

INSTITUTO NACIONAL DE ENDOCRINOLOGIA

Un método no cromatográfico para la determinación de dihidrotestosterona en plasma

Dra. Ada J. Machado, Dr. Francisco Navaroli, Dr. Lorenzo Mallea,
Téc. Felicita Morta

Machado, A. J. y otros: *Un método no cromatográfico para la determinación de dihidrotestosterona en plasma.*

Se describe una técnica no cromatográfica para la determinación por radioinmunoensayo de dihidrotestosterona (DHT), en la cual se introduce un paso de oxidación que elimina la interferencia de la testosterona (T). El ensayo es validado y se determinan los valores normales para una población de hombres (0,82 — 3,56 nmol/l) y mujeres (0,33 — 1,13 nmol/l) sanos y fértiles. Se comparan los valores obtenidos con los informados en la literatura.

INTRODUCCION

Es de todos conocido que la testosterona (T) es el andrógeno circulante principal en el hombre. Esta hormona es generalmente metabolizada por la enzima 5 α -reductasa a 5 α -dihidrotestosterona (DHT), que es el compuesto activo en las células.¹ Este andrógeno realiza muchas de las funciones relacionadas con la diferenciación sexual, virilización, y parece ser el mediador celular de los andrógenos en órganos andrógeno-sensibles como próstata, vesículas seminales, glándulas prepuciales, epididimo, et-cétera^{2,3}

Se han informado niveles de dihidrotestosterona (DHT) más bajos en hombres oligospermicos que en hombres normales,⁴ así como en hombres con varicocele, con conteo espermático por debajo de 20 millones/m/.

Esto ha motivado que se plantee la posibilidad de la existencia en estos pacientes, de una deficiencia en la actividad 5 α -reductasa en el epididimo.

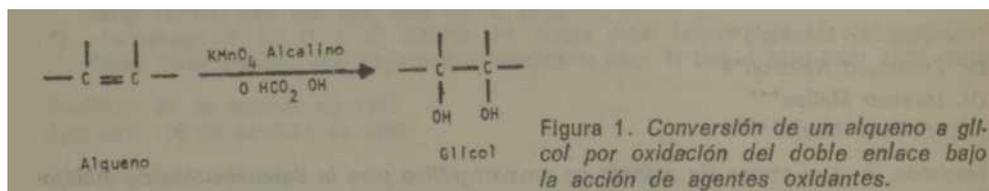
Por consiguiente, el análisis de los niveles circulantes de T y DHT es de vital

importancia para el estudio del hombre infértil.

La similitud estructural de ambos compuestos y la concentración mucho más alta de la T en sangre han hecho difícil el análisis por radioinmunoensayo (RIA) de la DHT.

En trabajos anteriores^{6,7} se presentaron los resultados de la validación de un RIA de DHT que utiliza cromatografía en Sephadex LH-20, para la separación de ambos compuestos. Este método resultó ser de ejecución laboriosa y de muy baja recuperación, lo cual lo hizo poco práctico para su uso de rutina.

Se conoce que ciertos agentes oxidantes como el permanganato de potasio (KMnO₄) y el ácido per fórmico (HCO₂OH) convierten los alquenos en glicoles, que son dihidroxialcoholes formados por la oxidación de un doble enlace, para dar 2 grupos hidroxilos⁸ (figura 1).



Cualquier esteroide con un doble enlace en la posición 4-5 puede ser convertido en glicol por tales agentes oxidantes. Así la T se transforma en un compuesto de ese tipo y la DHT puede ser analizada sin interferencia. Algunos autores han informado el empleo del KMnO₄ como agente oxidante, con buenos resultados,⁹ por lo que fue seleccionado para el montaje de este método. Una vez validado el proceso de oxidación y el método radioinmunológico se determinaron los valores normales de DHT, en una población de hombres y mujeres normales.

MATERIAL Y METODO

Se estudiaron 50 hombres y mujeres normales, sin patología endocrina conocida, con fertilidad probada y que acudieron al Banco de Sangre para donación voluntaria.

HORMONAS Y REACTIVOS

La 5 dihidrotestosterona para la preparación de los estándares se obtuvo de Sigma Co, EUA. El marcador (1,2,4,5,6,7, 3H) dihidrotestosterona (3H-DHT) se obtuvo de Amersham, Inglaterra. El antisuero utilizado es un antisuero anti-testosterona que tiene una reacción cruzada con la DHT del 43,2 % y nos fue suministrado por el Prof. *H. van der Molen*, de la Universidad de Erasmo, Rotterdam, Holanda.

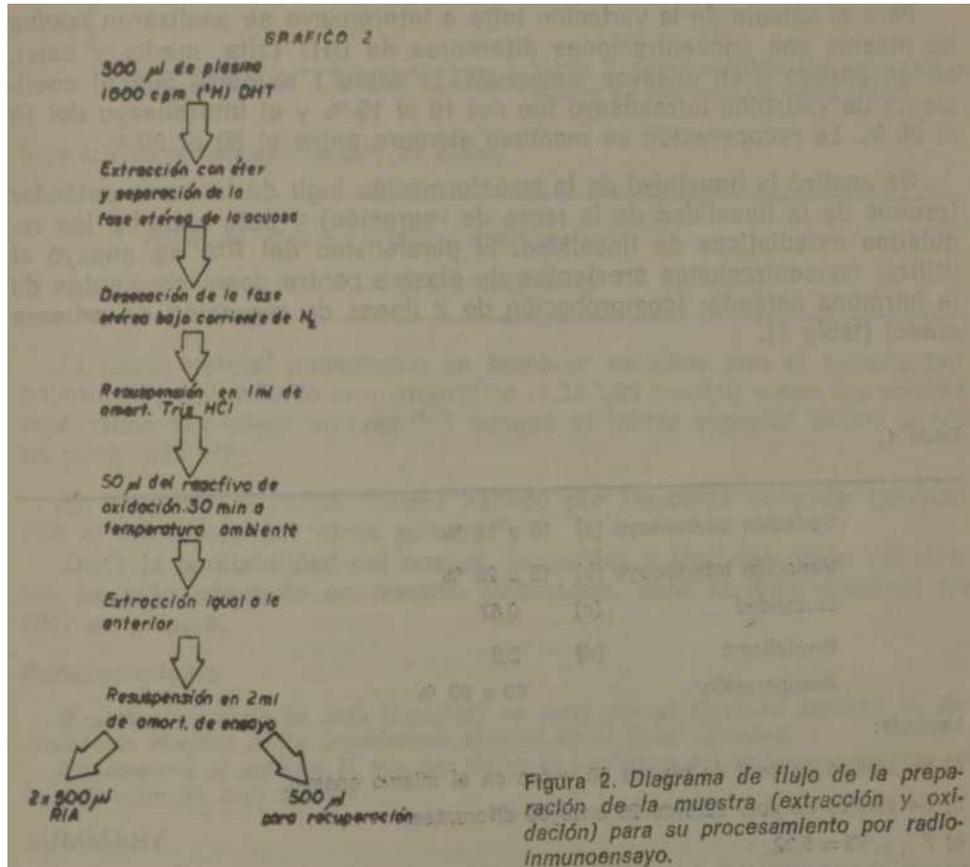
Los amortiguadores empleados son: fosfato 0,01 M. pH 7,4 al que se le añade gelatina al 1 % (amortiguador de ensayo) y Tris-ClH 0 1 M pH 8,5 (amortiguador de oxidación).

El reactivo de oxidación es una solución acuosa de KMnO₄ a una concentración de 50 mg/ml.

DESCRIPCION DE LA TECNICA

Se toman 500 μ l de plasma a los que se le añaden aproximadamente 1 000 cpm de 3H-DHT para corrección de la recuperación. Se extraen con 5 ml de éter durante 1 min. Se separa la fase etérea de la acuosa y se congela esta última en una mezcla

de hielo seco-etanol y se decanta la fase etérea. Esta se evapora bajo corriente de N_2 en un baño a $40\text{ }^\circ\text{C}$ y se resuspende en 1 ml de amortiguador de oxidación (figura 2).



Se añaden $50\ \mu\text{l}$ del reactivo de oxidación, se mezcla bien y se deja durante $40\ \text{min}$ a temperatura ambiente. La T es oxidada y la DHT es extraída con éter al seguir el procedimiento anterior. El residuo se resuspende en $2\ \text{ml}$ de amortiguador de ensayo, de los cuales se toman $500\ \mu\text{l}$ por duplicado para el RIA y $500\ \mu\text{l}$ que se colocan en viales de recuento, a los que se le añade líquido de centelleo y se cuentan en un contador, para así calcular el factor de corrección de la recuperación.

El RIA se efectúa como sigue: a las alícuotas de $2 \times 500\ \mu\text{l}$ de las muestras se les añaden aproximadamente $8\ 000\ \text{cpm}$ de 3H-DHT en $100\ \mu\text{l}$ de amortiguador de ensayo. Se añaden después $100\ \mu\text{l}$ de antisuero (dilución final: $1: 32\ 000$). Los tubos se mezclan y se incuban de 18 a $24\ \text{h}$ a $4\text{ }^\circ\text{C}$.

La hormona libre de la unida se separa por absorción de la porción libre con carbón-dextrán, centrifugación a 1 500 g durante 5 min y se decanta el sobrenadante en viales de recuento.

Una curva estándar de 6 puntos, con un rango de 0,2 a 6,8 nmol/l se procesa junto a las muestras en cada ensayo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Para el cálculo de la variación intra e interensayo se analizaron *poles* de plasma con concentraciones diferentes de DHT (alta, media y baja), en un ensayo y en ensayos sucesivos. La tabla 1 muestra que el coeficiente de variación intraensayo fue del 10 al 15 % y el interensayo del 15 al 20 %. La recuperación se mantuvo siempre entre el 80 al 90 %.

Se analizó la linealidad de la transformación logit de la curva estándar (prueba de la linealidad de la recta de regresión) y ésta cumplió los requisitos estadísticos de linealidad. El paralelismo del RIA se ensayó al utilizar concentraciones crecientes de plasma contra dosis crecientes de la hormona estándar (comprobación de 2 líneas de regresión de primera clase) (tabla 1).

Tabla 1.

Variación interensayo (a)	10 a 15 %
Variación interensayo (b)	15 a 20 %
Linealidad (c)	0,67
Paralelismo (d)	2,9
Recuperación	80 a 90 %

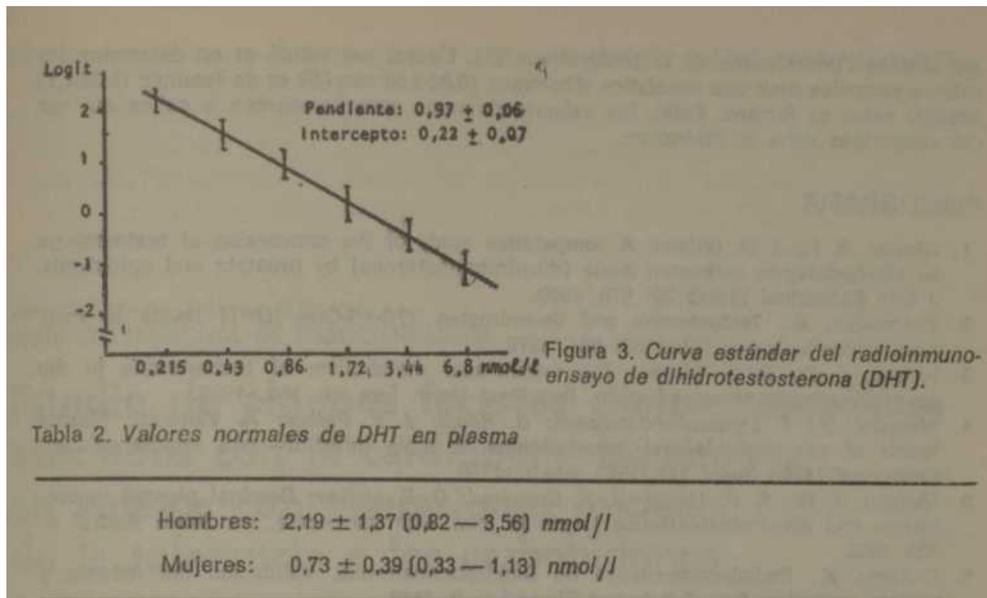
Leyenda:

a) Se analizó un *pool* de plasma 20 veces en el mismo ensayo.
b) Se analizó un *pool* durante 20 ensayos diferentes.
c) $F_{(1,0)} 95 = 5,32$.
d) $t_{(21)} 95 = 3,82$

Una curva estándar típica del RIA de DHT se muestra en la figura 3. Fue construida al utilizar la media de los valores de 10 ensayos diferentes.

La comprobación de la oxidación se efectuó al añadir reactivo de oxidación a cantidades crecientes de estándar de T y determinar posteriormente T por RIA. En ningún caso fue detectable, lo que demuestra que se produjo una oxidación completa.

Se determinaron los valores normales de DHT en plasma de hombres y mujeres normales, los que se muestran en la tabla 2.



El rango normal encontrado en hombres coincide con el hallado por nosotros con el método cromatográfico (1,35-3,29 nmol/l) y con los valores reportados por otros autores,¹⁰⁻¹⁵ aunque el límite superior tiende a ser un poco más alto.

En mujeres el rango normal hallado por nosotros coincide también con el informado por otros autores.¹⁶

Dada la confiabilidad del ensayo, la rapidez y fácil ejecución del mismo ha sido adoptado en nuestro laboratorio, para la determinación de DHT en plasma.

Agradecimiento

El presente trabajo ha sido financiado en parte por el Programa Especial de Reproducción Humana de la Organización Mundial de la Salud (Ginebra).

Agradeoemos al profesor H. van der Molen el suministro del antisuero empleado en la realización de este trabajo.

SUMMARY

Machado, A. J. et al.: A non-chromatographic method for the determination of plasma dihydrotestosterone.

A non-chromatographic technique for the determination by radioimmunoassay of dihydrotestosterone (DHT), in which an oxidation step for eliminating testosterone interference (T) is introduced, is described. The assay is validated and normal values for a healthy and fertile male (0,82-3,56 nmol/l) and female (0,33-1,13 nmol/l) population are determined. Values obtained are compared with those reported in the literature.

RÉSUMÉ

Machado, A. J. et al.: Une méthode non chromatographique pour le dosage de la dihydrotestostérone dans le plasma.

Il est décrit une technique non chromatographique pour le dosage de la dihydrotestostérone (DHT) par épreuve de radioimmunité, dans laquelle on introduit un pas d'oxydation qui élimine l'interférence de la testostérone (T).

L'essai est validé et on détermine les valeurs normales pour une population d'hommes (0,82-3,56 nmol/l) et de femmes (0,33-1,13 nmol/l) sains et fertiles. Enfin, les valeurs obtenues sont comparées à celles qui ont été rapportées dans la littérature. Ú-

BIBLIOGRAFIA

1. *Gloyna, R. E.; J. D. Wilson:* A comparative study of the conversion of testosterone to 17 β -hydroxy-5 α -androstane-3-one (dihydrotestosterone) by prostate and epididymis. *J Clin Endocrinol Metab* 29: 970, 1969.
2. *Vermeulen, A.:* Testosterone and 5 α -androstane-17 β -1-3-one (DHT) levels in men. *Acta Endocrinologica (Kbh)* 83: 651, 1976.
3. *Wilson, J. D.; R. E. Gloyna:* The intranuclear metabolism of testosterone in the accessory organs of reproduction. *Rec Prog Horm Res* 26: 309, 1970.
4. *Magrunl, G.; T. Lemorchand-Bereaud; B. Reudl; J. P. Felber; A. Vannotti:* Plasma levels of sex steroids and gonadotropins in male infertility and impotency. *Acta Endocrinol (Kbh) Suppl* 177, 1973, Abstract 56.
5. *Hudson, R. W.; K. A. Hayes; V. A. Crawford; D. E. McKay:* Seminal plasma testosterone and dihydrotestosterone levels in men with varicocele. *Int Journ Androl* 6: 135, 1983.
6. *Colunga, C.:* Radloinmunoensayo de Dihidrotestosterona. Validación del método y valores normales. *Rev Cub Invest Biomed* 1: 2, 1982.
7. *Machado, A. J.; F. Navaroli; C. Colunga:* Estudio de la concentración plasmática de estradiol, testosterona y dihidrotestosterona en hombres normales. *Rev Cub Invest Biomed* 2: 365, 1983.
8. *Morrison, R. T.; R. N. Boyd:* Organic chemistry 2nd Edition. Editado por Morrison, R. T. y Boyd, R. N. Boston Allyn S. Bacon Inc., Mass USA. 1970. P. 204.
9. *Werawatgoompa, S. N.; Dusitisin; P. Sooksamlti; S. Leeplapthaipoon; P. Vrutamasen; B. Boonsiri:* A rapid radioimmunoassay for the determination of 5 α -dihydrotestosterone. In: *Radioimmunoassay and related procedures in medicine*. IAEA Vienna, 1982. P. 327.
10. *Vermsulen, A.; L. Verdonok:* Radioimmunoassay of 17 β -hydroxy-5 α -androstane-3-one, 4-androstane-3,17-dione, dehydroepiandrosterone, 17-hydroxiprogesterone and progesterone and its application to human male plasma. *J Steroid Biochem* 7: 1, 1976.
11. *Tremblay, R. R.; I. Z. Bertlms; A. Kowarski; C. J. Migeon:* Measurement of plasma dihydrotestosterone by competitive protein binding analysis. *Steroids* 16: 29, 1970.
12. *Tremblay, R. R.; A. Kowarski; J. J. Park; C. J. Migeon:* Blood production rate of dihydrotestosterone in the syndrome of male Pseudohermaphroditism with testicular feminization. *J Clin End Metab* 35: 101, 1972.
13. *Gupta, D. E.; E. McCafferty; K. Kager:* Plasma 5 α -dihydrotestosterone (17 β -hydroxy-5 α -androstane-3-one) in adolescent males at different stages of sexual maturation. *Steroids* 19: 411, 1972.
14. *Ito, I.; R. Horton:* Dihydrotestosterone in human peripheral plasma. *J Clin End Metab* 31: 362, 1978.
15. *Jeffcoate, S. L.:* Comunicación personal.

Recibido: 15 de octubre de 1985

Aprobado: 17 de octubre de 1985

Dra. *Ada J. Machado*
Instituto Nacional de Endocrinología
Zapata y D. Vedado
municipio Plaza de la Revolución
Ciudad de La Habana, Cuba