

**ASPECTES TEÒRICS DE L'ANÀLISI DE SATURACIÓ.  
APLICACIÓ D'AQUESTA A LA DETERMINACIÓ  
DE PROGESTERONA \***

Comunicació presentada el dia 18 de gener de 1973  
pels doctors

**F. RIVERA**

i

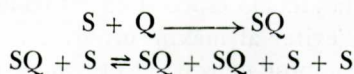
**R. CASAMITJANA**

Del Laboratori Central de Bioquímica de la Facultat de Medicina  
de la Universitat de Barcelona  
(Cap del Servei: Dr. A. Corominas i Vilardell)

\* Treball realitzat amb l'ajut 2.2.6. del «III Plan de Desarrollo».

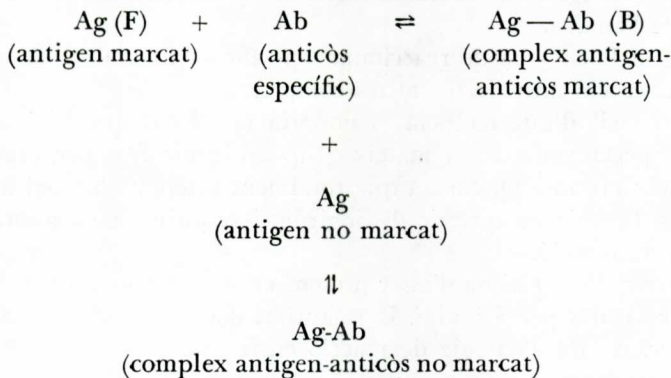
Tant el radioimmunoassaig com el PCB són formes una mica diferents d'un nou mètode analític anomenat «anàlisi de saturació» o de «desplaçament». Ambdós es basen en una reacció competitiva que podríem esquematitzar així:

a) En el cas del PCB:



En què S és una hormona que té una gran afinitat amb la proteïna Q.

b) En el cas del radioimmunoassaig:



La tècnica, en general, té com a fonament l'habilitat de l'hormona no marcada per a desplaçar l'hormona marcada lluny dels seus punts d'unió amb l'anticòs o amb la proteïna en general. Per tant, en el cas del RIE, la relació B/F va disminuint a mesura que augmenta la quantitat d'hormona no marcada.

Tenint en compte les característiques de l'anàlisi de saturació, hom veu clarament que la tècnica pot ésser aplicada a la determinació de moltes substàncies, i molt diverses: vitamines, glucòsids, digitàlics, nucleòtids, i, a més, tota mena d'hormones: insulina, TSH, HGH, gastrina, paratohormona, progesterona, etc.

Els avantatges que presenten aquestes tècniques en relació amb altres usades anteriorment, poden ésser resumits així:

- a) Necessiten una quantitat molt petita de plasma.
- b) Són mètodes ràpids que requereixen poques hores de treball.
- c) La realització és senzilla i, per això, no és necessari personal altament especialitzat.
- d) Tenen una elevada sensibilitat, i fins arriben a detectar quantitat petitíssimes de substància-problema.

A partir d'aquí, farem les consideracions generals sobre les «tècniques de saturació», basant-nos en el primer esquema, és a dir, el que fa referència al PCB. Posarem una atenció especial en les condicions en què ha d'ésser duta a terme, a fi d'evitar al màxim els errors.

En primer lloc, el compost marcat ha de trobar-se altament purificat i ha de tenir característiques idèntiques —o molt semblants— a les del compost problema, a fi que la reacció amb Q es faci en els mateixos punts d'unió. Qualsevol diferència química entre ambdós, que doni lloc a una diferència d'energies de reacció enfront de Q, afectarà la precisió i la sensibilitat de l'anàlisi.

En segon lloc, Q ha de reaccionar específicament amb S de forma que a aquesta reacció no l'afectin altres components.

Un cas fàcil d'interferència es donaria en el cas que hi hagués dues molècules pertanyents a un mateix grup antigènic S i, per tant, amb la mateixa afinitat amb Q, encara que totalment diferents biològicament; en aquest cas, Q seria incapaç de distingir-les i restarien, així, alterats els resultats de la reacció.

En darrer lloc, Q hi ha d'ésser present en una proporció que li permeti de quedar saturat per S i, així, la quantitat d'aquest resta limitada per la del primer. A més, l'energia de reacció entre ambdós ha d'ésser prou elevada per a assegurar que, a aquestes concentracions, no és possible l'existència de grans quantitats de S lliure ni de llocs de reacció de Q no ocupats.

Fetes aquestes consideracions prèvies, ja podem fer un esquema general de la marxa del procés analític i ja n'estudiarem més endavant els passos detalladament, quan l'aplicarem a la determinació de la progesterona.

PAS	FINALITAT	MITJA
1) <i>Preparació de la mostra.</i>		
a) Desproteïnitació.	Separació de la proteïna.	Escalfament. Dissolvents orgànics.
b) Purificació.	Separació de comp. anàlegs.	Repartiment entre dissolvents. Cromatografia en CF. Ídem en paper. Ídem en columna.
2) <i>Quantificació.</i>		
a) Equilibri de l'element marcat amb la proteïna analitzada.	Permet, a l'element problema i a l'element marcat, d'unir-se a la proteïna proporcionalment a llurs concentracions.	Mescla a temperatura ambient i refredament a 10 °C o menys.
b) Separació de l'element problema unit a la proteïna de l'element lliure.	Determina la distribució de la radioactivitat.	Diàlisi. Electroforesi. Precip. de proteïnes. Adsorció de la fracció no marcada a partícules insolubles.

Els dos primers passos no solen presentar dificultat de realització si tenim la cura de fer una dilució adequada de la mostra; veurem la importància d'aquesta precaució si ens fixem en les corbes de la figura 1.

La precisió final és més gran com més elevada és la dilució del plasma.

Per a aconseguir l'equilibri òptim entre l'element marcat i la proteïna, és aconsellable de treballar a baixes temperatures, de 10 °C o menys.

La separació de les fraccions «lliure» i «lligada» pot ésser duta a terme per diversos camins. En el cas de les hormones esteroides (p. e. la progesterona), ha estat emprat el Florisil, substància insoluble que absorbeix amb facilitat la fracció d'hormona lliure. En aquest procediment el recompte es fa a partir de la fracció lligada.

En qualsevol sistema emprat, cal tenir en compte que el temps de recompte és un factor crític, puix que la reacció entre l'absorbent i l'hormona lliure és essencialment irreversible, mentre que la que es produeix entre la proteïna i l'hormona lliure és fàcilment reversible. Si retardem el temps de recompte, la reacció hormona-proteïna és desplaçada cap a l'esquerra i, per això, es produeix un descens progressiu en el percentatge d'element marcat unit a la proteïna.

El mesuratge de l'hormona-problema és, doncs, de tipus indirecte i hom sol fer-lo comparant els resultats amb unes corbes *standard*, com veurem més endavant.

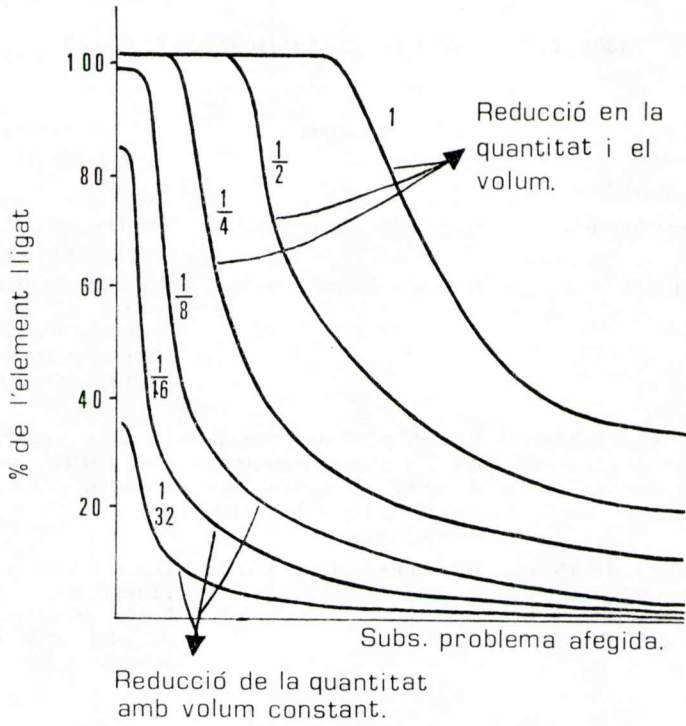


FIG. 1

MÈTODE RÀPID DE LA PROGESTERONA (Johansson 1969)

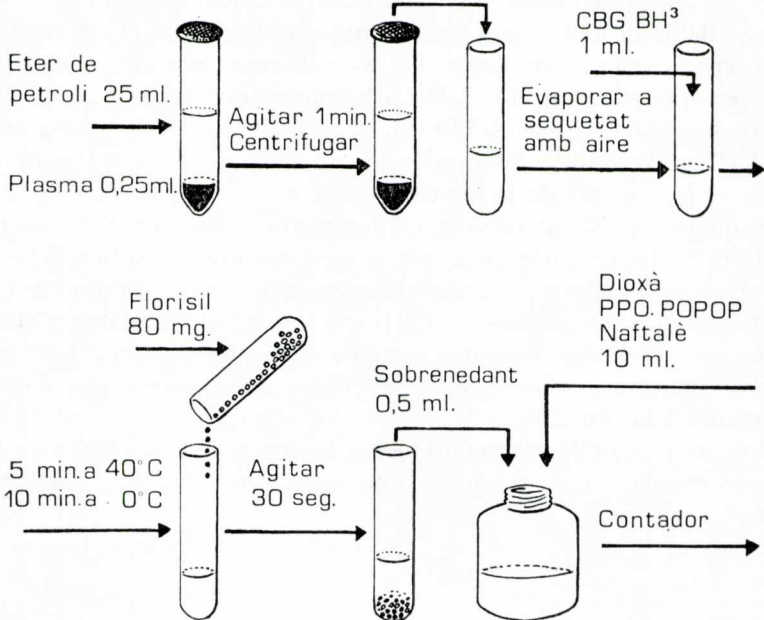


FIG. 2

## ANÀLISI DE PROGESTERONA EN PLASMA

Vegem ara l'aplicació de la tècnica del PCB a la determinació de progesterona en sang.

MURPHY, l'any 1967, descriví un mètode que semblava que feia possibles les determinacions a gran escala, però la necessitat d'intercalar-hi una cromatografia en capa fina presentava dificultats per interferència de factors derivats de les mateixes làmines de la capa.

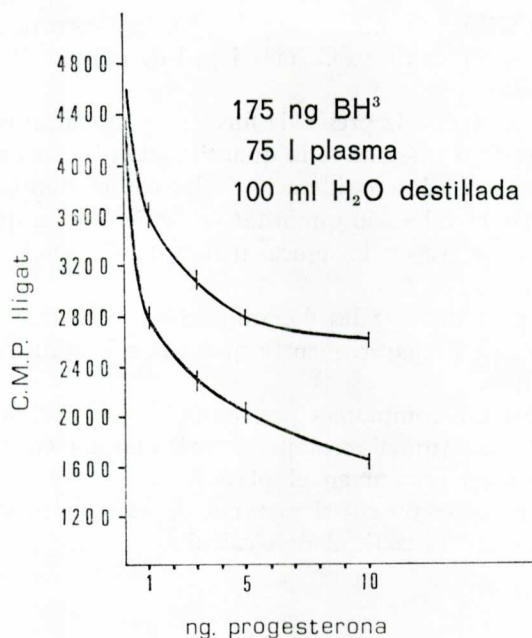


FIG. 3

Fou MURPHY mateix qui puntualitzà que, triant convenientment l'èter de petroli, hom podia extreure, pràcticament, tota la progesterona dels possibles esteroides plasmàtics que tinguessin també una elevada afinitat amb la transcortina.

El mètode simplificat que presentem en la figura 2, fou posat a punt per JOHANSSON el 1969.

Un punt crític del mètode resideix en l'extracció i, per això, és fonamental l'elecció de l'èter de petroli. Aquest dissolvent no ha de separar totes les proteïnes del plasma unides a la progesterona, perquè així s'alliberarien altres esteroides durant l'extracció, la presència dels quals falsejaria la determinació final de la progesterona.

Un altre punt crític de l'anàlisi sorgeix en el moment de separar la progesterona lliure de la que és unida a proteïna; al principi foren utilitzades, per a la separació, columnes de Sephadex, però els resultats foren enganyosos, puix que aquest material ofereix una baixa afinitat amb les proteïnes i aleshores, a causa d'això, eren alliberats els altres esteroides quan passaven per la columna. En el nostre mètode fem el Florisil, substància insoluble que absorbeix la fracció lliure de progesterona.

La solució CGB-H<sup>3</sup> és una mescla de 17,5 ng de corticosterona-1,2 H<sup>3</sup>, d'una activitat específica de 50 Ci/mM i 75 l de plasma dissolts en 100 ml d'aigua destil·lada.

El mètode pot revelar la presència fins de 0,5 ng/ml, si fem 0,25 ml de plasma, i fins de 0,3 ng/ml, si la quantitat de plasma és de 0,5 ml.

Podem passar ara a la consideració de les corbes standard que ens servirán per a donar la valoració quantitativa de l'esteroides que volem mesurar. Aquestes corbes (vegeu la figura 3) han d'ésser fetes sempre per duplicat.

La corba 1 procedeix de les determinacions fetes amb una solució de CGB-H<sup>3</sup> acabada de preparar, mentre que a la 2 la solució havia romàs a la nevera cinc dies.

El CPM lligat són comptatges per minut de corticosterona que roman unida a la proteïna. Aquest recompte és més elevat com més petita és la quantitat d'hormona present en el plasma.

Veiem com en el segon cas el pendent de la corba disminueix i com, per tant, disminueix l'exactitud dels càlculs.

#### BIBLIOGRAFIA

1. JOHANSSON, E. D. B.: *Progesterone levels in peripheral plasma during the luteal phase of the normal human menstrual cycle measured by a rapid competitive protein binding technique*. «Acta Endocrinologica», 61: 592-606 (1969).
2. JOHANSSON, E. D. B.: *Plasma levels of progesterone in pregnancy measured by a rapid competitive protein binding technique*. «Acta Endocrinologica», 61: 607-617 (1969).
3. JOHANSSON, E. D. B.: *A simplified procedure for the assay of progesterone*. «Karolinska Symposia on research methods in reproductive endocrinology. 2nd Symposium. Steroid Assay by Protein Binding» (1970).
4. JOHANSSON, E. D. B.: *A rapid competitive protein binding method for progesterone*. «Proceedings of the third international congress on hormonal steroids. Excerpta medica». 264, Amsterdam (1971).

5. LIPSETT, M. B., DOERR, P. i BERMÚDEZ, J. A.: *Saturation assays for plasma progesterone and 17-hidroxyprogesterone*. «Karolinska symposia on research methods in reproductive endocrinology. 2nd Symposium. Steroid assay by Protein Binding» (1970).
6. MURPHY, B. E. P.: *Protein binding and the assay of nonantigenic hormones*. «Recent. Progr. Hormo. Rese.», 25: 563 (1929).
7. MURPHY, B. E. P.: *Methodological problems in competitive protein-binding techniques; the case of Sephadex column chromatography to separate steroids*. «Acta Endocrinologica. Supplementum», 147: 37 (1970).
8. REEVES, B. D., DE SOUZA, M. L. A., THOMPSON, I. E. i DICZFALUSY, E.: *An improved method for the assay of progesterone by Competitive Protein Binding*. «Acta Endocrinologica», 63: 225-241 (1970).
9. YALOW, R. S. i BERGSON, S. H.: *Fundamental principles of radioimmuno-assay techniques in measurement of hormones*. «Recent advances in endocrinology. Excerpta medica», 16 (1971).
10. YOSHIMI, T. i LIPSETT, M. B.: *The measurement of plasma progesterone*. «Steroids», 2: 4 (1968).