

00361

36

2 ej

## FACULTAD DE CIENCIAS

### DESARROLLO E IMPLEMENTACION DE UN ENSAYO INMUNOENZIMATICO, HOMOLOGO Y ESPECIFICO, PARA LA DETERMINACION DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO DE POLLO (cGH)

Tesis que presenta:

**Maria del Rocio Sánchez García**

para obtener el Grado de:

**Maestra en Ciencias (Biología)**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

UNAM

Julio de 1990.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# INDICE

página

Glosario	1
I.- INTRODUCCION	2
I.1 Generalidades	2
I.1.1 Hormona de crecimiento de aves	4
I.1.2 Secreción de GH en aves	6
I.1.3 Influencias ambientales sobre la liberación de GH	7
I.1.4 Concentraciones circulantes de GH durante el crecimiento y desarrollo de aves	8
I.1.4.1 En el huevo y alrededor de la eclosión	9
I.1.4.2 Crecimiento y desarrollo post-eclosión	10
I.1.5 Efectos de la GH en aves	15
I.2 Técnicas Inmunométricas	17
I.2.1 Radioinmunoanálisis	19
I.2.2 Inmunoensayo Enzimático	20
I.2.3 Factores que determinan la elección de un inmunoensayo	21
I.3 Factores involucrados en el diseño del ELISA	22
I.3.1 Inmovilización del antígeno o del anticuerpo	22
I.3.2 Bloqueo de sitios inespecificos sobre la fase sólida	24
I.3.3 Elección de la concentración del antígeno y del anticuerpo	24
I.3.4 Selección de la enzima	25
I.3.5 Marcaje del antígeno o el anticuerpo con la enzima	27
I.3.6 Sensibilidad del ELISA	29
I.4 Tipos de Inmunoensayos	29

I.4.1 Ensayos competitivos	29
I.4.2 Ensayos no competitivos	31
I.4.3 Ensayos para medir anticuerpo	32
I.5 Ventajas y Desventajas en los ensayos Inmunoenzimáticos	32
II.- OBJETIVOS DE LA TESIS	34
III.- MATERIAL Y METODOS	35
III.1 Material Biológico	35
III.1.1 Hormona de crecimiento de pollo	35
III.1.2 Obtención del anticuerpo anti-cGH	35
III.2 Muestras Biológicas	35
III.3 Material y Reactivos	36
III.4 Metodología	36
III.4.1 Titulación de la cGH y del 1er Ab	36
III.4.2 Optimización de la Curva Patrón	38
III.4.3 Prueba de Paralelismo e Identidad	40
III.4.4 Pruebas de Especificidad	40
III.4.5 Medición de la cGH circulante en las 5 razas de pollos	42
III.5 Análisis Estadístico	43
IV.- RESULTADOS	44
IV.1 Preservación de la cGH	44
IV.2 Preservación del anticuerpo	44
IV.3 Titulación del antígeno y del anticuerpo	44
IV.4 Optimización de las concentraciones de antígeno para recubrir la placa	45

IV.5 Tiempos de competencia con el 1er Ab	48
IV.6 Tiempos de revelado de la enzima	55
IV.7 Optimización de la Curva Patrón	55
IV.8 Ensayos de Paralelismo e Identidad	58
IV.9 Ensayos de Especificidad	60
IV.9.1 Con respecto a otras hormonas adenohipofisarias	60
IV.9.2 Contra las proteínas del suero de pollo	62
IV.10 Niveles circulantes de cGH en pollos	64
IV.11 Análisis Estadístico	71
V.- DISCUSION	72
VI.- PERSPECTIVAS FUTURAS	84
VII.- CONCLUSIONES	85
VIII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	86
IX.- APENDICE	96

## Glosario

Ab	anticuerpo
Ag	antígeno
BSA	albúmina serica bovina
cGH	hormona de crecimiento de pollo
ELISA	ensayo inmunoenzimático
GH	hormona de crecimiento
GRF	factor liberador de la hormona de crecimiento
IgG	inmunoglobulina G
Kda	kilo daltones
ND-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes.
PBS	amortiguador de fosfatos salino
pI	punto isoelectrico
PM	peso molecular
Rf	movilidad relativa
RIA	radioinmunoanálisis
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida en dodecil sulfato de sodio
2oAb	segundo anticuerpo
SRIF	factor inhibidor de la liberación de somatotropina
T	triyodotironina
3	
T.A.	temperatura ambiente
TRH	hormona liberadora de la tirotropina

## I.- INTRODUCCION

### I.1 GENERALIDADES

Las hormonas son moléculas orgánicas altamente potentes y especializadas que sirven para regular y coordinar a las diversas funciones biológicas de los organismos en los cuales fueron sintetizadas.

Ellas ejercen sus acciones sobre células equipadas con receptores a los que se unen, con alta afinidad y especificidad, acoplándose para dar inicio a una respuesta característica.

Recientemente el desarrollo de métodos analíticos, (bioquímicos, fisiológicos, inmunológicos) ha permitido profundizar en la naturaleza química de las hormonas y sus receptores; sus sitios de biosíntesis, activación y degradación; y sus mecanismos de acción a nivel molecular. Este desarrollo ha llevado a conocer la amplia distribución de células blanco, los rápidos cambios en las concentraciones de las hormonas presentes en ellas y los factores que modifican el número de receptores y sus funciones. Estos y otros avances han modificado sustancialmente nuestro entendimiento sobre el sistema endócrino.

Dentro de la gran variedad de hormonas que tienen una participación importante en el desarrollo de los vertebrados, se encuentra la hormona de crecimiento (GH), la cual es una proteína con una gran versatilidad de funciones.

La GH se sintetiza en la glándula hipófisis, actúa sobre una gran variedad de tipos celulares y puede afectar la secreción de otras hormonas, como las somatomedinas.

La glándula pituitaria o hipófisis pesa alrededor de 500 mg en un humano adulto y de 10 a 12 mg en la rata adulta de 400 g. de peso. En las aves el peso de la hipófisis depende del tipo y de la edad del individuo. En el pollo de 8 semanas la glándula pesa alrededor de 6 - 8 mg y en el de 32 semanas pesa aproximadamente 12 mg.

A pesar de su pequeño tamaño esta glándula ejerce importantes efectos sobre el metabolismo de los carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos; en el balance de agua y electrolítico; sobre la diferenciación celular, el crecimiento y la maduración del organismo; influye en la tasa metabólica y temperatura corporal; en la función cardiovascular y en la reproductiva incluyendo la lactación; en la pigmentación de la piel, la muda y la conducta; y también en la resistencia al estrés e infecciones (Martin, 1985).

El tejido hipofisiario puede ser dividido en adenohipófisis y neurohipófisis cada una con un origen embrionario diferente.

La adenohipófisis de los mamíferos está formada por la pars distalis (glándula hipofisiaria anterior), la pars intermedia y la pars tuberalis. Sin embargo, en aves no hay pars intermedia y aquí la adenohipófisis está formada por la glándula anterior y la pars tuberalis únicamente. La adenohipófisis embriológicamente deriva de la bolsa de Rathke y tiene su origen de una invaginación del ectodermo y del techo de la fosa bucal primitiva que crece en dirección craneal formando una cavidad, por consiguiente las células secretoras de la adenohipófisis son de carácter epitelial. Se sabe que la adenohipófisis sintetiza y secreta

cuando menos siete diferentes hormonas: hormona adrenocorticotrófica (ACTH); hormona tirotrófica (TSH); hormona de crecimiento (GH); hormona estimulante del folículo (FSH); hormona luteinizante (LH); prolactina (PRL) y beta lipotropina ( $\beta$ -LPH).

La neurohipófisis forma la pars nervosa (el equivalente a la parte posterior de la glándula en las aves) el tallo infundibular y la eminencia media, su origen embrionario es nervioso pues nace de un crecimiento hacia abajo de la pared del diencéfalo que se convierte en el suelo del tercer ventrículo. Esta porción de la hipófisis almacena y secreta dos neurohormonas: la vasopresina y la ocitocina (Scanes, 1986).

#### I.1.1 Hormona de Crecimiento en Aves.-

El desarrollo y el crecimiento de los seres vivos pueden ser vistos como una serie de procesos múltiples, pero integrados, que involucren a factores nutricionales, ambientales y genéticos, que se encuentran dirigidos por mensajeros químicos. En las aves, como en otros organismos, el crecimiento y el desarrollo parecen estar bajo un intrincado mecanismo de control que involucra factores endocrinos, paracrinos y autocrinos.

La hormona de crecimiento juega un papel importante en el control del crecimiento y también en otros aspectos del metabolismo en aves de corral.

El papel preciso de la GH en el control del crecimiento aún no está bien definido en aves. Sin embargo su presencia en la circulación es esencial para obtener una tasa de crecimiento

normal en el pollo doméstico y en otras especies de corral. Una evidencia que apoya lo anterior es que la administración de suero contra GH de pollo, reduce el crecimiento (Scanes y col. 1977).

La hormona de crecimiento ha sido aislada del tejido hipofisiario de pavos, patos, palomas, pollos y avestruces (Farmer y col.1974; Harvey y Scanes 1977b; Papkoff y col.1982; Leung y col., 1983; Arámburo y col., 1989a).

En aves y mamíferos, la GH es una hormona proteínica con 191 residuos de aminoácidos, presentando cuatro residuos de cisteínas y por ello dos puentes disulfuro (Farmer y col.1974, Papkoff y col.1982).

Se ha descrito que la hormona de crecimiento de pollo (cGH) en realidad es una familia de proteínas homólogas, pero no idénticas, de manera que exhibe una marcada heterogeneidad molecular y funcional. La forma principal de cGH (monómero) tiene un PM de aproximadamente 26 KDa (en SDS-PAGE bajo condiciones reductoras) (Arámburo y col., 1989a). Existen además otras formas oligoméricas de mayor PM (Arámburo y col., 1990a). La forma monomérica presenta variantes de carga, de las cuales se han purificado tres con  $R_f = 0.23, 0.30$  y  $0.35$  en geles semipreparativos por ND-PAGE (Arámburo y col., 1989a). Los componentes de esta familia muestran los siguientes pI's en isoelectroenfoque analítico: 5.9, 6.8, 7.11, 7.3, 7.5, 7.9, 8.05 y 8.18 (Houston y Goddard, 1988; Arámburo y col., 1990a). La secuencia aminoterminal de la forma monomérica más abundante es TFPAMPLSNLFANA... (Arámburo y col., 1989a). Alrededor de la tercera parte de la población de moléculas de la cGH se encuentran fosforiladas, lo cual puede

contribuir a su heterogeneidad de carga (Arámburo y col., 1989a), y estudios recientes en nuestro laboratorio han mostrado que la cGH puede ser fosforilada in vitro por la proteína-cinasa A, y que las células hipofisiarias de pollo en cultivo incorporan fosfato radioactivo en una molécula semejante al dímero de cGH, cuya liberación es estimulada por GRF (Arámburo y col., 1990b). Por otra parte se sabe que una fracción significativa de la cGH se encuentra glucosilada (Berghman y col., 1987), y en nuestro laboratorio se ha descrito que también presenta heterogeneidad de carga y de masa (Arámburo y col., 1990c). Por otra parte, los estudios de nuestro laboratorio han revelado que las variantes de carga 0.23 y 0.3 de la cGH cuyo PM (26 KDa) e inmunorreactividad son semejantes, presentan diferentes actividades metabólicas (Arámburo y col., 1989b). La variante 0.23 tiene un potente efecto lipolítico pero carece de efecto antilipolítico; mientras que la variante 0.3 no estimula la lipólisis pero en cambio muestra una clara actividad antilipolítica (Arámburo y col., 1990a). Ambas variantes, sin embargo, mantienen y comparten un claro efecto somatotrópico (Scanes y col., 1990).

### **I.1.2 Secreción de GH en Aves**

La liberación de la GH, en todos los vertebrados, se encuentra bajo el control hipotalámico (Harvey, 1983). Existe evidencia de que tres son los factores hipotálamo-hipofisiotrópicos para la secreción de GH en aves: GRF (factor liberador de la hormona de crecimiento; somatoliberina, estimulador); SRIF (factor inhibidor de la liberación de

somatotropina; somatostatina, inhibidor); y el tri péptido modificado TRH (hormona liberadora de la tirotropina), que en condiciones normales estimula la liberación de GH del tejido hipofisiario de aves, in vitro (Harvey y col. 1978b). Además el TRH es un muy potente secretagogo de GH in vivo en pollos jóvenes (Harvey y col. 1978b), patos (Pethes y col. 1979) y pavos (Proudman y Opel, 1981).

Se ha observado que la liberación de GH in vivo se da de una manera pulsátil (Scanes y col., 1983a).

### I.1.3 Influencias ambientales sobre la liberación de GH.

Las concentraciones plasmáticas de GH varían con los diferentes patrones estacionales, con un máximo en el verano y el invierno en patos, ganso de Canadá y la perdiz (Scanes y col. 1983a).

Existe muy poca información sobre los efectos de la luz y la temperatura sobre la secreción de GH en aves. Una excepción a esto, fue la observación de que el incremento en la concentración de GH plasmática en respuesta al TRH se reduce por la exposición al frío (10°C), en patos adaptados (Pethes y col. 1979). Esto puede ser consistente con la elevación de hormonas tiroideas que inhiben la secreción de GH.

Un factor ambiental que influye en forma importante en la concentración de GH plasmática en aves es la dieta. Estas concentraciones se ven marcadamente afectadas por varias deficiencias nutricionales en aves, particularmente en pollos

jóvenes. Las concentraciones plasmáticas de GH en pollos, se eleva por el ayuno (Harvey y col.1978a), y restricción crónica de la ingesta de alimento (Engster y col. 1979).

Similarmente, en pavos de crianza, una dieta restringida da como resultado un incremento tanto en la concentración basal de GH en plasma, como en la magnitud del pico de concentración de GH en respuesta al TRH (Proudman y Opel,1981).

Existen evidencias de que la concentración de GH se incrementa en pollos cuya dieta se encuentra deficiente en proteínas. Pollos mantenidos con una dieta consistente en 5% de proteína disponible ad libitum, tienen elevados los niveles de GH comparado con pollos con libre acceso a una dieta isocalórica del 20% de proteínas (Scanes y col. 1981a). Estos datos sugieren que son las proteínas, y no las calorías, las responsables de los cambios en las concentraciones circulantes de GH.

Algunos aspectos de los nutrientes macrominerales se ha encontrado que influyen en la concentración de GH en plasma en el pollo doméstico. No sólo dietas bajas en calcio deprimen la concentración de GH (Sommerville y col. 1983), sino también se ha visto que esto ocurre con una dieta deficiente en fósforo (Gestone y col. 1982).

#### **I.1.4 Concentraciones circulantes de GH durante el crecimiento y desarrollo de las aves.**

Desde hace una década se han realizado estudios para conocer como varían las concentraciones de GH circulante en plasma, en aves de corral a lo largo de su crecimiento. Se han

comparado los niveles de GH circulante tanto en pollos de engorda como en gallinas ponedoras; asimismo se han determinado las concentraciones de esta hormona tanto en la etapa embrionaria como a lo largo de su desarrollo.

#### I.1.4.1 En el huevo y alrededor de la eclosión.

Las concentraciones plasmáticas de GH son detectables a partir del día 17 del desarrollo embrionario del pollo (Harvey y col. 1979). Las concentraciones de GH en plasma se elevan gradualmente con un gran incremento que ocurre durante la semana siguiente a la eclosión (Harvey y col. 1979).

Las bases fisiológicas de estos cambios en las concentraciones circulantes de GH son aún desconocidas. Durante la vida embrionaria se da un incremento logaritmico en el porcentaje de somatotropos en la hipófisis anterior (Malamed y col., en prensa). De esta manera el incremento en las concentraciones plasmáticas de GH (probablemente debido a la tasa de secreción) puede deberse a la presencia de una mayor liberación de GH en la hipófisis. In ovo, el embrión de pollo no parece ser capaz de responder a secretagogos de GH: no se observan respuestas a inyecciones de GRF o TRH, sino hasta los días 20 y 21 de la incubación, respectivamente (Huybrechts y col. 1985; Decuyperre y Scanes, 1983). Es probable que el incremento en las concentraciones plasmáticas de GH que se observa en la etapa post-eclosión se deba a una combinación que involucre un aumento

en el número de somatotropos y también una mayor capacidad de respuesta de la hipófisis a factores estimuladores de la liberación de GH (GRF y/o TRH).

#### I.1.4.2 Crecimiento y desarrollo post-eclosión.

En pollos, las concentraciones plasmáticas de GH se encuentran elevadas entre la 1er. semana y la 4a. a 8a. semanas de edad. Posteriormente las concentraciones de GH en plasma declinan hasta alcanzar un nivel bajo, y relativamente estable, bastante antes de alcanzar la pubertad. El momento de este decremento tardío depende de la raza del pollo. Se han observado patrones similares en las concentraciones plasmáticas de GH durante el desarrollo de otras aves, incluyendo pavos, patos y palomas (Scanes, 1987).

El decremento en las concentraciones circulantes de GH durante el desarrollo refleja, tanto una tasa de secreción reducida (ng/min) como un incremento en la tasa de depuración (ml/min) de GH (Lauterio y Scanes, 1988). El cambio en la tasa de depuración metabólica es explicable en términos de los cambios en el peso corporal y del peso individual de los órganos, tales como el hígado y riñón los cuales son los sitios probables de depuración de GH. Sin embargo, las bases fisiológicas para la tasa de secreción de GH son aún inciertas.

El decremento en las concentraciones plasmáticas de GH ocurre antes de la pubertad y no parece ser una consecuencia de los cambios en las concentraciones circulantes de esteroides sexuales (Scanes y Johnson, 1984).

La disminución de la secreción de GH no parece deberse a un decremento en el número de somatotropos o la GH almacenada en la hipófisis. Se ha observado que tanto el número de somatotropos como el contenido de GH en la hipófisis se incrementan durante la fase de desarrollo post-natal. (Malamed y col., en prensa; Vasiliatos-Younken, 1986)

No existe evidencia aún de que la declinación de la secreción de GH se deba a un decremento en la liberación de TRH o GRF de la eminencia media o a un incremento en la liberación del SRIF. Hasta el momento no se han determinado las concentraciones de los factores liberadores de GH en el sistema porta-hipofisario. Por otro lado, se han investigado los cambios en el funcionamiento de los somatotropos. Se conoce que existen diferencias en la estructura de los somatotropos entre pollos jóvenes y adultos. En particular, el tamaño de los gránulos de secreción disminuye con la edad (Malamed y col., 1988; Malamed y col., 1985) con una concomitante reducción en el contenido de GH de cada gránulo secretorio (Malamed y col., 1985). Este cambio en la estructura puede influir en el funcionamiento del somatotropo. Además, se han observado diferencias en la respuesta a secretagogos de GH en pollos jóvenes y adultos. En pollos concientes, la magnitud de la respuesta secretoria de GH al GRF es menor en pollos adultos que en los jóvenes, independientemente de que las aves estén concientes o anestesiadas.

El TRH es un potente secretagogo de GH en pollos jóvenes (Harvey y Scanes, 1984). De hecho se ha sugerido que el factor liberador estimulador endógeno más importante en los pollos es el

TRH, en función de la capacidad que la inmunización pasiva con anti-TRH muestra para suprimir la secreción de GH (Klandorf y col., 1985). Como es el caso con el GRF, el TRH evoca un incremento menor en las concentraciones plasmáticas de GH en pollos adultos anestesiados que en pollos jóvenes. De mayor significancia fisiológica son tal vez las observaciones de que el TRH estimula la secreción de GH en pollos jóvenes concientes, mientras que en pollos adultos concientes no se observa ningún efecto.

In vivo la infusión de SRIF reduce la respuesta tanto al TRH como al GRF. Se han observado diferencias relacionadas con la edad en la efectividad del SRIF para suprimir la liberación de GH inducida por TRH, teniéndose que el SRIF es más efectivo en los pollos adultos que en los jóvenes. Es concebible, entonces, que la declinación de GH se deba a diferencias en la sensibilidad y/o en la capacidad de respuesta a los factores liberadores (con decremento al TRH e incremento al SRIF).

Es posible que las hormonas periféricas que inhiben la secreción de GH en aves (p ej: IGF-1 y/o T<sub>3</sub> puedan estar involucradas en el decremento de la secreción de GH. Las concentraciones circulantes de factor de crecimiento insulinoide-1 (IGF-1) aumentan durante el crecimiento. Mas aún, el IGF-1 reduce el incremento en la secreción de GH evocada in vitro en respuesta al GRF y/o TRH (Pérez y col., 1985). Mientras que las concentraciones de T<sub>3</sub> no parecen incrementarse durante el crecimiento, existen evidencias que sugieren un papel para la T<sub>3</sub> en el decremento en la secreción de GH relacionado con la edad, tal vez debido a cambios en la sensibilidad/capacidad de

respuesta a la T<sup>3</sup>. Las hormonas tiroideas inhiben la secreción de GH tanto en pollos jóvenes como adultos; observándose un incremento en las concentraciones plasmáticas de GH posterior a la ablación tiroidea y un decremento después de la administración de T<sup>3</sup> y en menor grado de T<sup>4</sup> (Harvey y col., 1983, Harvey, 1983).

Similarmente la T<sup>3</sup> reduce la respuesta tanto del TRH como del GRF (Scanes y Harvey, 1989), siendo mayor la sensibilidad a la supresión por T<sup>3</sup> de la liberación de GH inducida por TRH, en pollos adultos anestesiados que en pollos jóvenes. Esto puede ser cuestionado si la carencia de efecto del TRH sobre la liberación de GH in vivo en pollos adultos concientes y restablecidos durante la anestesia, se encuentra relacionada al estado tiroideo. En conclusión, en pollos adultos con hipotiroidismo, el TRH es capaz de evocar un incremento en la secreción de GH in vivo (Harvey y col., 1984). Por el contrario la inyección o infusión de T<sup>3</sup> reduce o abate completamente la liberación de GH estimulada por TRH en pollos adultos anestesiados (Scanes y Harvey, 1989).

Por otra parte, en estudios comparativos se ha observado que las líneas seleccionadas (razas de engorda), que tienen una tasa de crecimiento rápida y mayores pesos corporales, presentan consistentemente menores niveles de GH que las líneas no seleccionadas (razas ponedoras), de tasa de crecimiento lento y menores pesos corporales (Leung, 1984; Scanes y Balthazart, 1981; Burke y Marks, 1982), durante su desarrollo. Como se puede observar en la tabla 1, dependiendo del autor, del ensayo

T A B L A I

Valores de cGH circulante en pollos.  
(ng/ml)

Edad (semanas)	1 Dw/dw	S-Dw/Dw	dw/dw	F-Dw/Dw	2 Pollo de Engor. H M	3 P. Engor.	4 G. Poned. P. Engor. G. Poned.
1 dfa	346.2+25.5 (24)	378.8+30.9 (24)	1584.8+346.7 (24)	414.5+35.0 (25)		380	410
1a.					170 20	280	420
2a.	133.7+12.6 (30)	149.9+12.8 (19)	309.5+31.9 (19)	107.8+5.5 (20)	140+30 35+13	250	550
3a.					110+15 220+46	260	450
4a.	69.9+ 8.7 (19)	108.4+11.2 (20)	329.6+42.4 (17)	60.0+ 6.7 (19)	70+16 95+15	200	600
5a.					90+20 140+20	180	500
6a.	38.8+ 4.3 (20)	41.8+ 5.3 (20)	168.1+25.7 (20)	30.4+ 2.5 (18)	50+5 130+30	170	350
7a.					100+16 110+12		
8a.	29.7+ 2.3 (19)	27.8+ 2.7 (19)	181.0+13.5 (19)	28.8+ 2.8 (20)	55+10 115+15 n=9	160 n=24	260 n=10

- Dw/dw = heterócigos de engorda 1 Lilburn y col. 1986.  
 S Dw/Dw = homócigos lento crecimiento 2 Harvey y col., 1979.  
 dw/dw = homócigos enanos de engorda 3 Burke y Marks, 1982.  
 F-Dw/Dw = homócigos de engorda 4 Harvey y col., 1979.  
 H = hembras  
 M = machos  
 P.engord. = pollos engorda  
 G.poned. = gallina ponedora

utilizado, y del tipo de animal en estudio (pollo de engorda o gallina ponedora) los niveles de cGH muestran un cierto grado de variación.

En otro estudio comparativo, Leung (1984) estudió las concentraciones de GH circulante en razas de pollos de rápido crecimiento con razas de pollos enanos, observando que las razas enanas presentan niveles más altos de GH circulante, durante todo el proceso de desarrollo.

Se ha descrito que los niveles circulantes de GH muestran variaciones con respecto al sexo, encontrándose que en machos las concentraciones son más elevadas, particularmente en pollos jóvenes (Harvey y col., 1979b).

#### **I.1.5 Efectos de la GH en las aves.**

Los niveles elevados de GH no necesariamente indican una alta tasa de crecimiento. Así en pollos hipotiroideos, los cuales se caracterizan por bajas tasas de crecimiento, hay un paradójico incremento en la concentración de GH en plasma. Esto se ha encontrado también en pollos obesos con tiroiditis autoinmune (Scanes y col.1976); en pollos deficientes en T<sub>3</sub>, en pollos enanos ligados al sexo (Scanes y col.1983b); y en pollos tiroidectomizados (Harvey ,1983).

Una evidencia directa para el papel que juega la GH en el crecimiento del pollo doméstico se ha obtenido en estudios en donde se extirpa la hipófisis y posteriormente se administra GH exógena. En el pollo la hipofisectomía es seguida por una marcada reducción en el crecimiento, en particular del crecimiento

esquelético. Sin embargo es importante hacer notar que aunque la hipofisectomía reduce grandemente el crecimiento, no lo abate por completo sino que solo lo hace más lento. Es interesante que la hipofisectomía ejerza un mayor efecto sobre el crecimiento esquelético que sobre la ganancia del peso corporal (Scanes y Harvey, 1984), esto se debe a la acumulación de grasa en las aves hipofisectomizadas (Nalbandov y Card, 1943). Lo que causa un incremento en la lipogénesis y un decremento en la lipólisis en pollos hipofisectomizados (Gibson y Nalbandov, 1966; Kompiang y Gibson, 1973).

Se conoce que la administración exógena de cGH en pollos hipofisectomizados restituye la función del crecimiento corporal y esquelético (Scanes y Harvey, 1984).

Existe evidencia de que la GH afecta el metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas, y a otras glándulas endócrinas incluyendo el páncreas, la tiroides y la glándula suprarrenal, así como también a varias funciones inmunes (Scanes y Harvey, 1984). La hormona de crecimiento parece tener diferentes efectos a corto plazo sobre el metabolismo en aves. Al actuar sobre el metabolismo de los lípidos, estimula la lipólisis, inhibe la lipogénesis en el hígado e incrementa la captura de la glucosa en tejido adiposo (Scanes y Harvey, 1982, Rudas y Scanes, 1983). Además de que la GH incrementa la concentración de glucosa y la circulación.

## I.2 TECNICAS INMUNOMETRICAS

Los inmunoensayos son algunas de las técnicas inmunoquímicas más poderosas. Ellas emplean un amplio rango de métodos para detectar y cuantificar antígenos y anticuerpos y para estudiar la estructura de los antígenos. Con un apropiado ensayo se puede obtener información de una manera rápida y fácil.

Existen muchas variaciones para llevar a cabo un inmunoensayo, y se pueden clasificar en base a diferentes criterios. Hay tres clases de inmunoensayos: 1) ensayo de captura del anticuerpo; 2) ensayo de captura del antígeno y 3) ensayo del "sandwich" de doble anticuerpo (Harlow y Lane, 1988).

En un ensayo de captura de anticuerpo, el antígeno se inmoviliza a un soporte sólido y el anticuerpo marcado se une a él. Después de lavar, el ensayo es cuantificado midiendo la cantidad de anticuerpo retenida sobre el soporte sólido. En un ensayo de captura de antígeno, el anticuerpo se adsorbe al soporte sólido y el antígeno marcado se une a él. Las proteínas no unidas son eliminadas por medio del lavado y el ensayo es cuantificado midiendo la cantidad de antígeno unido. En el ensayo del "sandwich" de doble anticuerpo, un anticuerpo es adsorbido al soporte sólido y el antígeno se une al 1er anticuerpo. El ensayo es cuantificado midiendo la cantidad de un 2o Ab marcado que puede unirse al antígeno.

Cualquier inmunoensayo puede tener cuatro variaciones: 1) que el ensayo tenga un exceso de anticuerpo; 2) un exceso de antígeno; 3) competencia por un anticuerpo y 4) competencia por

un antígeno. Los ensayos en donde hay un exceso de anticuerpo o antígeno para competir son utilizados para detectar y cuantificar antígenos, mientras que los ensayos en los que hay un exceso de antígeno o anticuerpo para competir son utilizados para detectar y cuantificar anticuerpos (Harlow y Lane, 1988).

En principio los factores que deben ser considerados para el diseño correcto de un inmunoensayo son los tipos de anticuerpos disponibles (anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales purificados por afinidad, un solo anticuerpo monoclonal, o dos o más anticuerpos monoclonales ) y el grado de pureza del antígeno.

Los sistemas de detección más comunmente utilizados para los inmunoensayos son los agentes radioactivos y los reactivos marcados con una enzima. Los ensayos que utilizan agentes radioactivos son más fáciles de cuantificar que los que utilizan enzimas como marcador, sin embargo el ensayo enzimático produce resultados más rápidos (Harlow y Lane, 1988).

En el campo de la Endocrinología, y otras áreas de la Biología Experimental, por varias décadas se ha utilizado al radioinmunoensayo como la técnica idónea para la cuantificación de las hormonas tanto en circulación como en tejido. Sin embargo con el gran avance en el conocimiento de nuevas técnicas, en los últimos tiempos se han venido implementando técnicas comparables al radioinmunoanálisis (RIA) en cuanto a su sensibilidad. Una de estas técnicas es la conocida como ensayo inmunoenzimático, la cual provee las mismas ventajas que el RIA pero utilizando tiempos más cortos de incubación que el RIA en términos generales, y además prescinde del uso de radioactividad.

### I.2.1 Radioinmunoanálisis

El RIA, es una técnica de análisis fisicoquímico, que deriva del ensayo de unión proteínica competitiva (CPBA), establecido en 1960 por Ekins (1974) y modificado posteriormente por Berson y Yalow (1959). El término de RIA, se emplea para designar de manera genérica a las técnicas que utilizan anticuerpos (Ab) como proteínas receptoras. El proceso se rige por la ley de acción de masas y, dependiendo de la naturaleza química del elemento saturable se denomina a estas técnicas como: CPBA, REA (ensayo radioenzimático) y RRA (análisis de radioreceptores). Además estos procedimientos tienen como común denominador el empleo de antígeno o su equivalente radioactivo y el principio fundamental en todas es el mismo (Ruiz, 1976; Chopra y col., 1971).

Este principio se basa en la reactividad entre un anticuerpo, cuya concentración fija en el sistema limita el número de sitios de acoplamiento por los que compiten: el antígeno radioactivo, presente en concentraciones limitadas y escasa masa, y el antígeno no marcado que se agrega en cantidades conocidas (puntos de la curva patrón) y en cantidades desconocidas (muestras problema). Así, a medida que se incrementa la concentración del antígeno no marcado, disminuye la posibilidad de que el antígeno radioactivo se acople al anticuerpo y forme el complejo Ag marcado- Ab, siendo cada vez mayor la proporción de complejos Ag-Ab formados, lo que da lugar a una menor cantidad de radioactividad medible en el complejo.

Para los lectores que se interesen en profundizar en el Radioinmunoanálisis se les sugiere consultar las siguientes referencias: Chard, 1982; Thorell, 1983; Abraham, 1975; y Aceves y Legarreta, 1982.

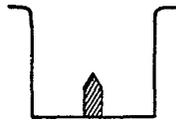
### I.2.2 Inmunoensayo enzimático

Desde hace dos décadas se iniciaron los denominados Ensayos Inmunoenzimáticos (ELISA) por Van Weemen y Schurs (1971) y Engvall y Perlmann (1971). Ellos combinaron el uso del antígeno o anticuerpos inmovilizados sobre una fase sólida, con conjugados de antígeno o anticuerpo marcados con una enzima, para producir ensayos con la sensibilidad y especificidad de una técnica isotópica.

Las virtudes particulares del ELISA son que todos los reactivos son seguros, tienen una vida media larga y el equipo que se utiliza es simple.

El ELISA es una técnica que tiene los mismos fundamentos que el RIA, solo que en el ELISA no se utilizan moléculas radioactivas para marcar al antígeno o al anticuerpo; en su lugar se utiliza una enzima que genere un producto colorido (Fig. 1).

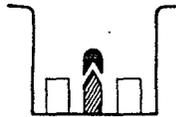
En el campo de la endocrinología muy pocos ELISAs se han implementado. Para hormonas adenohipofisarias se han reportado los siguientes: para prolactina de rata (Signorella y Hymer, 1984); para hormona de crecimiento de rata (Farrington y Hymer, 1987); para hormona de crecimiento bovina (Secchi y col., 1988),



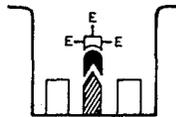
1.- Antígeno adsorbido a la fase sólida



2.- Proteína adsorbida a los sitios no ocupados por el antígeno



3.- Unión del anticuerpo presente en la muestra con el antígeno.



4.- Adición de un segundo anticuerpo acoplado con una enzima.



5.- Adición del sustrato.

Fig. 1 Fundamento del método de ELISA para la detección de antígenos.

y para gonadotropina de trucha (Salbert y col., 1990). Para hormonas esteroides se ha reportado para progesterona bovina (Prakash y col., 1987).

### I.2.3 Factores que determinan la elección de un Inmunoensayo.

Para la elección de un inmunoensayo se deben tomar en cuenta varias consideraciones en cuanto a los factores que se involucran en el desarrollo del ensayo. Los factores que se deben considerar son en general: las concentraciones de los reactantes (antígeno y anticuerpo); disponibilidad y calidad de reactivos; costo y complejidad de la técnica. El intervalo de concentraciones y sensibilidad de cualquier inmunoensayo depende principalmente del tipo de marcaje utilizado, ya sea una molécula radiactiva o una enzima.

Si se comparan el RIA con el ELISA, las dos técnicas resultan ser altamente sensibles, sin embargo se ha reportado que en ciertas condiciones, cuando la calidad del antígeno y anticuerpo son muy buenas, es decir que el anticuerpo sea muy específico a su antígeno, el ELISA logra sensibilidades aún mayores que las alcanzadas por el RIA.

## 1.3 Factores Involucrados en el diseño del ELISA

### 1.3.1 Inmovilización del Antígeno o del Anticuerpo.-

En el ELISA los antígenos y anticuerpos se adsorben físicamente a acarreadores plásticos (poliestireno, polivinilo, polipropileno o policarbonato), y a gomas de silicón o a vidrios tratados.

La mayoría de las proteínas se adsorben a superficies plásticas, probablemente como resultado de interacciones hidrofóbicas entre las subestructuras no polares de las proteínas y la matriz plástica no polar del soporte.

El grado o extensión del "pegado" al soporte depende del coeficiente de difusión de la molécula adsorbente, del radio y área de superficie a ser pegado, al volumen de solución de pegado, a la concentración de la sustancia, a la temperatura y a la duración de la reacción de pegado (Engvall, 1980).

El poliestireno es el compuesto que más ampliamente se ha utilizado como soporte en el ELISA, por permitir un "forrado" o recubrimiento fácil y reproducible.

Una dificultad puede ser que el antígeno o el anticuerpo sólo se adsorben físicamente, no se lleva a cabo ningún tipo de enlace covalente a la fase sólida. Este tipo de lechos pueden perder alguna cantidad de proteína en los procesos de lavado e incubación. Además ciertas proteínas pueden experimentar cierta degradación y en consecuencia disminuir su actividad inmunológica.

Otra desventaja es que la pérdida de adsorción conlleva a una disminución en la precisión y probablemente también la sensibilidad del ensayo. Otra desventaja es que las superficies plásticas tienen una capacidad de adsorción limitada. Sin embargo es fácil y rápida la separación del complejo antígeno-anticuerpo del antígeno o anticuerpo libre, lo cual compensa todas las desventajas antes mencionadas.

El proceso de adsorción, a diferencia de las interacciones antígeno-anticuerpo, no es específico. Por lo que durante la incubación del antígeno o anticuerpo inmovilizado con el anticuerpo o antígeno soluble pueden darse uniones no específicas directamente sobre la fase sólida. Esta adsorción no específica se puede minimizar por la adición de detergentes no iónicos, tales como el Tritón X-100 o el Tween-20. Estos no interfieren con la reacción antígeno-anticuerpo y si previenen la formación de nuevas interacciones hidrofóbicas entre las proteínas adicionadas y la fase sólida (Engvall, 1980).

La concentración óptima del antígeno o anticuerpo para forrar, es generalmente de 1-10  $\mu\text{g/ml}$ . Concentraciones superiores permiten incrementar la adsorción, pero el porcentaje adsorbido al final es menor. Además una alta concentración de proteína durante el forrado incrementa la desadsorción durante las incubaciones con los inmunorreactantes, dando como consecuencia el llamado efecto de prozona.

### **I.3.2 Bloqueo de sitios inespecíficos.**

Otro factor importante que se debe tomar en consideración, es el de prevenir la adsorción inespecífica sobre la fase sólida. Esta adsorción inespecífica se elimina si, posteriormente a la inmovilización del antígeno o anticuerpo, se bloquean los sitios no ocupados por los agentes inmunológicos. Esto se lleva a cabo agregando una solución que contenga proteínas y/o detergentes. Para elegir la solución bloqueadora es importante conocer las condiciones específicas del ensayo. En general se utilizan dos tipos de soluciones que son compatibles para la mayoría de los ensayos inmunoenzimáticos; una es utilizando leche deshidratada y descremada (Johnson y col., 1989) y otra empleando BSA (Towbin y col., 1979). Si las soluciones bloqueadoras con proteínas causan un alto "ruido basal", entonces se pueden sustituir las proteínas por algún detergente, por ejemplo, Tween-20 (Batteiger y col., 1982).

### **I.3.3 Elección de la concentración del antígeno y del anticuerpo.**

El antígeno puede ser cuantificado por su capacidad para inhibir el pegado del anticuerpo al antígeno adsorbido a la fase sólida.

La afinidad del antisuero es el factor más importante entre las variables que determinan la sensibilidad del ensayo.

Para determinar las concentraciones del antígeno y del anticuerpo que se utilizarán, primero se deben hacer titulaciones del

antígeno empleado para forrar el soporte y del antisuero (fig.2A y 2B).

Con este tipo de gráficas, se pueden elegir las concentraciones adecuadas del antígeno y del anticuerpo. La gama de las concentraciones del antígeno, como el de las diluciones del anticuerpo, se elige tomando en cuenta el intervalo comprendido al 50% del desplazamiento para cada caso (Engvall, 1980).

#### I.3.4 Selección de la Enzima.

La enzima debe ser convenientemente detectable al menos al nivel de nanogramos. Esto no solo significa que la enzima deba tener un alto número de recambio, es decir que pueda convertir a un gran número de moléculas de sustrato en moléculas de producto por unidad de tiempo, sino también que el producto sea detectable con una alta sensibilidad.

Una consideración importante en la elección de la enzima es que las muestras a ser medidas no contengan sustancias que puedan interferir con la actividad de la enzima o en su medición. Algunos ejemplos: se debe evitar que las muestras contengan EDTA, <sup>si</sup> la enzima utilizada requiere de metales para su actividad. Similarmente las oxidorreductasas no deben ser utilizadas cuando las muestras contengan preservativos.

Las enzimas que más se han utilizado son: B-galactosidasa, Peroxidasa, Fosfatasa alcalina y Glucosa oxidasa. Para todas ellas existen una gran variedad de sustratos cromogénicos.

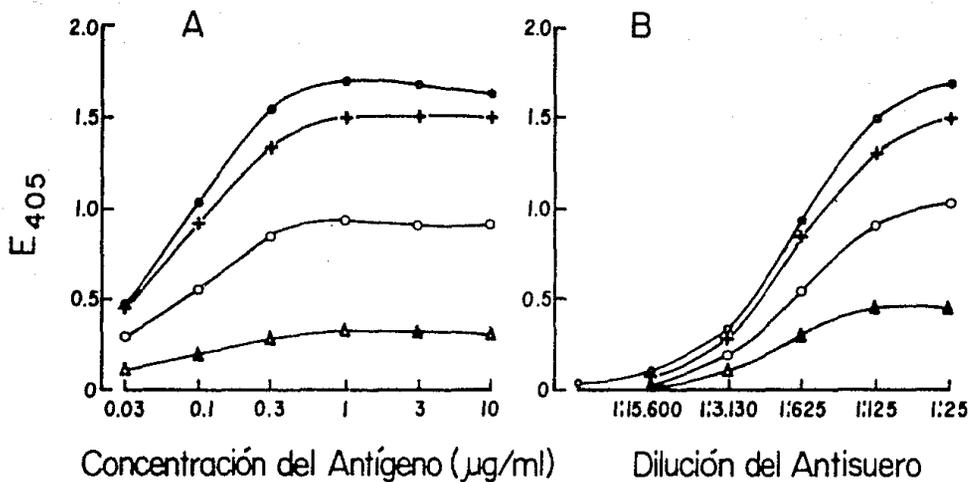


Fig. 2 CURVAS DE TITULACION DE LA CONCENTRACION DEL ANTIGENO UTILIZADO PARA FORRAR Y DE LA CONCENTRACION DE ANTICUERPO.

- A) Actividad Enzimática en función de la concentración del antígeno para forrar para diferentes diluciones de suero 1:25 (●), 1:25 (+), 1:625 (○) y 1:3, 1:25 (Δ);  
 B) Actividad Enzimática en función de la dilución del antisuero en los pozos forrados con  $\alpha$ -fetoproteína  $\mu\text{g/ml}$  (●), 300 ng/ml (+), 100 ng/ml (○), 30 ng/ml (Δ).  
 Enguall, 1980.

Los sustratos cromogénicos son generalmente usados en los ensayos enzimáticos en fase sólida. Estos normalmente se convierten en productos coloridos cuando son modificados por la acción enzimática.

Para los conjugados con peroxidasa en general se utiliza como sustrato el peróxido de hidrógeno con ortofeniléndiamina, sin embargo también se utiliza la orto-toluidina, el ácido 5-amino-salicílico y ABTS (2,2'-Azino-di-3-etil-benzotiazolina-6-Ácido sulfónico). El para-nitrofenil fosfato es un buen sustrato para la fosfatasa alcalina (Engvall, 1980).

### **I.3.5 Marcaje del Antígeno o el Anticuerpo con la Enzima**

Existen muchos métodos para acoplar haptenos, proteínas y carbohidratos a proteínas (tabla II).

Los reactivos acopladores proteína-proteína son generalmente no específicos, ya que reaccionan con los grupos funcionales comunes en todas las proteínas.

La enzima puede conjugarse con el anticuerpo empleando agentes entrecruzadores como el glutaraldehído (Avrameas y Ternyck, 1971) o periodato de sodio (Wilson y Nakane, 1978).

Para obtener óptimos resultados es aconsejable usar anticuerpos purificados por cromatografía de afinidad en los conjugados, ya que el marcaje se lleva a cabo con la mayor parte de la fracción total de inmunoglobulinas del suero. La purificación de los conjugados por precipitación salina o por filtración en gel pueden mejorar su funcionamiento.

TABLA II

Agentes acopladores de enzimas a proteínas.

Compuesto	Grupo reactivo en la proteína	Referencia
Glutaraldehído	-NH <sub>2</sub>	a, b
Diisocianato de tolueno	-NH <sub>2</sub>	c, d
p,p'-difluoro-m,m'dinitro-fenil sulfona	-NH <sub>2</sub>	e
Carbodiimidas	-COOH	f, g
p-Benzoquinona	-NH <sub>2</sub>	h
N,N'-o-fenilendimaleimida	-SH	i
m-Periodato	-SH	j
	-NH <sub>2</sub>	k
	-CHOH	

- a) S. Avrameas, *Immunochemistry* 6,43 (1969).  
 b) S. Avrameas y T. Ternyck, *Immunochemistry* 8,1175 (1971).  
 c) A.F. Schick y S.J. Singer, *J. Biol. Chem.* 236,2477 (1961).  
 d) R.R. Modesto y A.J. Pesce, *Biochim. Biophys. Acta* 229,384 (1971).  
 e) S.S. Tawde y J.S. Ram, *Arch. Biochem. Biophys.* 97,429 (1962)  
 f) S. Avrameas y J. Uriel, *C.R. Acad. Sci.* 262,2543 (1966).  
 g) P.K. Nakane, J.S. Ram y G.B. Pierce, *J. Histochem. Cytochem.* 14,789 (1966)  
 h) T. Ternyck y S. Avrameas, *Immunochemistry* 14,767 (1977).  
 i) K. Kato, Y. Hamaguchi, H. Fukui, y E. Ishikawa, *J. Biochem.* 78,235 (1975); *Eur. J. Biochem.* 62,285 (1976).  
 j) P.K. Nakane y A. Kawaoi, *J. Histochem. Cytochem.* 22,1084 (1974).  
 k) A. Murayama, K. Shimada y T. Yamamoto, *Immunochemistry* 15,523 (1978).

### **I.3.6 Sensibilidad del ELISA.**

Para diseñar un ensayo con una óptima sensibilidad es esencial: a) escoger un antisuero de alta afinidad; b) usar tiempos de incubación que permitan llegar al equilibrio a la reacción antígeno-anticuerpo; c) usar concentraciones bajas de antígeno y anticuerpo y d) utilizar tiempos largos para el desarrollo del color.

Con estos factores tomados en cuenta, la sensibilidad de un ELISA es comparable a la de un Radioinmunoensayo (Engvall, 1980).

### **I.4 Tipos de Inmunoensayos.-**

Los inmunoensayos enzimáticos se han clasificado en ensayos competitivos y no competitivos, dependiendo de si se involucra un paso en el cual el antígeno marcado y no marcado compitan por un número limitado de sitios de anticuerpo (ensayo competitivo), o si el antígeno o anticuerpo a ser medido, primero reacciona con el anticuerpo o antígeno sobre una fase sólida seguida de la cuantificación de la enzima marcada (ensayo no competitivo) (Engvall, 1980).

#### **I.4.1 Ensayos Competitivos.-**

Conjugado antígeno-enzima. Los ensayos para IgG y gonadotropina coriónica humana (HCG) respectivamente fueron los primeros dos ejemplos de inmunoensayos enzimáticos cuantitativos.

Ambos están basados en la competencia del antígeno marcado con la enzima, con el antígeno presente en estándares o muestras problemas, por la unión de una cantidad limitada del anticuerpo acoplado a la fase sólida. En este tipo de ensayos lo primero es la unión (pegado) física o química de una cantidad apropiada de anticuerpo a la fase sólida. Esto se incuba con una solución conteniendo una concentración fija de antígeno marcado, patrones con concentraciones conocidas del antígeno no marcado, o con muestras problemas de concentraciones no conocidas. Esta mezcla de reacción se incuba hasta que la reacción antígeno-anticuerpo llega al equilibrio. Después de lavar, se determina la actividad de la enzima sobre la fase sólida, generalmente por incubación con un sustrato por un cierto período de tiempo.

Las concentraciones del producto de la reacción enzimática son inversamente proporcionales a las concentraciones del estándar o antígeno adicionado.

Conjugado anticuerpo-enzima. este es otro tipo de ELISA de competencia y emplea al anticuerpo marcado con la enzima, con el antígeno pegado a la fase sólida.

En esta técnica la unión del anticuerpo marcado al antígeno inmovilizado es competitivamente inhibido al adicionar estándares del antígeno o muestras problemas.

Como en el caso del ELISA competitivo con antígeno marcado, la concentración del producto de la reacción enzimática medidas al final, son inversamente proporcionales a las concentraciones del antígeno (estándares o muestras problemas).

Esta es la forma más versátil y conveniente, y se le ha modificado al utilizar una anti-inmunoglobulina (2oAb) marcada con la enzima .

El antígeno sobre la fase sólida es incubado con grandes diluciones del anticuerpo con o sin la adición de estándares de antígeno o muestras problemas. Después de lavar, los anticuerpos unidos a la fase sólida son detectados usando una antiIzG marcada con una enzima. El mismo conjugado del 2oAb puede ser usado para diferentes antígenos, siempre y cuando el primer anticuerpo sea preparado en la misma especie contra la que se preparó el 2oAb.

Este método se conoce también como el método de "sandwich" de doble anticuerpo, y ha tenido una amplia aplicación en la endocrinología, especialmente para la cuantificación de hormonas peptídicas.

#### I.4.2 Ensayos no competitivos.-

Ensayo del "sandwich".- El anticuerpo en exceso se inmoviliza y se incuba con estándares de antígeno o muestras problema. Después de lavar, el complejo antígeno-anticuerpo inmovilizado se incuba con un exceso de anticuerpo acoplado a la enzima, el cual se une a uno o más sitios antigénicos libres. Alternativamente el segundo anticuerpo puede estar o no marcado, y el proceso se alarga incluyendo una incubación con un exceso de tercer anticuerpo acoplado a la enzima, el cual es una inmunoglobulina específica contra la especie del animal en el cual el segundo anticuerpo fué levantado.

En este tipo de ensayo la concentración del producto de la reacción enzimática es directamente proporcional a la concentración del antígeno estandar o muestra problema.

#### **I.4.3 Ensayos para medir anticuerpo.**

Otro tipo de ELISA no competitivo es el método indirecto para medir la concentración del anticuerpo. Este procedimiento emplea antígeno inmovilizado y segundo anticuerpo conjugado a la enzima, contra IgG de la especie en la cual los anticuerpos han sido producidos.

Este método ha sido utilizado para medir anticuerpos de una gran variedad de antígenos.

#### **I.5 Ventajas y Desventajas de los Ensayos Inmunoenzimáticos.**

A pesar de que el ELISA competitivo es una técnica muy específica y fácil de ejecutar, cuenta con algunas desventajas.

Para llevar a cabo el ELISA de competencia utilizando antígeno marcado, se requiere de grandes cantidades de antígeno para preparar el conjugado. En los casos en los que el antígeno no esté disponible se puede utilizar anticuerpo marcado o anti-IgG marcada.

Un problema serio en la aplicación del ELISA competitivo, se relaciona con la dificultad de incubar antígeno o anticuerpo marcado con fluidos biológicos tales como: sueros, orina o extractos de tejido. Estos fluidos poseen proteasas, además de que pueden presentar inhibidores de la enzima. Tales sustancias

cuando se presentan pueden alterar la actividad de la enzima utilizada como marcador. Esta dificultad es evitada en el ELISA no competitivo, en el cual la incubación con las muestras problema se lleva a cabo separadamente de la incubación con el antígeno o anticuerpo marcado.

El ELISA no competitivo ofrece ventajas adicionales, puesto que la mayoría de estos ensayos emplean anticuerpos marcados, la purificación y marcaje específico de antígenos individuales no es necesario.

Por lo tanto el mismo procedimiento de marcaje y pegado a la fase sólida puede ser usado para diferentes anticuerpos.

Otra ventaja del ELISA no competitivo es la posibilidad de unir muchas moléculas de anticuerpo marcado a una sola molécula de antígeno polivalente, lo que provee de un elemento de amplificación.

## II. OBJETIVOS DE LA TESIS

- 1) Implementar y optimizar un Ensayo Inmunoenzimático homólogo para la Hormona de Crecimiento de Pollo (cGH).
- 2) Aplicar esta técnica para cuantificar las concentraciones de cGH circulante en 5 razas de pollos de engorda, haciendo un estudio ontogenético durante la etapa de crecimiento rápido (1 - 8 semanas de edad).

### **III. MATERIAL Y METODOS**

#### **III.1 Material Biológico.**

##### **III.1.1 Hormona de Crecimiento de pollo.**

Se purificó cGH a partir de hipófisis de pollos de la raza Pilch según el método de Arámburo y col. (1989a). Se pesó 1 mg de hormona y se solubilizó en un amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 10.3, quedando la solución a una concentración de 1 ug/ul. Se tomó una alícuota y se cuantificó la concentración real de proteína por el método de Lowry (Hartree, 1972).

A esta solución se le agregó merciolate 0.01% y se mantuvo a 4°C.

##### **III.1.2 Obtención del anticuerpo anti-cGH.**

La inmunización se llevó a cabo en conejos de la raza Nueva Zelanda, machos, de aproximadamente 2 kg de peso. La inoculación se realizó directamente en los ganglios poplíteos del animal (Arámburo y col., 1989c).

El suero obtenido se diluyó 1:10 en PBS 0.01 M pH 7.8 y se hicieron alícuotas de 20 ul, las cuales se mantuvieron en congelación hasta su uso.

#### **III.2 Muestras Biológicas.**

Se estudiaron 5 razas comerciales de pollos (Arbor acres, Hubbard hubard, Pilch pilch, Indian River Vantres e Indian River Pilch).

Se obtuvieron muestras de sangre por punción cardiaca de 10 animales de cada raza. Desde el día 1 (eclosión), y después cada semana hasta la octava.

Esto se realizó en una granja experimental ubicada en Cuernavaca, Mor., en donde los pollos fueron criados durante las primeras 8 semanas de vida, en condiciones controladas de alimento, luz, temperatura y espacio.

El muestreo se llevó a cabo entre las 9:30 - 10:30 AM.

### III.3 Material y Reactivos.

El segundo anticuerpo (IgG cabra-anticonejo) conjugado a Peroxidasa, la ortofenilendiamina, Tween-20 y el Affigel-G10 fueron de BioRad Laboratories. Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos (IMMULON II) provenientes de Dynatech. El peróxido de urea fué de HyClone. Se utilizó albúmina bovina de SIGMA.

Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

### III.4 METODOLOGIA

#### III.4.1 Titulación de la cGH y del 1er Ab IgG anticGH.

Para titular tanto a la hormona como al anticuerpo se probaron dos sistemas de amortiguadores: uno de Carbonatos de sodio 0.1M pH 10.3 y otro de Fosfatos salino (PBS) 0.01M pH 7.8.

Se probaron diferentes concentraciones de cGH (500,250,125,62.5,31.25,15.62,7.81,3.90 y 1.95 ng/pozo) diluidas en PBS, y diferentes diluciones del 1er Ab (1:1,000; 1:3,000; 1:10,000; 1:30,000; 1:60,000 y 1:100,000), en una solución de BSA 1%, PBS 0.01 M pH 7.8. Tween-20 0.05%.

Protocolo para la titulación:

- 1) Se incuban 100 ul/pozo de la solución de hormona a la concentración deseada en el amortiguador de carbonatos o PBS en las placas de titulación. Se deja toda la noche a 4°C (16 horas).
- 2) Se lava la placa 5 veces con una solución de PBS, Tween-20 0.05%, (empleando un lavador manual de placas de ELISA, NUNC).
- 3) Se agregan 100 ul/pozo de una solución de BSA 1% en PBS, Tween-20 0.05% y se deja por 1 hora a temperatura ambiente.
- 4) Se lava 5 veces con la solución de lavado.
- 5) Se agregan las diferentes diluciones del 1er Ab en BSA 1%, PBS, Tween-20 0.05%, esto se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 6) Se lava 5 veces.
- 7) Se agregan 100 ul/pozo de la solución del 2oAb (IgG cabra-anticonejo) en una dilución 1:3000, en BSA 1%, PBS, Tween-20 0.05%, y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 8) Se lava 5 veces.

9) Se revela la placa agregando (100 ul) de una solución de orto-fenilendiamina (0.4 mg/ml) más una solución de peróxido de urea (0.2 mg/ml) solubilizados en un amortiguador de citratos de sodio 0.05M pH 5.0, se deja por 10 min. en la oscuridad.

10) Se detiene la reacción agregando 50 ul ácido sulfúrico 4 N.

11) Se lee la D.O. de las soluciones presentes en los pozos de la placa en un lector de placas de ELISA a 490 nm.

Esta metodología se llevó a cabo en dos tipos de placas; una de baja afinidad (LINBRO) y otra de alta afinidad (IMMULON II). Con objeto de evaluar cuál funcionaba mejor para el caso particular de la hormona de crecimiento de pollo.

#### III.4.2 Optimización de la Curva Patrón.

Como se trata de un ensayo de competencia, las muestras problema y las distintas concentraciones de cGH de la curva patrón (diluidas en PBS 0.01 M pH 7.8) se ponen a incubar con el 1er Ab en tubos de ensayo a 40C, toda la noche (16 horas). El intervalo de concentración empleado fue de 0.125 - 32 ng cGH/pozo.

Las condiciones del ELISA fueron las siguientes:

1) Forrado de la placa con 100 ul/pozo de la solución de cGH en amortiguador de carbonatos a 40C (16 horas).

2) Bloqueo de la superficie no ocupada del soporte con una solución de BSA 1% en PBS, Tween-20 0.05% por 1 hora a temperatura ambiente.

3) Competencia con el 1er Ab, se agregan 100 ul/pozo de cada una de las muestras previamente incubadas (ver arriba), se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente.

4) Incubación con el 2o Ab (1:3000), durante 2 horas a T.A.

5) Revelado de la placa 15 min. en la oscuridad.

Se probaron varias concentraciones de cGH para forrar la placa (62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 6.0 y 4.0 ng/pozo).

Simultáneamente se probaron diferentes diluciones del 1er Ab (1:10,000, 1:30,000 y 1:40,000).

Una vez elegida la concentración de cGH para el forrado de la placa y la dilución del 1er Ab. Se procedió a optimizar el tiempo de competencia con el 1er Ab., probándose diferentes tiempos; 15, 30, 60 y 120 min.

Una vez elegido el mejor tiempo se procedió a optimizar el tiempo de revelado de la enzima. Por lo que se probaron diferentes tiempos de revelado: 15, 30, 45 y 60 min.

#### **Puntos control.**

En cada ensayo se evaluaron el BLANCO = densidad óptica del pozo al que no se le adicionó 1er Ab, y el 100% de UNION = densidad óptica del pozo al cual no se le adicionó estandar de cGH.

### III.4.3 Prueba de Paralelismo e Identidad

Para verificar si el anticuerpo anti-cGH reconocía por igual tanto a la cGH purificada en el laboratorio como a la que se encuentra en circulación o en los tejidos, se probaron diluciones de un homogeneizado de hipófisis ( $1 \times 10^1$  -  $1 \times 10^6$ ) y diluciones de suero de pollo (1:2 - 1:200).

### III.4.4 Pruebas de Especificidad.

1) Con el objeto de saber que tan específico era el ensayo, se decidió probar la inmunorreactividad cruzada de otras hormonas de crecimiento (bovina, rata y humana), así como prolactina bovina.

Se probaron las mismas concentraciones utilizadas como estándares en la curva patrón de cGH (0.125 -32 ng/pozo), adicionando un punto de 2.000 ng/pozo.

2) Otra prueba de especificidad fue verificar que el ensayo no reconocía a ninguna de las proteínas presentes en el suero de pollo. Para ello se procesó suero de pollo en una columna de afinidad, acoplado a Affigel G-10 a IgG anti-cGH., con el objeto de eliminar la cGH del suero, y obtener una fracción sérica libre de hormona.

Para poder preparar la columna de afinidad se purificaron inmunoglobulinas acGH a partir de suero de conejos previamente inmunizados con cGH. Para la purificación se utilizó el siguiente protocolo:

- 1.- Se equilibra una columna previamente empacada con Sefarosa 4B acoplada a proteína A, con un amortiguador de fosfatos de sodio 0.1 M pH 8.0 (aproximadamente 3 volúmenes de columna).
- 2.- Se aplica un flujo de 30 ml/hora con una bomba peristáltica.
- 3.- Se aplica el suero de conejo previamente centrifugado (2 ml) y se deja incubar con la resina, a T.A. por dos horas.
- 4.- Se eluye el suero, lavando la columna con el amortiguador de fosfatos de sodio 0.1 M pH 8.0, hasta que la resina se vea completamente blanca.
- 5.- Para eluir a las inmunoglobulinas acGH, se aplica Ácido acético 0.1 M con cloruro de sodio 0.15 M, este paso se lleva a cabo sin bomba peristáltica, es decir, se destapa la columna y se le agrega directamente el amortiguador.
- 6.- Se colectan fracciones de 2 ml en tubos que contienen 100  $\mu$ l de PBS 10X para neutralizar el pH.
- 7.- Se juntan las fracciones de IgGs y se ponen a dializar (a 4°C) en agua bidestilada. Se le hacen varios cambios.
- 8.- Una vez dializadas las inmunoglobulinas se concentran en una cámara de ultrafiltración (AMICON) y se vuelven a dializar en el amortiguador de Hepes 0.1 M pH 7.5.
- 9.- Una vez purificadas las IgG a cGH se preparó la columna de afinidad con el Affigel G-10.

#### Preparación de la columna de afinidad Affigel G-10 - IgG a cGH

- Se tomaron 4 ml de Affigel G-10
- Se lavó con isopropanol ( 3 volúmenes de resina)
- Posteriormente se activó la resina con agua desionizada fría (3 volúmenes de resina)
- Se agregaron las IgGs a cGH en un amortiguador de Hepes 0.1 M pH 7.5
- Se acoplaron aproximadamente 40 mg de inmunoglobulinas
- Se dejó la reacción toda la noche a 40C
- Posteriormente se detuvo la reacción con una solución de etanolamina 1 M pH 8.0 (100 ul/ml gel).

Una vez sintetizada la columna de afinidad, y equilibrada en PBS 0.01 M pH 7.8:

- se aplicaron a la columna 500 ul de suero de pollo y se dejó incubar por 2 horas a T.A.
- posteriormente se eluyó el suero con PBS 0.01 M pH 7,8 y se concentró, probándolo posteriormente en el ELISA.
- la cGH adsorbida a la resina se eluyó con ácido acético 0.1 M + 0.15 M de cloruro de sodio, colectando fracciones de 1 ml y neutralizándolas con 100 ul de PBS 10 X.

#### III.4.5 Medición de la cGH circulante en las 5 razas de pollos.

Las muestras de sangre se centrifugaron para obtener el suero, se hicieron alícuotas y se congelaron hasta su uso.

Para la cuantificación de la cGH se midieron 20 ul de cada suero por duplicado.

Los valores obtenidos se graficaron en función de la edad de los animales.

### III.5 Análisis Estadístico.

A los valores obtenidos de cGH circulante para las 5 razas de pollos, se les aplicó una prueba estadística de Análisis de Varianza de dos vías.

#### IV. RESULTADOS.

##### IV.1.1 Preservación de la cGH

La cGH se mantuvo en solución a 4°C con mertiolate al 0.01%. Este método de preservar a la cGH resultó bastante eficiente pues permitió que los ensayos fueran reproducibles.

Esto se debe a que se observó que cuando la cGH era varias veces congelada y descongelada, los ensayos perdían sensibilidad debido posiblemente a que con este proceso la hormona formaba agregados moleculares que ya no eran igualmente reconocidos por el anticuerpo.

##### IV.1.2. Preservación del anticuerpo.

El haber diluido el anticuerpo y haberlo alicuotado para evitar pasos de congelación y descongelación, resultó un buen procedimiento pues evitó la desnaturalización del anticuerpo.

Se observó que cuando el anticuerpo no se encontraba diluido y era congelado y descongelado, la sensibilidad del ensayo disminuía. Es por esto que se decidió diluirlo y hacer alicuotas que se utilizaran en un máximo de dos ensayos, de esta manera se alargaba la vida media del anticuerpo.

##### IV.1.3. Titulación del antígeno y del anticuerpo.

La hormona de crecimiento de pollo es una proteína con características fisicoquímicas básicas, cuya solubilización

Óptima se lleva a cabo en soluciones alcalinas. Es por esto que se probaron dos sistemas de amortiguadores uno de Carbonatos pH 10.3 y otro de PBS pH 7.8, dando mejores resultados el amortiguador de carbonatos. Como se puede observar en la figura 3 en donde la solubilización de la cGH se hizo en el amortiguador de PBS 0.01 M pH 7.8, las curvas de titulación fueron más bajas que las obtenidas para el amortiguador de carbonatos. Se puede apreciar en esta figura (3) que el 50% del desplazamiento se dió entre las diluciones del 1er Ab de 1:30,000 - 1:100,000 con concentraciones de cGH que iban de 31.25 - 62.0 ng/pozo. Mientras que para el amortiguador de carbonatos de sodio 0.1 M pH 10.3 el 50% del desplazamiento se dió en el mismo rango de diluciones del 1er Ab. (1:30,000 - 1:100,000), sin embargo el rango de concentraciones de cGH era más bajo (7.81 - 16.25 ng/pozo (fig. 4). Por lo que se optó utilizar el sistema de carbonatos.

Estas titulaciones se llevaron a cabo en dos tipos de placas; una de baja afinidad (LINBRO) y otra de alta afinidad (IMMULON II). Se eligió la placa IMMULON II debido a que los valores de los BLANCOS eran casi de cero.

#### IV.1.4. Optimización de la concentración de antígeno para recubrir la fase sólida.

Para la optimización de la concentración del antígeno fue necesario probar diferentes concentraciones de cGH para recubrir la placa y diferentes diluciones del 1er Ab con el objeto de encontrar la curva con mejor desplazamiento y por lo tanto con mejor sensibilidad.

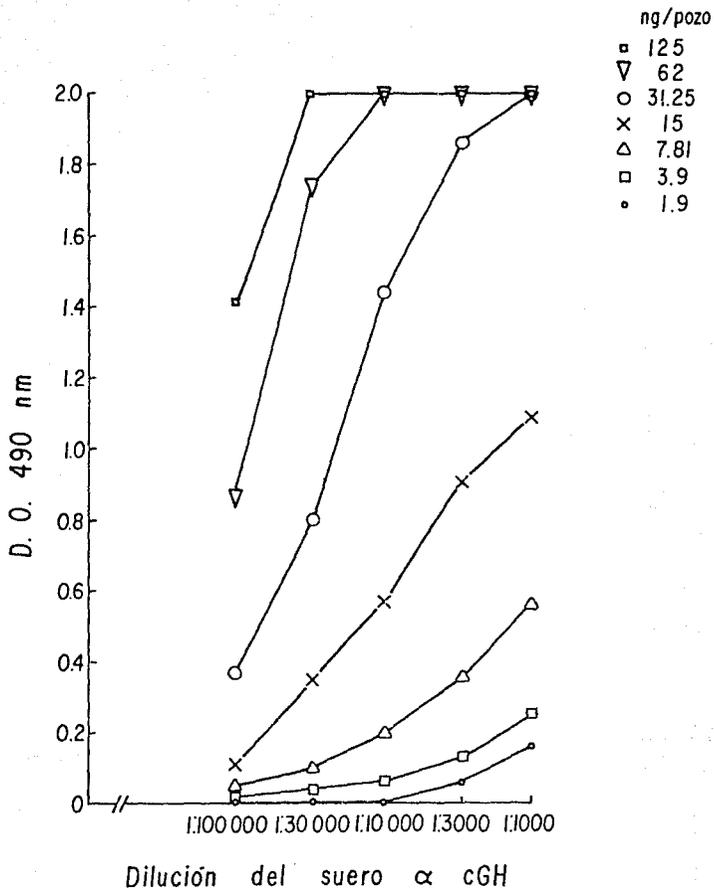


Fig. 3 Curvas de titulación de cGH y del suero anti-cGH en PBS 0,01 M pH 7,8. Se incubaron 100  $\mu$ l/pozo de cGH (1,9-125 ng/pozo), 16 hrs. a 4°C; se agregaron 100 $\mu$ l/pozo de las diluciones del suero anti-cGH 2 horas a T.A.; se adicionaron 100 $\mu$ l/pozo del 2° Ab-HRP (1:3000) 2 h. a T.A.; se adicionó el sustrato (100 $\mu$ l/pozo) 15 min. y se leyó la D.O. de la placa en un lector de ELISA a 490 nm.

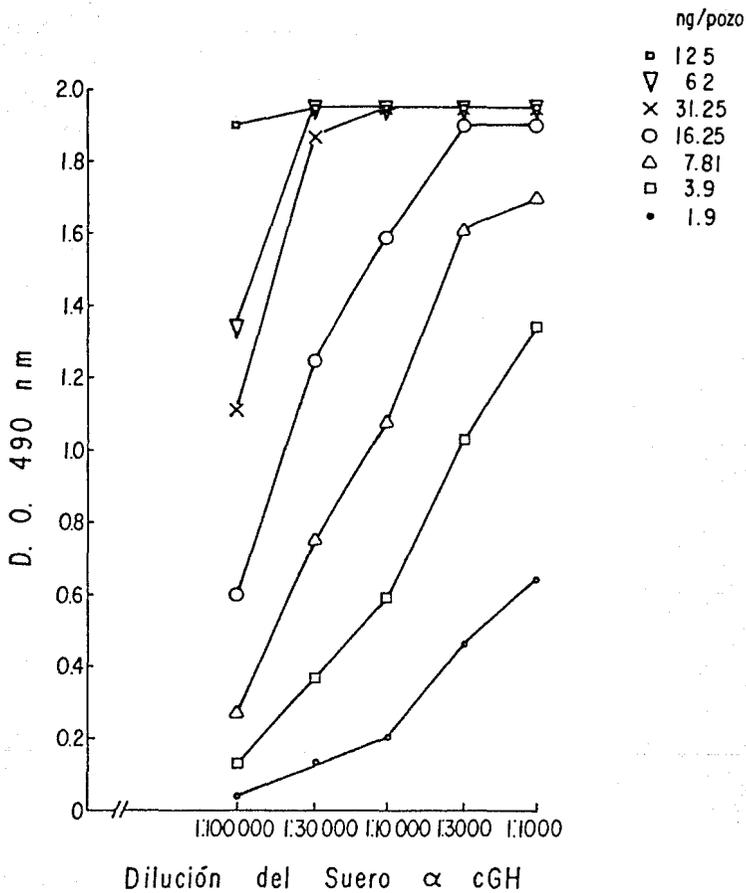


Fig. 4 Curvas de titulación de cGH y del suero anti-cGH en Carbonato 0.1 M pH 10.3. Mismas condiciones que la Fig. 3.

Primero se forró la placa con dos concentraciones de cGH (62.5 y 31.25 ng/pozo) y dos diluciones de 1er Ab (1:10,000 y 1:14,000) y como se puede observar en las figuras 5A y 5B prácticamente no hubo desplazamiento en ninguna de las dos condiciones probadas.

Se disminuyeron las concentraciones de cGH a 15.62 y 7.81 ng/pozo con dos diluciones de 1er Ab de 1:10,000 y 1:30,000. Para la concentración de 15.62 ng/pozo, con ambas diluciones de 1er Ab, si hubo desplazamiento, sin embargo, el 50% de este se dió en dosis muy altas de cGH (16 ng/pozo) en la dilución 1:30,000 y de 32 ng/pozo para la dilución 1:10,000 (fig.6A).

Para la concentración de 7.81 ng/pozo, en ambas diluciones del 1er Ab, el 50% del desplazamiento se dió a los 8 ng/pozo de la curva estándar (fig. 6B).

Sin embargo como se quería que el ensayo fuera más sensible se probó una concentración de cGH aún más baja (4.0ng/pozo) con las mismas diluciones del 1er Ab, dando como resultado un desplazamiento muy bajo (fig.7).

Por último se probó forrar con 6 ng/pozo, con dos nuevas diluciones del 1er Ab, 1:30,000 y 1:40,000, resultando un desplazamiento del 50% a la dosis de 6 ng/pozo de la curva estándar, para ambas diluciones (fig. 8).

#### IV.1.5. Tiempos de Competencia con el 1er Ab.

Para la optimización de la competencia con el 1er Ab. y para obtener una mayor sensibilidad, se decidió que las muestras a competir con la cGH inmovilizada a la fase sólida se encontraran en el equilibrio. Es por esto que estas muestras (estándares de

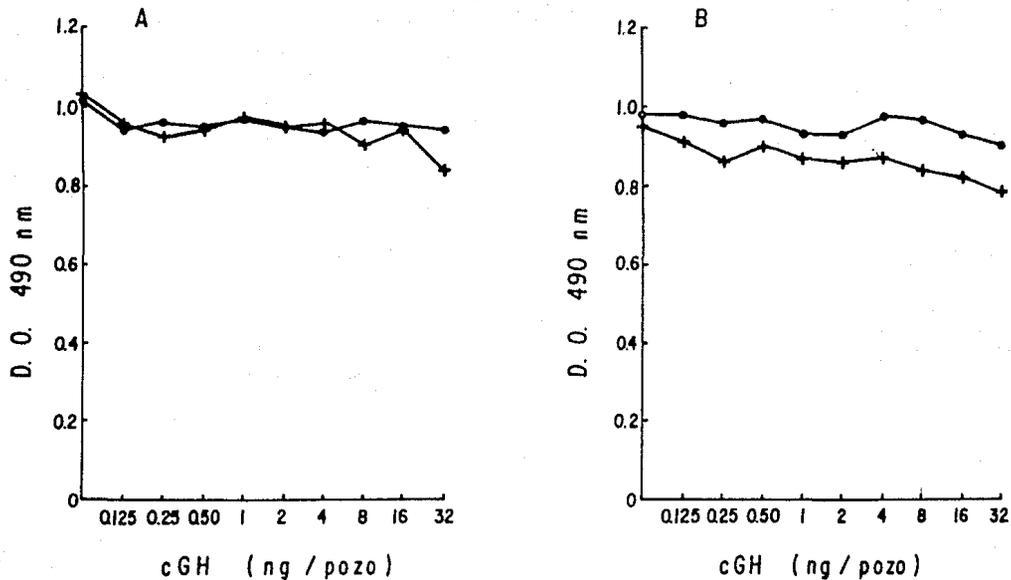


Fig. 5 Optimización de la Curva Patrón.  
Se utilizaron dos concentraciones de cGH para forrar la placa, A) 62.5 ng/pozo y en B) 31.25 ng/pozo, con dos diluciones del suero anti-cGH (○) 1:10,000 y (\*) 1:30,000. Siguiendo el mismo protocolo de la fig. 3.

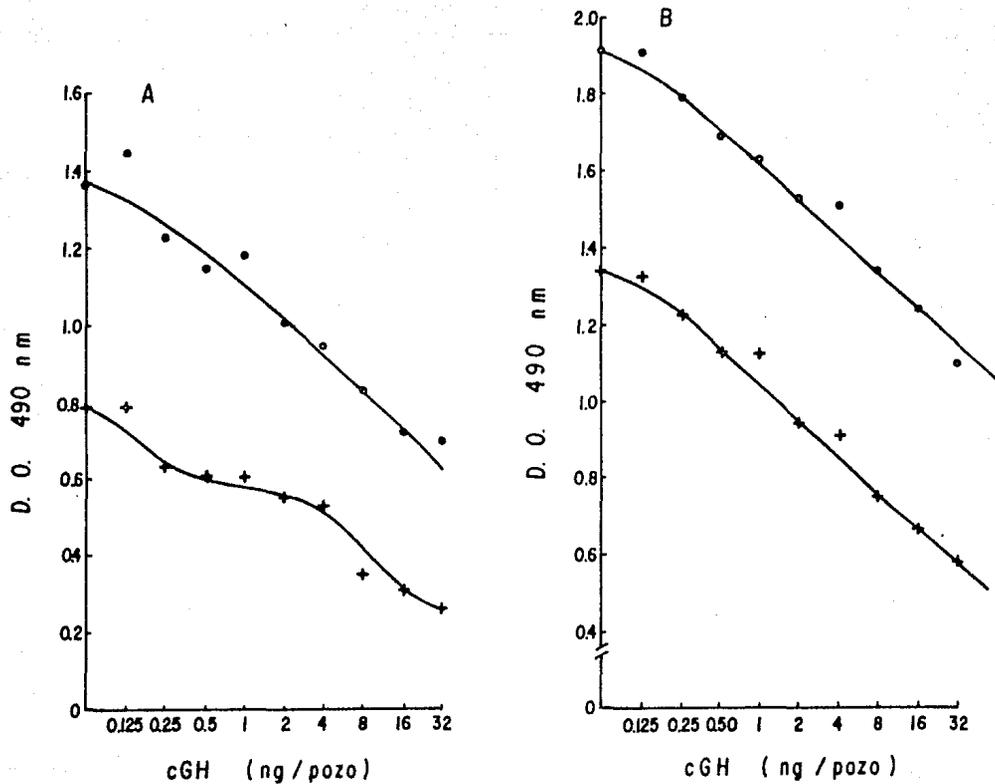


Fig. 6 Optimización de la Curva Patrón. En A) 7.81 ng/pozo de cGH, en B) 15.62 ng/pozo de cGH. (●) 1:10,000, (+) 1:30,000. Mismas condiciones que la fig. 3.

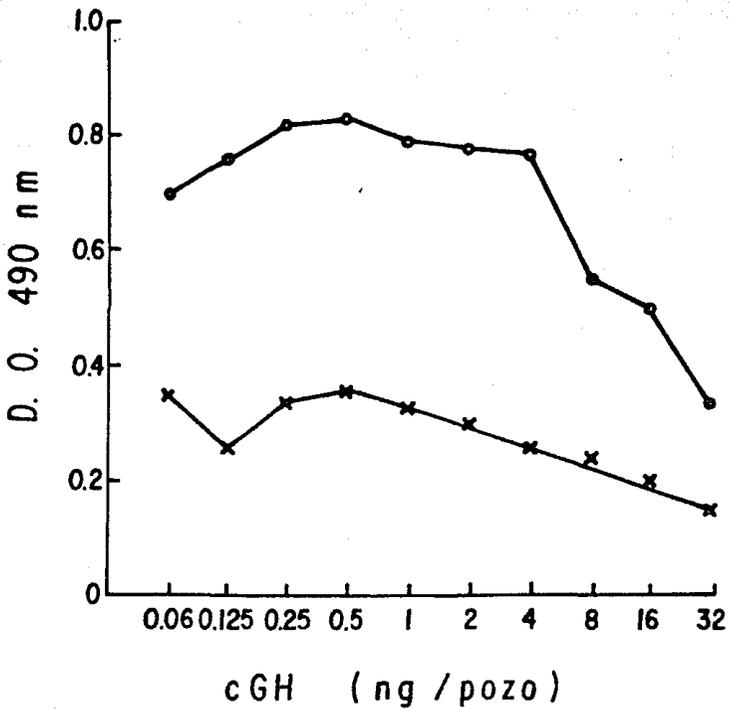


Fig. 7 Optimización de la Curva Patrón. Se utilizaron 4 ng/pozo (o) 1:10,000, (x) 1:30,000. Mismas condiciones de la fig. 3.

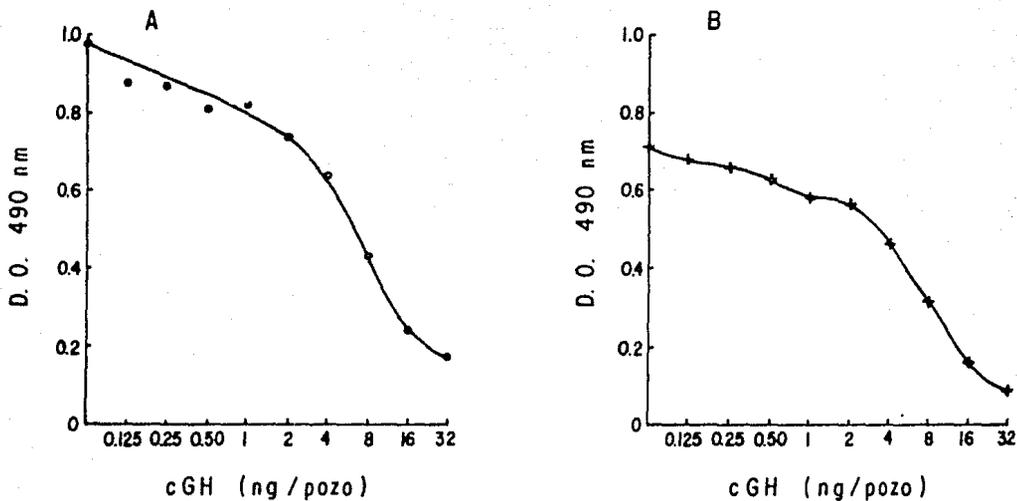


Fig. 8 Optimización de la Curva Patrón. Se probaron 6 ng/pozo para forrar la placa y dos diluciones del ter. Ab, A) 1:30,000 en B) 1:40,000. Mismas condiciones de la fig. 3.

cGH para la curva patrón y muestras problemas con el 1er Ab.) se preincubaron por 16 horas a 40°C antes de ponerlas a competir en los pozos previamente recubiertos con cGH, de esta manera nos asegurábamos que la reacción en la preincubación llegara al equilibrio. Esto es importante de tomar en cuenta ya que si las muestras no son preincubadas la sensibilidad del ensayo disminuye.

Posteriormente se probaron diferentes tiempos de competencia (15, 30, 60 y 120 min) con el 1er Ab diluido 1:30,000 y 1:40,000.

Como se puede observar en la figura 9 a los 15 minutos de incubación con el 1er Ab, tanto para la dilución de 1:30,000 como para la de 1:40,000, las curvas de desplazamiento resultaron muy bajas, pues el rango de lecturas de D.O. iba de 0.3-0.05 para la dilución de 1:30,000 y de 0.2-0.03 para la dilución de 1:40,000. Para el tiempo de 30 minutos se puede apreciar que las lecturas de D.O. siguen siendo bajas para ambas diluciones. Para el tiempo de incubación de 60 minutos las curvas de desplazamiento presentan una pendiente más grande con respecto a las curvas de los tiempos de 15 y 30 min., además el rango de lecturas de D.O. iba de 0.8-0.1 para la dilución de 1:30,000 y de 0.7-0.05 para la dilución 1:40,000. Para el tiempo de 120 min. las curvas patrón presentaban mayores lecturas de D.O. para ambas diluciones, sin embargo la pendiente se mantenía similar a las obtenidas para los 60 min. de incubación. Por lo que se eligió incubar por 60 min. la competencia, a la dilución 1:40,000 del 1er Ab por dar un desplazamiento del 50% a los 6ng/pozo de la curva patrón.

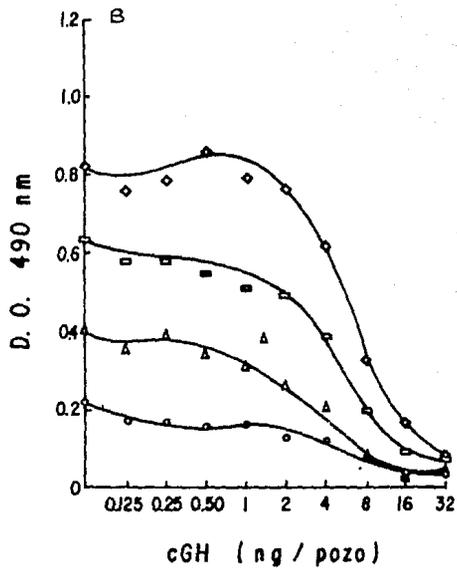
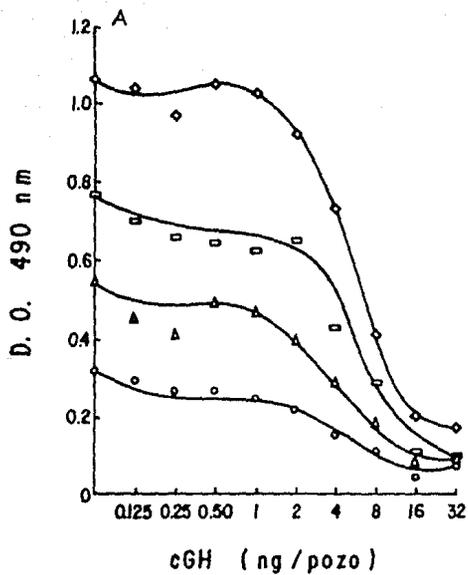


Fig. 9 Tiempos de Competencia con el 1er. Ab anti-cGH. Se probaron diferentes tiempos de competencia de las muestras previamente incubadas (16 hs) de los estándares de cGH de la curva patrón con dos diluciones del 1er. Ab A) 1:30,000 y en B) 1:40,000, 15 min (○), 30 min (△), 60 min (□), 120 min (◇). Se utilizaron 6ng/pozo de cGH para forrar la placa. Mismo protocolo de la fig. 3.

#### IV.1.6. Tiempos de revelado de la enzima

Finalmente se optimizó el tiempo de revelado de la enzima, probándose diferentes tiempos (15, 30, 45 y 60 min.).

Como se puede observar en la figura 10A a los 15 y 30 minutos de revelado de la enzima las curvas patrón presentaban un buen desplazamiento, sin embargo, las lecturas de D.O. eran bajas pues la lectura máxima fue de 0.5 a los 15 min. y de 0.7 a los 30 min. En la fig. 10B se puede apreciar que la mejor curva de desplazamiento se obtenía a los 60 min., debido a que la sensibilidad era más alta para este tiempo, además de que el intervalo de lecturas de D.O. iba de 1.0-0.07, siendo un intervalo de lecturas bastante confiable.

Por esto se decidió elegir el tiempo de 60 minutos de revelado de la enzima, debido a que se mantenían las condiciones de sensibilidad ya alcanzadas (concentración de cGH para forrar de 6 ng/pozo, dilución del 1er Ab. de 1:40,000 y un tiempo de competencia de 60 min.).

#### IV.1.7 Optimización de la Curva Patrón.

Una vez probadas y establecidas todas las variables que se pueden controlar, se procedió a optimizar las condiciones de la curva patrón de la siguiente manera:

- 1) Forrado con 6 ng/pozo de cGH durante toda la noche a 40C, poniendo a incubar simultáneamente, en tubos por separado los estándares de cGH y las muestras problema con el 1er Ab diluido 1:40,000, también en frío.

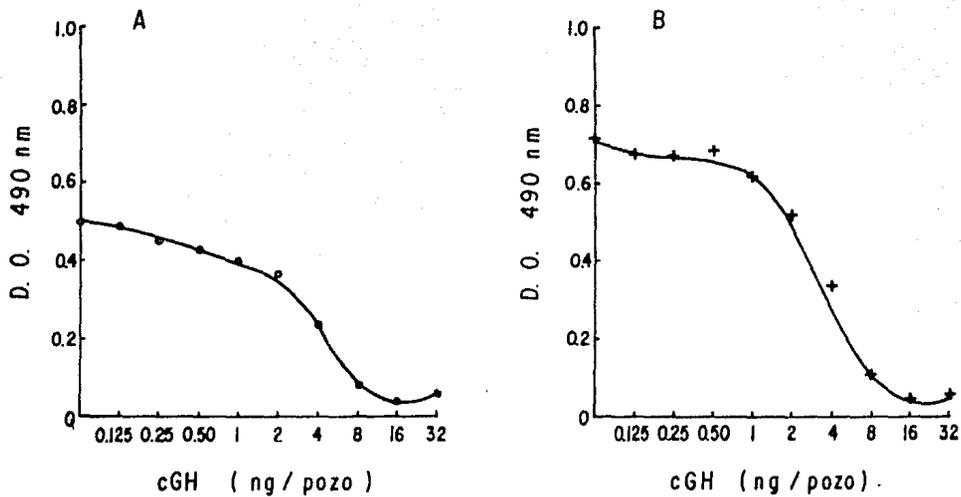


Fig. 10A Tiempos de revelados de la enzima. Se probaron dos tiempos para revelar a la enzima A) 15 min, en B) 30 min. Se utilizaron 6 ng/pozo para forrar, 1 hora de tiempo de competencia con el 1er Ab 1:40,000, 2º Ab (1:3000) por 2 horas.

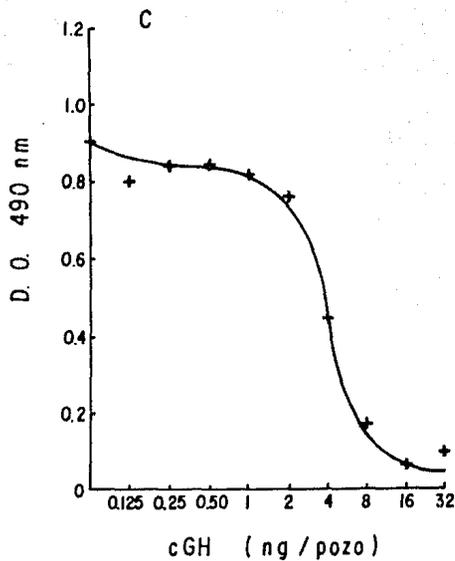
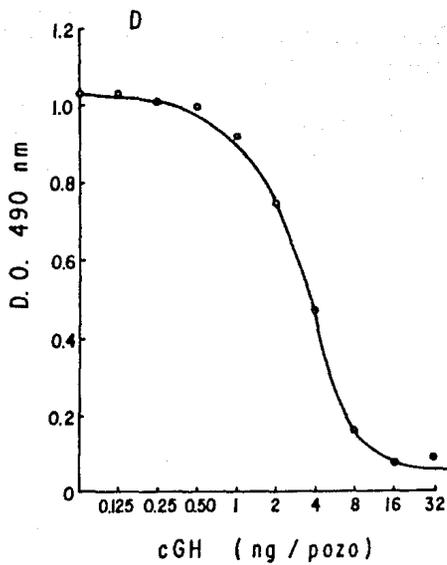


Fig. 10B Tiempos de revelado de la enzima. Se probaron dos tiempos de revelado D) 60 min, en C) 45 min. Mismas condiciones que la fig. 10A.

- 2) Lavado 5X
- 3) Bloqueo del soporte plástico con una solución de BSA 1% en PBS, Tween-20 0.05%, durante una hora a temperatura ambiente.
- 4) Lavado 5X
- 5) Poner a competir la mezcla de 1er Ab y estándares de cGH (ya preincubados) en cada pozo en donde se encuentra el antígeno fijo, durante una hora a T.A.
- 6) Lavado 5X
- 7) Incubación con el 2o Ab (1:3.000) durante 2 horas.
- 8) Lavado 5X
- 9) Revelado de la reacción enzimática agregando el sustrato, por 1 hora en la obscuridad.

En la fig. 11 se puede observar la curva patrón promedio, con un coeficiente de variación intraensayo ( $n=8$ ) de  $3.53 \pm 0.63\%$  y un coeficiente interensayo ( $n=16$ ) de  $3.8 \pm 0.5\%$ , para la dosis de 4 ng/pozo de la curva patrón. Bajo las condiciones empleadas se obtuvo una sensibilidad de 1.0 ng/pozo, con un desplazamiento del 50% en la dosis de 6.0 ng/pozo de la curva patrón.

#### IV.1.8. Ensayo de Paralelismo e Identidad

Se probaron diferentes diluciones de un homogeneizado de hipófisis de pollo y diluciones de suero de pollo. Para comparar como se comportaban estas curvas con respecto a la curva patrón de cGH, y así determinar si el Ag empleado en esta era inmunológicamente idéntico al que se encuentra en tejido y en la circulación de manera natural.

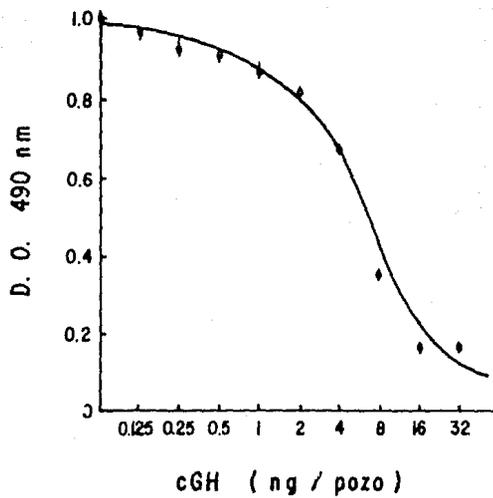


Fig. 11 Curva Patrón de cGH. Se muestra el valor promedio de los puntos (n=16)  $\pm$  SEM.

Como se puede observar en la fig. 12, tanto el homogeneizado de hipófisis como las diluciones del suero de pollo, presentaron curvas de desplazamiento paralelas a la curva patrón de cGH.

Debido a que se iban a hacer determinaciones de cGH circulante (suero de pollo) para las 5 razas comerciales de pollos, se eligió el intervalo de diluciones del suero de pollo las cuales estuvieran en la parte lineal de la curva patrón, para de esta manera poder cuantificar la cGH circulante con mayor precisión.

Como se puede observar en la figura 12, para la curva de suero de pollo, el intervalo de diluciones que correspondían a la parte lineal iba de 6.25-25 ul/pozo de suero. Se eligió un volumen de 20 ul para llevar a cabo las determinaciones de las 5 razas de pollos. Debido a que era un volumen fácil de medir y por lo tanto con menos fuente de error, además de ser un volumen que entraba en la parte lineal de la curva patrón de cGH.

#### **IV.1.9 Ensayos de Especificidad.**

##### **IV.1.9.1 Con respecto a otras hormonas adenohipofisarias.**

En este ensayo se probaron diferentes hormonas de crecimiento (bovina, de rata y humana ) y prolactina bovina a las mismas concentraciones de la curva patrón de cGH, además se agregó un punto de 2,000 ng/pozo, para ver la especificidad del anticuerpo en este sistema.

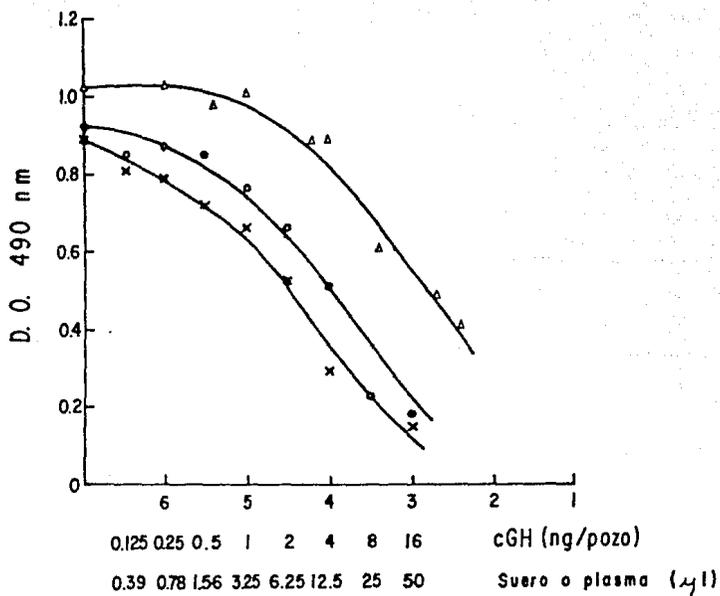


Fig. 12 Curvas de Paralelismo e Identida. Se probó un homogeneizado de hipófisis de pollo ( $1 \times 10^1 - 1 \times 10^6$ ) ( $\Delta$ ), diluciones de suero de pollo de 1:1 - 1:125 (x), comparando con la curva patrón (e). El ensayo se llevó a cabo bajo las condiciones de la curva patrón.

Para la GH de rata y bovina se logró ver un ligero desplazamiento del 50%, pero sólo para la concentración más alta (2000 ng/pozo). Mientras que para la GH humana y prolactina bovina no se obtuvo desplazamiento alguno. Estos resultados indican que el anticuerpo anti-cGH utilizado es altamente específico, pues la inmunorreactividad cruzada fué menor al 0.005% (fig. 13).

#### IV.1.9.2 Contra las proteínas del suero de pollo.

Para verificar que el ELISA sólo reconocía a la cGH presente en las muestras de suero, obtenidas para el estudio ontogenético de las concentraciones de hormona en las 5 diferentes razas de pollos, se procedió a eliminar a la cGH de una muestra de suero de pollo.

Para lo cual como ya se mencionó en la sección métodos, el suero se separó por una cromatografía de afinidad (Affigel-IgG anti-cGH) para de esta manera limpiar al suero de la cGH presente, y posteriormente probarlo en el ELISA verificando que el anticuerpo no reconocía a ninguna proteína de las existentes en el suero, como se puede observar en la siguiente tabla:

		ng de cGH
suero de pollo normal	20 ul	6.0
suero de pollo sin cGH	20 ul	0

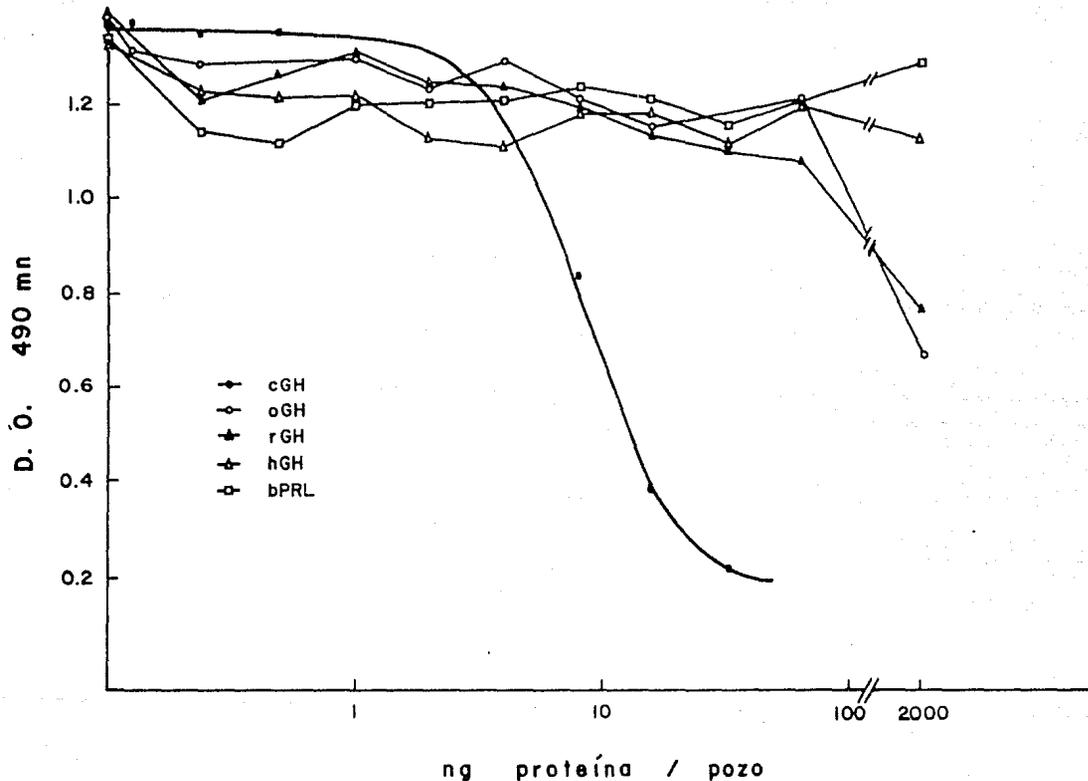


Fig. 13 Especificidad del ELISA de cGH. Se probó la curva patrón contra otras hormonas de crecimiento y prolactina, provenientes de diferentes especies de mamíferos, a las siguientes dosis: 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 2000 ng/pozo. El ensayo se llevó a cabo bajo las mismas condiciones de la curva patrón de cGH. oGH (GH ovina); rGH (GH rata); hGH (GH humana); bPRL (prolactina bovina).

#### IV.1.10 Niveles circulantes de cGH en las 5 razas de pollo.

Se midieron los niveles de cGH para las 5 razas de pollos de engorda, a partir del día 1 (eclosión) hasta la octava semana de edad. (tabla # III).

Los valores obtenidos de hormona de crecimiento se graficaron con respecto a la edad y al peso corporal de los animales (ver gráficas 14,15,16,17 y 18).

Las tres razas puras (Hubard hubard, Arbor acres y Pilch pilch ) presentaron perfiles hormonales similares entre si, presentando en la 1a y 2a semana los picos de máxima concentración de cGH, para posteriormente decrecer.

Las dos razas híbridas (Indian River Vantres e Indian River Pilch) a su vez también presentaron perfiles hormonales similares entre si, pero ligeramente diferentes a las razas puras. En estas razas se observó que los picos de mayor concentración de cGH se dieron a la 1a y 5a semana de edad.

Los valores obtenidos para cGH oscilaron en un intervalo de 600-300 ng/ml. Valores que resultaron relativamente altos con respecto a lo reportado en la literatura.

No se observaron diferencias con respecto al sexo entre machos y hembras.

Se puede apreciar que los niveles de cGH presentan una relación inversa con respecto al peso corporal, corroborando lo reportado en la literatura.

También se puede apreciar que los niveles de cGH presentan una relación casi directa con respecto a la ganancia relativa de peso corporal a lo largo del crecimiento (figuras 14 - 18).

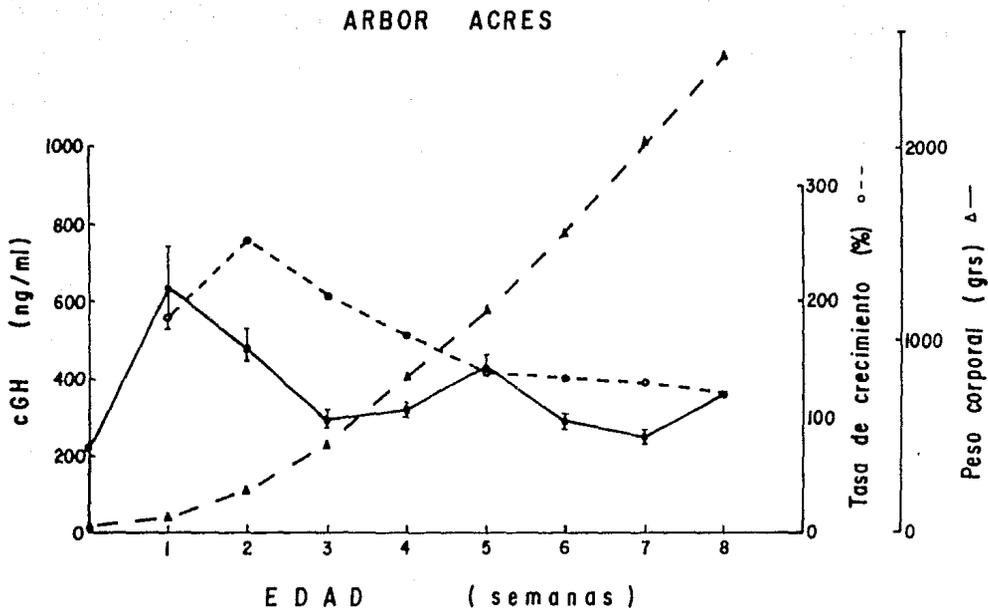


Fig. 14 Perfil de las concentraciones de cGH circulante en pollos de la raza ARBOR ACRES, desde el día 1 (eclosión) hasta la 8a semana de edad. Los puntos representan el valor promedio ( $n=10$ )  $\pm$  SEM  $\bullet$ —; tasa de crecimiento  $\circ$ - - -; peso corporal  $\blacktriangle$ — . El ensayo se llevó a cabo bajo las mismas condiciones de la curva patrón.

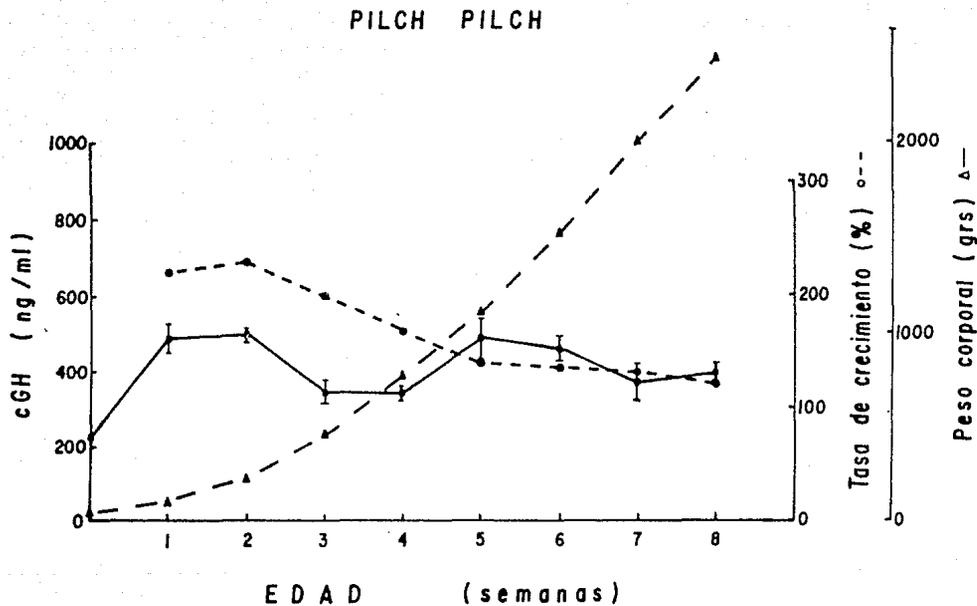


Fig. 15 Perfil de las concentraciones de cGH circulante en pollos de la raza PILCH PILCH, desde el día 1 (eclosión) hasta la 8a semana de edad. Los puntos representan el valor promedio ( $n=10$ )  $\pm$  SEM  $\leftarrow$  : tasa de crecimiento  $\circ \rightarrow$  : peso corporal  $\triangle \rightarrow$  : El ensayo se llevó a cabo bajo las condiciones de la curva patrón.

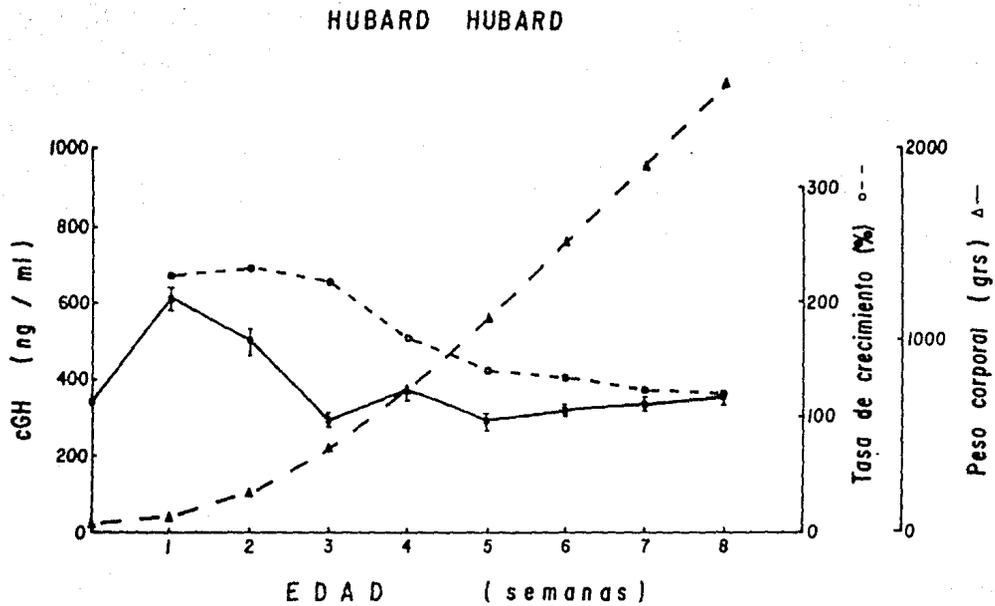


Fig. 16 Perfil de las concentraciones de cGH circulante en pollos de la raza HUBARD HUBARD, desde el día 1 (eclosión) hasta la 8a semana de edad. Los puntos representan el valor promedio (n=10) ± SEM —●— ; tasa de crecimiento—○— ; peso corporal —△—. El ensayo se llevó a cabo bajo las condiciones de la curva patrón.

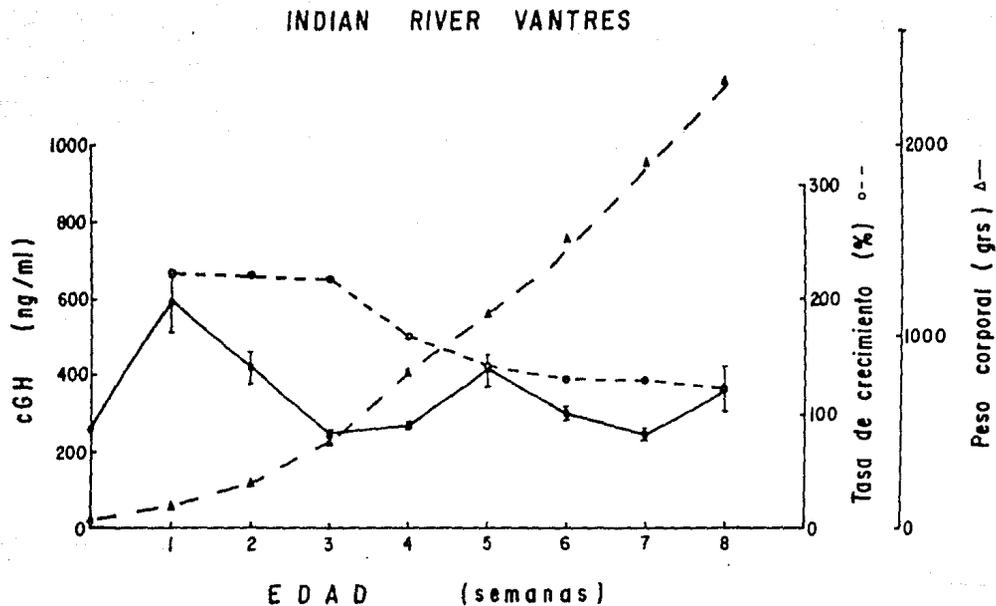


Fig. 17 Perfil de las concentraciones de cGH circulante en pollos de la raza INDIAN RIVER VANTRES, desde el día 1 (eclosión) hasta la 8a semana de edad. Los puntos representan el valor promedio ( $n=10$ )  $\pm$  SEM  $\leftarrow$ ; tasa de crecimiento  $\circ-\circ$ ; peso corporal  $\triangle-\triangle$ . El ensayo se llevó a cabo bajo las mismas condiciones de la curva patrón.

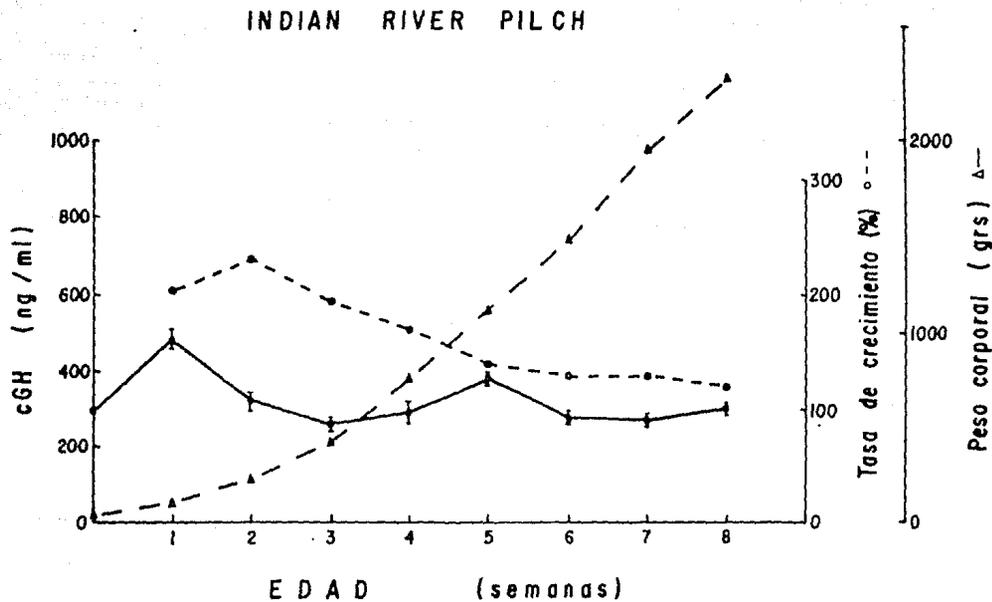


Fig. 18 Perfil de concentraciones de cGH circulante en pollos de la raza INDIAN RIVER PILCH, desde el día 1 (eclosión) hasta la 8a semana de edad. Los puntos representan el valor promedio ( $n=10$ )  $\pm$  SEM  $\longleftrightarrow$ ; tasa de crecimiento  $\circ-\circ$ ; peso corporal  $\Delta-\Delta$ . El ensayo se llevó a cabo bajo las mismas condiciones de la curva patrón.

T A B L A III

Concentración de cGH circulante durante la ontogenia de pollos de engorda

Edad Semanas	Arbor acres		Hubard hubard		Pilch pilch		Indian River Vantres		Indian River Pilch	
	cGH (ng/ml±SEM)	Peso (grs)	cGH (ng/ml±SEM)	Peso (grs)	cGH (ng/ml±SEM)	Peso (grs)	cGH (ng/ml±SEM)	Peso (grs)	cGH (ng/ml±SEM)	Peso (grs)
1 día	275	48	340	40	225	45	260	50	290	50
1a.	638±108 d	90	615±31 d	90	492±37 a	100	591±(80) c	110	486±(30) c	101
2a.	488±41 a	230	500±35 c	208	496±17 a	231	421±(36) a	243	324±(24) a	234
3a.	291±9 c	473	297±15 a,b	454	344±31 c	466	255±(8) b	482	259±(13) b	456
4a.	325±13 b,c	810	363±23 a	769	340±18 c	791	272±(15) b	806	295±(25) a,b	793
5a.	436±30 a,b	1160	296±10 b	1105	491±52 a	1122	411±(92) a	1136	382±(15) d	1128
6a.	294±7 c	1562	320±13 a,b	1510	458±39 a,b	1540	307±(11) b	1506	278±(8) a,b	1498
7a.	256±16 c	2048	336±15 a,b	1917	373±51 b,c	2010	255±(8) b	1930	277±(10) a,b	1967
8a.	364±6 a,c	2493	354±21 a,b	2345	394±30 a,c	2450	366±(53) a,b	2359	301±(10) a,b	2334

Para el día 1 el valor representa una mezcla de sueros de 10 animales

De la 1a. a 8a. semana n = 10

El análisis estadístico se hizo por ANOVA ( $P < 0.05$ ), letras diferentes indican diferencias significativas.

#### IV.11.1 Análisis Estadístico.

El análisis de varianza de dos vías, comparó las concentraciones de cGH circulante entre las 5 razas de pollos estudiadas. Este análisis concluyó que la raza Pilch pilch, es significativamente diferente a las otras cuatro razas de pollos. Que las razas Indian River Vantres e Indian River Pilch son iguales entre sí. Que la raza Indian River Vantres comparte características similares con las razas Arbor acres y Hubard hubard. Con una significancia de  $p \leq 0.05$ ).

También se comparó para cada raza, si las concentraciones de cGH obtenidas para cada semana de edad eran significativamente diferentes. Con respecto a este análisis se observó que la 1er semana es significativamente diferente a las demás, que la 2a y 5a semana fueron similares entre sí, pero diferentes a las otras edades, y que la 3a, 4a, 6a, 7a y 8a fueron semejantes entre sí (ver tabla III).

## V. DISCUSION

En la ultima década se han hecho considerables progresos en el campo de la Endocrinología, acercándonos cada vez más al entendimiento de la gran diversidad de funciones en las que se involucran las hormonas. Estos estudios nos han llevado a tratar de entender a nivel molecular los cambios que se dan, tanto en la secreción como en la regulación de las hormonas, en condiciones fisiológicas muy particulares.

Es por esto que cobra una gran importancia el contar con técnicas altamente sensibles que nos permitan determinar las concentraciones de las hormonas, tanto de las que se encuentran en circulación como de las almacenadas en tejidos.

A pesar de que en el laboratorio ya se había optimizado el radioinmunoanálisis (RIA) para la cGH, se decidió implementar un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación de cGH, debido a que esta técnica cuenta con varias ventajas sobre el RIA. Si bien ambos inmunoensayos se basan en los mismos fundamentos, en el RIA la molécula marcada solo da una señal de decaimiento, mientras que en el ELISA el sustrato de la enzima continua transformándose en un producto, a menudo en un rango de aproximadamente 100,000 moléculas por minuto. Más aún el ELISA no requiere de un equipo costoso, y elimina el uso de materiales radiactivos, aún tomando en consideración que ciertas sustancias que se utilizan en el ELISA pueden ser tóxicas. El ELISA no requiere de licencias para poder adquirir los reactivos, los cuales son muy estables, y no son tan costosos como los utilizados en el RIA, además de que poseen una vida media más

larga. Aunado a esto el ELISA no requiere de tiempos de incubación tan largos como los del RIA, lo cual es una gran ventaja. Con estos antecedentes el ELISA tiene importantes ventajas sobre el RIA, logrando sensibilidades similares y en ciertas circunstancias obteniendo sensibilidades aún mayores que las logradas por el RIA.

A continuación se discutirán los factores involucrados en el diseño del ELISA para cGH, haciendo comparaciones con el RIA de cGH.

Como se mencionó anteriormente la hormona de crecimiento de pollo (cGH), es una proteína con características fisicoquímicas básicas, lo cual es muy importante de tomar en cuenta para su caracterización. A lo largo de la experiencia que se ha tenido al trabajar con esta hormona, hemos tenido que considerar ciertos factores que la afectan.

Se observó que la cGH no debe ser congelada y descongelada varias veces, pues esto provoca que la hormona posiblemente forme agregados que el anticuerpo no reconoce dando como consecuencia que la reproducibilidad del ensayo disminuya.

Es por esto que se decidió mantener a la cGH en una solución de carbonatos de sodio pH 10.3 con mertiolate al 0.01% y almacenada a 4° C., lo cual dió muy buenos resultados pues de esta manera se obtuvieron ensayos bastante reproducibles.

De igual manera se razonó con el anticuerpo anticGH, pues se vió que si era varias veces congelado y descongelado su afinidad disminuía, haciendo que el ensayo perdiera sensibilidad, por lo que se decidió diluirlo en PBS 1:10 y hacer alícuotas pequeñas

que solo se utilizaran en dos ensayos. De esta manera el anticuerpo siempre mostró una buena respuesta en los ensayos.

#### TITULACION DEL ANTIGENO Y DEL ANTICUERPO

Para los ensayos de titulación se probaron dos amortiguadores uno de carbonatos pH 10.3 y otro de fosfatos salino pH 7.8 dando mejores resultados el amortiguador de carbonatos, debido a que como posee un pH más alcalino, hace que la cGH se encuentre mejor solubilizada y por lo tanto sea más estable.

Con respecto a los dos tipos de placas que se probaron: con la de baja afinidad (LINBRO), los valores del blanco eran altos, es decir que probablemente se dieran interacciones no específicas, por poseer una baja afinidad para la cGH. Mientras que para la placa de alta afinidad (IMMULON II) los valores del blanco, fueron bastante bajos o igual a cero, lo que nos indicó que esta era la mejor placa para trabajar con menos fuente de error, debido a que la cGH se adsorbía con mayor afinidad.

Para las titulaciones de la cGH y del anticuerpo anti-cGH, se eligieron concentraciones de ambos que abarcaran un rango amplio para poder visualizar mejor las curvas de titulación.

Así, para el amortiguador de carbonatos se obtuvo que el 50% de desplazamiento se dió entre las concentraciones de cGH de 16.25 - 7.81 ng/pozo; y empleando al 1er Ab a la dilución entre 1:10,000 a 1:50,000. Por otra parte, para el amortiguador de PBS el 50% de desplazamiento se dió para la dosis de cGH de 62.5 - 31.25 ng/pozo, y del 1er Ab a las diluciones entre 1:30,000 a 1:100,000.

Con estos resultados se decidió utilizar el amortiguador de carbonatos ya que con éste se requerían concentraciones más bajas de cGH para obtener un desplazamiento al 50%, es decir se aumentaba la sensibilidad y se obtenía una buena reproducibilidad.

En cuanto a la dilución del 1er Ab, se vió que del intervalo de 1:10,000 a 1:50,000, la dilución óptima para obtener un desplazamiento al 50% fue de 1:40,000.

En cuanto a las condiciones del ELISA para la titulación con respecto a los tiempos de incubación con el 1er Ab y 2o Ab, se decidió que fueran de 2 horas para asegurarnos que la reacción antígeno-anticuerpo llegara al equilibrio.

Para los demás pasos de este protocolo, nos basamos en las metodologías descritas en la literatura para ensayos de titulación. Es decir, el tiempo de forrado de la placa (toda la noche a 4°C), el tiempo de bloqueo con BSA 1% (1 hora) y la concentración del sustrato (0.4 mg/ml y 0.2mg/ml de peróxido de urea) más 15 min. de tiempo de revelado.

#### Optimización de la Curva Patrón

Como ya se mencionó anteriormente, se probaron diferentes diluciones de cGH para forrar la placa, y diferentes diluciones del 1er Ab. con el objeto de encontrar la curva con la mejor sensibilidad.

Se observó que si se utilizaban altas concentraciones de cGH (62.5, 31.25 y 15.62 ng/pozo) y bajas concentraciones del 1er

Ab (1:10,000 y 1:14,000), la sensibilidad del ensayo no era tan buena, pues el 50% del desplazamiento se daba en dosis altas de la curva patrón (16 y 32 ng/pozo).

Por el contrario cuando se decidió disminuir la concentración de cGH (4 ng/pozo) con dos diluciones del 1er Ab (1:10,000 y 1:30,000), prácticamente no había desplazamiento.

Sin embargo al probar 6 ng/pozo para forrar la placa y una dilución de 1:40,000 del 1er Ab, la curva patrón presentó un desplazamiento del 50% en la dosis de 6 ng/pozo de la curva patrón.

Se decidió utilizar estas concentraciones tanto de cGH como de anticuerpo, pues las lecturas de densidad óptica al 100% de unión eran de 1 unidad, lo que resultaba bastante práctico, pues de esta manera se trabaja con lecturas que se podían detectar con gran reproducibilidad. Si comparamos estas condiciones para la optimización de la curva patrón en el ELISA con respecto al RIA, se puede apreciar que en el ELISA se requiere de una menor cantidad de cGH, pues para forrar la placa y para los estándares de la curva patrón solo se requiere de 1  $\mu$ g de hormona, mientras que para el RIA se requiere de más hormona (6  $\mu$ g para la yodación más la necesaria para los estándares de la curva patrón). Con respecto al antisuero en el ELISA se utiliza en una dilución de 1:40,000 mientras que para el RIA se utiliza 1:24,000 (Arámburo y col. 1989c). En este sentido se puede ver que el ELISA requiere de menores cantidades tanto de hormona como de antisuero, con respecto al RIA.

Para la optimización de los tiempos de incubación se tomó en cuenta que los tiempos cortos de incubación hacen disminuir la sensibilidad del ensayo, además de que la variabilidad aumenta debido a que las reacciones pueden no llegar al equilibrio.

Esto se demostró al probar los diferentes tiempos de competencia con el 1er Ab, pues como se puede observar en la fig. 9, el mejor tiempo fué a los 60 min.

De igual manera sucedió con el tiempo de revelado, pues se vió que cuanto más tiempo se dejaba la incubación las lecturas eran mejores y la sensibilidad se mantenía estable, decidiéndose por el tiempo de 60 min.

Con respecto al 2° Ab. nos basamos en la literatura, y en la experiencia en el laboratorio con las inmunoelctrotransferencias (Arámburo y col., 1990a) en donde se utiliza en una dilución de 1:3000 y una incubación de 2 horas. Como se puede apreciar el ELISA requiere de menores tiempos de incubación que el RIA. El ELISA se lleva a cabo en aproximadamente 21 horas, mientras que el RIA requiere de mayores tiempos de incubación, en total 96 horas. En cuanto a la dilución del 2° Ab, en el ELISA se utiliza en una dilución de 1:3000 mientras que en el RIA se requiere más concentrado (1:20), sin embargo es importante hacer notar que el 2o Ab cumple funciones diferentes en cada tipo de ensayo, en el ELISA se requiere más diluído que en el RIA puesto que en este tipo de inmunoensayos, el 2o Ab se utiliza para marcar al 1er anticuerpo que se unió al antígeno, y de esta manera poder hacer la cuantificación, mientras que en el RIA el 2o Ab sirve para precipitar el complejo antígeno-anticuerpo, y es por esto que se requiere de una mayor concentración. Como se puede observar en la

fig. 11 las condiciones que se manejaron de rutina permitieron trabajar con un ELISA altamente sensible (1.0 ng/pozo) y reproducible pues tanto el coeficiente de variación intraensayo, como el interensayo fueron pequeños (3.53% y 3.8% respectivamente).

#### Ensayo de Paralelismo e Identidad.

El ELISA reconoce de igual manera, tanto a la hormona pura como a la nativa que se encuentra circulante en la sangre, así como a la que se encuentra en tejido hipofisiario, como se puede observar en la fig. 12 en donde las curvas fueron paralelas a la curva patrón de cGH pura.

Estos resultados prueban que en la hormona purificada se mantienen sitios antigénicos que también están presentes en la hormona nativa, los cuales son reconocidos de igual forma por el anticuerpo empleado.

Estos resultados fueron similares a lo observado por medio del radioinmunoensayo (Arámburo y col., 1989c), lo cual corrobora que esta técnica es igualmente sensible a una técnica isotópica. Sin embargo en el RIA el volumen de muestra que se requiere para hacer las determinaciones de las muestras problema es de 50 - 100  $\mu$ l, mientras que en el ELISA los volúmenes de muestras problema son menores de 10 - 20  $\mu$ l.

Como se puede apreciar, en general el ELISA posee ciertas ventajas sobre el RIA, lo que la hace una técnica alternativa para la cuantificación de las concentraciones de cGH.

## Ensayo de Especificidad con hormonas adenohipofisarias.

Como ya se vió en los resultados obtenidos en este ensayo, el anticuerpo utilizado para el ELISA fue totalmente específico para la hormona de crecimiento de pollo, pues la inmunorreactividad cruzada con otras hormonas adenohipofisarias (GH bovina, GH rata, GH humana y prolactina bovina ) fue del 0.005%. Esto sugiere que los anticuerpos anti-cGH reconocen epítomos conformacionales muy específicos de la hormona y que no son compartidos con otras hormonas debido, posiblemente a que no se encuentran expuestos o presentes a pesar de la gran homología a nivel de estructura primaria con la cGH (60 - 80%).

Estudio ontogenético de la circulante en 5 razas de pollos de engorda.

Las razas utilizadas para este estudio fueron diferentes en cuanto a sus características genéticas.

Tres de ellas son razas consideradas genéticamente puras (Hubard hubard, Arbor acres y Pilch pilch), mientras que las otras dos fueron razas híbridas (Indian River Vantres e Indian River Pilch).

Esto es importante de mencionar porque parte del objetivo de este estudio era ver si existían diferencias en los niveles circulantes de cGH con respecto a sus características genéticas.

Como se pudo observar en los patrones de concentración para las razas puras (fig. 14,15 y 16) estas tres razas presentaron un

perfil de cGH bastante similar, observándose en la 1a y 2a semanas de edad los picos de máxima concentración de cGH.

Mientras que para las razas híbridas el perfil de cGH fue similar entre ellas pero ligeramente diferente al de las razas puras.

En las razas híbridas como se puede observar en las figs. 17 y 18, los picos de mayor concentración de cGH fueron en la 1a y 5a semana de edad.

También es importante hacer notar que en las primeras dos semanas de edad los coeficientes de variación fueron altos, esto se puede deber muy probablemente a que la secreción de GH se da de una manera desincronizada (Harvey y col., 1979b), además de que se debe tomar en cuenta la variabilidad que existe entre individuos de la misma raza. Según el análisis de varianza de dos vías, cuando se compararon los niveles de cGH entre las 5 razas se vió que la raza Pilch pilch resultó significativamente diferente de las otras cuatro razas. Que las razas híbridas (Indian River Vantres e Indian River Pilch) resultaron ser similares entre sí, con respecto a sus concentraciones de cGH. Las razas Arbor acres, Hubard hubard e Indian River Vantres, también comparten similitudes entre sí.

Con respecto a las concentraciones obtenidas de cGH para cada raza, se observó que para todas las razas la 1er semana fue la que presentó los valores más altos de cGH, las semanas 2a y 5a fueron similares entre sí pero diferentes a las demás, y las semanas 3a, 4a, 6a, 7a y 8a son semejantes entre sí.

Esto coincide con los perfiles de cGH obtenidos para cada raza, en donde en general la 1a, 2a y 5a semana fueron las edades

con mayores concentraciones de cGH, mientras que en la 3a, 6a, 7a y 8a los niveles son menores, en particular en las últimas tres edades los niveles de cGH se mantienen con poca variación.

Se corroboró que existe una relación inversa entre la concentración de cGH y el peso corporal. Sin embargo se vio una correlación casi directa entre las concentraciones de cGH y la tasa de crecimiento. Es decir, que cuando los pollos son jóvenes y presentan altas tasas de crecimiento, las concentraciones de cGH también son elevadas y conforme los pollos se van haciendo adultos y su tasa de crecimiento disminuye, los niveles de cGH también decrecen.

También se observó que no hubo diferencias en las concentraciones de cGH con respecto al sexo, lo cual se contradice con lo reportado en la literatura, en donde se ha visto que los machos jóvenes presentan concentraciones más elevadas que las hembras. Sin embargo esto puede tener una explicación y es que el número de animales con los que se trabajó fué pequeño  $n=10$  (5 para c/sexo) mientras que en lo reportado manejan números más grandes de animales.

Otro aspecto interesante que se pudo observar en este estudio fué el hecho de que las concentraciones obtenidas de cGH para todas las razas fueron de 2 - 6 veces más altos que lo reportado en la literatura.

Para tratar de darle una explicación a esto se deben de hacer varias consideraciones; primeramente hacer referencia que los valores reportados en la literatura han sido cuantificados por RIA lo cual crea ciertas diferencias en cuanto al tipo de

sistema utilizado, pues si bien estas dos técnicas tienen los mismos fundamentos, en el RIA tanto la hormona como el anticuerpo se encuentran en solución, mientras que en el ELISA la hormona se encuentra inmovilizada a una fase sólida.

Esto da como consecuencia que el ELISA sea un método más sensible, debido a que al estar el antígeno inmovilizado a una fase sólida sus determinantes antigénicos se encuentran totalmente expuestos, mientras que en el caso del RIA al encontrarse en solución los reactantes es muy posible que el anticuerpo no tenga la misma facilidad para reconocer a algunos determinantes antigénicos.

Otro factor que se debe tomar en cuenta es lo referente a las concentraciones a las cuales se encuentra el antígeno y el anticuerpo, como ya se mencionó la calidad del anticuerpo utilizado en este ensayo es muy buena y esto se ve reflejado en la dilución a la cual se utiliza (1:40,000). Además de que también la concentración de la hormona es baja (6 ng/pozo). Dando como consecuencia un ensayo altamente sensible y específico.

Otro hecho que valida la especificidad del ensayo fue el control de suero sin cGH, el cual al haber dado lecturas de cero, nos indicaba que el anticuerpo no reconocía a ninguna otra proteína presente en el suero de pollo.

Esto se corroboró no solo con el ELISA sino con una inmunoelectrotransferencia que se realizó paralelamente (datos no presentados) en donde ninguna de las proteínas que se transfirieron al papel de nitrocelulosa fueron reconocidas por el anticuerpo.

Por lo que respecta a los valores obtenidos para los sueros de pollo, pudieran ser valores reales si consideramos que el ELISA en ciertas ocasiones resulta ser una técnica hasta 10 veces más sensible que el RIA (Prakash y col., 1987).

Salbert y col. (1990), reportaron un ELISA para gonadotropina de trucha, en donde observaron que el límite inferior de sensibilidad para el RIA era de 300 pg/ml mientras que para el ELISA fue de 70 pg/ml.

Esto es una evidencia más, que apoya el hecho de que el ELISA es una técnica que detecta menores concentraciones que las detectables por RIA, siendo esto una posible explicación a los altos valores encontrados de cGH en la circulación de los pollos estudiados.

Como se puede observar a lo largo de la discusión de los resultados el ELISA para cGH resultó ser una técnica, que bajo nuestras condiciones fue altamente sensible y específica. En comparación con el RIA para cGH el ELISA puede ser una técnica alternativa para las determinaciones de la hormona, pues además de superar la sensibilidad, ofrece varias ventajas como son: un menor tiempo de duración del ensayo; concentraciones más bajas de cGH y de antisuero; volúmenes más pequeños de muestra problema; y sobre todo la eliminación de material radiactivo.

## VI. PERSPECTIVAS FUTURAS.

El contar con una técnica tan sensible y específica como lo fue el ELISA para cGH, nos permitirá seguir caracterizando a la hormona de crecimiento de pollo (cGH), en cuanto a sus características de su estructura-función.

En este sentido, trataremos de ver si las variantes de carga y de masa que se han reportado para esta hormona, que poseen actividades independientes, pueden ser detectadas en la circulación, esto tendría una gran relevancia pues trataríamos de saber en donde se lleva a cabo el procesamiento de estas variantes.

Por otro lado se podría determinar la cGH que se secreta tanto en ensayos in vivo como in vitro, bajo condiciones fisiológicas muy particulares.

## VII. CONCLUSIONES.

- Se implementó un Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) para la determinación de la hormona de crecimiento de pollo (cGH).
- La curva patrón presentó una sensibilidad al 50% del desplazamiento a la dosis de 6.0 ng/pozo de cGH. El intervalo útil de medición bajo estas condiciones fue de 1.0 - 32 ng/pozo.
- El ELISA reconoce por igual tanto a la hormona de crecimiento de pollo que se encuentra circulante en la sangre, así como la que se encuentra en el tejido hipofisiario, generando curvas paralelas.
- El ELISA para cGH, resultó ser específico para la hormona de crecimiento de pollo, pues la inmunorreactividad cruzada con otras hormonas adenohipofisarias fue menor de 0.005%.
- Se obtuvo un coeficiente de variación interensayo de  $3.8 \pm 0.5\%$  (n=16), y un coeficiente de variación intraensayo de  $3.53 \pm 0.63\%$  (n=8).
- Los valores obtenidos para los sueros de las 5 razas de pollos estudiados, resultaron ser de 2 a 6 veces más altos que los reportados por el RIA.
- Con respecto a los patrones de concentración de cGH a lo largo del crecimiento obtenidos para las 5 razas de pollos de engorda, la raza Pilch Pilch resultó ser significativamente diferente a las otras 4 razas.
- En conclusión se obtuvo un ELISA altamente sensible, homólogo y específico para la cuantificación de la hormona de crecimiento de pollo (cGH).

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Abraham, G.E. (1975) Handbook of Radioimmunoassay. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel. p.177.
- 2.- Aceves, V.C.Y. y Legarreta, F.G. (1982) Determinación de valores normales de triyodotironina (T<sup>3</sup>) y tiroxina (T<sup>4</sup>) en dos grupos de vertebrados de consumo humano: Bovinos y Caprinos. Tesis de Licenciatura de Biología, Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. p. 95.
- 3.- Arámburo, C., Carranza, M., Sánchez, R. and Perera, G. (1989a) Partial biochemical and biological characterization of purified chicken growth hormone (cGH). Isolation of cGH charge variants and evidence that cGH is phosphorylated. Gen. Comp. Endocrinol. 76: 330 - 339.
- 4.- Arámburo, C., Campbell, R.M. and Scanes, G.C. (1989b) Heterogeneity of chicken growth hormone (cGH). Identification of lipolytic and non-lipolytic variants. Life Sci. 45:2201- 2207.
- 5.- Arámburo, C., Sánchez, R., Fenton, B., Perera, G. y Valverde-R.C. (1989c). Desarrollo de un radioinmunoensayo homólogo y específico para la detección de hormona de crecimiento de pollo (cGH). Vet. Mex. 20:397-405.
- 6.- Arámburo, C., Montiel, J. L., Perera, G., Navarrete, S. and Sánchez R. (1990a) Molecular isoforms of chicken growth hormone (cGH). Different bioactivities of cGH charge variants. Gen. Comp. Endocrinol. (en prensa).
- 7.- Arámburo, C., Donoghue, D., Montiel, J. L., Berghman, L.R. and Scanes, G.C. (1990b) Phosphorylation of chicken growth hormone. Life Sci. (en prensa).
- 8.- Arámburo, C., Navarrete, S., Montiel, J. L., Sánchez, R. and Berghman L.R. (1990c) Glycosylated chicken growth hormone. Purification and electrophoretic characterization. Gen. Comp. Endocrinol. (enviado a publicación).
- 9.- Avrameas, S., and Ternynck, T. (1971) Peroxidase labelled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. Immunochemistry, 8:1175-1179.
- 10.- Bates, R.W., Miller, R.A., and Garrison, M.M. (1962) Evidence in the hypophysectomized pigeon of a synergism among prolactin, growth hormone, thyroxine and pregnisone upon weight of the body, digestive tract, kidney and fat stores. Endocrinology, 71:345.

- 11.- Battaiger, B. ,Newhall, W.J. and Jones R.B. (1982). The use of Tween 20 as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. *J. Immunol. Methods* 55:297-307.
- 12.- Belanger, L., Sylvestre, C., and Dufour, D. (1973) Enzymelinked immunoassay for alpha-fetoprotein by competitive and sandwich procedures. *Clin. Chim. Acta* 48: 15-18.
- 13.- Berghman, L.R., Leus, P., Decuypere, E., Kuhn, E.R. and Vandersande, F. (1987) Glycosylated chicken growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 68: 408 - 414.
- 14.- Buonomo, F.C., Lauterio, T.J., and Scanes, C.G. (1984) Episodic growth hormone secretion in the domestic fowl (*Gallus domesticus*) : Alpha adrenergic regulation. *Comp. Biochem. Physiol.* 78C: 409 - 413.
- 15.- Burke, W.H., and Marks, H.L. (1982) Growth hormone and prolactin levels in non-selected and selected broiler lines of chickens from hatch to eight weeks of age. *Growth* 46:289 - 295.
- 16.- Burke, W.H., and Marks, H.L. (1984) Growth hormone, Thyroxine and Triiodothyronine levels of Japanese quail selected for four week body weight. *Growth*, 63: 207 - 213.
- 17.- Carlsson, H.E., and Lindberg, A.A. (1978) *Scand. J. Immunol.* 8, Suppl. 7, 97.
- 18.- Carranza, M.E. (1987) Purificación y caracterización bioquímica de la hormona de crecimiento (GH) hipofisaria de pollo. Tesis de Licenciatura de Biología, Facultad de Ciencias. UNAM, México, D.F. p. 102.
- 19.- Chard, T. (1982) An introduction to radioimmunoassay and related techniques. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam. p. 284.
- 20.- Chopra, I.J., Nelson, J., Solomon, D.H. and Beall, G.N. (1971) Production of antibodies specifically binding T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub>. *J. Clin. Endocrinol.* 32:299-308.
- 21.- Decuypere, E., and Scanes, C.G. (1983) Variation in the release of thyroxine, triiodothyronine and growth hormone in response to thyrotrophin releasing hormone during development of the domestic fowl. *Acta endocrinol.* 102: 220-223.
- 22.- Ekins, R.P. (1974) Basic principles theory. *Brit. Med. Bull.* 30:1-103.

- 23- Engster, H.M., Carew, L.B., Harvey, S., and Scanes C.G. (1979) Growth hormone metabolism in essential fatty acid-deficient and pair-fed non-deficient chicks. *J. Nutr.*, 109: 330 - 338.
- 24.- Engvall, E. and Perlmann, P. (1971) Enzyme linked immunoassay (ELISA): Quantitative assay of IgG. *Immunochemistry*, 8:871-874.
- 25.- Engvall, E., Jonsson, K., and Perlmann, P. (1971) Enzymelinked immunosorbent assay. II Quantitative assay of protein antigen immunoglobulin G by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochem. Biophys. Acta* 251-427.
- 26.- Engvall, E., and Perlmann, P. (1972) Enzyme-linked immunosorbent assay. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. Immunol.* 109:129-135.
- 27.- Engvall, E., and Perlmann, P. (1975) in " Automation in Microbiology and Immunology " (C.G. Heden and T. Illeni, eds. ), p. 529. Wiley, New York.
- 28.- Engvall, E. (1980) Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT. *Methods Enzymol.* 70:419-439.
- 29.- Farmer, S.W., Papkoff, H., and Hayashida, T. (1974) Purification and properties of avian growth hormones. *Endocrinology*, 95:1560-1565.
- 30.- Farrington, M.A., and Hymer, W.C. (1987) An Enzyme Immunoassay for rat growth hormone: Applications to the study of growth hormone variants. *Life Sciences* 40:2479-2488.
- 31.- Frackelton, Jr. A.R., Szaro, R.P., and Weltman, J.K. (1976) A galactosidase immunosorbent test for carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.* 36, 2845-2849.
- 32.- Gibson, W.R. and Nalbandov, A.B. (1966) Lipolysis and lipogenesis in liver and adipose tissue of hypophysectomized cockerels. *Am. J. Physiol.* 211:1352-1356.
- 33.- Gestone, T.A., Carew, L.B., Alser, F.A., and Scanes, C.G. (1982) Effect of a phosphorus deficiency on thyroid function, growth and organ weights in chicken. *Poul. Sci.*, 61:1471.
- 34.- Haimovich, J., Hurwitz, E., Novik, N., and Sela, M. (1970) Preparation of protein-bacteriophage conjugates and their use in detection of anti-protein antibodies. *Biochem. Biophys. Acta* 207, 125.

- 35.- Harlow, E. and Lane, D. (1988) Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York pp. 726.
- 36.- Harvey, S., Godden, P.M.M., and Scanes, C.G. (1977) Plasma growth hormone levels during growth in domesticated turkeys. Br. Poult. Sci., 18:547-551.
- 37.- Harvey, S., and Scanes, C.G. (1977) Purification and radioimmunoassay of chicken growth hormone. J. Endocrinol., 73, 321-329.
- 38.- Harvey, S., Scanes, C.G., Chadwick, A., and Bolton, N.J. (1978a) Influence of fasting, glucose and insulin on the levels of growth hormone in the plasma of the domestic fowl (Gallus domesticus). J. Endocrinol. 76: 501-506.
- 39.- Harvey, S., Scanes, C.G., Chadwick, A., and Bolton, N.J. (1978b) The effect of tryptropin releasing hormone (TRH) and prolactin secretion in vitro and in vivo in the domestic fowl (Gallus domesticus). Neuroendocrinology 26: 249-260.
- 40.- Harvey, S., Davison, T.F., and Chadwick, A. (1979a) Ontogeny of growth hormone and prolactin secretion in the domestic fowl (Gallus domesticus). Gen. Comp. Endocrinol. 39:270-273.
- 41.- Harvey, S., Scanes, C.G., Chadwick, A., and Bolton, N.J. (1979b) Growth hormone and prolactin secretion in growing domestic fowl: Influence of sex and breed. Br. Poult. Sci., 20:9-17.
- 42.- Harvey, S., and Phillips, J.G. (1980) Growth hormone and corticosterone secretion in fresh water and saline-adapted ducklings (Anas platyrhynchos). Gen. Comp. Endocrinol., 42: 334-345.
- 43.- Harvey, S. (1983a) Neuroendocrine control of growth hormone secretion in birds. In: Progress in Non-mammalian Brain Research. (G. Nistico and Budd, eds.) CRC Press, Boca Raton. pp 207-237.
- 44.- Harvey, S., Sterling, R.J., and Klandorf, H., (1983) Concentrations of triiodothyronine growth hormone, and luteinizing hormone in the plasma thyroidectomised fowl (Gallus domesticus) Gen. Comp. Endocrinol. 50: 275-281.
- 45.- Harvey, S. (1983b) Thyroid hormones inhibit growth hormone secretion in domestic fowl (Gallus domesticus) J. Endocrinol. 96: 329-334.

- 46.- Harvey, S., Scanes, C.G., and Marsh, J.A., (1984) Stimulation of growth hormone secretion in Dwarf chickens by thyrotrophin releasing hormone (TRH) in human pancreatic growth hormone-releasing factor (hpGRF) Gen. Comp. Endocrinol. 55: 493-497.
- 47.- Harvey, S., and Scanes, C.G. (1984) Comparative stimulation of growth hormone secretion in anesthetized chickens by human pancreatic growth hormone releasing factor (hpGRF) and thyrotrophin releasing hormone (TRH). Neuroendocrinology 39:314-320.
- 48.- Houston, B. and Goddard, C. (1988) Molecular forms of growth hormone in the chicken pituitary gland. J. Endocrinol. 116: 35-41.
- 49.- Huybrechts, L.M., Lauterio, T.J., Campbell, R.M., Scanes, C.G., Rivier, J., and Vale, W. (1983) Synthetic human pancreatic growth hormone releasing factor (hpGRF) stimulates growth hormone (GH) secretion in vivo in chickens and turkeys. Poult. Sci. 62:1438.
- 50.- Huybrechts, L.M., Decuypere, E., Scanes, C.G., Callewaert, P., Peys, E., and Kuhn, E.R. (1985) Hormon. Metab. Res. 17: 690-691.
- 51.- Johnson, D.A., Gautsch, J.W., Sportsman, J.R. and Elder, J.H. (1984) Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. Gene. Anal. Tech. 1:3-8.
- 52.- Jozsa, R., Scanes, C.G., Vigh, S., and Mess, B. (1979) Functional differentiation of the embryonic chicken pituitary gland studies by immunohistological approach. Gen. Comp. Endocrinol. 39:158-163.
- 53.- Klandorf, H., Harvey, S., and Fraser, H.M. (1985) Physiological control of growth hormone secretion by thyrotrophin releasing hormone in the domestic fowl. J. Endocrinol. 105: 351-355.
- 54.- Kompiang, I.P. and Gibson, W.R. (1973) The effect of hypophysectomy on lipogenesis and glycogenesis in cockerels. Am. J. Physiol. 224:362-366.
- 55.- Lauterio, T.J., and Scanes, C.G. (1988) Poult. Sci. 67: 120-125.
- 56.- Leung, F.C., and Taylor, J.E. (1983) In vivo and in vitro stimulation of growth hormone release in chickens by synthetic human pancreatic growth hormone releasing factors (hpGRF). Endocrinology 113:1913-1915.

- 57.- Libby, D.A., Meites, J., and Schaible, J. (1955) Growth hormone in chickens. *Poult. Sci.* 34, 1329.
- 58.- Malamed, S., Gibney, J.A., Loesser, K.E., and Scanes, C.G. (1985) Age-related changes of the somatotrophs of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Cell Tissue Res.* 239: 87-91.
- 59.- Malamed, S., Gibney, S.A., and Scanes, C.G. (1988) *Cell Tissue Res.* 251: 581-585.
- 60.- Malamed, S., Gibney, J., and Scanes, C.G. *Cell Tissue Res.* (en prensa).
- 61.- Martin, C.R. (1985) *Endocrine Physiology*. Oxford University Press. New York. pp 1009.
- 62.- Malbandov, A.V., and Card, L.E. (1943) Effect of hypophysectomy on growing chicks. *J. Exp. Zool.*, 94, 387.
- 63.- Navarrete, S.S. (1990) Identificación, Purificación y Caracterización Parcial de una Variante Glucosilada de la Hormona de Crecimiento de pollo. Tesis de Licenciatura de Investigación Biomédica Básica, IIBM, UNAM, Mexico, D.F. p. 73.
- 64.- Papkoff, H., Licht, P., Bona-Gallo, A., Mackenzie, D.S., Oelofsen, W., and Oosthuizen, M.M.J. (1982) Biochemical and immunological characterization of pituitary hormones from the ostrich (*Struthio camelus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 48:181-195.
- 65.- Pethes, G., Scanes, C.G., and Rudas, P. (1979) Effect of synthetic thyrotropin releasing hormone on the circulating growth hormone concentration in cold and heat stressed ducks. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 27:175-177.
- 66.- Perez, F.M., Malamed, S., and Scanes, C.G. (1985) *IRC Med. Sci.* 13: 871-872.
- 67.- Prakash, B.S., Meyer, H.H.D., Schallenberger, E., and Van De Wiel, D.F.M. (1987) Development of a sensitive enzyme immunoassay (EIA) for progesterone determination in unextracted bovine plasma using the second antibody technique. *J. Steroid. Biochem.* 28:623-627.
- 68.- Proudman, J.A., and Wentworth, B.C. (1978) Radioimmunoassay of turkey growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 36:194-200.
- 69.- Proudman, J.A., and Wentworth, B.C. (1980). Ontogenesis of growth hormone in large and midget white strains of turkeys. *Poult. Sci.* 59:906-913.

- 70.- Proudman, J.A., and Opel, H. (1981) Effect of food or water restriction on basal and TRH-stimulated growth hormone secretion in the growing turkey poult. *Poult. Sci.*, 650:659-667.
- 71.- Proudman, J.A. (1984) Growth hormone and prolactin response to thyrotropin releasing hormone and growth releasing factor in the immature turkey. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 175:79-83.
- 72.- Rubenstein, K.E., Schneider, R.S., and Ullman, E.F. (1972) Homogeneous enzyme immunoassay. A new technique. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47:846-851.
- 73.- Rudas, P., and Scanes, C.G. (1983) Influences of growth hormone on glucose uptake by avian adipose tissue. *Poultry Sci.* 62:1838-1845.
- 74.- Ruiz, J.A. (1976) Implementación y normalización del radio-inmunoanálisis de gastrina. Tesis de Licenciatura de Química. U.I.A. México, D.F.
- 75.- Salbert, G., Bailhache, T., Zohar, Y., Breton, B., and Jégo, P. (1990) A rapid and sensitive ELISA for Rainbow trout Maturation Gonadotropin (tGtH II): Validation on Biological Samples; In vivo and In vitro Responses to GnRh. *Gen. Comp. Endocrinol.* 78:110-122.
- 76.- Scanes, C.G., Gales, L., Harvey, S., Chadwick, A., and Newcomer, W.S. (1976) Endocrine studies in young chickens of the obese strain. *Gen. Comp. Endocrinol.* 30:419-423.
- 77.- Scanes, C.G., Harvey, S., and Chadwick, A. (1977) Hormone and growth in poultry. "Growth and Poultry Meat Production" (K.N. Boorman and B.J. Wilson, eds.). Edinburgh: British Poultry Science, p.79.
- 78.- Scanes, C.G., Griminger, P., and Buonomo, F.C. (1981) Effect of dietary protein restriction on circulating concentrations of growth hormone in growing domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 168:334-337.
- 79.- Scanes, C.G., and Balthazart, J. (1981) Circulation concentrations of growth hormone during, maturation, and reproductive cycles in ring doves (*Streptopelia risoria*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 45:381-385.
- 80.- Scanes, C.G., and Harvey, S. (1982) Hormones, nutrition and metabolism in birds. In *Aspects of Avian Endocrinology: Practical and theoretical Implication.* (Scanes, C.G., Ottinger, M.A., Kenny, A.D., Balthazart, J., Cronshaw, J., Chester Jones, I. eds) Texas Tech. Press, Lubbock., pp 173-184.

- 81.- Scanes, C.G., Lauterio, T.J., and Buonomo, F.C. (1983a) Annual developmental and diurnal cycles of pituitary hormone secretion. In: Avian Endocrinology: Environmental and Ecological Perspectives. (Mikami, S., Homma, K., and Miwada, eds.). Jpn. Sci. Soc. Press, Tokyo, pp 307-326.
- 82.- Scanes, C.G., Marsh, J., Decuyper, E., and Rudas, P. (1983b) Abnormalities in the plasma concentration of thyroxine tri-iodothyronine and growth hormone in sex-linked dwarf and autosomal dwarf White Leghorn domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J. Endocrinol.* 97:97-135.
- 83.- Scanes, C.G., and Gross, T.W. (1983c) A possible role for cyclic AMP and calcium and potassium in the induction of growth hormone release from chicken pituitary cells. *IRCS Med. Sci.*, 11:506-507.
- 84.- Scanes, C.G., and Harvey, S. (1984) Stimulation of growth hormone secretion by human pancreatic growth hormone releasing factor (hpGRF) and thyrotrophin releasing hormone (TRH) in anesthetize chickens. *Gen. Comp. Endocrinol.* 56: 198-203.
- 85.- Scanes, C.G., and Johnson, A.L. (1984) Failure of castration to prevent the prepubescent decline in the circulation concentration of growth hormone in the domestic fowl. *Gen. Comp. Endocrinol.* 53: 398-401.
- 86.- Scanes, C.G. and Lauterio, T.J. (1984) Growth hormone: Its Physiology and Control. *J. Exp. Zool.* 232:443-452.
- 87.- Scanes, C.G., Carsia, R.V., Lauterio, T.J., Huybrechts, L., Rivier, J., and Vales, W. (1984) Synthetic human pancreatic growth hormone releasing factor (GRF) stimulates growth hormone secretion in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Life Sci.* 34:1127-1134.
- 88.- Scanes, C.G. (1986) Pituitary gland. *Avian Physiology.* 4th edition (P.D. Sturkie ed.) Springer-Verlag, U.S.A. pp. 383-402.
- 89.- Scanes, C.G. (1987) *CRC Crit. Rev. Poul. Biol.* 1: 51-105.
- 90.- Scanes, C.G., and Harvey, S. (1989a) Somatostatin inhibition of thyrotrophin releasing hormone and growth hormone releasing factor- induced growth hormone secretion in young and adult anesthetized chickens. *Gen. Comp. Endocrinol.* 75: 256-264.
- 91.- Scanes, C.G., and Harvey, S. (1989b) Triiodothyronine inhibition of thyrotrophin- releasing hormone and growth hormone releasing factor-induced growth hormone secretion in anesthetized chickens. *Gen. Comp. Endocrinol.* 73: 477-484

- 92.- Scanes, C.G., Arámburo, C. and Campbell, R.M. (1990) Hormonal involvement in avian growth and development: growth hormone and insulin-like growth factor I. In : "Endocrinology of Birds: Molecular to Behavioral" (M.Wada, S. Ishii and C.G.Scanes, Eds.) Japan Sci. Soc. Press Tokio, Springer Verlag, Berlin pp. 93-110.
- 93.- Secchi, C., Biondi, P.A., Berrini, A., Simonic, T., and Ronchi, S. (1988) A biotin-avidin sandwich enzyme-linked immunosorbent assay of growth hormone in bovine plasma. *J. Immunol. Meths.* 110:123-128.
- 94.- Signorella, A.P., and Hymer, W.C. (1984) An enzyme-linked immunosorbent assay for rat prolactin. *Anal. Biochem.* 136: 372-381.
- 95.- Sommerville, B.A., Harvey, S., and Chadwick, A. (1983) Early changes in the adaptation to a low calcium diet in the chick. *Calcif. Tissue Int.* 35:339-343.
- 96.- Strosser, M.T., Harvey, S., Foltzer, C., and Mialhe, P. (1984) Comparative effects of somatostatin-28 and somatostatin-14 on basal growth hormone release and pancreatic function in immature ducks (*Anas platyrhynchos*).
- 97.- Thompson, R.A. (1981) *Techniques in Clinical Immunology.* Blackwell Scientific Publications.
- 98.- Thorell, J.I. (1983) *Radioimmunoassay Design and Quality control.* Pergamon Press, France. p. 145.
- 99.- Towbin, H.T., Staehelin and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:4350-4354.
- 100.- Van Weemen, B.K., and Schuur, A.H.W.M. (1971) Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett.* 15:232.
- 101.- Vasilatos-Younken, R. (1986) Preparation and culture of dispersed avian pituitary cells, and age-related changes in donor pituitary weight and growth hormone content. *Gen. Comp. Endocrinol.* 64: 90-104.
- 102.- Wilson, B.M., and Nakane, P.K. (1978) Developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase to antibodies. In: *Immunofluorescence and Related Staining Techniques,* (Knapp, W., Holubar, K., and Wick, G. eds.), p.215. Elsevier/North Holland, New York.

- 103.- Voller, A., Bartlett, A., and Bidwell, D.E. (1978) Scand. J. Immunol. 8, Suppl. 7:125.
- 104.- Yalow, R.S. and Berson, S.A. (1959) Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. Nature 184:1648-1654.

## IX. APENDICE.

Soluciones amortiguadoras.-

- Amortiguador de fosfatos de sodio salino. PBS 0.01 M pH 7.8 +  
0.15 M de cloruro de sodio.

Sol. A Fosfatos de sodio 0.5 M pH 7.8

Fosfato de sodio monobásico

137.99 - 1 M	68.995 grs - 1000 ml
x - 0.5 M	x - 50 ml
x = 68.995 grs	x = 3.44 grs en 50 ml de H <sub>2</sub> O

Fosfato de sodio dibásico

141.965 - 1 M	70.98 grs - 1000 ml
x - 0.5 M	x - 200 ml
x = 70.98 grs	x = 14.19 grs en 200 ml de H <sub>2</sub> O

Se disuelve el fosfato dibásico (14.19 grs) en aproximadamente  
100 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada, se ajusta el pH a 7.8 con la solución  
de fosfato monobásico. Se afora a 200 ml con H<sub>2</sub>O.

PBS 0.01 M pH 7.8

De la solución A se toman 20 ml y se afora a 1 litro con H<sub>2</sub>O,  
agregando 8.76 grs de cloruro de sodio.

- PBS, Tween 20 0.05%

A un litro de PBS se le agrega Tween 20 0.05%, es decir 500 ul de  
Tween a un litro de PBS.

- PBS, Tween 20 0,05%, BSA 1%

Se pesan la albúmina bovina necesaria y se solubiliza en el  
amortiguador de PBS, Tween 20 0.05%.

- Amortiguador de Carbonatos 0.1 M pH 10.3

Carbonato de sodio 0.1 M

105.993 - 1 M	10.59 grs - 1000 ml
x - 0.1 M	x - 100 ml
x = 10.59 grs	x = 1.05 grs

Bicarbonato de sodio 0.035 M

64.01 - 1 M	2.24 grs - 1000 ml
x - 0.035 M	x - 100 ml
x = 2.24 grs.	x = 0.224 grs.

Se disuelven tanto el carbonato como el bicarbonato de sodio en 100 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada. El pH queda en aproximadamente 10.3.

2

- Amortiguador de Citrato de sodio 0.1 M pH 5.0

Citrato de sodio 0.5 M pH 5.0

Acido cítrico 0.5 M

210.146 - 1 M	105.073 - 1000 ml
x - 0.5 M	x - 100 ml
x = 105.073 grs.	x = 10.50 grs

fosfato de sodio dibásico 1 M

141.965 - 1 M	141.965 - 1000 ml
	x - 50 ml
	x = 7.09 grs en 50 ml de H <sub>2</sub> O

Se disuelve el ácido cítrico en aproximadamente 50 ml de H<sub>2</sub>O. se

2

ajusta el pH en un rango de 5.0 - 5.2 con la solución de fosfato 1 M y se afora a 100 ml con H<sub>2</sub>O. Esta solución se filtra para

2

evitar su contaminación.

De la solución 0.5 M se toman 3 ml + 12 ml de H<sub>2</sub>O para obtener

2

una solución final de citrato de sodio 0.1 M pH 5.0.

Acido sulfúrico 4 N

29 ml - 1 N	116 ml - 1000 ml H <sub>2</sub> O
	2
x ml - 4 N	x ml - 100 ml
x = 116 ml	x = 11.6 ml de ácido sulfúrico en 100 ml de H <sub>2</sub> O

2

## Soluciones para el ELISA

- Solución para forrar la placa.

La CGH se disuelve en el amortiguador de carbonatos para forrar la placa.

Los estándares de la curva patrón y las muestras problema se diluyen en PBS.

- Solución bloqueadora.

Para bloquear los sitios no ocupados por la hormona, se agrega a cada pozo una solución de PBS, Tween 20 0.05%, BSA 1%.

- Solución para diluir al 1er Ab y 2o Ab.

Los anticuerpos se diluyen en PBS, Tween 20 0.05%, BSA 1%.

- Solución del sustrato.

ortofenilendiamina 0.4 mg/ml

0.4 mg - 1 ml

x mg - 15 ml

x = 6 mg en 15 ml de amortiguador de citratos.

peróxido de urea 0.2 mg/ml

0.2 mg - 1 ml

x mg - 15 ml

x = 3 mg

Se prepara un solución concentrada 100 veces es decir:

se pesan 20 mg y se disuelven en 1 ml de H<sub>2</sub>O

20 mg - 1000 ul

3 mg - x ul

x = 150 ul

La solución del sustrato se prepara en el momento de utilizarla.