

CU9800400

39-96

# IEN-R

ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE TRAZADORES  
RADIOACTIVOS YODADOS PARA RADIOINMUNOENSAYOS DE  
TETOSTERONA, PROGESTERINA Y CORTISOL

STABILITY IN TIME OF IODINATED TRACERS FOR  
TESTOSTERONE, PROGESTERONE AND CORTISOL  
RADIOIMMUNOASSAYS

Nisembaum Alas, A.T.; Machado Curbelo, A.J.; Diaz  
Castro, D.; Chape Puertas, A.; Santander Lopez,  
A.; Cabrera Oliva, V.

Instituto Nacional de Endocrinología.

La Habana, Cuba

VOL 27 No 2 1

**NEXT PAGE(S)  
left BLANK**

# **NOTICE**

**PLEASE BE AWARE  
THAT THIS IS THE  
BEST  
REPRODUCTION  
POSSIBLE BASED  
UPON THE ORIGINAL  
DOCUMENT  
RECEIVED**

**ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE TRAZADORES RADIACTIVOS YODADOS PARA  
RADIOINMUNOENSAYOS DE TESTOSTERONA, PROGESTERONA Y CORTISOL**

**STABILITY IN TIME OF IODINATED TRACERS FOR TESTOSTERONE,  
PROGESTERONE AND CORTISOL RADIOIMMUNOASSAYS**

**Autores:**

Lic. Amparo Teresa Nisembaum Alas

Dra. Ada Julia Machado Curbeo

Ing. Doraida Díaz Castro

Lic. Alina Chapé Puertas

Lic. Ana Maribel Santander López

Lic. Victor Cabrera Oliva

Instituto Nacional de Endocrinología. Hospital CMDTE "Manuel Fajardo". Zapata y D. Vedado,  
Ciudad de La Habana, Cuba.  
CP:10400 Tel:(537)32-7275  
e-mail: inen@inen.sld.cu

**Subject: B13.30**

**Keywords: radiimmunoassay, labelled compounds: M1; tracer techniques; testosterone;  
progesterone; corticosteroids; quality control: Q1**

## RESUMEN

Se estudió la estabilidad en el tiempo de tres trazadores radiactivos yodados para Radioinmunoensayos de hormonas esteroideas: Testosterona-3 Carboximetiloxima-histamina-<sup>125</sup>I, Progesterona-11 Hemisuccinato-histamina-<sup>125</sup>I y Cortisol-21 Hemisuccinato-histamina-<sup>125</sup>I producidos en el Instituto Nacional de Endocrinología, Ciudad de La Habana, Cuba.

Los radioligandos se prepararon (por quintuplicado) según el método descrito por Nars y Hunter, modificado en el paso de la purificación.

Durante los marcejes, se encontraron altos rendimientos (92.1 ± 2.4% para la Testosterona; 90.1 ± 3.6% para la Progesterona y 88.6 ± 2.8% para el Cortisol); así como elevadas actividades específicas (Testosterona: 23.44 ± 1.2 mCi/mg, Progesterona: 20.5 ± 0.8 mCi/mg; Cortisol: 44.57 ± 1.01 mCi/mg).

Se ensayó la estabilidad de estos trazadores radiactivos en dos condiciones de almacenamiento diferentes: desecados en atmósfera de nitrógeno con conservación posterior a 4°C y conservados sin modificación alguna a 4°C.

En ambos casos, se realizaron curvas dosis-respuestas cada 7 días durante 100, 127 y 112 días para los derivados de la Testosterona, la Progesterona y el Cortisol, respectivamente, comparándose las curvas del inicio y el final del experimento mediante un análisis de regresión para rectas de primera clase.

No se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) ni entre las varianzas ni entre las pendientes de las rectas comparadas para las dos condiciones de almacenamiento ensayadas.

Lo anterior indica que los trazadores radiactivos conservaron sus propiedades como antígenos marcados en los ensayos durante el tiempo que duraron los experimentos. Por lo cual es posible sugerir que estos trazadores yodados para RIAs de hormonas esteroideas tienen un tiempo de vida útil superior a los 60 días, hecho que tiene importancia económica y práctica.

## ABSTRACT

Stability in time of three iodohistamine derivatives for steroid hormone radioimmunoassays (RIAs) Testosterone-3 Carboxymethylamine-histamine-<sup>125</sup>I, Progesterone-11 Hemisuccinate-histamine-<sup>125</sup>I and Cortisol-21 Hemisuccinate-histamine-<sup>125</sup>I produced in the National Institute of Endocrinology, Havana, Cuba was tested.

Iodinated tracers were prepared according to Nars and Hunter's method, modified in the purification step.

High labelling recovery (92.1 ± 2.4% for Testosterone; 90.1 ± 3.6% for Progesterone and 88.6 ± 2.8% for Cortisol) and good specific activities (23.44 ± 1.2 mCi/mg for Testosterone; 20.5 ± 0.8 mCi/mg for Progesterone and 44.57 ± 1.01 mCi/mg for Cortisol) were obtained.

One lyophilized aliquot was stored at 4°C and other, not lyophilized, was stored at the same temperature. Dose-response curves were performed each week during 100, 127 and 112 days for Testosterone, Progesterone and Cortisol derivatives.

No significant differences ( $p < 0.05$ ) were found between tracers at the beginning and the end of the experiment (in the two storage conditions assayed), using parallelism test. Similar results were reported by other research groups.

These iodinated tracers maintained their properties during more than 60 days (the half-time life for the majority of iodinated tracers).

## INTRODUCCIÓN

Los Radioinmunoensayos (RIAs) que emplean trazadores radiactivos yodados (<sup>125</sup>I) presentan ventajas económicas y prácticas sobre los que utilizan trazadores tritados (<sup>3</sup>H).

En primer lugar, átomo por átomo, el conteo promedio del <sup>125</sup>I es 100 veces superior al <sup>3</sup>H, de lo cual se deriva que para lograr similares resultados sea necesario adicionar menor cantidad de radiactividad<sup>2,3</sup>.

En segundo lugar, no existe necesidad de emplear líquido de centelleo para medir la radiactividad<sup>2,3,4</sup>; y en tercer lugar, estos análisis pueden prepararse en el laboratorio con las condiciones mínimas necesarias para la manipulación del material radiactivo<sup>5</sup>.

Sin embargo, les ha sido señalada como una de las principales desventajas<sup>47</sup> el corto tiempo de vida media del <sup>125</sup>I (60 días) lo cual es un problema a considerar cuando se prepara un juego de reactivos.

Lo anterior, nos hizo proponernos como objetivo Realizar un ensayo de estabilidad en el tiempo a tres trazadores radiactivos yodados para RIAs de hormonas esteroides (Testosterona-3 Carboximetiloxima-histamina-<sup>125</sup>I, Progesterona - 11 Hemisuccinato-histamina-<sup>125</sup>I y Cortisol-21 Hemisuccinato-histamina-<sup>125</sup>I) preparados en el Instituto Nacional de Endocrinología, Ciudad de La Habana, Cuba.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los trazadores radiactivos yodados se prepararon (por quintuplicado) según el método descrito por Nars y Hunter<sup>4</sup> modificado en el paso de la purificación<sup>5</sup> y como derivados del esteroide se utilizaron la Testosterona-3 Carboximetiloxima (T-3CMO), la Progesterona-11 Hemisuccinato (P-11HS) y el Cortisol-21 Hemisuccinato (C-21HS) provenientes de la firma comercial Sigma.

El procedimiento consistió de una doble conjugación en medio alcalino en la cual los derivados fueron activados en una mezcla de solventes orgánicos y luego conjugados a la histamina (previamente marcada con la molécula de <sup>125</sup>I) Posteriormente, se detuvo la reacción por cambio de pH y se separaron los intermediarios de las reacciones de acuerdo a sus polaridades siendo el paso final, la purificación de los trazadores radiactivos.

Dicha purificación se realizó por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de fase reversa bajo las siguientes condiciones: columna ODS-120 preparativa equilibrada con mezcla de metanol-agua (60:40%), flujo de 1 mL/minuto, presión de 20 bar y colectándose 3 mL/tubo.

A las fracciones resultantes se les determinó la absorbancia a 254 mμ en un integrador LKB BROMMA modelo 1220, la radiactividad a 10 segundos en un contador RIAGAMMA modelo 1271; así como la inmunoreactividad de cada trazador frente a antisuero específico anti T-3CMO BSA<sup>6</sup>, anti P-3CMO BSA<sup>7</sup> y anti C-3CMO BSA<sup>8</sup>, respectivamente determinándose las uniones máximas (%Bo) y las uniones no específicas (%UNE) para las diluciones de los trazadores radiactivos correspondientes a 10 000 cuentas/minuto/tubo.

El cálculo de los por cientos (%) de rendimiento y las actividades específicas de los radioligandos se efectuaron a partir de

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Cuentas de la hormona activa}}{\text{Cuentas totales del cromatograma}} \times 100$$

$$\text{Actividad Específica (mCi / mg)} = \frac{\text{Radioactividad incorporada a la hormona}}{\text{Masa de la hormona}}$$

El estudio de estabilidad de los conjugados se efectuó en dos condiciones de almacenamiento diferentes. En el primer caso, se almacenaron los trazadores radiactivos en diferentes frascos, se desecaron en atmósfera de gas nitrógeno y se almacenaron a 4°C. En el segundo caso, se conservaron volúmenes apropiados en frascos a 4°C.

Para ambas condiciones de almacenamiento, cada 7 días se realizaron curvas dosis-respuestas (por triplicado) de los radioinmunoensayos<sup>9,10,11</sup> durante 100, 127 y 112 días para la T-3CMO-histamina-<sup>125</sup>I, la P-11HS-histamina-<sup>125</sup>I y el C-21HS-histamina-<sup>125</sup>I, respectivamente.

Las curvas dosis-respuestas encontradas al inicio y al final de los experimentos fueron comparadas mediante un análisis de regresión para rectas de primera clase<sup>12,13</sup> donde se compararon las varianzas ("test" de Fisher) y las pendientes ("test" de Students) de las rectas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los rendimientos obtenidos en los 5 marcajes realizados para cada conjugado fueron de 92.1 ± 2.4% para el derivado yodado de la Testosterona, 90.1 ± 3.6% para el de la Progesterona y 88.6 ± 2.8% para el derivado del Cortisol.

Por otra parte, las actividades específicas encontradas fueron de 23.44 ± 1.2 mCi/mg, 20.50 ± 0.8 mCi y 44.5 ± 1.01 mCi/mg para la T-3CMO-histamina-<sup>125</sup>I, la P-11HS-histamina-<sup>125</sup>I y el C-21HS-histamina-<sup>125</sup>I, respectivamente.

Ambos resultados fueron considerablemente superiores a los reportados por los autores de la técnica y por otros investigadores que la emplearon con posterioridad donde el rendimiento no excedió de un 50%<sup>13,14</sup>.

Lo anterior resulta lógico si se tiene en cuenta la variante introducida en el paso de la purificación de los trazadores ya que han sido demostradas las ventajas de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) sobre los métodos de purificación que le precedieron (el TLC entre otros)<sup>1,15</sup> en cuanto a reproducibilidad, alto grado de purificación y pérdidas mínimas de material radiactivo.

El hecho de haber obtenido trazadores radiactivos con alto grado de pureza y actividades específicas elevadas resultó importante para el ensayo de estabilidad ya que la presencia de remanentes (yodados o no) junto a los trazadores produce un aumento de la formación de agregados, incrementa la radiolisis, disminuye la actividad específica disminuyendo significativamente el tiempo de vida media de éstos<sup>15</sup>.

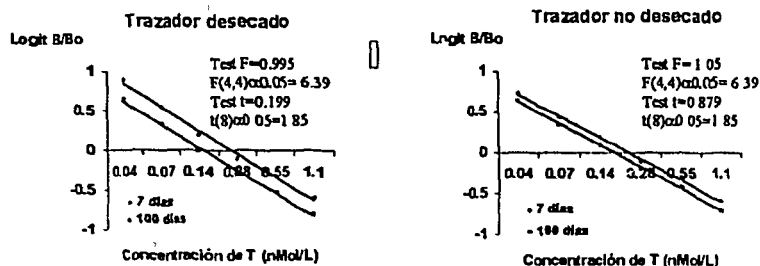
En los ensayos de estabilidad, no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) (ni entre las varianzas ni entre las pendientes) en el análisis de regresión para rectas de primera clase efectuado entre las curvas dosis-respuestas realizadas al inicio y al final de los experimentos para las dos condiciones de almacenamiento probadas: desecado y conservado en solución etanólica (Fig. 1, Tabla I)

Fig. No.1 Curvas dosis-respuestas de los trazadores radiactivos yodados (A. Testosterona-3 carboximetiloxima-histamina-<sup>125</sup>I, B. Progesterona-11 hemisuccinato-histamina-<sup>125</sup>I; C. Cortisol-21 hemisuccinato-histamina-<sup>125</sup>I) realizadas al inicio y al final del experimento conservados en las dos condiciones de almacenamiento ensayadas

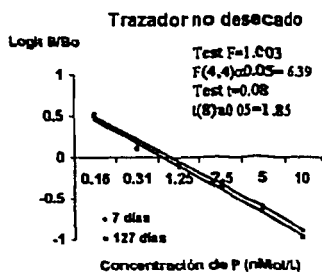
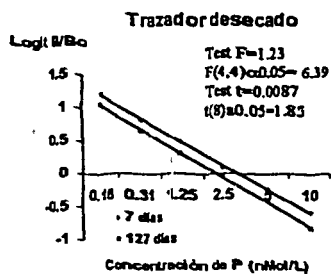
1. Desecado y conservado a 4°C

2. Conservado a 4°C

## A. TRAZADOR RADIOACTIVO DE TESTOSTERONA



## B. TRAZADOR RADIOACTIVO DE PROGESTERONA



## C. TRAZADOR RADIOACTIVO DE CORTISOL

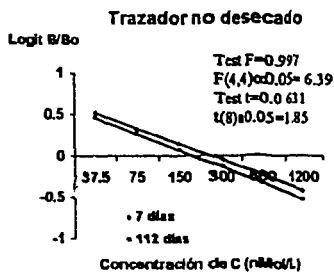
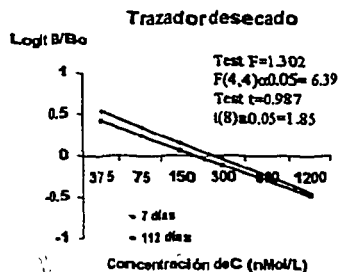


Tabla No. 1 Parámetros de las curvas dosis-respuestas realizadas al inicio y al final de los experimentos de estabilidad, realizados en dos condiciones de almacenamiento:

1. Desecado y conservado a 4°C
2. No desecado y conservado a 4°C

### TRAZADOR DESECADO

Parámetros	T-3CMO-his- <sup>125</sup> I		P-11HS-his- <sup>125</sup> I		C-21HS-his- <sup>125</sup> I	
	7 días	100 días	7 días	127 días	7 días	112 días
Bo (%)	33.71	30.45	-31.25	30.19	-44.00	36.01
UNE (%)	3.72	5.01	4.41	5.13	2.00	4.01
Pendiente	-0.944	-0.831	-0.909	-0.867	-0.867	-0.633
Intercepto	-0.521	-0.389	-0.256	-0.256	1.534	

## TRAZADOR NO DESECADO

Parámetros	T-3CMO-his- <sup>125</sup> I		P-11HS-his- <sup>125</sup> I		C-21HS-his- <sup>125</sup> I	
	7 días	100 días	7 días	127 días	7 días	112 días
Bo (%)	22.98	30.78	30.23	31.03	43.00	37.00
UNE (%)	3.07	4.56	3.14	4.79	1.00	3.00
Pendiente	-0.911	-0.871	-1.003	-0.912	-0.624	-0.658
Intercepto	-0.443	-0.358	-0.258	-0.222	1.500	1.501

Estos resultados indicaron que los conjugados radiactivos conservaron sus características como antígenos marcados durante todo el tiempo que duraron las experiencias: 100 para el derivado yodado de la Testosterona, 127 días para el derivado de la Progesterona y 112 días para el Cortisol yodado en las dos condiciones ensayadas. Esto concuerda con los encontrados por otros grupos de investigadores<sup>16,17</sup> para derivados yodados de la Testosterona y el Estradiol.

No obstante, los resultados hallados cuando los trazadores radiactivos fueron desecados en atmósfera de nitrógeno fueron algo superiores a los obtenidos cuando estos se conservaron en solución etanólica, lo que ha sido reportado en la literatura para conjugados isotópicos y enzimáticos<sup>18</sup>.

Estos trazadores radiactivos para radioinmunoanálisis de hormonas esteroideas tienen un tiempo de vida útil superior a los 60 días, en lo cual se sugiere que hay sido determinado por el método de purificación empleado cuyas ventajas ya fueron señaladas<sup>13</sup> así como por la estructura lipídica de los esteroides<sup>14,17</sup>.

Este hecho tiene importancia económica y práctica ya que el corto tiempo de vida media es una de las limitantes fundamentales de los trazadores yodados.

## BIBLIOGRAFÍA

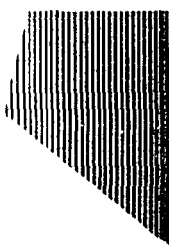
1. Thorell, J.; Ekman, R.; Malmquist, M. Technical aspects of the production and application of iodinated steroid for radioimmunoassay. Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine. Proceedings of a Symposium Vienna, June 21-25, 1982. eds IAEA. Vienna, 1982. pp 147-50
2. Hunter, WM; Nars, PW; Rutherford, FJ. Preparation and behaviour of <sup>125</sup>I-labelled radioligand for phenolic and neutral steroids. Steroid Immunoassay. Proceedings of the Fifth Tenovus Workshop. Cardiff, April, 1974. eds: Alpha Omega Publishing, Ltd. Wales, 1975. pp 141-52.
3. Nars, PW; Hunter, WM. A method for labeling oestradiol-17 $\beta$  with radioiodine for radioimmunoassays. *J Endocr.* 57:20-24. 1973
4. Allen, RM; Reddihan, WR; Holdworth, R. A comparison of tritiated and iodinated tracers in the radioimmunoassay of progesterone in cow milk. *J Reprod Fert.* 58:89-93. 1980
5. Corrie, JE. A direct radioimmunoassay for salivary progesterone using a radioiodinated tracer. Immunoassay of Steroid in Saliva. Proceedings of the Ninth Tenovus Workshop. Cardiff, Nov 1982. eds: Alpha Omega Publishing, Ltd. Wales, 1984. pp 127-33
6. Kim, JB; Bamard, G.J; Collins, WP; Kohen, F; Lundner, HR; Eshnar, Z. Measurement of plasma estradiol-17 $\beta$  by solid phase Chemiluminescence Immunoassay. *Clin Chem.* 28:1120-24. 1982



7. Roda, A; Girotti, S; Paoletini, AL; Preti, S; Lodi, S. Development of a sensitive, direct Luminescent Enzyme Immunoassay for plasma estradiol-17 $\beta$ . Anal. Biochem. 56 :267-73. 1986.
8. Nisembaum, AT; Machado, AJ; Mallea, L. Montaje y validación de un radioinmunoanálisis para la cuantificación de testosterona plasmática. Rev.Cubana End. 1:14-26. 1989.
9. WHO Special Programme of Research Development and Training in Human Reproduction. Programme for Provision of Matched Assay reagent for Immunoassay of Hormones. eds:HRP/WHO. Londres, 1996. pp:43-73.
10. Nisembaum, AT; Santander, AM; Machado, AJ. Dos Radioinmunoanálisis (extractivo y directo) para cuantificar progesterona plasmática utilizando trazador yodado. Rev Cubana End. (En Prensa).
11. Diaz, D, Chapé, A; Cabrera, V; Nisembaum, AT; Machado, AJ; Protoondo, D. Radioinmunoanálisis de Cortisol plasmático utilizando trazador radiactivo yodado. LABORAT-acta 4 109-14 1992.
12. Rodbard, DM, Munson, PJ, De Lean, A. Improved curve-fitting parallelism testing, characterization of sensitivity, validation and optimization for radioligand assays. Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine. Vol II. Proceedings of a Symposium (Berlin, Oct.31-Nov 4,1977 eds IAF A. Viena, 1978 pp 49-514
13. Análisis para rectas de regresión de primera clase. Documenta Geigy. Tablas Científicas. eds:J.R. Geigy, S.A. Basilea, 1965. pp:180-82.
14. Cameron, EH; Scarsbrick, JJ; Morris, SE; Read, G. <sup>125</sup>I-iodohistamine derivatives as tracers for the radioimmunoassay of progestagens. Steroid Immunoassay. Proceedings of the Fifth Tenovus Workshop Cardiff, April 1974. eds:Alpha Omega Publishing, Ltd. Wales, 1975. pp 153-76.
15. Andres, RY. Iodination tracers for Radioimmunoassays preparation and purification. Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine. Proceedings of a Symposium Viena, June21-25, 1982. eds:IAEA, Viena, 1982. pp:133-46.
16. Niswender, GD En: Cameron, EH; Scarsbrick, JJ; Morris, SE; Read, G <sup>125</sup>I-iodohistamine derivatives as tracers. Steroid Immunoassay. Proceedings of the Fifth Tenovus Workshop. Cardiff, April 1974. eds:Alpha Omega Publishing, Ltd. Wales, 1975. pp:153-76.
17. Rutherford, FJ. En: Cameron, EH; Scarsbrick, JJ; Morris, SE; Read, G <sup>125</sup>I-iodohistamine derivatives as tracers. Steroid Immunoassay Proceedings of the Fifth Tenovus Workshop. Cardiff, April 1974 eds:Alpha Omega Publishing, Ltd. Wales, 1975 pp.153-76.
18. Montoya, A; Castell, JV. Long-term storage of peroxidase-labelled immunoglobulins for use in enzyme immunoassay. J.Immunol.Methods 99.13-20. 1987

#### AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado, en parte, por el Programa Especial de Reproducción Humana de la Organización Mundial de la Salud (HRP/WHO)



**CIEA**

**CENTRO DE INFORMACION  
DE LA ENERGIA NUCLEAR**

Calle 20 No. 4113 e/ 18A y 47, Playa

Telf.: 22-7527. Fax: 331188.

E mail: [cien@ceniai.cu](mailto:cien@ceniai.cu)