



**HAL**  
open science

## Validacion del radioinmunoensayo para la estimacion de testosterona, 11-cetotestosterona y 17 $\beta$ -estradiol en plasma de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.)

F. Prat, M. Carrillo, A. de Mones

### ► To cite this version:

F. Prat, M. Carrillo, A. de Mones. Validacion del radioinmunoensayo para la estimacion de testosterona, 11-cetotestosterona y 17 $\beta$ -estradiol en plasma de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.). *Investigacion Pesquera*, 1986, 50 (2), pp.279-295. <hal-01600783>

**HAL Id: hal-01600783**

**<https://hal.science/hal-01600783v1>**

Submitted on 2 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons CC BY-SA 4.0 - Attribution - ShareAlike - International License

## Validación del radioinmunoensayo para la estimación de testosterona, 11-cetotestosterona y 17 $\beta$ -estradiol en plasma de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) \*

F. PRAT y M. CARRILLO

Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal. Ribera de Cabanes, Castellón.

A. DE MONES

Laboratoire de Physiologie des Poissons, I.N.R.A.  
Campus de Beaulieu, 35042 Rennes Cedex, Francia.

*Palabras clave:* R.I.A., estradiol, testosterona, 11-cetotestosterona, teleósteos, lubina.

*Key words:* R.I.A., estradiol, testosterone, 11-ketotestosterone, teleosts, sea bass.

**RESUMEN:** El radioinmunoensayo (R.I.A.) ha sido la técnica más usada en estos últimos años para el estudio de los niveles plasmáticos de esteroides. En el presente trabajo, el método se validó para la testosterona, 11-cetotestosterona y 17 $\beta$ -estradiol en plasma de lubina. Previamente al ensayo, se extrajeron los esteroides del plasma y, posteriormente, se purificaron por cromatografía en columnas de Sephadex LH-20 con el fin de aumentar al máximo la especificidad del ensayo. Las recuperaciones de las tres hormonas después de este proceso fueron altamente satisfactorias (testosterona: 85,2 %; 11-cetotestosterona: 88,7 %; 17 $\beta$ -estradiol: 71,6 %). En el ensayo, para separar la fracción de esteroide unida al anticuerpo del esteroide libre, se utilizó la precipitación fraccionada con PEG, presentando muy bajos niveles de uniones inespecíficas. El R.I.A. presentó buena sensibilidad, especificidad y precisión, mientras que la exactitud del ensayo demostró ser una técnica válida para la estimación de testosterona, 11-cetotestosterona y 17 $\beta$ -estradiol en plasma de lubina.

**SUMMARY:** VALIDATION OF RADIOIMMUNOASSAY FOR THE MEASUREMENT OF PLASMA TESTOSTERONE, 11-KETOTESTOSTERONE AND 17 $\beta$ -ESTRADIOL IN THE SEA BASS (*Dicentrarchus labrax* L.). — In the last years, radioimmunoassay (R.I.A.) has been used in order to measure plasma steroid levels. The present work validates R.I.A. for determination of testosterone, 11-ketotestosterone and 17 $\beta$ -estradiol in the plasma of sea bass. Prior assay and to increase the assay specificity, the plasma steroids were extracted and purified on Sephadex LH-20 columns. The recoveries (testosterone: 85.2 %, 11-ketotestosterone: 88.7 %, and 17 $\beta$ -estradiol: 71.6 %) after chromatography were satisfactory. Precipitation with PEG was used to separate the steroid-antibody complex from free steroid, showing very low levels of non-specific counts. The assay showed a good sensibility, specificity and precision; its accuracy demonstrated that R.I.A. is a valid technic for the measurement of plasma testosterone, 11-ketotestosterone and 17 $\beta$ -estradiol in the sea bass.

\* Recibido el 18 de febrero de 1986. Aceptado el 3 de abril de 1986.

## INTRODUCCIÓN

Para el estudio de la fisiología de la reproducción es de gran importancia el conocimiento de los niveles plasmáticos de las diferentes hormonas que controlan el proceso reproductor.

Los ovarios y los testículos de los teleósteos son capaces de sintetizar estrógenos, andrógenos y progestágenos que están estrechamente implicados en la regulación endocrina del ciclo reproductor, en la producción de gametos y en la atracción entre congéneres (ver revisión FOSTIER *et al.*, 1983).

El método más utilizado actualmente en la determinación de los niveles hormonales es el radioinmunoensayo (R.I.A.). Este método fue inicialmente usado en el estudio de la insulina (BERSON y YALOW, 1959; YALOW y BERSON, 1959) y es válido para la determinación de cualquier tipo de hormona proteica con capacidad inmunogénica. Recientemente el R.I.A. se ha extendido al estudio de otros agentes biológicos de naturaleza no proteica, entre los que se encuentran los esteroides (WU y LUNDY, 1971; ABRAHAM, 1973, 1974; ANDERSON *et al.*, 1976; ABRAHAM *et al.*, 1977).

Desde que IDLER *et al.*, (1960) identificaron 11-cetotestosterona en plasma de salmón, se han llevado a cabo numerosos estudios tendentes a la identificación y cuantificación de los esteroides gonadales de los teleósteos (IDLER, 1972), siendo el R.I.A. el método más utilizado en esta última década (SIMPSON y WRIGTH, 1977; FOSTIER *et al.*, 1978; COOK *et al.*, 1980; SCOOT *et al.*, 1980; FOSTIER *et al.*, 1982; LAMBA *et al.*, 1982; SOWER y SCHRECK, 1982; BURKE *et al.*, 1984; VAN der KRAAK *et al.*, 1985; ROSENBLUM *et al.*, 1985; entre otros).

El presente trabajo forma parte de una serie de estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio con el fin de investigar los cambios hormonales que tienen lugar a lo largo del ciclo sexual de la lubina y su objeto es la validación y desarrollo del R.I.A. para la determinación de los niveles plasmáticos de testosterona, 11-cetotestosterona y 17  $\beta$ -estradiol en la mencionada especie.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Animales y obtención del plasma*

Machos ( $887,3 \pm 53,7$  g;  $44,7 \pm 0,8$  cm) y hembras ( $1066 \pm 85,7$  g;  $46,8 \pm 1,3$  cm) adultos de lubina criados en nuestras propias instalaciones fueron mantenidos a fotoperíodo y temperatura naturales en tanques de 12 000 litros, bien aireados y provistos de renovación continua de agua de mar. A los animales, mensualmente se les extrajo entre 0,5 y 1 ml de sangre; en lo posible, el muestreo se llevó a cabo en las últimas horas de la mañana. La sangre, una vez recogida en tubos heparinizados, se centrifugó durante 20 min. a 3000 rpm

en una centrífuga Heraeus-Christ Minifuge GL; el plasma separado se guardó a  $-30^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.

### *Reactivos*

Todos los disolventes utilizados fueron de calidad analítica (Merck) excepto el etanol que fue de calidad pura (PANREAC).

Los esteroides no radioactivos (testosterona, 11-cetotestosterona y  $17\beta$ -estradiol) fueron adquiridos a Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA). Con ellos se prepararon soluciones stock a una concentración de  $100\ \mu\text{g/ml}$  disolviéndolos con etanol a  $20^{\circ}\text{C}$  y almacenándolos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Las soluciones de (1, 2, 6,  $7\text{-}^3\text{H}$ )testosterona ( $93\ \text{Ci/mmol}$ ), 11-ceto ( $1,2\text{-}^3\text{H}$ )testosterona ( $40\ \text{Ci/mmol}$ ) y (2, 4, 6,  $7\text{-}^3\text{H}$ )estradiol ( $93\ \text{Ci/mmol}$ ) fueron adquiridos a Amersham International (Amersham, Inglaterra) y se diluyeron con benceno: metanol (9:1 v/v) a una concentración de  $5\ \mu\text{Ci/ml}$ , almacenándose también a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Para el ensayo se utilizó tampón fosfato  $0,01\text{M}$ ,  $\text{pH} = 7,25$  conteniendo gelatina al  $0,1\ \%$  (TPG). Para la dilución de los anticuerpos se utilizó tampón  $\gamma$ -globulina conteniendo  $0,5\ \text{mg}$  de  $\gamma$ -globulina por mililitro de TPG. Para precipitar el complejo unido esteroide-anticuerpo se utilizó polietilenglicol 6000 (PEG) al  $25\ \%$  (Merck). Los componentes del líquido de centelleo fueron adquiridos a Merck y se mezclaron para obtener una solución que contenía  $4\ \text{g}$  de PPO (2,5-difeniloxazol),  $0,1\ \text{g}$  de POPOP (2,2'-p-fenilen bis(5-feniloxazol)) por litro de tolueno.

### *Anticuerpos*

Los anticuerpos (anti-testosterona-3-carboximetil-BSA, anti- $17\beta$ -hidroxiandrost-4-ene-3,11-dione-3-carboximetil-BSA y anti- $17\beta$ -estradiol-6-carboximetil-BSA) producidos en conejo se almacenaron a  $-30^{\circ}\text{C}$  a una dilución inicial de  $1/100$  y nos fueron donados generosamente por el Dr. A. FOSTIER del Laboratoire de Physiologie des Poissons (I.N.R.A.) en Rennes (Francia). La  $\gamma$ -globulina de conejo nos fue asimismo donada por el Dr. FOSTIER. Esta última también se almacenó a  $-30^{\circ}\text{C}$  a una concentración inicial de  $5\ \text{mg/ml}$ .

### *Extracción y cromatografía*

A cada alícuota de  $0,1\ \text{ml}$  de plasma se le añadió un volumen igual del esteroide radiactivo apropiado (aproximadamente  $1200\ \text{cpm}$ ) con el fin de determinar su recuperación. Las muestras fueron extraídas en 10 volúmenes de etilacetato:ciclohexano (1:1 v/v) agitando en un vórtex durante 20 segundos aproximadamente. Inmediatamente después fue congelada la fase acuosa y la orgánica recuperada. Esta operación se repitió por segunda vez, tras lo cual la fase orgánica fue evaporada y el residuo disuelto con  $0,2\ \text{ml}$  de etanol.

La purificación se realizó por cromatografía en columnas de Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemical) utilizando diclorometano:metanol (95:5 v/v) como disolvente. Los extractos, evaporados y redissueltos con 0,2 ml de disolvente, se transfirieron a las columnas (12 cm de longitud  $\times$  0,5 cm de diámetro); posteriormente se lavaron las paredes internas de los tubos con 0,1 ml más de disolvente que fueron igualmente transferidos a las columnas. Una vez puestos los extractos en la columna, se procedió a la separación añadiendo disolvente.

En las muestras provenientes de los machos, se descartaron los primeros 1,2 ml recogiendo los siguientes 1,6 ml que contenían la fracción de testosterona y 11-cetotestosterona. En las muestras provenientes de las hembras, también se descartaron los 1,2 ml primeros, recogiendo los 1,6 ml siguientes (testosterona), descartando asimismo los 2,1 ml que pasan a continuación y volviendo a recoger los 3,2 ml últimos en que se obtiene la fracción de  $17\beta$ -estradiol (fig. 1). Las fracciones así obtenidas fueron evaporadas y redissueltas en 0,2 ml de etanol, almacenándose a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Radioinmunoensayo

El R.I.A. se realizó de acuerdo con lo descrito por FOSTIER *et al.* (1978, 1982). Los extractos secos de plasma fueron disueltos en 0,35 o 0,5 ml de TPG. Tras un precalentamiento a  $40^{\circ}\text{C}$  durante 10 min., se tomaron tres alícuotas de 0,1 ml cada una, dos para ensayarlas por duplicado y la tercera para determinar el porcentaje de recuperación.

Para construir la curva estándar, se preparó un banco de diluciones (5-1000 pg/0,1 ml) con TPG, a partir de la solución stock del esteroide apropiada.

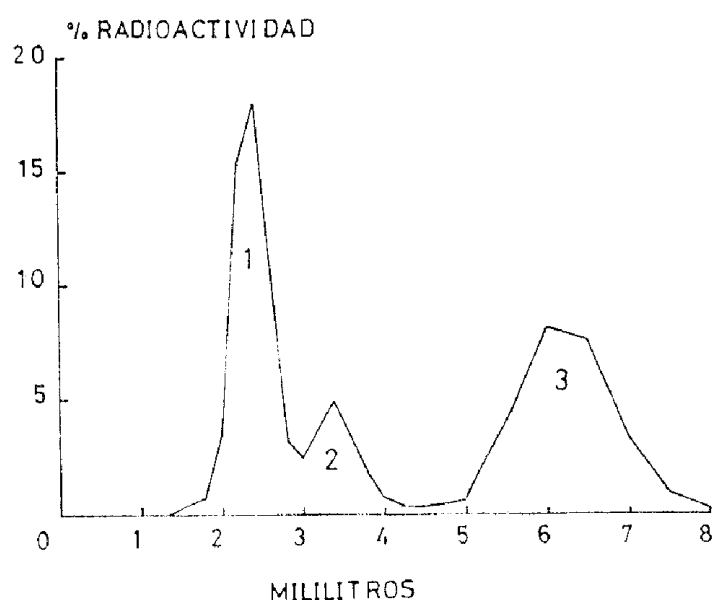


FIG. 1. — Patrones de elución de testosterona y 11-cetotestosterona (1), estrona (2) y  $17\beta$ -estradiol (3) de cromatografías con columna de Sephadex LH-20. Los datos representan la media de los porcentajes de radioactividad encontrados en 10 columnas realizadas.

do; posteriormente, para el ensayo, se tomaron por triplicado 0,1 ml de cada dilución.

Estándares y muestras se procesaron conjuntamente, añadiendo 0,1 ml del anticuerpo correspondiente, diluido con tampón  $\gamma$ -globulina hasta 1/3500 (anti-testosterona), 1/7500 (anti-11-cetotestosterona) o 1/2500 (anti-17  $\beta$ -estradiol. Después de adicionar el esteroide radioactivo apropiado (10 000-12 000 cpm/0,1 ml), los tubos se incubaron a 20°C durante 3 h. Tras la adición de 2 ml de PEG al 25 % en tampón fosfato sin gelatina, los tubos se mantuvieron toda la noche a 4°C con el fin de que precipitase la fracción ligada. Una vez terminada esta fase, la fracción ligada se compactó en el fondo de los tubos, tras una centrifugación a 3200 rpm, a 14°C y durante 40 min. (centrifuga Jouan K110), descartando el sobrenadante. Después de una nueva adición de 2 ml de PEG al 25 %, se procedió a una nueva centrifugación durante 30 min. El sobrenadante se descartó y el precipitado se redisolvió en 0,1 ml de etanol puro; una vez disuelto, se añadieron 2,8 ml de líquido de centelleo procediéndose seguidamente a medir la radioactividad en un contador de centelleo líquido LKB Wallace 1212 Rackbeta.

Con el fin de conocer la radioactividad total, las uniones no específicas (N) y el máximo ligado (Bo), respectivamente, se procesaron simultáneamente 5 tubos con sólo esteroide radioactivo, 3 tubos sin anticuerpo pero con  $\gamma$ -globulina y 6 tubos sin esteroide no radioactivo.

#### *Cálculos y análisis estadístico*

La curva estándar se rectificó mediante la transformación logit:

$$\text{logit}(Bi/Bo) = \ln \frac{Bi - N}{Bo - Bi}$$

Las muestras se evaluaron por interpolación en la curva estándar, utilizando un programa realizado en un ordenador Hewlett Packard 9826.

La exactitud del ensayo se calculó mediante regresiones. La relación existente entre las variables fue puesta de manifiesto por el coeficiente de correlación. La bondad del ajuste de la regresión se determinó comparando el coeficiente de regresión (b) con el cero, mediante un análisis de la varianza. Por otra parte también se utilizó un test t-Student para comparar el parámetro 'a' de la recta con el cero y la pendiente con el 1 y así observar si la recta pasaba por el origen y si los valores medidos variaban en la misma proporción que los esperados.

Para el estudio de paralelismos entre distintas curvas, se realizó un análisis de la covarianza a fin de observar la similitud entre sus pendientes.

## RESULTADOS

### CURVAS ESTÁNDAR

Las distintas curvas estándar de cada hormona mostraron una buena correlación, mientras que las pendientes presentaron poca variación; por otra parte, las uniones no específicas no superaron, en ningún caso, el 1 % de la radioactividad total del ensayo (cuadro I).

### SENSIBILIDAD

La sensibilidad, definida como la menor cantidad de esteroide que es distinta del «cero estándar» al 95 % de límites de confianza (ABRAHAM *et al.*, 1977; CHARD, 1978), osciló en el caso de la testosterona, entre 20-40 pg/tubo, mientras que en el caso de la 11-cetotestosterona y 17 $\beta$ -estradiol fue mayor (10-30 pg/tubo y 5-10 pg/tubo, respectivamente).

### ESPECIFICIDAD

La especificidad del ensayo depende principalmente de la especificidad del anticuerpo. Para calcularla, se ensayaron distintas concentraciones de posi-

CUADRO I

Correlaciones y pendientes de las curvas estándar de testosterona, 11-cetotestosterona y 17 $\beta$ -estradiol, y uniones inespecíficas de los ensayos realizados para cada hormona.

	Correlación <sup>(1)</sup>	Pendiente <sup>(2)</sup>	Uniones inespecíficas <sup>(3)</sup>
Testosterona	$r = -0,986$ a $-0,995$	$\bar{X} = -1,041$ $SD = 0,053$ ( $n = 4$ ) $CV = 5,11\%$	$118,4 \pm 10,9$ ( $1,04 \pm 0,08\%$ )
11-cetotestosterona	$r = -0,993$ a $-0,998$	$\bar{X} = -0,952$ $SD = 0,076$ ( $n = 4$ ) $CV = 8,03\%$	$36,0 \pm 5,3$ ( $0,87 \pm 0,18\%$ )
17 $\beta$ -estradiol	$r = -0,995$ a $-0,997$	$\bar{X} = -0,994$ $SD = 0,024$ ( $n = 3$ ) $CV = 2,51\%$	$104,0 \pm 20,8$ ( $0,98 \pm 0,10\%$ )

- (1) Rango en que oscilaron los coeficientes de correlación de las distintas curvas estándar para cada hormona.
- (2) Media ( $\bar{X}$ ), desviación estándar ( $SD$ ) y coeficiente de variación ( $CV$ ) de las pendientes correspondientes a las curvas estándar construidas para cada hormona. Entre paréntesis se indica el número de curvas estándar realizadas.
- (3) Media  $\pm$  error estándar de la media de cuentas por minuto (cpm). Entre paréntesis se indica el porcentaje de radioactividad con respecto a la radioactividad total del ensayo.

bles esteroides competidores de la hormona a ensayar con el anticuerpo usado en el ensayo. Las reacciones cruzadas, evaluadas como la cantidad de esteroide competidor que produce un 50 % de inhibición en la unión del esteroide a ensayar con el anticuerpo y expresadas como porcentaje, fueron aceptables en todos los casos. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro II.

## CUADRO II

Especificidad de los anticuerpos para la testosterona, 11-cetotestosterona y 17 $\beta$ -estradiol utilizados en los ensayos.

<i>Anticuerpo</i>	<i>Esteroides competidor</i>	<i>Reacción cruzada (%)</i> <sup>(1)</sup>
Testosterona <sup>(2)</sup>	Testosterona	100
	11-cetotestosterona	31
	5 $\alpha$ -dihidrotestosterona	40,7
	Androstendiona	14
	5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol	2,2
	5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol	6,2
	11 $\beta$ -hidroxandrostendiona	0,23
	11 $\beta$ -hidroxitestosterona	<0,1
	17 $\beta$ -estradiol	<0,1
	Dehidroepiandrosterona	<0,1
11-cetotestosterona	11-cetotestosterona	100
	Testosterona	1,4
	11 $\beta$ -hidroxitestosterona	0,79
	5 $\alpha$ -androstan-17 $\beta$ -ol-3-one	0,64
	Dehidroepiandrosterona	<0,1
	Androstendiona	<0,1
	Androsterona	<0,1
	5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol	<0,1
	5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol	<0,1
	17 $\beta$ -estradiol	<0,1
17 $\alpha$ -hidroxi-20 $\beta$ -dihidroprogesterona	<0,1	
17 $\beta$ -estradiol	17 $\beta$ -estradiol	100
	Estrona	3,11
	6-cetoestradiol-17 $\beta$	2,95
	16-cetoestradiol-17 $\beta$	2,75
	16-epiestriol	1,88
	Estriol	0,34
	17 $\alpha$ -estradiol	<0,1
	Testosterona	<0,1
	11-cetotestosterona	<0,1
	17 $\alpha$ -hidroxi-20 $\beta$ -dihidroprogesterona	<0,1

(1) Medida como la cantidad de esteroide competidor que produce un 50 % de inhibición en la unión de testosterona, 11-cetotestosterona o 17 $\beta$ -estradiol (según el caso) con el anticuerpo, expresado en porcentaje.

(2) Datos cedidos por el Dr. Alexis FOSTIER, del Laboratoire de Physiologie des Poissons de Rennes (Francia).

## CUADRO III

Precisión de los R.I.A. de testosterona, 11-cetotestosterona y 17 $\beta$ -estradiol realizados.

	<i>Precisión intraensayo<sup>(1)</sup></i>	<i>Precisión interensayo<sup>(2)</sup></i>
Testosterona	$\bar{X} = 1,696$ ng/ml; $SD = 0,163$ ; $CV = 9,43$ % ( $n = 4$ ) $\bar{X} = 0,845$ ng/ml; $SD = 0,087$ ; $CV = 10,34$ % ( $n = 4$ ) $\bar{X} = 6,635$ ng/ml; $SD = 0,646$ ; $CV = 9,72$ % ( $n = 4$ )	$\bar{X} = 5,250$ ng/ml; $SD = 0,494$ ; $CV = 9,43$ % ( $n = 3$ )
11-cetotestosterona	$\bar{X} = 0,513$ ng/ml; $SD = 0,028$ ; $CV = 5,62$ % ( $n = 3$ ) $\bar{X} = 2,211$ ng/ml; $SD = 0,138$ ; $CV = 6,26$ % ( $n = 6$ )	$\bar{X} = 2,765$ ng/ml; $SD = 0,261$ ; $CV = 9,46$ % ( $n = 3$ )
17 $\beta$ -estradiol	$\bar{X} = 1,590$ ng/ml; $SD = 0,165$ ; $CV = 10,39$ % ( $n = 4$ ) $\bar{X} = 4,010$ ng/ml; $SD = 0,337$ ; $CV = 8,41$ % ( $n = 4$ )	$\bar{X} = 1,810$ ng/ml; $SD = 0,272$ ; $CV = 15,03$ % ( $n = 3$ )

(1) Media ( $\bar{X}$ ), desviación estándar ( $SD$ ) y coeficiente de variación ( $CV$ ) de réplicas de una misma muestra en un mismo ensayo.(2) Media ( $\bar{X}$ ), desviación estándar ( $SD$ ) y coeficiente de variación ( $CV$ ) de réplicas de una misma muestra en distintos ensayos.

## PRECISIÓN

La precisión fue calculada evaluando la variación intraensayo (dentro de un mismo ensayo) y la variación interensayo (entre distintos ensayos). La primera se determinó utilizando un número determinado de replicaciones de un mismo «pool» plasmático, colocando los tubos al azar entre todos los del ensayo y calculando posteriormente los coeficientes de variación. La precisión interensayo se determinó calculando el coeficiente de variación de una misma muestra en distintos ensayos. Los resultados estuvieron dentro de los límites aceptables y se presentan en el cuadro III.

## EXACTITUD

La exactitud del ensayo fue determinada por los test de dilución y de sobrecarga. El primero se realizó diluyendo tres plasmas, con alto contenido en el esteroide apropiado, a 1/2, 1/3, 1/4, 1/6 y 1/8. Posteriormente, se estimaron los esteroides para cada dilución y se compararon los valores medidos con los esperados mediante una regresión (fig. 2), observándose, en todos los casos, un buen ajuste de la recta (ANOVA,  $p < 0,01$ ), y que la pendiente y el origen de coordenadas no diferían significativamente de 1 y 0, respectivamente (t-Student,  $p < 0,05$ ). Los coeficientes de correlación fueron 0,884, 0,974 y 0,979 para la testosterona, 11-cetotestosterona y 17  $\beta$ -estradiol, respectivamente.

El test de sobrecarga se realizó adicionando cantidades conocidas de esteroide apropiado (de 1 a 30 ng/ml) a 3 plasmas con bajo contenido en ese esteroide. Después de medidos se compararon, como en el caso anterior, los valores encontrados con los esperados (fig. 3). El ajuste de las rectas fue

## CUADRO IV

Niveles plasmáticos de testosterona, 11-cetotestosterona en machos y de 17 $\beta$ -estradiol en hembras de lubina, durante los meses previos a la puesta y los meses de puesta, estimados por R.I.A.

	<i>Testosterona</i> <sup>(1)</sup>	<i>11-cetotestosterona</i> <sup>(1)</sup>	<i>17<math>\beta</math>-estradiol</i> <sup>(1)</sup>
Noviembre	1,616 $\pm$ 0,153 (15)	1,392 $\pm$ 0,211 (15)	2,020 $\pm$ 0,258 (8)
Diciembre	1,528 $\pm$ 0,313 (8)	3,305 $\pm$ 0,367 (8)	3,506 $\pm$ 0,596 (8)
Enero	2,255 $\pm$ 0,531 (8)	3,736 $\pm$ 0,697 (8)	3,848 $\pm$ 0,927 (6)
Febrero	1,039 $\pm$ 0,301 (7)	2,374 $\pm$ 0,966 (7)	4,850 $\pm$ 1,712 (5)
Marzo	0,510 $\pm$ 0,230 (4)	0,364 $\pm$ 0,138 (5)	0,687 $\pm$ 0,190 (3)

(1) Media  $\pm$  error estándar de la media. Entre paréntesis se indica el número de individuos.

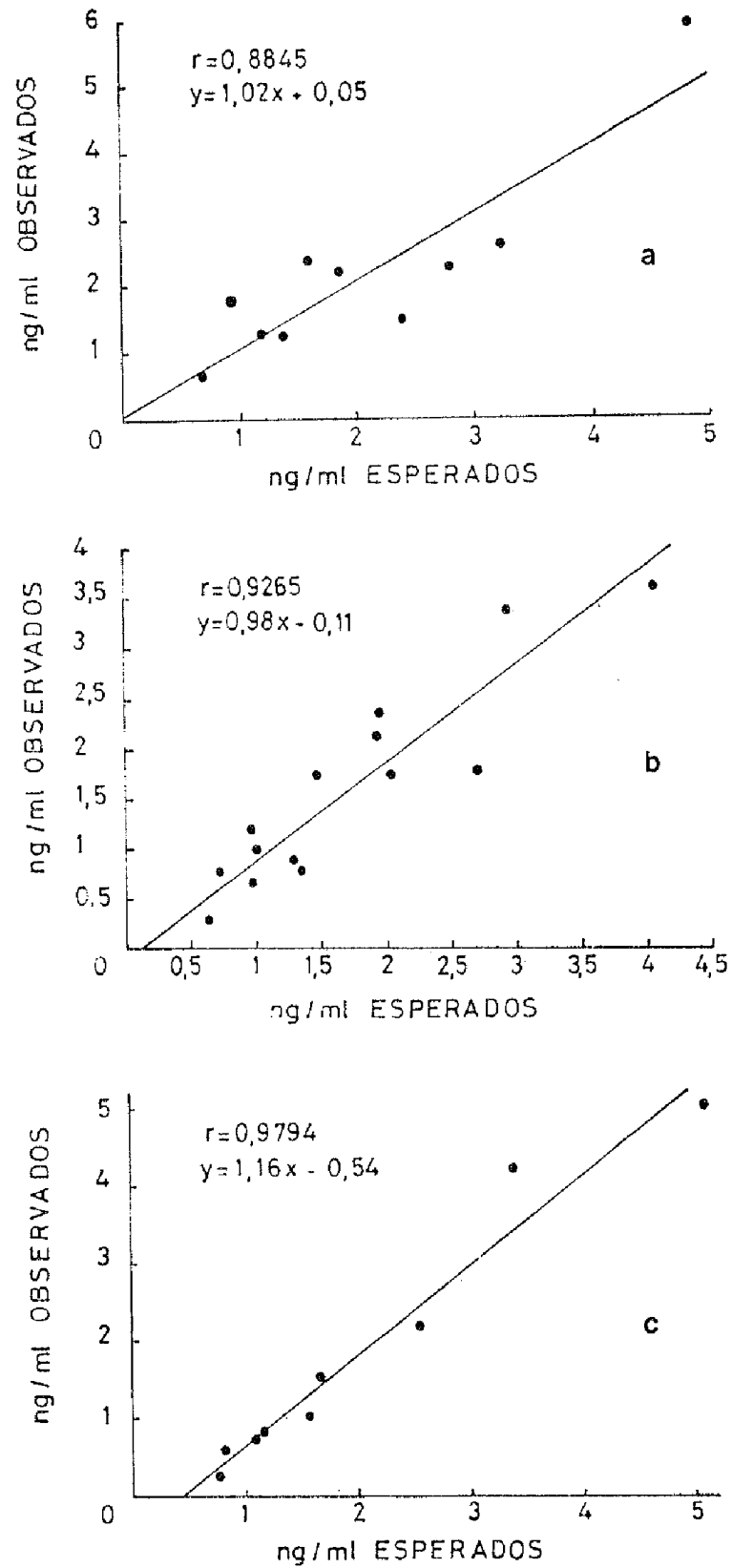


FIG. 2.— Test de dilución: a) testosterona, b) 11-cetotestosterona, y c) 17β-estradiol.

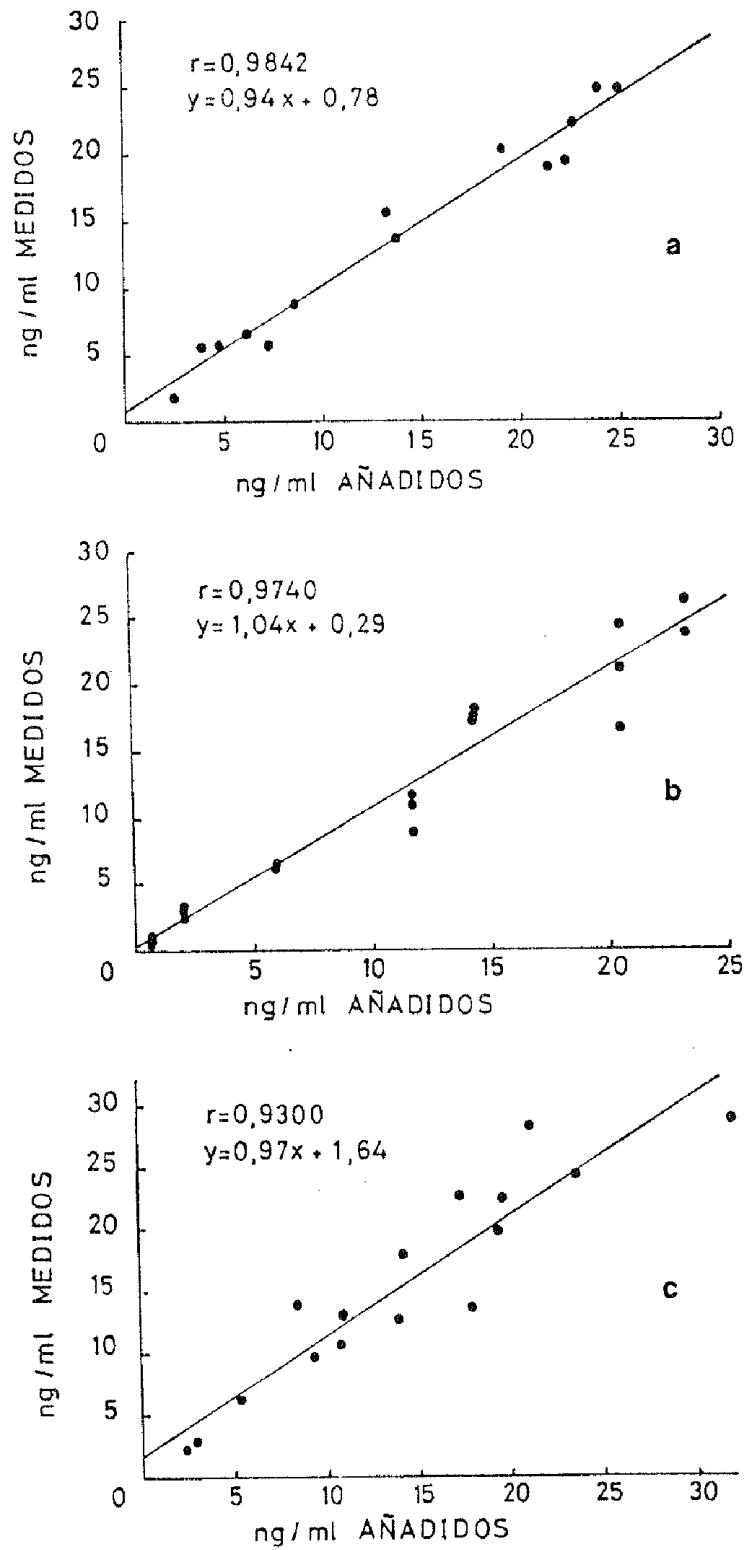


FIG. 3. — Test de sobrecarga: a) testosterona, b) 11-cetotestosterona, y c) 17β-estradiol.

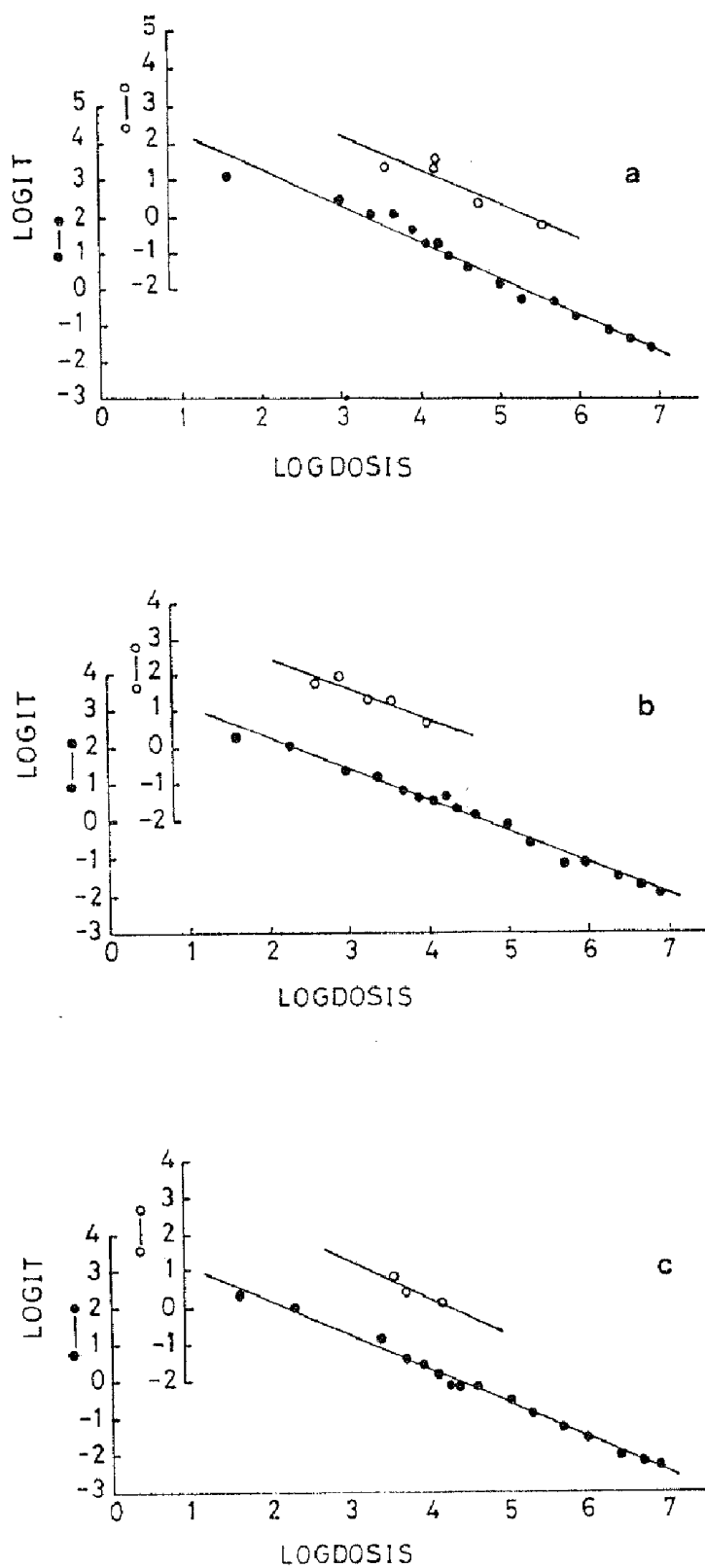


FIG. 4.— Curva estándar del ensayo (●—●) y curva estándar construida a partir de una serie de diluciones de plasma (○—○): a) testosterona, b) 11-cetotestosterona, y c)  $17\beta$ -estradiol.

bueno (ANOVA,  $p < 0,01$ ) y la pendiente y origen de coordenadas no difirieron de 1 y 0, respectivamente (t-Student,  $p < 0,05$ ). Los coeficientes de correlación fueron 0,984 para la testosterona, 0,926 para la 11-cetotestosterona y 0,930 para el 17  $\beta$ -estradiol.

Por otra parte, con los plasmas diluidos, se construyó una curva con transformación logit y su pendiente se comparó con la de la curva estándar mediante un análisis de la covarianza (fig. 4). No se observaron diferencias significativas entre las pendientes en ningún caso ( $p < 0,05$ ), manifestándose un buen paralelismo entre las curvas.

## DISCUSIÓN

Aunque los anticuerpos de esteroides son muy específicos para la sustancia contra la cual se ha obtenido, siempre existe el riesgo de la aparición de fenómenos de reacción cruzada con otros esteroides. Por ello, es preciso extraer y purificar los esteroides plasmáticos a estudiar, como paso previo al R.I.A., de cara a aumentar al máximo la especificidad.

En el presente estudio, la purificación se realizó por cromatografía en columna, utilizando Sephadex LH-20, obteniéndose buenas recuperaciones de testosterona ( $85,2 \pm 0,4 \%$ ;  $n = 120$ ) y 11-cetotestosterona ( $88,7 \pm 0,6 \%$ ;  $n = 182$ ); no obstante, la recuperación del 17  $\beta$ -estradiol fue sensiblemente menor ( $71,6 \pm 0,5 \%$ ;  $n = 92$ ), aunque concuerda con los resultados obtenidos por otros autores (WU y LUNDI, 1971). MCGREGOR III *et al.* (1981), sin usar el paso cromatográfico, obtienen valores similares de recuperación, por lo que cabe pensar que la pérdida de este esteroide se produce en la extracción, puesto que es la hormona más polar; esto concuerda con el hecho de que, en estudios realizados con hormona estándar, cromatografiada directamente, se obtienen recuperaciones del orden de 80-90 % (PRAT, 1985).

Uno de los requerimientos del R.I.A. es utilizar un buen método de separación de la fracción ligada de la libre. En la mayoría de los R.I.A. para esteroides, el método utilizado es el del carbón activo recubierto con dextrano (WU y LUNDY, 1971; ABRAHAM *et al.*, 1977; SIMPSON y WRIGHT, 1977; LAMBA *et al.*, 1982; BAYNES y SCOTT, 1985); en este estudio se ha utilizado el polietilenglicol para favorecer la precipitación de la fracción ligada (FOSTIER *et al.*, 1982). Se demuestra que el método es bueno, debido a que se obtuvieron valores muy bajos de interferencias no específicas ( $\leq 1 \%$ ) y, por tanto, los resultados no son alterados.

Las curvas estándar se construyeron mediante transformación logit con el fin de linealizar la curva. De esta manera se facilita la lectura, por interpolación, de las muestras desconocidas. Cada curva presentó unos coeficientes de correlación del orden de  $-0,99$ , y las pendientes mostraron poca variación

(cuadro I), sugiriéndose así una buena precisión entre las curvas estándar de distintos ensayos. No obstante, este tipo de curva presenta ciertos inconvenientes, como el de que los extremos de la recta son los más imprecisos, ya que presentan los intervalos de confianza más amplios (CHARD, 1978), por lo que, conviene diluir o concentrar las muestras con el fin de intentar que los valores medidos estén lo más cerca posible de la parte central de la recta.

La sensibilidad del ensayo fue satisfactoria para las tres hormonas ensayadas, presentándose más sensible el R.I.A. de  $17\beta$ -estradiol. No obstante, la sensibilidad se puede aumentar o disminuir por varios métodos (CHARD, 1978), según las necesidades del investigador.

La especificidad del ensayo depende mayoritariamente de la especificidad del anticuerpo, como ya se mencionó anteriormente. Ésta fue buena para la 11-cetotestosterona y  $17\beta$ -estradiol que presentaron bajo porcentaje de reacción cruzada (cuadro II). Sin embargo, en el caso de la testosterona, el anticuerpo mostró reacción cruzada con la 11-cetotestosterona (31 %) y  $5\alpha$ -dihidrotestosterona (40,7 %). De esta última hormona no existen referencias de que se encuentre en el plasma de los peces; la 11-cetotestosterona, en cambio, sí se encuentra, siendo una de las hormonas más importantes en los machos. No obstante, su reacción cruzada se puede obviar, ya que se ha observado que, en la lubina, cuando las concentraciones de testosterona son máximas, las de 11-cetotestosterona son mínimas (PRAT, 1985).

La precisión de los ensayos fue aceptable, no variando excesivamente de los márgenes propuestos por CHARD (1978), y está de acuerdo con otros autores (BURKE *et al.*, 1984; SCHULTZ, 1984; KIME y DOLBEN, 1985). Por regla general, la precisión intraensayo suele ser mayor que la interensayo (ABRAHAM, 1974), aunque, en este estudio, son similares en el caso de la testosterona.

La exactitud del ensayo, definida como el grado en que la muestra estudiada se acerca al valor verdadero (CHARD, 1978), fue satisfactoria, ya que los coeficientes de correlación y de regresión son cercanos a la unidad, lo que sugiere que los valores medidos en el ensayo se corresponden con los que realmente existen en el plasma; los resultados también señalan la no existencia de cantidades significativas de sustancias en el plasma de lubina que puedan interferir en el ensayo. Por otro lado, al no encontrarse diferencias significativas entre las pendientes de la curva estándar y de la curva construida a partir de una serie de diluciones plasmáticas, se deduce que la hormona medida en el plasma es inmunológicamente idéntica a la utilizada como estándar.

Al comparar nuestros resultados con los obtenidos por otros autores, observamos que, para la testosterona y 11-cetotestosterona (cuadro IV) fueron mucho menores que los obtenidos en trucha y otros salmónidos (FOSTIER *et al.*, 1982; FOSTIER *et al.*, 1984; SCHULTZ, 1984; BAYNES y SCOTT, 1985; MORRISON *et al.*, 1985), aunque estuvieron de acuerdo con los observados en especies marinas (DINDO y MCGREGOR III, 1981; MCGREGOR III *et al.*, 1981; SHUKOVSKI *et al.*, 1984) y en otras especies de agua dulce como *Heteropneustes fossilis* (LAMBDA *et al.*, 1982) e *Ictalurus nebulosus* (BURKE *et al.*, 1984). La única referencia en-

contrada acerca de los niveles de esteroides en lubina es concordante con nuestros resultados (LE BAIL y FOSTIER, 1984).

Los resultados que hallamos, referentes al  $17\beta$ -estradiol, al ser comparados con los presentados por otros autores en truchas, en unos casos fueron inferiores (VAN BOHEMEN y LAMBERT, 1981; SCOTT *et al.*, 1983; LOU *et al.*, 1984; SCHULTZ, 1984), mientras que, otros, fueron similares (BROMAGE *et al.*, 1982; WHITEHEAD *et al.*, 1983); también fueron parejos en salmón (MORRISON *et al.*, 1985), en otras especies de agua dulce (LAMBA *et al.*, 1982; BURKE *et al.*, 1984) y en algunas especies marinas (DINDO y MCGREGOR III, 1981; MCGREGOR III *et al.*, 1981; KADMON *et al.*, 1984; SHUKOVSKI *et al.*, 1984).

Estas diferencias entre las distintas especies son debidas seguramente a la diversidad existente dentro del grupo de los peces, al no existir cepas seleccionadas de cada una; por tanto, las diferencias no pueden atribuirse al ensayo en sí, el cual debe ser validado individualmente para cada especie.

En conclusión, en el presente trabajo se ha validado el radioinmunoensayo de testosterona, 11-cetotestosterona y  $17\beta$ -estradiol en plasma de lubina, presentándose sensible, específico, preciso y exacto.

## AGRADECIMIENTO

Al Dr. A. FOSTIER del Laboratorio de Physiologie des Poissons (I.N.R.A.) de Rennes (Francia), por habernos donado gentilmente los anticuerpos necesarios para los ensayos.

## BIBLIOGRAFÍA

- ABRAHAM, G. E. — 1973. Radioimmunoassay of plasma steroid hormones. In: *Modern methods of steroid analysis*. Ed. Eich Heftmann. Academic Press. New York. pp. 451-470.
- 1974. Radioimmunoassay of steroids in biological materials. *Acta Endocrinol. (Suppl. 153) (Kbh)*, 75: 1-42.
- ABRAHAM, G. E., F. S. MANLIMOS y R. GARZA. — 1977. *Radioimmunoassay of steroids*. In: *Handbook of radioimmunoassay*. G. E. Abraham, ed. Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 591-656.
- ANDERSON, D. S., B. R. HOPPER, B. L. LASLEY y S. S. C. YEN. — 1976. A simple method for the assay of eight steroids in small volumes of plasma. *Steroids*, 28 (2): 179-196.
- BAYNES, S. M. y A. P. SCOTT. — 1985. Seasonal variations in parameters of milt production and in plasma concentration of sex steroids of male rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 57 (1): 150-160.
- BERSON, S. A. y R. S. YALOW. — 1959. Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. *J. Clin. Invest.*, 38: 1966.
- BROMAGE, N. R., C. WHITEHEAD y B. BRETON. — 1982. Relationship between serum levels of gonadotropin, oestradiol-17 $\beta$  and vitellogenin in the control of ovarian development in the rainbow trout. II. The effects of alterations in environmental photoperiod. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 47 (3): 366-376.
- BURKE, M. G., J. F. LEATHERLAND y J. P. SUMPTER. — 1984. Seasonal changes in serum testosterone, 11-ketotestosterone and 17 $\beta$ -estradiol levels in the brown bullhead, *Ictalurus nebulosus* Lesueur. *Can. J. Zool.*, 62: 1195-1199.
- CHARD, T. — 1978. *An introduction to radioimmunoassay and related techniques*. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. T. S. Work y E. Work, eds. North Holland Publishing Co. Amsterdam.
- COOK, A. F., N. E. STACEY y R. E. PETER. — 1980. Perioviulatory changes in serum cortisol levels in the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 40 (4): 507-510.
- DINDO, J. J. y R. MCGREGOR III. — 1981. Annual cycle of serum gonadal steroids and serum lipids in stripped mullet. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 110: 403-409.
- FOSTIER, A., C. WEIL, M. TERQUI, B. BRETON y B. JALABERT. — 1978. Plasma estradiol-17 and gonadotropin during ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.*, 18: 929-936.
- FOSTIER, A., R. BILLARD, S. BRETON, M. LEGENDRE y S. MARLOT. — 1982. Plasma 11-oxotestosterone and gonadotropin during the beginning of spermatation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 46 (4): 428-434.
- FOSTIER, A., B. JALABERT, R. BILLARD, B. BRETON y Y. ZOHAR. — 1983. The gonadal steroids. In: *Fish Physiology*, Vol. IX, Part A. Edited by W. S. Hoar, D. J. Randall y E. M. Donaldson. Academic Press. New York: pp. 277-372.
- IDLER, D. R., ed. — 1972. *Steroids in nonmammalian vertebrates*. Academic Press. New York.
- IDLER, D. R., P. J. SCHMIDT y A. P. RONALD. — 1960. Isolation and identification of 11-ketotestosterone in salmon plasma. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 38: 1053-1057.
- KADMON, G., Z. YARON y H. GORDIN. — 1984. Patterns of estradiol and 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroprogesterone in female *Sparus aurata*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 53 (3): 453.
- KIME, D. E. y I. P. DOLBEN. — 1985. Hormonal changes during induced ovulation of the carp, *Cyprinus carpio*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 58 (1): 137-149.
- LAMBA, V. J., S. V. GOSWAMI y B. I. SUNDARAJ. — 1982. Radioimmunoassay for plasma cortisol, testosterone, estradiol-17 $\beta$  and estrone in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch): development and validation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 47 (2): 170-181.
- LE BAIL, P. Y. y A. FOSTIER. — 1984. Techniques d'identification du sexe et d'estimation de la maturité sexuelle chez les poissons vivans. In: *L'aquaculture du bar et des sparidés*. G. Barnabé et R. Billard, Ed. I.N.R.A. Publish. Paris: pp. 45-52.
- LOU, S. W., K. AIDA, I. HANYU, K. SAKAI, M. NOMURA, M. TANAKA y S. TAZAKI. — 1984. Endocrine profiles in the females of twice-annually spawning strain of rainbow trout. *Aquaculture*, 43: 13-22.

- MCGREGOR III, R., J. J. DINDO y J. H. FINUCANE. — 1981. Changes in serum androgens and estrogens during spawning in bluefish, *Pomatomus saltator*, and king mackerel, *Scomberomorus cavalla*. *Can. J. Zool.*, 59: 1749-1754.
- MORRISON, P. F., J. F. LEATHERLAND y R. A. SONSTEGARD. — 1985. Plasma cortisol and sex steroids levels in great lakes coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum) in relation to fecundity and egg survival. *Comp. Biochem. Physiol.*, 80 A (1): 61-68.
- PRAT, F. — 1985. *Radioinmunoensayo de esteroides plasmáticos en lubina* (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aplicación para la testosterona, 11-cetotestosterona, 17-estradiol y 17 $\alpha$ -hidroxi-20 $\beta$ -dihidroprogesterona*. Tesina. Facultad de Biología, Universidad de Barcelona.
- ROSENBLUM, P. M., L. YAMADA, J. P. CALLARD y G. V. CALLARD. — 1985. Validation of radioimmunoassay systems for the measurement of 11-keto- and 11 $\beta$ -hydroxytestosterone in teleost blood. *Comp. Biochem. Physiol.*, 82 B (4): 659-665.
- SCHULTZ, R. — 1984. Serum levels of 11-oxotestosterone in male and 17 $\beta$ -estradiol in female rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during first reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 56 (1): 111-120.
- SCOTT, A. P., V. J. BYE, S. M. BAYNES y J. R. C. SPRINGATE. — 1980. Seasonal variations in plasma concentrations of 11-ketotestosterone and testosterone in male rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, 17: 495-505.
- SHUKOVSKI, L., H. GORDIN y Z. YARON. — 1984. Levels of circulating steroids in immature and maturing mullets (*Mugil cephalus*) reared in saltwater ponds in Elat. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 53 (3): 453.
- SIMPSON, T. H. y R. S. WRIGHT. — 1977. A radioimmunoassay for 11-oxotestosterone: its application in the measurement of levels in blood serum of rainbow trout (*S. gairdneri*). *Steroids*, 29: 383-398.
- SOWER, S. A. y C. B. SCHRECK. — 1982. Steroid and thyroid hormones during sexual maturation of coho salmon (*O. kisutch*) in seawater or fresh water. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 47 (1): 42-53.
- VAN BOHEMEN, Ch. G. y J. G. D. LAMBERT. — 1981. Estrogen synthesis in relation to estrone, estradiol and vitellogenin plasma levels during the reproductive cycle of the female rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 45 (1): 105-114.
- VAN DER KRAAK, G., H. M. DYE, E. M. DONALDSON y G. A. HUNTER. — 1985. Plasma gonadotropin, 17 $\beta$ -estradiol, and 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one levels during luteinizing hormone-releasing hormone analogue and gonadotropin induced ovulation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Can. J. Zool.*, 63: 824-833.
- WHITEHEAD, C., N. R. BROMAGE y B. BRETON. — 1983. Changes in serum levels of gonadotropin, oestradiol-17 $\beta$  and vitellogenin during the first and subsequent reproductive cycles of female rainbow trout. *Aquaculture*, 34: 317-326.
- WU, C.-H. y L. E. LUNDY. — 1971. Radioimmunoassay of plasma estrogens. *Steroids*, 18 (1): 91-111.
- YALOW, R. S. y S. A. BERSON. — 1959. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature*, 184: 1648-1649.