

Determinación de testosterona en suero por radioinmunoanálisis sin extracción previa

E. Ortega, E. Ruiz, B. Neira y C. Osorio

Departamento de Fisiología y Bioquímica
Facultad de Medicina
Granada

(Recibido el 8 de marzo de 1977)

E. ORTEGA, E. RUIZ, B. NEIRA and C. OSORIO. *Determination of Testosterone in Human Serum by Radiochemical Assay without Previous Extraction*. Rev. esp. Fisiol., 33, 283-286. 1977.

A modification to the radiochemical assay method to measure testosterone in serum, that renders unnecessary the extraction of testosterone from a serum sample is described. The serum is heated at 60° C for 1 hour, thereby testosterone binding proteins are destroyed, then radioimmunoassay follows as usual.

Recientemente se han desarrollado diferentes métodos para medir niveles de testosterona en plasma: los que utilizan la doble dilución isotópica (1, 10, 27), los que usan cromatografía gaseosa con detección de captura electrónica (2, 16, 32) y, sobre todo, los de competición en la unión a proteínas (11, 15, 21, 25) y de radioinmunoanálisis (3, 4, 8, 12, 13, 19, 30, 31) que son suficientemente precisos como para utilizarlos en la rutina clínica. Todos ellos tienen un inconveniente común, la necesidad de extraer la testosterona del suero problema.

En este trabajo se presenta una modificación a la técnica de radioinmunoanálisis en que no es necesaria la extracción de la testosterona del suero problema.

Material y métodos

Recogida de sangre. En condiciones basales se extraen 5 ml de sangre. Des-

pués de coagular a temperatura ambiente se obtiene por centrifugación el suero, que se guarda congelado hasta el momento de analizarlo.

Desnaturalización de las proteínas que unen testosterona. 0,25 ml de suero de hombre o 0,1 ml de suero de mujer se añaden a tubos de ensayo conteniendo, respectivamente, 0,3 ó 0,2 ml de tampón fosfato (0,04 M, ph 7,4). Se tapan los tubos, se agitan e introducen en estufa a 60° C durante un hora. Pasado este tiempo, se enfrían y empieza el radioinmunoanálisis.

Determinación de testosterona. Se realiza siguiendo fundamentalmente las técnicas de FURUYAMA *et al.* (9) y DUEAU *et al.* (5). A todos los tubos se les añade 0,1 ml de solución acuosa del antisuero (0,012 g/ml) y 0,1 ml de una solución de H³-testosterona en tampón fosfato 0,04 M,

pH 7,4 (0,035 $\mu\text{Ci/ml}$). Se agitan e incuban los tubos a 37° C durante 30 minutos y, posteriormente, a 4° C durante una hora.

Después de la incubación, a cada tubo se le añade 0,5 ml de una suspensión de carbón-dextrano en tampón fosfato (0,13 g/60 ml) y se dejan a 0° C (en baño agua-hielo) durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugan a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4° C. Del sobrenadante se extraen 0,5 ml que se mezclan con 10 ml de líquido de centelleo (5 g de PPO, 100 gramos de naftaleno, 100 ml de toluol y 1.000 ml de dioxano) y los viales se cuentan en un contador de centelleo líquido.

Las cifras de testosterona de los problemas se calculan por interpolación en una curva patrón. Para el suero de hombre los valores obtenidos por lectura en la curva se multiplican por 4 para expresarlo en ng/ml.

Curva patrón. A tubos de ensayo conteniendo 0,2 ml de tampón fosfato se añaden 0,1 ml de soluciones de testosterona en tampón fosfato de concentraciones 4, 2, 1, 0,5, 0,25 y 0,125 ng/ml y se sigue el mismo procedimiento que para los problemas.

Reactivos. Testosterona en etanol (0,4 $\mu\text{g/ml}$); estradiol en etanol (0,4 $\mu\text{g/ml}$); cortisol en etanol (16 $\mu\text{g/ml}$); $^{3\text{H}}$ -Testosterona en etanol (0,35 $\mu\text{Ci}/0,5 \text{ ml}$); tampón fosfato 0,04 M, pH 7,4 con 0,1 % de BSA; antisuero antitestosterona, carbón-dextrano (Cea-Ire Sorin), y dihidrosterona; androstendiol; dehidroepiandrosterona; PPO, naftaleno, toluol y dioxano (Merck).

Resultados

La dosis mínima de hormona medida que es posible diferenciar de cero nos define la sensibilidad del método. Según el criterio de EKINS, ésta ha sido obtenida proyectando sobre una curva patrón

el error del punto cero (7). El límite de sensibilidad encontrado al 95 % de confianza es de 0,22 ng.

La reproductibilidad o precisión en la medida de los sueros problema ha sido estudiada bajo dos aspectos: precisión en el ensayo, obtenida al analizar cinco veces un mismo suero, en una misma experiencia, y precisión entre ensayos, en que se comparan las medidas de cinco sueros en cinco experiencias. El coeficiente de variación (CV) de los sueros en un mismo ensayo es 9,8 % para hombres y 7,1 % para mujeres y el coeficiente de variación entre ensayos es para suero de hombres del 12 % y para suero de mujeres del 15 por ciento.

Cantidades crecientes de testosterona: 0,25, 0,5, 1 y 2 ng/ml fueron añadidas a sueros de hombres, mujeres y niños, respectivamente, para estudiar la recuperabilidad. En el suero de hombres es de $74 \pm 0,1 \%$, para suero de mujeres $86,5 \%$ y para suero de niños $72 \pm 0,1 \%$.

La especificidad del antisuero se ha comprobado midiendo la capacidad de desplazar la testosterona marcada del antisuero por diferentes esteroides: dihidrotestosterona, androstendiol, dihidroepian-

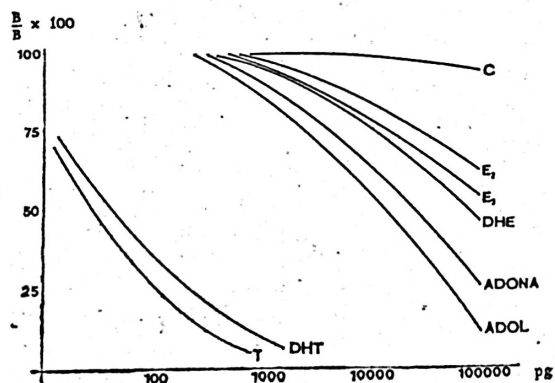


Fig. 1. Reacciones cruzadas del antisuero antitestosterona con otros esteroides.

T = Testosterona, DHT = Dihidrotestosterona, ADOL = Androstendiol, ADONA = Androstendiona, DHE = Dihidroepiandrosterona, E₁ = Estridol, E₂ = Estradiol, C = Cortisol.

drosterona, estradiol, estriol y cortisol (figura 1). Se observa que la dihidrotestosterona es el único esteroide capaz de desplazar la testosterona marcada; los demás esteroides estudiados sólo la desplazan a concentraciones mucho más elevadas que las existentes en el suero.

Discusión

La mayor parte de la testosterona circulante por el plasma se encuentra unida a proteínas: albúmina (6, 28), transcortina y, sobre todo, SHBG (22, 26). Aunque parece que la testosterona activa es la libre (18, 23) es difícil medir sólo ésta, por ser reversible la unión proteína-testosterona. Por eso, los métodos de radioinmunoanálisis, miden la testosterona total, rompiendo el complejo proteína-testosterona antes de realizar el análisis. El procedimiento seguido es extraer la testosterona con disolventes orgánicos, con lo que se rompe el complejo y, a la vez, se eliminan algunas sustancias que interfieren el radioinmunoanálisis.

Los métodos que utilizan la extracción como paso previo presentan los inconvenientes de ser poco precisos, inespecíficos y laboriosos, por lo que no son útiles en la rutina diaria.

Una manera de medir la testosterona total es desnaturalizar las proteínas que la unen calentando el suero problema a 60° C. Este procedimiento es rápido, ba-

rato, eficaz y no añade al suero agentes extraños que puedan desnaturalizar el antisuero usado en el radioinmunoanálisis.

Al calentar a 60° C no sólo queda libre la testosterona, sino también los demás esteroides que circulan unidos a proteínas y que podrían interferir en el método; sin embargo, el antisuero usado es suficientemente específico (fig. 1) y da una reacción apreciable sólo con la dihidrotestosterona, por lo que se cree que no hay interferencia en el estudio de la función androgénica.

Como se muestra en la tabla I los datos de sensibilidad y precisión son más satisfactorios usando el calentamiento en lugar de la extracción previa con éter. Respecto a la recuperabilidad, ha sido imposible conseguir un coeficiente de correlación significativo con el método de extracción.

Los valores de sensibilidad, precisión y recuperabilidad del método descrito son muy parecidos a los obtenidos por otros autores (14, 17, 20, 24, 29) que usan extracción previa a radioinmunoensayo.

En conclusión, se trata de un método exacto, fácil y rápido para determinar testosterona en suero y que se debe usar como técnica de rutina.

Resumen

Se describe una modificación al análisis radioquímico para medir testosterona en suero, que hace innecesaria su extracción del suero

Tabla I. Comparación de los métodos de calentamiento y extracción para medir valores de testosterona en suero.

La recuperabilidad en el método de extracción no se anota en la tabla por no haberse conseguido un coeficiente de correlación significativo.

Técnica	Calentamiento			Extracción	
Suero	Hombre	Mujer	Niño	Hombre	Mujer
Precisión dentro del ensayo (%)	9,8	7,1	—	12	17
Precisión entre ensayos (%)	12	15	—	13	18
Recuperabilidad (%)	74±0,1	80±5	70±0,1	—	—
Cifras normales * (ng/ml)	4,3-5,5	0,34-0.62	—	3,1-5,7	0,22-0,32

* Se da un intervalo para los valores medios de testosterona en sangre con un nivel de confianza del 95 %.

problema. El suero se calienta a 60° C durante una hora para destruir las proteínas que unen testosterona y el análisis se continúa como es usual en los métodos de radioinmunoensayo.

Bibliografía

1. BARDIN, C. W. y LIPSETT, M. M.: *Steroids*, 9, 71-76, 1967.
2. BROWNE, A. C., VANDER-MOLEU, H. J., NISHIZANA, E. y EIK-NES, K. B.: *J. Clin. Endocr.*, 24, 1090-1096, 1964.
3. CASTRO, A., SHIH, H. H. W. y CHING, A.: *Steroids*, 23, 625-630, 1974.
4. COLLINS, W. P., MANSFIELD, M. D., ALLADING, N. S. y SOMMERVILLE, I. F.: *J. Steroid Biochem.*, 3, 333-338, 1972.
5. DUFAY, M. L., CATT, K. S., TSURUHARA, T. y RYAN, D.: *Clin. Chim. Acta*, 37, 109-113, 1972.
6. EIK-NES, K., SCHELLMAN, J. A., LUMRY, R. y SAMUELS, L. T.: *J. Biol. Chem.*, 206, 411-416, 1954.
7. EKINS, R. P.: *Clin. Chim. Acta*, 5, 453-458, 1960.
8. FORTI, G., PAZZAGLI, M., CALABRASI, E., FIORELLI, G. y SERIO, M.: *Clin. Endocr.*, 3, 5-9, 1974.
9. FURUYAMA, S., MAYES, D. M. y NUGENT, C. A.: *Steroids*, 16, 415-419, 1970.
10. GANDY, H. M. y PATERSON, R. E.: *J. Clin. Endocr.*, 28, 949-955, 1968.
11. GUERIGUIAN, J. L. y PERLMAN, W.: *J. Biol. Chem.*, 243, 5226-5234, 1968.
12. ISMAIL, A. A. A., LOVE, D. N. y NIESCHEAG, E.: *Res. Steroids*. (Roma), 4, 4-10, 1970.
13. ISMAIL, A. A. A., NISERNDER, G. D. y MIDGLEY, A. R.: *J. Clin. Endocr.*, 34, 177-182, 1972.
14. JOYCE, B. G., FAHMY, D. y HILLER, S. G.: *Clin. Chim. Acta*, 62, 231-238, 1975.
15. KATO, T. y HORTON, R.: *Steroids*, 12, 631-637, 1968.
16. KIRSHNER, M. A. y COFFMAN, G. D.: *J. Clin. Endocr.*, 28, 1347-1352, 1968.
17. KONNO, M., HOSAKA, M., MAMIYA, T. y NISHIMURA, R.: *J. Urol.*, 65, 637-647, 1974.
18. LANITSKI, I. y FRANKLIN, H. R.: *J. Endocr.*, 54, 333-339, 1972.
19. LOX, C. D., CRISTIAN, C. D. y HEINE, M. V.: *Am. J. Obst. Gynecol.*, 118, 114-121, 1974.
20. MAHOUEAM, J. A. y BRICAIRE, H.: *Ann. Biol. Clin.*, 30, 559-566, 1972.
21. MAYES, D. y NUGENT, C. A.: *J. Clin. Endocr.*, 28, 1169-1175, 1968.
22. MERCIER, C., ALFSEN, A. y BAULIEU, E. E.: *Exc. Med. Inter. Congres. Ser.*, 101, 212-218, 1966.
23. MOWSZOWICZ, I., KAHN, D. y DRAY, F.: *J. Clin. Endocr.*, 31, 584-590, 1970.
24. NIESCHEAG, E. y LORIAUX, D. L.: *Z. Klin. Chem.*, 10, 164-168, 1972.
25. NUGENT, C. A. y MAYES, D.: *Acta Endocr.*, 147, 257-262, 1970.
26. PEARLMAN, W. H. y CREPY, O.: *J. Biol. Chem.*, 242, 182-188, 1967.
27. RIONDEL, A., TAIT, J. F., GUT, M., TAIT, S. A. S., JOACHIM, E. y LITTLE, B.: *J. Clin. Endocr.*, 23, 620-626, 1963.
28. SCHELLMAN, J. A., LUMRY, R. y SAMUELS, L. T.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 76, 2808-2812, 1954.
29. TRESQUERRES, J. A. F., FERNÁNDEZ, M. D., FERNÁNDEZ-GALAZ, M. C. y ORIOL-BOCH, A.: *Rev. Iber. Endocr.*, 127, 23-41, 1975.
30. TYLER, J. P. P., HERRMAN, J. F., NEWTON, J. R. y COLLINS, W. P.: *Steroids*, 2, 871-877, 1973.
31. VERJANS, H. L., COOKE, B. A., DE JONG, F. H., DE JONG, C. M. M. y VAN DER MOLEN, H. J.: *J. Steroid Biochem.*, 4, 665-671, 1973.
32. VERMEULEN, A.: *Clin. Chim. Acta*, 34, 223-229, 1971.