

————— *Artículo original* —————

**Modelo general y cuatro ecuaciones para el
ajuste de curvas de calibración en RIA.
Comparación de resultados**

Recibido el 9 de diciembre de 2006

DÍEZ MONTORO, R.¹; SALABERT SALVADOR, M. T.¹,
J. L. MORENO FRIGOLS^{1,2*}

¹*Departamento de Química Física. Facultad de Farmacia.
Universidad de Valencia.*

²*Servicio de Radioisótopos. Hospital Clínico Universitario
de Valencia.*

RESUMEN

Se presenta un modelo teórico para la justificación de las ecuaciones de los cuatro parámetros y logarítmico-logística, utilizadas empíricamente en el ajuste de las curvas de calibración en RIA. De dicho modelo se deducen otras dos ecuaciones. Se analiza el ajuste de 192 curvas de RIA para las cuatro ecuaciones y se interpretan los resultados en términos de las posibles características de enlace en la unión antígeno-anticuerpo.

Palabras clave: Ecuación cuatro parámetros.—Inmunoanálisis.—Reacción antígeno-anticuerpo.

* Doctor José Luis Moreno Frigols.
Departamento de Química Física. Facultad de Farmacia.
Avda. Vicent Andrés Estellés, s/n. 46100 Burjassot (Valencia).
e.mail: Jose.L.Moreno@uv.es

ABSTRACT

General model and four equations for the fit of calibration curves in RIA. Comparison of results

A theoretical model for the justification of the equations of the four parameters and logarithmic-logistic, used empirically in the fit of the calibration curves in RIA, is presented. From this model other two equations are deduced. The fit of 192 curves of RIA is analyzed for the four equations and the results are interpreted in terms of the possible characteristics of binding in the union antigen-antibody.

Key words: Equation four parameters.—Immunoanalysis.—Antigen-antibody reaction.

INTRODUCCIÓN

En el terreno bioquímico-fisiológico es frecuente la existencia de sustancias cuyas concentraciones en los fluidos biológicos son demasiado pequeñas para ser detectadas por las técnicas espectrofotométricas. Por otra parte, muchas de ellas se encuentran mezcladas con otras de estructura muy semejante (1). La determinación analítica de tales sustancias suponía un doble reto, ya que se necesitaba una técnica de gran sensibilidad y especificidad. Yallow y Berson resolvieron el problema poniendo a punto, para la valoración de la insulina, un método que combina la capacidad de la radioquímica para la detección de cantidades muy pequeñas, con la cualidad de distinguir selectivamente entre compuestos muy parecidos, característica de las reacciones antígeno-anticuerpo.

El fundamento de la técnica consiste en añadir a la muestra una cantidad fija de la sustancia objeto de estudio marcada y un anticuerpo específico frente a ella. Puesto que la presencia del átomo marcador no altera (teóricamente) las propiedades químicas de la sustancia, el anticuerpo reacciona indiscriminadamente con la no marcada (presente en la muestra) y con la marcada (añadida). Si se aísla el complejo antígeno-anticuerpo del resto y se mide su radiactividad, el valor de esta será una función decreciente de la concentración de la muestra.

La determinación de la concentración de las muestras problemas se realiza mediante su lectura en la correspondiente curva de cali-

brado, la cual es siempre decreciente, puesto que una cantidad grande de sustancia en la muestra tenderá a saturar el anticuerpo, por lo que la actividad unida a éste será baja. Si la cantidad es pequeña, ocurrirá lo contrario.

Casi todos los análisis con grandes cantidades de muestras en química clínica usan los cálculos de resultados automatizados, que aumentan el rendimiento eliminando el proceso manual de la interpolación, el error del observador y disminuyendo la presencia de errores de la transcripción. Dicha curva, basada en los puntos obtenidos al medir muestras patrones, necesita de un ajuste de cuya bondad depende la exactitud del valor de la concentración problema.

El modelo no lineal más usado en inmunoanálisis es el modelo logístico de los Cuatro Parámetros (4). Puede ser escrito de varias formas; siendo una forma común la que se muestra en la Ecuación 1.

$$y = \frac{D - A}{1 + (x/C)^b} + A \quad \text{Ec. 1}$$

En esta ecuación x es la concentración de una muestra, y y la respuesta analítica (actividad cpm para el caso del RIA) correspondiente a dicha concentración. Cuando $x = 0$ y se hace igual a D , y cuando x tiende a infinito y se acerca asintóticamente a A según se muestra en la Figura 1. La sustitución de $x = C$ en la ecuación produce $y = (D+A)/2$, que es intermedio entre la ordenada en el origen y la asíntota.

Este modelo ha tenido éxito porque simula las características físicas reales de sistemas de radioinmunoanálisis. No obstante, hasta que el uso de ordenadores no estuvo ampliamente extendido, la Ecuación 1 no se usó directamente. Su utilización pasaba por realizar una linealización mediante el uso de una nueva variable Y definida por:

$$Y = \frac{y - A}{D - A} \quad \text{a partir de la cual se obtenía:}$$

$$\text{logit}(Y) = \ln\left(\frac{Y}{1 - Y}\right) = \ln\left(\frac{x}{C}\right)^b = \ln C^b - b \cdot \ln x \quad \text{Ec. 2}$$

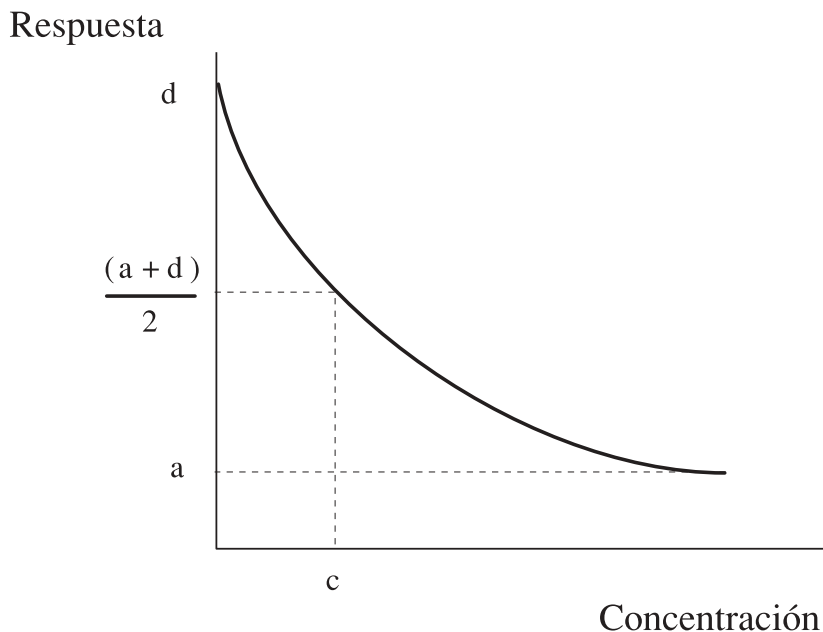


FIGURA 1. *Representación gráfica del modelo de los cuatro parámetros.*

Lógicamente antes de poder utilizar esta ecuación, se debe estimar el valor de los parámetros A y D. En el radioinmunoanálisis el valor de A coincide con las cuentas no específicas (NSB) y se puede estimar incluyendo un tubo sin el anticuerpo pero con el ligando marcado agregado. D se define como la respuesta medida para una concentración igual a 0. Con los radioinmunoanálisis comerciales, el reactivo no siempre está disponible para poder determinar fácilmente A. Si se hace una mala estimación de A y D, la Ecuación 2 no será una transformación lineal y los puntos del estándar, transformados al logit, no se ajustarán a una línea recta al representarse frente a la concentración.

OBJETIVO

Puesto que la ecuación de cuatro parámetros, utilizada ampliamente, se justifica únicamente en función de su capacidad para ajus-

tarse a los resultados obtenidos en las determinaciones analíticas, es nuestro propósito elaborar un modelo general que deduzca teóricamente dicha ecuación y analizar la calidad de los ajustes obtenidos para los distintos casos particulares a que da lugar.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado los resultados obtenidos en el Servicio de Isótopos del Hospital Clínico de Valencia para un total de 192 curvas de calibración correspondientes a ocho técnicas radioinmunoanalíticas: Aldosterona, Androstendiona, Gastrina, Glucagón, Insulina, Osteocalcina, Péptido C y TSI. Dichos resultados se analizaron mediante el programa informático Statistica, verificando el ajuste de las cuentas por minuto (cpm) frente a la concentración de los patrones para las ecuaciones mencionadas a continuación. Como criterios para la calidad del ajuste se utilizaron el coeficiente de correlación (r) y la suma de los cuadrados de los residuales (σ)

Ecuación de los tres parámetros (E3P):
$$y = E + \frac{F}{1 + \frac{x}{G}}$$

Ecuación de los cinco parámetros (E5P):
$$y = E + \frac{H}{1 + \frac{x}{K}} + \frac{J}{1 + \frac{x}{L}} + M$$

Ecuación de los cuatro parámetros (E4P):
$$y = A \frac{D - A}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^b}$$

Ecuación logarítmico-logística (logit-log) (ELL):

$$\text{Logit}\left(\frac{B}{B_0}\right) = b * \text{Ln}C - b * \text{Ln}x$$

RESULTADOS

En el Anexo presentamos un grupo de tablas en los que se dan los resultados experimentales en cpm (y) obtenidos en las medidas de cada muestra y su variación con la concentración (x) junto con la desviación estándar y del coeficiente de regresión para cada una de las curvas.

DISCUSIÓN

Como se indicó anteriormente, es nuestro propósito elaborar un modelo general que deduzca teóricamente la ecuación de los cuatro parámetros y analizar la calidad de los ajustes obtenidos para los distintos casos particulares a que da lugar.

Supóngase que una macromolécula P, que tiene n sitios de unión, reacciona con una sustancia de bajo peso molecular, A. La unión a uno de los sitios puede expresarse como:



Cuya constante de equilibrio es:

$$K_M = \frac{(PA)}{(P)(A)}$$

La mayoría de los métodos experimentales proporcionan solamente el número de moles de A enlazados a la macromolécula. Como la población es heterogénea, se obtiene un promedio:

$$\nu = \frac{(A)_{LIGADA}}{(P)_{TOTAL}}$$

donde $(P)_{TOTAL}$ es el número de moles de macromoléculas en cualquier forma (P,PA,PA₂,...).

Sabiendo que:

$$\begin{aligned} (A)_{LIGADA} &= (PA) + 2(PA_2) + 3(PA_3)+... \\ (P)_{TOTAL} &= (P) + (PA) + (PA_2)+... \end{aligned}$$

$$(PA) = K_1 (P)(A)$$

$$(PA_2) = K_1 K_2 (P)(A)^2$$

Se obtiene la expresión general para ν

$$\nu = \frac{K_1(A) + 2K_1K_2(A)^2 + \dots + n(K_1K_2\dots K_n)(A)^n}{1 + K_1(A) + K_1K_2(A)^2 + \dots + (K_1K_2\dots K_n)(A)^n}$$

Suponiendo que la unión de un ligando a uno de los sitios de una macromolécula «activa» tan fuertemente a los otros sitios que éstos se llenan inmediatamente, la ecuación anterior se reduce a una forma muy sencilla (12), ya que las concentraciones de todas las especies, excepto P y PA_n , serán despreciables. Por tanto, resulta:

$$\nu = \frac{nK(A)^n}{1 + K(A)^n}$$

$$\sigma = \frac{\nu}{n} = \frac{K(A)^n}{1 + K(A)^n} \quad (\text{Ecuación de Hill})$$

Si la ecuación de Hill se aplica a un sistema que contiene los ligandos M y Q, siendo $n = 2$, se supone que no quedan sitios sin ocupar y que no existen especies mixtas, resulta:

$$\sigma_M = \frac{K_M(M)^2}{K_M(M)^2 + K_Q(Q)^2}$$

σ_M representa la fracción de sitios ocupados por moléculas marcadas, y por tanto puede hacerse igual a B/B_0 , siendo B la actividad unida específicamente al anticuerpo, y B_0 el valor de B correspondiente a una concentración nula de antígeno no marcado.

$$\frac{B}{B_0} = \frac{K_M(M)^2}{K_M(M)^2 + K_Q(Q)^2} = \frac{1}{1 + \frac{K_Q(Q)^2}{K_M(M)^2}} = \frac{1}{1 + \frac{(Q)^2}{\frac{K_M(M)^2}{K_Q}}} \quad \text{Ec. 3}$$

Llamando x a la concentración de analito, resulta:

$$x = (Q) + (PQ) + (PQM) + 2(PQ_2) \approx (Q) + 2(PQ_2) = (Q) + 2K_0(P)(Q)^2 = (Q)(1 + 2KQ(P)(Q)) \quad \text{Ec. 4}$$

Introduciendo en Ecuación 3 el valor de (Q) obtenido de Ecuación 4 y agrupando las constantes se obtiene:

$$\frac{B}{B_0} = \frac{1}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^2}$$

B representa la actividad unida específicamente al anticuerpo, y por tanto, puede escribirse:

$$B = y - A$$

$$B_0 = D - A$$

Siendo:

y = Actividad medida en cpm

A = Actividad inespecífica medida en cpm

D = Actividad en cpm correspondiente a una muestra con $x = 0$

Se obtiene:

$$y = A + \frac{D - A}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^2}$$

El exponente 2 se ha obtenido suponiendo una cooperatividad positiva total. Como un caso más general puede tomar valores distintos de 2, resultando finalmente:

$$y = A + \frac{D - A}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^b} \quad \text{Ecuación de los cuatro parámetros (E4P)}$$

Suponiendo que los sitios de unión son idénticos e independientes, el exponente b se hace igual a 1, con lo que la E4P se transforma en:

$$y = E + \frac{F}{1 + \frac{x}{G}} \quad \text{Ecuación de los tres parámetros (E3P)}$$

Suponiendo que los sitios de unión de anticuerpo son distintos (más de una clase de sitios) e independientes, podrá hacerse un planteamiento análogo al anterior para cada uno de ellos, obteniéndose finalmente:

$$y = \frac{H}{1 + \frac{x}{K}} + \frac{J}{1 + \frac{x}{L}} + M \quad \text{Ecuación de los cinco parámetros (E5P)}$$

Si se introduce una nueva variable Y definida por $Y = \frac{y - A}{D - A}$, la E4P queda en la forma:

$$\frac{Y}{1 - Y} = \frac{1}{\left(\frac{x}{C}\right)^b} \quad \text{Ec. 3}$$

tomando logaritmos en ambos lados de la Ecuación 3, se obtiene la Ecuación 4:

$$\text{logit}(Y) = \ln\left(\frac{Y}{1 - Y}\right) = -\ln\left(\frac{x}{C}\right)^b = \ln C^b - b * \ln x \quad \text{Ec. 4}$$

$$\text{logit}\left(\frac{B}{B_0}\right) = -b * \ln x \quad \text{Ecuación logarítmico-logística (ELL)}$$

Este Modelo General teórico se ha elaborado en conexión con anteriores publicaciones (5-11), y como resumen podemos decir que a partir de él se obtienen cuatro ecuaciones:

- Ecuación de los cuatro parámetros (E4P): Aplicable a reacciones en las que los sitios de unión del anticuerpo son idénticos e interaccionantes.
- Ecuación de los tres parámetros (E3P): Aplicable a reacciones en las que los sitios de unión del anticuerpo son idénticos e

independientes. Se obtiene como un caso particular de la E4P haciendo $b = 1$.

- Ecuación de los cinco parámetros (E5P): Aplicable a reacciones en las que los sitios de unión del anticuerpo son distintos e independientes. Se obtiene a partir de la E3P suponiendo que hay más de una clase de sitios independientes.
- Ecuación logit-log (ELL): Es una modificación de la E4P utilizable para linealizar las gráficas.

CONCLUSIONES

La capacidad de las ecuaciones para ajustarse a los resultados analíticos se ha comparado entre sí utilizando 192 curvas estándar de RIA correspondientes a ocho sustancias diferentes. En la tabla siguiente se muestra el número de veces que una determinada ecuación ha producido el mejor ajuste (atendiendo al parámetro r) para cada sustancia:

Sustancia	E3P	E4P	E5P	ELL
Aldosterona	0	13	5	0
Androstendiona	0	6	31	0
Gastrina	0	15	2	0
Glucagón	0	5	12	0
Insulina	0	0	22	0
Osteocalcina	0	5	12	0
Péptido C	0	14	5	0
TSI	0	34	3	0

Llama la atención el hecho de que las ecuaciones de tres parámetros y logit-log no producen el mejor ajuste en ningún caso. Ello puede justificarse por motivos diferentes:

- La ecuación de tres parámetros puede considerarse como un caso particular de la de cuatro parámetros en la que $b = 1$, lo

cual exige que los sitios de unión del anticuerpo sean idénticos e independientes. Los resultados obtenidos parecen indicar que estas condiciones no se cumplen en ninguno de los casos estudiados.

- La ecuación logit-log es una transformación de la de cuatro parámetros, por lo que teóricamente cabe esperar que los ajustes por ambas sean concordantes. No ocurre así en la práctica, lo cual puede deberse a que, para su aplicación, es necesario conocer los valores exactos de B_0 y D , y los resultados obtenidos sólo permiten disponer de valores puntuales de tales parámetros afectados de su correspondiente error.
- La ecuación de cinco parámetros resulta preferible en los casos de Androstendiona, Insulina, Glucagón y Osteocalcina, sustancias para las que cabe esperar que sus anticuerpos presenten dos sitios de unión distintos e independientes.
- La ecuación de cuatro parámetros resulta preferible en los casos de TSI (Anticuerpo anti receptor de la TSH), Gastrina, Péptido C y Aldosterona, sustancias para las que cabe esperar que sus anticuerpos presenten dos sitios de unión idénticos y dependientes.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) MORENO FRIGOLS, J. L. (2001): Inmunoanálisis, Cinética y Difusión. En el Libro Homenaje al Profesor Joaquín Moreno Clavel. Universidad Politécnica de Cartagena.
- (2) YALOW, R. S. and BERSON, S. A. (1970): General aspects of radioimmunoassay procedures. En: *In vitro* procedures with radioisotopes in medicine. 455-482. Viena.
- (3) MILES, L. E. M. and HALES, C. N. (1970): Immunoradiometric assay procedures: New developments. En: *In vitro* procedures with radioisotopes in medicine. 483-490. Viena.
- (4) CHAN, D. W. (1987): Immunoassay: A Practical Guide. Academic Press, Inc., 129-147.
- (5) OLIVAS ARROYO, C. and MORENO FRIGOLS, J. L. (2001): Influence of viscosity and ionic strength on the reaction kinetics of aldosterone and androstendione and their specific antibodies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26: 547-562.

- (6) GARCÍA GÓMEZ, J.; PORCAR PONS, M. and MORENO FRIGOLS, J. L. (2002): Some kinetic aspects in the immunoradiometric assay of insulin-like growth factor binding protein-3. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29: 307-315.
- (7) GARCÍA GÓMEZ, J. and MORENO FRIGOLS, J. L. (2002): Kinetics and equilibrium in the immunoradiometric assay (IRMA) of Thyroglobuline, *J. Immunoassay & Immunochemistry.* 23(3): 347-367.
- (8) OLIVAS ARROYO, C.; DUART DUART, M. J. and MORENO FRIGOLS, J. L. (2002): Kinetics and equilibrium in insulin radioimmunoassay, *J. Immunoassay & Immunochemistry.* 23(4): 407-428.
- (9) GARCÍA GÓMEZ, J.; PORCAR PONS, M. and MORENO FRIGOLS, J. L. (2004): Kinetics aspects in the immunoradiometric assay (IRMA) of human Interleukin-1 β (IL-1 β). *Chemistry: An Indian Journal.* 1(6): 451-457.
- (10) DÍEZ MONTORO, R.; SALABERT SALVADOR, M. T. and MORENO FRIGOLS, J. L. (2005): Kinetics of androstendione - radioactive immunocomplex substitution reaction. *J. Immunoassay & Immunochemistry.* 26(2): 97-107.
- (11) DÍEZ MONTORO, R.; SALABERT SALVADOR, M. T. and MORENO FRIGOLS, J. L. (2006): The influence of reactant concentration and reaction médium ionic strength, viscosity, and temperature in the immunocomplex substitution reaction in the radioimmunoassay of aldosterone. *Labmedicine.* Aceptado.
- (12) VAN HOLDE, K. (1979): *Bioquímica Física.* Ed. Alambra.

ANEXO

- x: Concentración de las muestras patrones.
- y: Actividad en cpm correspondiente a cada muestra para diferentes curvas. A cada una de ellas corresponde el número que acompaña a y.

TABLA I: *Aldosterona*

x								E3P		E4P		E5P		ELL
	0	25	50	100	200	600	1200	σ	r	σ	r	σ	r	r
y1	3754	3446	3342	2811	2408	1597	953	33543	0,9974	25850	0,9979	33543	0,9974	0,9927
y2	4344	3811	3359	2821	2596	1789	1155	130917	0,9912	61997	0,9958	27346	0,9982	0,9906
y3	3774	3431	3078	2482	2325	1509	1135	66291	0,9942	58732	0,9948	49522	0,9956	0,9923
y4	2127	2036	1856	1531	1376	1137	955	17616	0,9927	13997	0,9942	17616	0,9927	0,963
y5	2445	2428	2220	1716	1666	1216	846	76846	0,9829	76841	0,9828	66992	0,9851	0,9264
y6	2617	2484	2190	1525	1257	1066	846	112535	0,9814	33049	0,9945	112535	0,9814	0,9448
y7	4399	4200	3850	3529	3119	2025	1279	25064	0,9984	13391	0,999	25064	0,9844	0,9944
y8	3501	3460	3268	2600	2365	1455	1056	78789	0,9931	71415	0,9937	78789	0,9931	0,9713
y9	2775	2613	2365	1930	1770	1212	841	36203	0,9941	33841	0,9945	36203	0,9941	0,9889
y10	2602	2154	2154	1606	1551	1141	646	115425	0,9782	70480	0,9867	54036	0,9899	0,9669
y11	2526	1885	1808	1581	1198	1026	631	82708	0,9824	32514	0,9931	36333	0,9923	0,9929
y12	4261	3841	3633	3044	2636	1683	1151	25599	0,9984	16871	0,9989	14414	0,9991	0,9973
y13	2230	1954	1912	1469	1299	927	654	26827	0,9932	25728	0,9935	26827	0,9932	0,9877
y14	1824	1649	1567	1522	1254	915	567	13180	0,9945	5720	0,9976	13180	0,9945	0,9814
y15	5239	5104	4471	4184	3374	1959	1436	72376	0,9973	62582	0,9976	72376	0,9973	0,9835
y16	4237	4106	3805	3553	2723	1620	1113	46337	0,9975	18374	0,999	46337	0,9975	0,9968
y17	2718	2539	2241	2070	1848	1038	775	29972	0,9953	26982	0,9958	29972	0,9954	0,9918
y18	2968	2849	2825	2639	2249	1334	943	24025	0,9969	3114	0,9996	24025	0,9969	0,9919

TABLA II: *Gastrina*

x								E3P		E4P		E5P		ELL
	0	32,6	65,2	131	261	523	1045	σ	r	σ	r	σ	r	r
y1	2934	2750	2426	2031	1334	864	471	28737	0,9974	6773	0,9993	28737	0,9974	0,9986
y2	2671	2598	2447	1884	1212	742	415	92006	0,991	8268	0,9992	92006	0,991	0,9968
y3	2545	2290	1804	1662	1200	627	311	43635	0,9947	41535	0,9949	43635	0,9947	0,9854
y4	7437	6402	6021	4552	2902	1645	1175	319301	0,9956	132104	0,9982	319301	0,9956	0,994
y5	7068	6579	6174	4440	2802	1399	813	621441	0,992	63069	0,9992	621441	0,992	0,9975
y6	7182	6632	6213	4579	2772	1291	863	713081	0,9912	54131	0,9993	713081	0,9912	0,9961
y7	6532	5756	5487	3935	2541	1470	881	325186	0,9945	104866	0,9982	325186	0,9945	0,9942
y8	7162	7039	6298	4716	3194	2261	1206	569963	0,9917	186481	0,9973	569963	0,9917	0,9825
y9	7674	6570	5896	4339	3092	1903	1298	104075	0,9985	45032	0,9994	104075	0,9985	0,9987
y10	5614	5114	4753	3705	2675	1608	907	70191	0,9982	18518	0,9995	70191	0,9982	0,9976
y11	5194	4369	4205	3164	2076	1342	735	107821	0,9968	88406	0,9974	107821	0,9968	0,9902
y12	3715	3359	2920	2033	1524	1116	512	94296	0,9945	77958	0,9955	94296	0,9945	0,9917
y13	6248	6135	5446	4386	3125	1674	1563	563871	0,9881	117824	0,9975	563871	0,9881	0,9753
y14	6142	4991	4568	3709	2418	1954	763	213268	0,995	161349	0,9962	143618	0,9966	0,9757
y15	5072	4441	3846	2932	1759	1057	424	55018	0,9985	14538	0,9996	55018	0,9985	0,9938
y16	4485	3751	3262	2705	1962	1253	783	10866	0,9995	4138	0,9998	2978	0,9999	0,9964
y17	4061	3479	2992	2115	1382	926	551	49357	0,9977	9577	0,9996	49357	0,9977	0,999

TABLA III: *Androstendiona*

x							E3P		E4P		E5P		ELL
	0	0,15	0,4	1,5	4	10	σ	r	σ	r	σ	r	r
y1	12793	11260	9990	7170	5319	3709	201267	0,9984	24860	0,9998	24402	0,9998	0,9996
y2	15787	13510	11625	8811	6345	3730	1484103	0,9927	87788	0,9995	1118	0,9999	0,933
y3	11524	9937	8217	5856	4327	2508	589436	0,995	174196	0,9985	10513	0,9999	0,9949
y4	9265	8167	6889	5261	3785	2415	343173	0,995	67263	0,999	20815	0,9997	0,9965
y5	11716	9762	9120	6188	4662	2698	785405	0,9932	272022	0,9976	253749	0,9978	0,9883
y6	11217	9425	8868	5556	4250	2880	495259	0,9954	433679	0,9959	186589	0,9983	0,9914
y7	12082	9979	8771	6268	4461	2734	732338	0,9941	13847	0,9999	33140	0,9997	0,9948
y8	11422	10525	9415	7044	4595	3081	52014	0,9995	26753	0,9998	19687	0,9998	0,9995
y9	21229	18310	16482	11129	8666	6045	824840	0,9977	494588	0,9998	434102	0,9988	0,9976
y10	12212	10289	9538	7547	5556	3288	1199678	0,9888	16278	0,9998	22765	0,9998	0,9825
y11	13285	11362	10439	7411	6434	4495	818044	0,9926	442018	0,996	334454	0,997	0,9934
y12	12586	11221	9858	7375	4856	3229	240264	0,9982	36865	0,9997	21968	0,9998	0,9987
y13	17143	14237	13556	8679	6434	4400	1283009	0,9948	1004213	0,9959	195987	0,9992	0,9913
y14	15780	12759	11282	7910	6135	3778	1590849	0,992	197369	0,999	232563	0,9988	0,9934
y15	15220	11805	10857	6810	5251	3555	1383702	0,9929	635691	0,9967	241041	0,9988	0,9927
y16	12541	10549	9161	6727	5079	3167	822210	0,9933	59232	0,9995	19003	0,9998	0,9954
y17	12313	11869	9419	7206	4777	2824	837597	0,9943	744889	0,9949	620778	0,9958	0,98
y18	17080	13801	12011	9386	6692	4526	2403310	0,9888	45368	0,9998	10955	0,9999	0,994
y19	11524	9937	8217	5856	4327	2508	589436	0,995	174196	0,9985	10513	0,9999	0,9949

TABLA III: *Androstendiona (continuación)*

							E3P		E4P		E5P		ELL
y20	16003	13804	12262	8923	6393	4214	648004	0,9968	11456	0,9999	29513	0,9999	0,9981
y21	15847	12901	11492	7995	5566	4179	757943	0,9963	136769	0,9993	0	0,9999	0,9982
y22	24103	21934	17499	13319	9606	6318	2554240	0,9947	1710236	0,9964	1036554	0,9979	0,9912
y23	17638	15664	12869	9993	7025	4773	1255667	0,9949	481198	0,9981	290574	0,9988	0,9957
y24	10474	9637	8771	6272	4886	3187	172583	0,9979	129286	0,9984	62735	0,9992	0,9982
y25	18421	15601	14139	10361	7443	4274	1806439	0,9936	76178	0,9997	144815	0,9995	0,9902
y26	12696	10673	9933	7816	5719	3853	1008951	0,9906	54986	0,9995	5417	0,9999	0,9989
y27	11146	9205	8949	6984	4774	3437	903637	0,9893	349145	0,9959	17577	0,9998	0,9811
y28	11396	9414	8040	6608	4205	2904	1283947	0,9873	264823	0,9974	192554	0,9981	0,9903
y29	14966	13715	11246	8917	6662	3336	2153802	0,9888	862640	0,9955	319896	0,9983	0,9843
y30	14649	13282	11975	10144	7646	5395	755736	0,9938	83465	0,9993	48351	0,9996	0,9956
y31	17793	15619	14767	10761	7588	5123	596398	0,9976	297542	0,9988	29398	0,9999	0,9935
y32	18038	15548	13941	10504	7431	5507	744740	0,9968	65963	0,9997	6727	0,9999	0,9989
y33	16550	14771	13092	8627	6832	4763	388678	0,9982	379690	0,9983	289711	0,9987	0,9968
y34	16427	14912	13320	9465	7074	4788	213167	0,999	112587	0,9995	36138	0,9998	0,9993
y35	15554	14282	12834	9483	6471	4000	133889	0,9994	2948	0,9999	393	0,9999	0,9988
y36	12965	11927	10445	7612	5156	3415	68934	0,9996	20247	0,9998	11851	0,9999	0,9995
y37	16025	13454	12057	9220	6492	4362	1326048	0,9931	29489	0,9998	24	0,9999	0,9951

TABLA IV: *Glucagón*

							E3P		E4P		E5P		ELL
x	0	31,25	62,5	125	500	1000	σ	r	σ	r	σ	r	r
y1	4726	3451	3024	2273	952,3	697	38564	0,998	24877	0,999	4176	1,000	0,997
y2	6895	5264	4617	2878	1702	1017	245936	0,995	224250	0,996	245936	0,995	0,992
y3	3047	2401	1728	1013	575,9	428,5	94320	0,991	5842	0,999	94320	0,991	0,984
y4	2125	1737	1402	1051	477,5	424	7915	0,998	1820	1,000	7915	0,998	0,993
y5	2055	1602	1187	739,5	441	237	28201	0,994	12084	0,998	28201	0,994	0,988
y6	2235	1835	1581	1009	538,4	527,5	40902	0,992	11370	0,998	40902	0,992	0,978
y7	2823	2350	2087	1334	716,4	530,5	52412	0,994	24301	0,997	52412	0,994	0,993
y8	1221	852,6	804,8	504,9	283,8	244,5	10207	0,993	10206	0,993	10207	0,993	0,985
y9	2235	1835	1581	1009	538,4	527,5	40858	0,992	11418	0,998	40858	0,992	0,978
y10	3815	2774	2411	1544	588,5	348,6	30789	0,998	30544	0,998	30789	0,998	0,997
y11	7436	6382	5806	4057	1543	1011	222867	0,997	82709	0,999	222867	0,997	0,998
y12	4271	3299	3032	2488	1628	1120	65700	0,995	9409	0,999	11080	0,999	0,994
y13	3181	2559	2037	1770	733,5	399,1	31283	0,997	20698	0,998	31283	0,997	0,993

TABLA V: *Insulina*

x								E3P		E4P		E5P		ELL
	0	5	15	50	100	200	400	σ	r	σ	r	σ	r	r
y1	4627	3721	2712	1724	1286	1066	565	76974	0,997	51012	0,998	13828	1	0,991
y2	5506	4228	3158	1873	1482	1125	692	69514	0,998	28484	0,999	8002	1	0,996
y3	6799	5065	3818	2543	1948	1554	880	275237	0,995	51758	0,999	10232	1	0,991
y4	8203	6205	4858	2999	2357	1791	1021	326930	0,996	65464	0,999	47900	0,999	0,992
y5	9136	7159	5297	3389	2484	2034	1185	240478	0,997	100895	0,999	20270	1	0,994
y6	7978	6022	4541	3108	2484	1801	1062	465225	0,994	71573	0,999	586	1	0,99
y7	7894	6229	4449	3115	2532	1636	1010	483111	0,994	192522	0,997	61613	0,999	0,991
y8	6943	5545	4152	2586	2079	1674	935	180467	0,997	109892	0,998	23173	1	0,991
y9	10291	7954	5939	3752	3064	1976	1274	470296	0,996	121144	0,999	40620	1	0,995
y10	9028	7238	5612	3488	2658	2124	1406	125728	0,999	48595	1	18574	1	0,998
y11	5629	4339	3181	2160	1478	1200	623	174610	0,996	53553	0,999	23767	0,999	0,989
y12	7993	6559	4531	3309	2813	2000	1058	772060	0,99	482347	0,994	162191	0,998	0,98
y13	7603	5587	4310	3088	2079	1585	983	491020	0,993	40234	0,999	32654	1	0,992
y14	4801	3808	2907	1784	1447	1077	544	115394	0,996	50610	0,998	9452	1	0,988
y15	6364	4741	3484	2485	1887	1370	668	439395	0,991	78384	0,998	5606	1	0,979
y16	12259	9667	7124	4829	3699	2697	1668	670806	0,996	186707	0,999	16217	1	0,995
y17	5803	4609	3339	2051	1646	1162	692	100003	0,998	55972	0,999	9252	1	0,995
y18	11947	8845	6665	4445	3290	2542	1593	692751	0,996	59526	1	25824	1	0,996
y19	8827	7360	4842	3389	2714	1914	1219	549025	0,994	500222	0,995	288797	0,997	0,989
y20	11065	9055	6833	4386	3479	2367	1555	335006	0,998	127053	0,999	27833	1	0,997
y21	11617	9130	6958	4419	3562	2518	1723	385179	0,998	87827	0,999	24455	1	0,998
y22	11248	8743	6770	4317	3335	2525	1675	355089	0,998	44655	1	27354	1	0,998

TABLA VI: *Osteocalcina*

x							E3P		E4P		E5P		ELL
	0	1	4,5	14	30	60	σ	r	σ	r	σ	r	r
y1	5037	4257	3019	1721	1009	730	9715	0,9996	12301	0,9997	4434	0,9998	0,999
y2	5542	4300	2842	1699	1315	981	5570	0,9993	22486	0,9998	4927	0,9999	0,999
y3	4752	3615	2381	1257	887	679	14567	0,999	27602	0,9994	3724	0,9999	0,999
y4	4576	3821	2585	1389	946	727	7105	0,9997	7576	0,9997	7576	0,9997	0,999
y5	4863	4148	2875	1935	1293	853	13288	0,9986	35650	0,9995	3713	0,9998	0,998
y6	7093	5504	3790	2436	1885	1203	24276	0,9971	151735	0,9995	17302	0,9997	0,996
y7	6057	4629	3100	2016	1360	799	10830	0,9963	150682	0,9997	159	0,9999	0,992
y8	4722	3658	2851	1687	1238	835	35715	0,9947	121313	0,9984	6195	0,9997	0,993
y9	5779	5137	3680	2586	1799	1087	43715	0,9976	83234	0,9987	11096	0,9997	0,996
y10	7200	5803	4737	2917	2321	1315	123995	0,9928	360317	0,9974	100328	0,998	0,983
y11	5683	4099	3386	1982	1537	1060	114563	0,9873	390962	0,9963	16304	0,9995	0,985
y12	5577	4226	3354	2047	1502	1058	52438	0,9926	222998	0,9983	4919	0,9998	0,992
y13	7380	6016	4215	2501	1938	1278	31054	0,9988	68533	0,9995	32373	0,9994	0,998
y14	6989	5789	4208	2297	1710	1158	56236	0,9988	66085	0,9999	15843	0,9997	0,998
y15	5124	4284	3064	1641	1329	984	41697	0,9985	41918	0,9986	41918	0,9985	0,996
y16	3568	3011	2226	1134	941	661	16219	0,9973	38391	0,9974	38391	0,9973	0,995
y17	2752	2494	1760	1430	1146	849	28880	0,9938	34830	0,9946	15162	0,9973	0,988

TABLA VII: Péptido C

							E3P		E4P		E5P		ELL
x	0	0.5	1	3	10	30	σ	r	σ	r	σ	r	r
y1	8847	7340	5827	3988	1499	856	242483	0,9976	165440	0,9984	110683	0,9989	0,995
y2	11592	8375	7234	3907	1722	929,5	1276979	0,9925	825106	0,9952	60916	0,9996	0,99
y3	10020	8136	5882	3454	1288	593,5	46454	0,9997	23232	0,9998	17487	0,9999	0,998
y4	10008	8083	6252	3255	1335	626,5	134770	0,9991	134591	0,9991	134770	0,9991	0,998
y5	6874	6488	5302	2725	1213	566,5	351808	0,9953	38366	0,9995	351808	0,9953	0,998
y6	5995	5272	4010	2609	1015	469,1	22423	0,9996	21890	0,9996	21083	0,9996	0,999
y7	4912	4366	3679	1982	802	403,9	95298	0,9974	36551	0,999	95298	0,9974	0,998
y8	12037	9764	7921	3700	1562	748	651214	0,9969	599973	0,9972	651214	0,9969	0,996
y9	11068	9741	7975	4092	1623	936,5	539737	0,9971	186008	0,999	539737	0,9971	0,997
y10	8764	8293	6031	3167	1375	613,2	438318	0,9964	73714	0,9994	438318	0,9964	0,995
y11	8620	8017	6787	3861	1791	918,7	309613	0,9971	51000	0,9995	309613	0,9971	0,999
y12	8356	6863	5971	2881	1340	574	500104	0,995	471205	0,9953	500104	0,995	0,991
y13	9609	8030	6524	3243	1633	737,5	322794	0,9975	289217	0,9978	322794	0,9975	0,997
y14	8302	6709	4235	2712	1485	556	224344	0,9975	209020	0,9977	103283	0,9989	0,992
y15	9316	8402	5808	3435	1713	1021	211426	0,9982	91270	0,9992	211426	0,9982	0,994
y16	7050	6797	5593	3160	1724	764,5	301116	0,9958	120354	0,9983	301116	0,9958	0,994
y17	8395	7193	6488	3368	1877	1141	610152	0,9933	467295	0,9948	610152	0,9933	0,99
y18	8832	8057	6640	3541	1460	599,5	301258	0,9975	60465	0,9995	301258	0,9975	0,999
y19	12427	11824	7312	4099	2601	1286	2013036	0,991	1014732	0,9955	2013036	0,991	0,971

TABLA VIII: TSI (Anticuerpo anti receptor de TSH)

x							E3P		E4P		E5P		ELL
	0	5	15	45	135	405	σ	r	σ	r	σ	r	r
y1	3052	2743	2160	1226	1114	753,9	80909	0,9909	47919	0,9946	80909	0,9909	0,97
y2	5707	4720	4285	3138	1605	760,8	154687	0,9957	88228	0,9976	8685	0,9998	0,985
y3	3067	3469	2811	1926	1053	774,5	260472	0,9786	118341	0,9903	260472	0,9786	0,987
y4	4066	3694	3319	2345	1193	726,5	29244	0,9984	17681	0,9991	29244	0,9984	0,997
y5	7504	6766	5479	3660	1612	1090	110069	0,9969	20657	0,999	110069	0,9984	0,996
y6	5311	4723	3778	2524	1451	1269	49275	0,9983	20657	0,9993	49275	0,9983	0,985
y7	6073	5654	4369	2867	2417	1801	196713	0,9937	97906	0,9969	196713	0,9937	0,964
y8	6244	5329	4426	2685	1818	1279	54787	0,9986	46247	0,9988	54787	0,9986	0,995
y9	6130	5290	4287	3092	1612	1327	77294	0,998	77067	0,998	73047	0,9981	0,992
y10	4819	4546	3709	2309	1392	1103	106063	0,9959	581	0,9999	106063	0,9959	0,982
y11	4769	4342	3422	2121	1396	1128	66068	0,9972	535	0,9999	66068	0,9972	0,982
y12	5431	4798	4033	2491	1348	1159	100254	0,9969	39569	0,9988	100254	0,9969	0,986
y13	6381	5917	4344	2744	1409	1210	215340	0,9957	65321	0,9987	215340	0,9957	0,977
y14	6316	5701	4515	2817	1502	1248	110400	0,9976	17339	0,9996	110400	0,9976	0,987
y15	6025	5548	4815	2880	1574	1173	192952	0,9955	21820	0,9995	192952	0,9955	0,991
y16	4516	4327	3943	2487	1334	946,2	165985	0,9932	6905	0,9998	165985	0,9932	0,991
y17	4816	4252	3339	2134	1337	1210	51006	0,9978	8008	0,9996	51006	0,998	0,978
y18	3991	3547	3035	1896	1186	1029	54810	0,9965	18727	0,9988	54810	0,9965	0,984
y19	4471	3925	3518	1886	1114	747,1	156553	0,9936	80501	0,9967	156553	0,9936	0,99
y20	3988	3193	2946	1889	1509	1375	98480	0,991	98134	0,9911	98480	0,991	0,968
y21	3604	3310	2854	1797	1032	877,5	61792	0,9955	8840	0,9993	61792	0,9955	0,985
y22	5932	5275	4152	2586	1739	1255	46492	0,9987	9679	0,9997	46492	0,9987	0,99

TABLA VIII: TSI (Anticuerpo anti receptor de TSH) (continuación)

x							E3P		E4P		E5P		ELL
	0	5	15	45	135	405	σ	r	σ	r	σ	r	r
y23	3529	3370	2715	1628	935,9	760,8	87506	0,994	1351	0,9999	87506	0,9941	0,977
y24	5113	4885	3811	2259	1190	808,9	149595	0,9957	13430	0,9996	149595	0,9957	0,985
y25	3784	3472	2874	1520	1125	887,8	148057	0,9906	24155	0,9985	148057	0,9906	0,973
y26	6259	5033	3880	2841	1640	1156	93437	0,9976	27723	0,9993	21888	0,9994	0,998
y27	3572	3390	2234	1392	957,9	642,6	141374	0,9908	67690	0,9956	141374	0,9908	0,959
y28	2858	2735	1595	919,6	541,1	323,7	159121	0,9867	69170	0,9942	159121	0,9867	0,959
y29	2010	1897	1617	1100	559,6	374,5	10019	0,9979	1037	0,9998	10019	0,9979	0,996
y30	3394	3384	2664	1769	908,1	617,7	80099	0,9945	27374	0,9981	80099	0,9945	0,934
y31	2770	2484	2444	1649	860,9	723	86094	0,9889	34010	0,9956	86094	0,9889	0,97
y32	2422	1969	1776	1191	643,1	563,3	32646	0,9942	32206	0,9943	32646	0,9942	0,982
y33	7833	6791	5015	3675	2429	2073	81950	0,9985	72239	0,9987	81950	0,9985	0,981
y34	4899	4696	4011	2364	1718	1311	218223	0,991	32023	0,9987	218223	0,991	0,974
y35	6059	5673	4080	3607	2897	2629	271301	0,9865	230919	0,9885	271301	0,9865	0,92
y36	4847	4538	3264	2885	2318	2103	173748	0,9865	147860	0,9885	173748	0,9865	0,92
y37	3892	3533	2899	1942	1449	1137	21350	0,9983	6192	0,9995	21350	0,9983	0,984