200.6
50.00	544.5	520.1	560.6	541.7
100.00	1001.6	981.4	1032.6	1005.2
200.00	2475.8	2300.1	2494.3	2423.4
400.00	4942.4	5003.2	4970.8	4972.1

El ensayo de tubos recubiertos presenta un coeficiente de determinación de 0.9962 el cual nos da un indicio del comportamiento de correlación lineal positiva que forma la curva de estándares. (Gráfica N° 3)

El valor del intercepto es de 12.40 para una ecuación del rango lineal que corresponde a:

$$y = -46.5 + 12.40 x.$$

Teniendo en cuenta que:

$$H_0: r = 0$$

Debido a que el valor de r para este ensayo es de 0.996, se acepta la linealidad del ensayo.

TABLA N°6
Repeticiones de la curva de estándares en el
ensayo con Fase magnética carboxilada

Estándares (mUI/mL)	1º Repetición (cpm)	2º Repetición (cpm)	3º Repetición (cpm)	Valor promedio (cpm)
0.00	162.1	167.3	153.4	160.9
6.25	281.2	264.7	275.4	273.8
12.50	428.6	417.1	420.2	422.0
25.00	474.2	586.5	499.7	520.1
50.00	901.2	1160.8	1056.5	1039.5
100.00	1465.6	1417.1	1453.2	1445.3
200.00	2502.6	2653.4	2598.6	2584.9
400.00	3057.4	2998.8	3036.4	3030.9

El ensayo con la fase magnética carboxilada presentó un coeficiente de determinación de 0.8921 , que denota la tendencia de una correlación lineal positiva(Grafica N°3) y un intercepto de 7.47, para una ecuación del rango lineal que corresponde a:

$$y = -443.29 + 7.47x.$$

Teniendo en cuenta que:

$$H_0: r=0$$

Se acepta la linealidad del ensayo, por poseer éste un valor de $r = 0.8968$

De acuerdo a los resultados anteriormente expuestos se determinó que ambos ensayos presentan una linealidad directamente proporcional.

8.1.3. Sensibilidad

Tomando en cuenta la regresión lineal aplicada en el inciso anterior se realizó una varianza al valor de la pendiente, obteniéndose los siguientes valores:

$$\text{Considerando que: } S = \frac{\sum (y_i - \bar{y})}{n-1}$$

Para el ensayo con tubos recubiertos tenemos que,

$$S = \frac{(12.37-12.4) + (12.37-12.4) + (12.45-12.4)}{2} = 2.150 \times 10^{-3}$$

Para el ensayo con fase magnética obtenemos la siguiente varianza

$$S = \frac{(7.53-7.47) + (7.37-7.47) + (7.51-7.47)}{2} = -7.6 \times 10^{-3}$$

El ensayo comercial presenta la siguiente varianza:

$$S = \frac{(19.93-20.4) + (19.12-20.4) + (20.22-20.4)}{2} = -1.8917$$

Teniéndose que:

$$H_0: b=1$$

Se acepta nuestra hipótesis para ambos ensayos, ya que el ensayo con tubos recubiertos presenta una varianza de -7.6×10^{-3} y el ensayo con fase magnética carboxilada un valor de varianza de -1.8917 . Por presentar ambos ensayos producidos localmente valores menores de 1 se confirma nuestra hipótesis.

8.1.4. Límites de detección y cuantificación

Se realizaron 5 repeticiones del estándar 0 determinándose que el rango de señal al cual se cuantifica es de 65.4-80.4 cpm en el ensayo para tubos recubiertos y de 149.14-176.41 cpm para el de fase magnética. Empleando para ello el valor de

la media más-menos 2 desviaciones estándar, en cada ensayo. Para determinar la dilución mínima cuantificable se realizaron diluciones del estándar menor (6.25 mUI/mL) determinándose que la mínima concentración cuantificable es de 1.25 mUI/mL en el ensayo de tubos recubiertos y de 1.04 mUI/mL para el ensayo con fase magnética carboxilada.

8.1.5. Precisión

Se realizaron 5 repeticiones de cada estándar para obtener el perfil de repetibilidad.

Se determinó el límite permisible de coeficiente de variación por medio de la ecuación:

$$\text{Coeficiente de variación} = \frac{\text{desviación estándar}}{\text{media}} \times 100$$

Se consideró el valor medio de los coeficientes de variación de dicha curva más, menos 2 desviaciones estándar. Para el ensayo con tubos recubiertos se determinó que este límite es de 5.79%, obteniéndose que todos los estándares poseen un coeficiente de variación menor a 5.79%. En el ensayo con fase magnética carboxilada, se determinó que el límite permisible de coeficiente de variación es de 10.08%, obteniéndose que para este ensayo todos los estándares están dentro de dichos límites.

8.1.6. Reproducibilidad

Para ambos ensayos se escogieron 4 muestras al azar, las cuales fueron analizadas bajo dos condiciones distintas, siendo la primera variación la persona que realizó el ensayo y la segunda la hora a la que se realizó dicho ensayo, obteniéndose los siguientes resultados:



TABLA Nº 7
VARIACION DE PERSONA
ENSAYO CON TUBOS RECUBIERTOS

MUESTRA	VALORES OBTENIDOS POR SUJETO Nº 1 (mUI/mL)	VALORES OBTENIDOS POR SUJETO Nº2 (mUI/mL)	VALORES OBTENIDOS POR SUJETO Nº 3 (mUI/mL)	VALORES OBTENIDOS POR SUJETO Nº4 (mUI/mL)
1	74	80	76	81
2	144.6	150.3	137.2	153.2
3	544.8	571.2	548.6	530.1
4	1001.6	1205.3	1124.1	998.3

TABLA Nº 8
VARIACION DE HORA DE REALIZACION
ENSAYO CON TUBO RECUBIERTO

MUESTRA	VALORES OBTENIDOS 7:00 a.m (mUI/mL)	VALORES OBTENIDOS 10:00 a.m. (mUI/mL)
1	78.0	68.0
2	139.5	141.6
3	520.1	560.6
4	981.4	1032.6

Con el ensayo con fase magnética carboxilada, se obtuvieron los siguientes resultados:

TABLA N° 9
VARIACION DE PERSONA
ENSAYO CON FASE MAGNETICA CARBOXILADA

MUESTRA	VALORES OBTENIDOS SUJETO N°1 (mUI/mL)	VALORES OBTENIDOS SUJETO N°2 (mUI/mL)
1	162.1	130.3
2	428.6	440.4
3	901.2	887.9
4	1465.6	1421.6

TABLA N°10
VARIACION DE HORA DE REALIZACION
ENSAYO CON FASE MAGNETICA CARBOXILADA

MUESTRA	VALORES OBTENIDOS 7:00 a.m. (mUI/mL)	VALORES OBTENIDOS 10:00 a.m. (mUI/mL)
1	167.3	153.4
2	417.1	420.2
3	1160.8	1056.5
4	1417.1	1453.2

Los datos obtenidos se analizaron por medio de una ANDEVA de tres vías, según el cual demostró que no existe diferencia significativa entre los ensayos en ninguno de los dos tipos de fases sólidas.

8.1.7. Exactitud.

Se realizaron 3 repeticiones de cada estándar de origen comercial determinando el valor de porcentaje de recuperación según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de recuperación} = ([] \text{ encontrada} / [] \text{ real}) 100$$

Se determinó el rango de exactitud según los límites permisibles del coeficiente de variación, que en el ensayo con tubos recubiertos es del 5.79% y en el ensayo con fase agnética carboxilada de 10.08%.

Se analizó por medio de una "t de student" el rango al cual es exacto el ensayo.

Teniendo en cuenta que:

$$H_0: \mu (\%r) = 100\%$$

TABLA N°11
EVALUACION DE
PORCENTAJE DE RECUPERACION EN
ENSAYO CON TUBOS RECUBIERTOS

ESTANDAR (mUI/mL)	1° REPETICION (mUI/mL)	2° REPETICION (mUI/mL)	3° REPETICION (mUI/mL)	VALOR PROMEDIO	% DE RECUPERACION
0	0.0	0.0	0.0	0.0	
12.5	13.0	11.5	11.8	12.1	96.8%
25.0	26.4	25.4	24.5	25.4	101.6%
50.0	51.2	48.0	52.0	50.4	100.8%
100	98.6	99.0	99.8	97.4	97.4%
200.0	204.0	203.4	198.7	202.0	101.0%
400.0	401.8	402.3	391.9	398.7	99.8%

TABLA Nº12
EVALUACION DE
PORCENTAJE DE RECUPERACION EN
ENSAYO CON FASE MAGNETICA CARBOXILADA

ESTANDAR (mUI/mL)	1º REPETICION (mUI/mL)	2º REPETICION (mUI/mL)	3º REPETICION (mUI/mL)	VALOR PROMEDIO	% DE RECUPERACION
0	0.0	0.0	0.0	0.0	
12.5	12.3	11.9	12.7	12.3	98.4%
25.0	24.9	25.0	26.0	25.3	101.2%
50.0	46.0	42.3	47.4	45.2	90.4%
100	97.6	103.1	91.2	97.3	97.3%
200.0	198.6	209.1	213.0	206.9	103.4%
400.0	389.6	385.6	395.6	390.3	97.6%

Se obtuvo como resultado que para el ensayo con tubos recubiertos se tiene un porcentaje de recuperación promedio de 99.6% y para el ensayo con la fase magnética carboxilada de 98.05%, considerando que el juego de reactivos tiene un porcentaje de recuperación del 100%.

Al aplicarles "t de student", con un α de 0.05 al que corresponde un valor crítico de 1.94, se obtiene que:

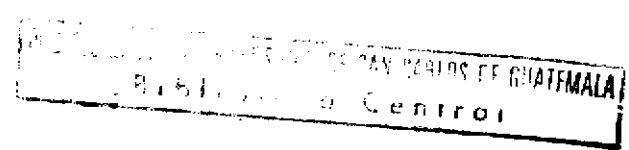
Ensayo con tubos recubiertos:

$$t \text{ de student} = \frac{99.6 - 100}{2 - \sqrt{6}} = 0.889,$$

Ensayo con fase magnética carboxilada:

$$t \text{ de student} = \frac{98.05 - 100}{4.43 - \sqrt{6}} = -0.984$$

Por lo que se acepta la exactitud de ambos ensayos.



8.1.8. Comparación de métodos

Para evaluar el ensayo la relación que existe entre los ensayos elaborados localmente, con el juego de reactivos de origen comercial se realizó una colinealidad (ver gráfica N°4), en la que se demuestra que ambos ensayos producidos localmente poseen una linealidad directamente proporcional y una tendencia similar.

Se realizaron 5 repeticiones de cada estándar del juego de reactivos de origen comercial para determinar la regresión lineal que presenta el ensayo, para compararlo con los ensayos producidos localmente ya que fue empleado como método de referencia.

TABLA N°13
REPETICIONES
REACTIVOS DE ORIGEN COMERCIAL

Estándar (mUI/mL)	1º REPETICION	2º REPETICION	3º REPETICION	4º REPETICION	5º REPETICION	VALOR MEDIO
0.0	158.8	160.3	130.4	149.6	171.6	154.14
12.5	573.8	568.4	563.6	570.6	600.3	575.34
25.0	931.4	942.6	920.6	940.8	989.6	945.0
50.0	1681.4	1438.3	1430.4	1679.6	1721.4	1590.22
100.0	2431.4	2022.8	2225.6	2440.0	2560.3	2336.02
200.0	4688.1	3995.6	4951.6	4700.6	4801.4	4627.46
400.0	8232.0	8024.2	8466.4	8546.4	8901.6	8434.14

Con una regresión lineal:

$$y = 393.38 + 20.66x$$

$$r = 0.999$$

Al realizar los análisis estadísticos anteriores de especificidad, linealidad, sensibilidad, límite de detección y cuantificación, precisión, reproducibilidad y exactitud se determinó una comparación simultánea con el juego de reactivos de origen comercial para establecer la validez de los anteriores parámetros.

9. DISCUSION DE RESULTADOS

La marcación de la hormona con Iodo 125 se realizó por medio de reacciones de óxido reducción con cloramina T y metabisulfito de sodio, lo que permite la incorporación del Iodo radioactivo a la molécula, pero que a la vez pueden dañar la estructura de la misma (14), lo cual pudo influir en obtener un porcentaje de transferencia relativamente bajo (35.50%), comparado con los valores que se observan en la literatura(14). Aun así se observa una adecuada actividad específica (12.18 uCi/ug). La elución se realizó usando como columnas pipetas serológicas de 10 mL con Sepadhex G100, cuya longitud y tamaño de poro permitió una buena separación entre los picos del eluido, que según se observa en la gráfica 1 diferencia claramente el pico que corresponde al anticuerpo anti hGC marcado con Iodo-125 y el pico del Iodo 125 que no fue incorporado a la molécula del anticuerpo anti hGC.

Para optimizar los ensayos se evaluaron distintas concentraciones del anticuerpo acoplado a las dos fases sólidas en estudio, así como también el tiempo de incubación necesario para ello. En el ensayo con tubos recubiertos se obtuvieron los mejores resultados con una concentración de 0.5 ug/300uL, en comparación con las otras concentraciones (5.0 ug/300uL y 50.0 ug/300uL) en las cuales se observa un radio menor, ya sea por un efecto de prozona, un enlace no específico elevado, debido a la presencia de otras proteínas que pueden interferir con el ensayo. Así mismo se eligió un tiempo de incubación durante el acoplamiento de 18 horas, el cual presenta un radio mayor, esto es una relación estándar mayor/estándar cero más alta, lo que señala una mejor diferenciación de valores entre la curva de estándares.

Para el ensayo con fase magnética carboxilada se empleó 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDAC), en lugar de carbonilimidazol (CDI), como sugiere la literatura (16), presentando dicho reactivo mejor unión, esto pudo ser debido a la labilidad de la estructura del CDI o a la estructura de la molécula, el EDAC introduce su grupo etil al óxido ferroso por medio de un enlace covalente, el grupo imidazol reacciona con el grupo amino de péptido del anticuerpo para producir

N-alcalinocarbamato derivado de la inmovilización del anticuerpo, el cual está en capacidad de capturar a su respectivo antígeno(16).

Para homogenizar las partículas de fase magnética carboxilada se recomienda ultrasonificación, pero debido a que se carece de dicho equipo se agitó manualmente durante 10 minutos, presentando el inconveniente que no se asegura una correcta homogenización de la solución y es necesario la agitación frecuente para evitar deposición del óxido ferroso.

La concentración óptima elegida fue 0.025mg/mL con 2 horas de incubación a temperatura ambiente en rotación, ya que, como en el caso anterior presentó el mejor radio, en comparación con las otras concentraciones y tiempos de incubación lo que se puede deber a los efectos ya citados.

La especificidad que presentan ambos ensayos es adecuada comparada con la especificidad que presenta el juego de reactivos de origen comercial, no se observó interferencia de la hormona folículo estimulante, ni de la hormona luteinizante las cuales poseen una estructura similar en su cadena alfa a la de la hormona gonadotropina coriónica. Sin embargo la hormona estimulante de la tiroides presenta una interferencia de 1.86% en concentraciones elevadas (60 mUI/mL), lo cual no influye en manera significativa en población normal, pero debe considerarse en las determinaciones de hGC realizadas a pacientes hipotiroideos. El uso de anticuerpos monoclonales favorece ese factor pero se debe tener especial cuidado en considerar la pareja de anticuerpos monoclonales que se usará para este tipo de ensayo, ya que se debe considerar que ambos no estén dirigidos contra un mismo epítotope de la molécula o que se determine únicamente determinada región de la molécula con lo que no se estaría midiendo la hormona gonadotropina coriónica total sino sólo alguna de las fracciones.

Ambos ensayos poseen una adecuada linealidad, aunque el ensayo con tubos recubiertos presentó un valor r de 0.996, en comparación con el valor de 0.8968 para el ensayo con fase magnética carboxilada. Siendo ambas directamente

proporcionales, como es de esperar en ensayos inmunorradiométricos.

La sensibilidad es un factor importante, principalmente cuando se emplea el ensayo como marcador tumoral, ya que de acuerdo al rango normal permitirá detectar tempranamente el aparecimiento de neoplasias, con pequeñas elevaciones de la hormona, o monitorear adecuadamente el tratamiento de alguna de estas neoplasias y evitar recidivas en el paciente(10). La sensibilidad que poseen ambos ensayos es adecuada, lo que se denota según las pruebas estadísticas, sin embargo el ensayo con tubos recubiertos posee una mejor sensibilidad, comparado con el ensayo con tubos recubiertos.

Para la determinación de los límites de detección y cuantificación se realizaron 5 diluciones del estándar menor 6.25mUI/mL para cada ensayo, los ensayos inmunorradiométricos poseen la característica de detectar bajas concentraciones de un analito, lo cual se comprueba al encontrar en ambos ensayos un límite detectable de cuantificación bastante aceptable, de 1.25 mUI/mL para el ensayo con tubos recubiertos y de 1.04 mUI/mL en el ensayo con fase magnética carboxilada, lo cual es importante en la aplicación diagnóstica de la cuantificación de esta hormona como marcador tumoral, así como en el reconocimiento precoz de recidiva tumoral. Considerándose como valor normal de la concentración de la hormona gonadotropina coriónica en pacientes sanos sin embarazo, o en hombres normales de 0 - 5 mUI/mL.

La precisión de la prueba fue determinada por la aplicación de una curva de Levy Jennings, estableciéndose que ambos ensayos poseen una precisión adecuada, que no sobrepasa los límites dados por las dos desviaciones estándar, para cada concentración de calibrador. Con el ensayo con fase magnética carboxilada se debe tener especial consideración en la manera de homogenizar el óxido ferroso, para impedir que se sedimente, lo que influye directamente sobre la precisión en el ensayo, principalmente cuando se deben analizar varias muestras en una corrida, es recomendable agitar constantemente para evitar su precipitación y colocar controles de calidad intercalados entre las muestras durante la realización de un ensayo para

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
1981

evaluar dicha homogenización del óxido ferroso.

Para analizar la reproducibilidad del ensayo se usaron 4 estándares comerciales los cuales fueron evaluados como muestras. Cada ensayo fue realizado por dos personas, capacitadas en la realización de ensayos innumorradiométricos, con el fin de analizar si existe alguna variación significativa por la persona que realice la prueba, así también se realizaron los ensayos en dos horas distintas (8:00 a.m. y 10:00 a.m.), por estas personas evaluando así si factores externos a los ensayos inciden sobre la reproducibilidad de los mismos determinándose que no existe diferencia significativa en estos factores en ninguno de los dos ensayos evaluados.

Considerando que la exactitud de un ensayo nos indica cuán veraces son nuestros resultados, esto es si reflejan la concentración real del analito que estamos analizando se evaluaron como muestras los estándares del juego de reactivos comercial y se obtuvo el porcentaje de recuperación.

Para ambos ensayos se obtuvo que el rango de exactitud es similar al del ensayo de origen comercial, ya que son exactos hasta una concentración de 400mUI/mL, el cual es el estándar mayor de estos juegos de reactivos, en rangos superiores al de esta concentración es aconsejable efectuar diluciones debido a que en este tipo de ensayo a altas concentraciones se da el efecto Hooke, el cual es una desviación de la linealidad de la pendiente a altas concentraciones del analito que impide que arriba del límite máximo de cuantificación se puedan cuantificar la concentración exacta de las muestras(16).

El ensayo con fase magnética carboxilada presenta el inconveniente que posee una inadecuada especificidad por lo que se descarta su empleo en la determinación de la hormona gonadotropina coriónica, ya que puede presentar valores falsamente positivos e inferir en el mal diagnóstico y tratamiento de los pacientes a bajas concentraciones.

Al evaluar la colinealidad de los ensayos se observó que ambos (ensayo con tubos recubiertos y ensayo con fase magnética carboxilada) poseen una linealidad

directamente proporcional, sin embargo el ensayo con fase magnética carboxilada en altas concentraciones (400 mUI/mL), presenta tendencias a una relación plana, lo cual se pueda deber al efecto Hooke, en el cual a altas concentraciones del analito ya no se guarda una relación directamente proporcional.

El ensayo con tubos recubiertos presenta una linealidad similar a la del ensayo comercial.

La validación de cada aspecto se realizó simultáneamente con la comparación entre métodos para analizar simultáneamente el ensayo que comparado con el juego de reactivos de origen comercial cumple mejor los aspectos de especificidad, linealidad, sensibilidad, límites de detección y cuantificación, precisión, reproducibilidad exactitud.

Según lo anteriormente evaluado se demuestra que se puede emplear el ensayo con tubos recubiertos producido localmente en laboratorio de Radioinmunoanálisis del Hospital General San Juan de Dios para la determinación y cuantificación de la hormona gonadotropina coriónica, tomando en cuenta siempre que se debe evaluar adecuadamente cada lote de tubos que se emplean ya que cada lote puede dar diferentes capacidades de adsorción y almacenar adecuadamente estos evitando humedad y variaciones de temperatura que afecten la estructura del anticuerpo acoplado.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 La técnica de marcación por óxido-reducción, empleando Cloramina T y metabisulfito de sodio, de los anticuerpos monoclonales anti-hGC es adecuada y no daña la estructura del anticuerpo.
- 10.2 La técnica de acoplamiento del anticuerpo monoclonal a tubos de poliestireno es adecuada para la cuantificación de la hormona gonadotropina coriónica.
- 10.3 La concentración óptima de la hormona gonadotropina coriónica total a acoplar a los tubos de poliestireno es de 0.5 ug/300uL, con un tiempo de incubación durante el acoplamiento de 18 horas rotando a temperatura ambiente.
- 10.4. El ensayo con tubos recubiertos posee una adecuada especificidad, linealidad, sensibilidad, precisión, reproducibilidad, exactitud además de poseer óptimos límites de detección y cuantificación.
- 10.5 El ensayo producido localmente que emplea fase magnética carboxilada presenta una inadecuada especificidad por lo que se descarta su uso para la cuantificación de hormona gonadotropina coriónica.
- 10.6 El ensayo con tubos recubiertos es validado al compararlo con el ensayo de origen comercial, por lo que se acepta su uso en la cuantificación de la hormona gonadotropina coriónica.
- 10.7 El ensayo con tubos recubiertos es adecuado además por presentar un costo menor que el ensayo de origen comercial.

11. RECOMENDACIONES

Se recomienda determinar la vida media de los lotes de tubos de poliestireno acoplados con hormona gonadotropina coriónica para establecer su fecha de caducidad.

Recomiendo evaluar la posibilidad de sustituir el uso de anticuerpos monoclonales de origen comercial por anticuerpos policlonales producidos en conejos a nivel local para ser acoplados a fases sólidas en la elaboración de juegos de reactivos.

Considero recomendable diseñar y validar reactivos a nivel local para la cuantificación de otras hormonas y con ello disminuir los costos de las pruebas

12.REFERENCIAS

1. Verloes, A. et al. A prenatal trisomy 21 screening program using α -fetoprotein human chorionic gonadotropin, and free estriol assays on maternal dried blood. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172:167-174.
2. O'Connor, J. et al. Recent Advances in the Chemistry and Immunochemistry of Human Chorionic Gonadotropin: Impact on Clinical Measurements. *Endoc Reviews* 1994; 15:650-677.
3. Kralem, Z. Human chorionic gonadotropin stimulates thyroid hormone secretion, iodide uptake, organification, and adenosine 3',5'-monophosphate formation in cultured human thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:595-599.
4. Braunstein, G. et al. Serum human chorionic gonadotropin level throughout pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1976; 126:678-681.
5. Madersbacher, S. et al. Free α -Subunit, Free β -Subunit of Human Chorionic Gonadotropin (hGC), and Intact hGC in Sera of Healthy Individuals and Testicular Cancer Patients. *Clin, Chem.* 1992; 38:370-376.
6. Berger, P. et al. Variants of Human Chorionic Gonadotropin from Pregnant women and Tumor Patients recognized by Monoclonal Antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77:347-351.
7. Bidart, Jean, Dominique Bellet. Human Chorionic Gonadotropin Molecular Forms, Detection, and Clinical Implications. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 4:285-290.

8. Matsui, T. et al. Structural Analysis of N-linked Oligosaccharides of Equine Chorionic Gonadotropin and Lutropin β -Subunits. *Biochemistry* 1994; 33:14039-14048.
9. Blithe, D. et al. β -Core Chemical and Clinical Properties. *TEM* 1990; 2:394-398.
10. Bernard, J. et al. Diagnóstico y Tratamientos Clínicos por el laboratorio. 9a. Edición. Salvat. España, 1993. 1507pp (489-496).
11. Stites, D. et al. Inmunología Básica y clínica. 7a. edición. Ed. El Manual Moderno. México, 1991. pp 258-260.
12. Díaz Cueto, L. et al. Amplitude Regulation of Episodic Release, in Vitro Biological to Immunological Ratio, and Median Charge of Human Chorionic Gonadotropin in Pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78:890-897.
13. Cole, Laurence y Andrew Kardana. Discordant Results in Human Chorionic Gonadotropin Assays. *Clin Chem.* 1992; 38:263-270.
14. Akar, A. et al. A Radioimmunoassay for the Core Fragment of the Human Chorionic Gonadotropin subunit. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988; 66:538-545),
15. Cole, L. et al. Occurrence and properties of glycoprotein hormone free subunits. CRC Press. New York, 1988. 230-233.

16. Chapman. R.S. In-vitro nuclear medicine techniques; monoclonal antibodies, receptor assays, PCR and DNA probes. International Atomic Energy Agency. Thailand, 1995. pp 56.
17. Klee, George. Serum hGC assays: wide across-method differences. Col Am Path. 1994; 3:11-13.
18. Jones, H. y Jones, G. Tratado de Ginecología de Novak. 10a. ed. Interamericana. México, 1990. pp323-340.
19. Donhowe, J. Chorionic Gonadotropin testing in early pregnancy. Endoc Res Com. 1995; 9:24-25.
20. Odell, W. et al. Chorionic Gonadotropin Secretion in Normal, Nonpregnant Humans. TEM. 1990; 6:418-421.
21. Toth, P. et al. Expression of Functional Human Chorionic Gonadotropin/Human Luteinizing Hormone Receptor Gene in Human Uterine Arteries. J Clin Endocrinol Metab. 1994; 79:307-315.
22. Dávila, J. et al. Valor predictivo de la HGC en el diagnóstico precoz del embarazo ectópico. Estudio prospectivo. Rev. Obst. Gin. 1991; 51(3):171-174.
23. Cole, L. Andrew Kardana. Urine hGC β -subunit core Fragment, a Sensitive Test for Ectopic Pregnancy. J Clin Endocrinol Metab. 1994; 78: 497-500.

24. Oyarzún, Enrique, Alejandro Serani. Aborto precoz: ¿Error de la naturaleza o falta de espíritu crítico? *Rev Med. Chile.* 1994; 122:454-458.
25. Eta, E. et al. Direct Regulation of Human Myometrial Contractions by Human Chorionic Gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 79:1582-1586.
26. Zuo, J. et al. Human Myometrial Chorionic Gonadotropin/Luteinizing Hormone Receptors in Preterm and Term Deliveries. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 79:907-911.
27. Matzusaki, N. et al. Soluble Interleukin-6 (IL-6) Receptor in the Sera of Pregnant Women Forms a Complex with IL-6 and Augments Human Chorionic Gonadotropin Production by Normal Trophoblast through Binding to the IL-6 Signal Transducer. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80: 2912-2917.
28. Nishimori, K. et al. Expression of Luteinizing Hormone and Chorionic Gonadotropin Receptor Messenger Ribonucleic Acid in Human Corpora Lutea during Menstrual Cycle and Pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80:1444-1448.
29. Lei, Z. et al. Novel Coexpression of Human Chorionic Gonadotropin (hGC)/Human Luteinizing Hormone Receptors and Their Ligand hGC in Human Fallopian Tubes. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; 77:863-872.
30. Neulen, J. et al. Human Chorionic Gonadotropin-Dependent Expression of Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor in Human Granulosa Cells: Importance in Ovarian Hyperstimulation Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80:1967-1971.

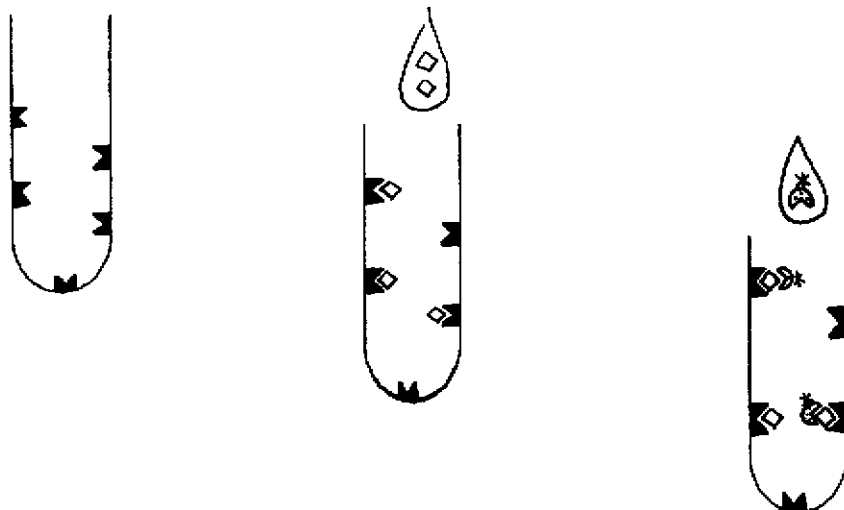
31. Thyrotropic Activity of Basic Isoelectric Forms of Human Chorionic Gonadotropin Extracted from Hydatidiform Mole Tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 78:862-866.
32. Human Chorionic Gonadotropin β -Subunit Nicking Enzymes in Pregnancy and Cancer Patient Serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 79:761-767.
33. Toth, P. et al. Administration of human chorionic gonadotropin affects sleep-wake phases and other associated behaviors in cycling female rats. *Brain Res.* 1994; 654:181-190.
34. Madersbache, S. et al. Free α -Subunit, free β -subunit of Human Chorionic Gonadotropin (hGC), and intact hGC in Sera of Healthy Individuals and Testicular Cancer Patients. *Clin Chem.* 1992;38(3):370-376.
35. Rieu, Max, et al. Testicular Steroidogenesis in Adult Men with Human Chorionic Gonadotropin-Producing Tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80:2404-2409.
36. Morinaga, S. et al. Human Chorionic Gonadotropin and Alpha-Fetoprotein in Testicular Germ Cell Tumors. *Cancer.* 1983; 52(1):1281-1289.
37. Gill, P. et al. The effects of preparations of human chorionic gonadotropin on AIDS-related Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med.* 1996;335:1261-1269.
38. Loomans, E. et al. Assessment of the functional affinity constant of monoclonal antibodies using an improved enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods.* 1995; 184:207-217.

REPUBLIC OF GUATEMALA

39. Kardana, A y L. Cole. Plypeptide Nicks Cause Erroneous Results in Assays of Human Chorionic Gonadotropin Free β -Subunit. Clin Chem. 1992;38(1):26-33.
40. Cole, L. et al. The Deactivation of hGC by Nicking and Dissociation. J Clin Endocrinol Metab. 1993; 76:704.710.
41. Dual analyte assay based on particle types of different size measured by flow cytometry. J Immunol Methods. 1995; 178:141-151.
42. Vandrieken, L y R. De Hertogh. Rapid, Automated Quantification of Total Human Chorionic Gonadotropin in Serum by a Chemiluminescent Enzyme Immunometric Assay. Clin Chem. 1995;41(1)36-40.
43. Chapman. R.S. et al. Application of 1,1'-carbonyldiimidazole as a rapid, practical method for the production of solid-phase immunoassay reagents. International Atomic Energy Agency. Thailand, 1995. Pp56.

13. ANEXOS

ESQUEMATIZACION DE ENSAYO INMUNORRADIOMETRICO



Anticuerpo unido a fase sólida



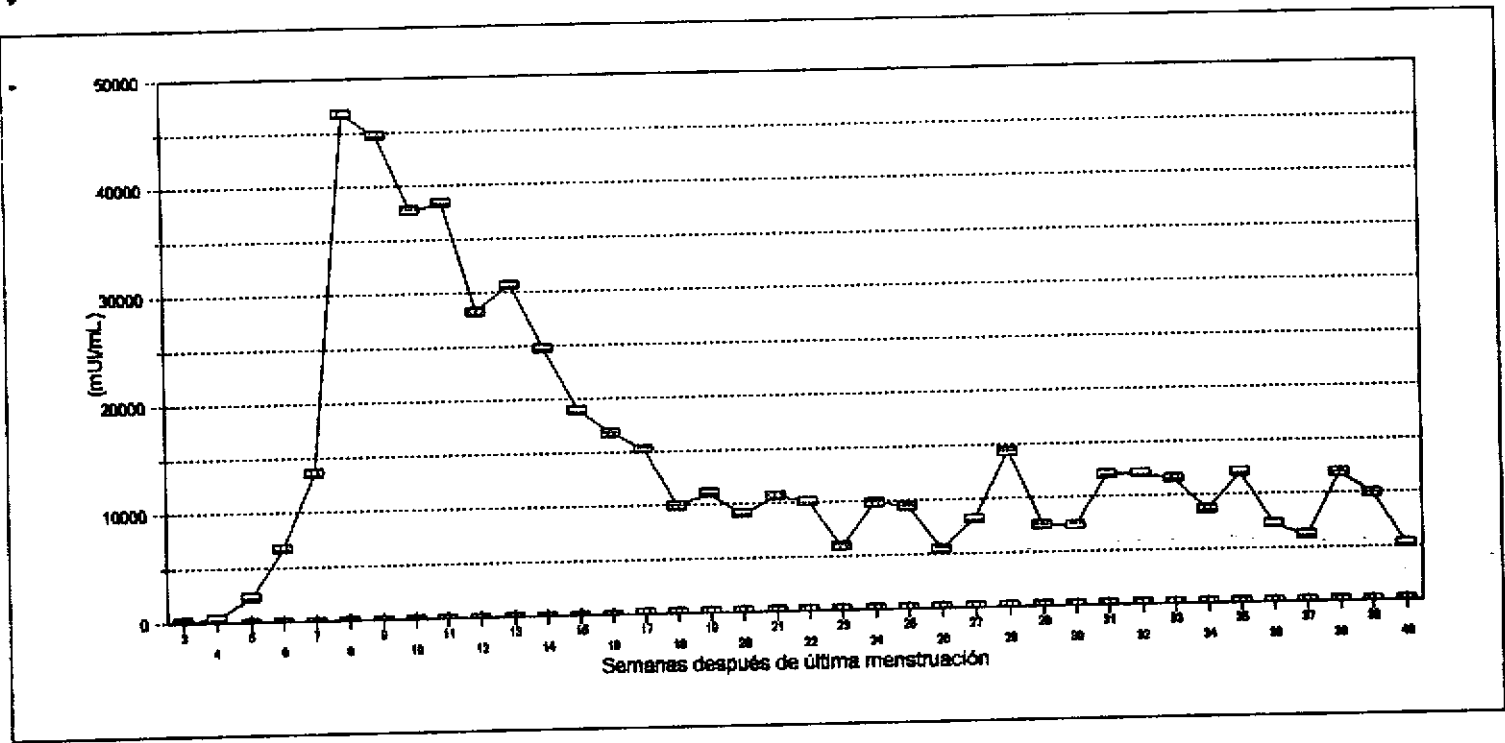
Hormona



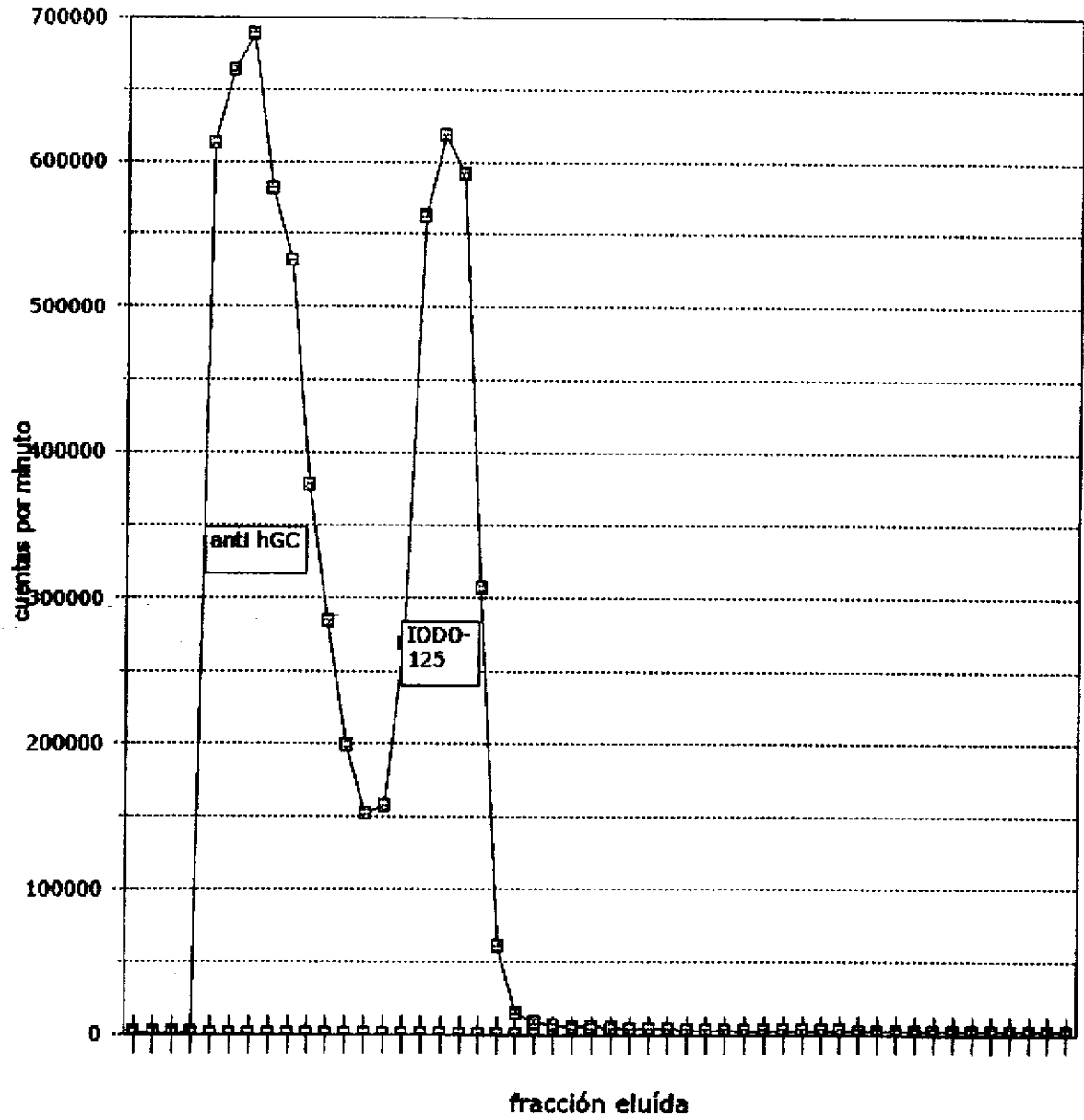
Anticuerpo marcado con radiosótomo



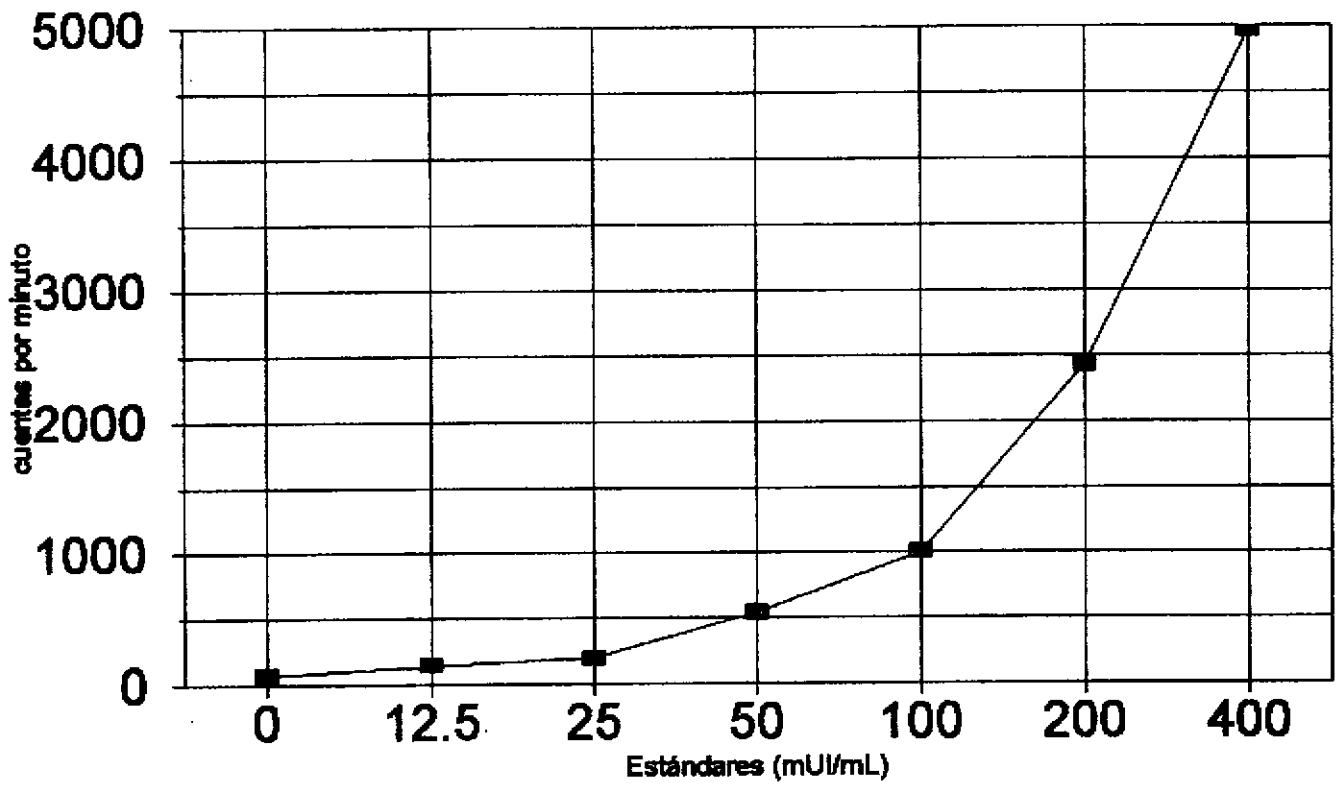
NIVELES SERICOS DE hGC DURANTE EMBARAZO NORMAL



GRAFICA Nº1
MARCACION DE ANTICUERPO ANTI hGC
CON IODO 125

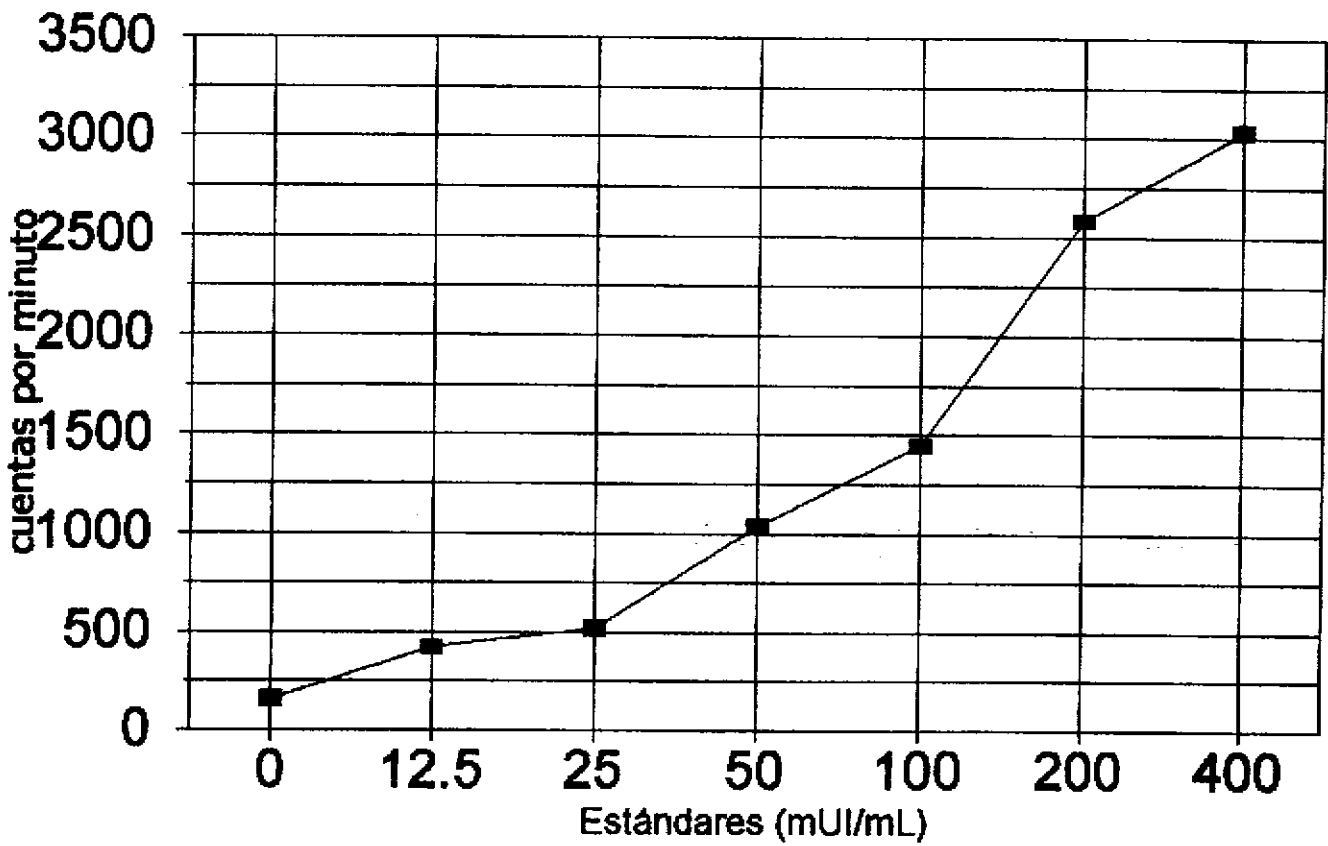


GRAFICA N°2
ENSAYO CON TUBOS RECUBIERTOS

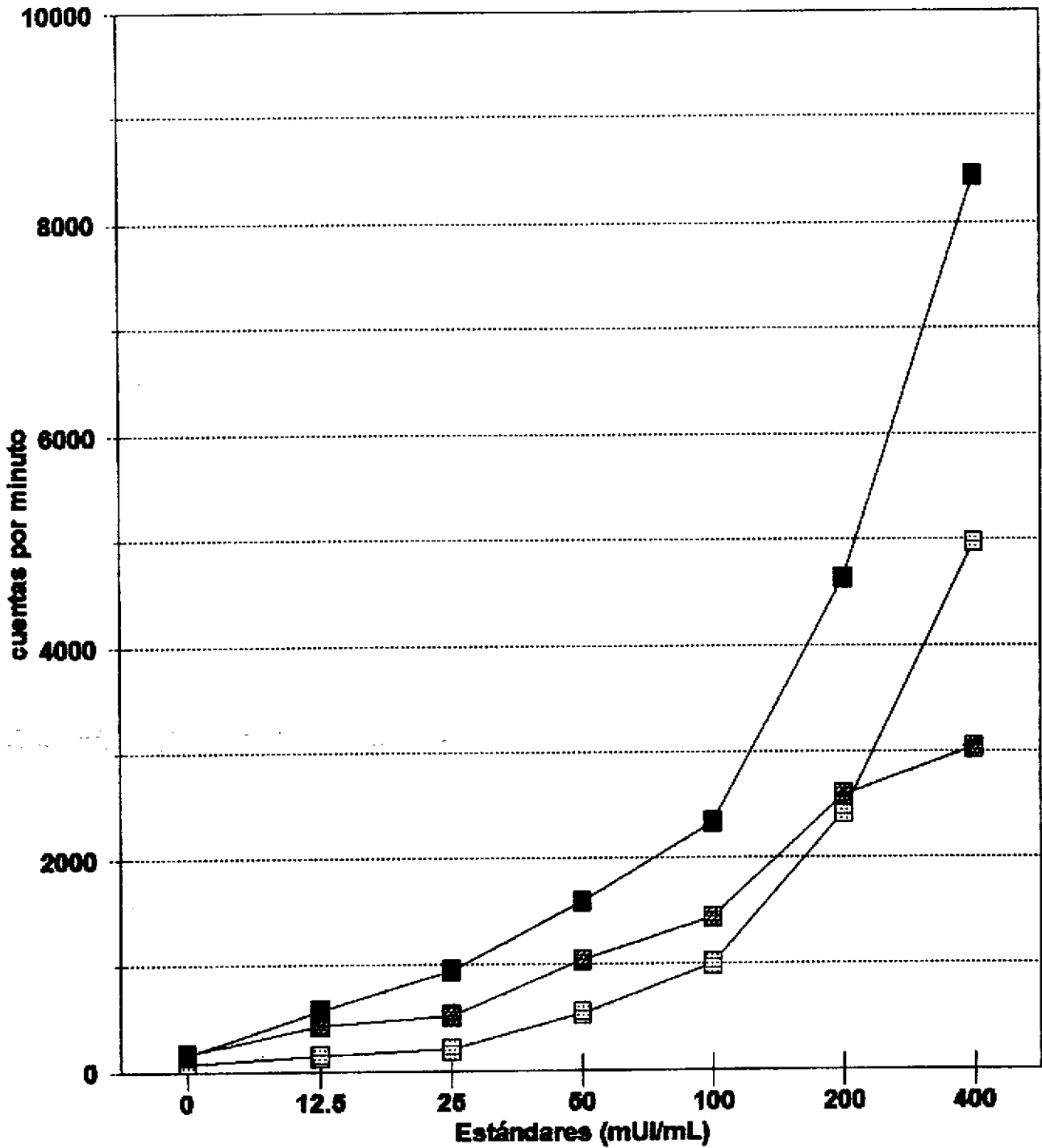


RECEIVED
LABORATORY
FEB 21 1971

GRAFICA N°3
ENSAYO CON FASE MAGNETICA CARBOXILADA



COLINEALIDAD DE ENSAYOS CUANTIFICACION DE hGC



- ENSAYO CON TUBOS RECUBIERTOS
- ▣ ENSAYOS CON FASE MAGNETICA
- ENSAYO CON JUEGO DE REACTIVOS DE ORIGEN COMERCIAL

Karla Lange Cruz

Karla Josefina Lange Cruz

Mayra Lizeth Barrondo Lima de Sánchez

Licda. Mayra Lizeth Barrondo Lima de Sánchez

ASESORA

Heidi Elke Logemann Lima

Licda. Heidi Elke Logemann Lima

DIRECTORA

Hada Marieta Alvarado Beteta

Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta

DECANA