



1 01680
2ej
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**COMPARACION DE TRES FUENTES BIOLÓGICAS
PARA PRODUCIR ANTICUERPOS CONTRA
PROGESTERONA PARA UTILIZARSE EN
RADIOINMUNOANÁLISIS O
ENZIMOINMUNOANÁLISIS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN PRODUCCION ANIMAL (Reprod. animal)

P R E S E N T A :

RUBEN CORNELIO MONTES PEREZ

Asesor: M.V.Z. Ph. D. Luis A. Zarco Quintero



México, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1991

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

LISTA DE CONTENIDO

	<u>Página</u>
1. INTRODUCCION.	1
1.1 PRESENTACION DEL PROBLEMA.	1
2. MARCO TEORICO.	4
2.1 LOS ESTEROIDES COMO INMUNOGENOS	4
2.2 METODOS DE INMUNIZACION CONTRA PROGESTERONA	8
2.3 TITULACION DEL ANTICUERPO	10
2.4 METODOS DE SEPARACION DE INMUNOGLOBULINAS A PARTIR DEL SUERO.	12
2.5 OBTENCION DE ANTICUERPOS DE LA YEMA DEL HUEVO	14
2.6 CRITERIOS PARA EVALUAR AL ANTICUERPO	17
2.7 ESTABLECIMIENTO DEL RIA O EIA	23
2.8 VALIDACION DEL ENSAYO	28
3. MATERIAL Y METODO	31
3.1 INDUCCION DEL ANTICUERPO	31
3.1.1 <u>Inmunización de cabritos</u>	31
3.1.2 <u>Inmunización de conejos</u>	32
3.1.3 <u>Inmunización de gallinas</u>	32
3.2 EXTRACCION Y CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS	35
3.2.1 <u>Extracción de Inmunoglobulinas del suero de conejo.</u>	35
3.2.2 <u>Extracción de Inmunoglobulinas de la yema del huevo.</u>	36
3.2.3 <u>Monitoreo del proceso de extracción de gama globulinas de suero y de la yema del huevo.</u>	37

	<u>Página</u>
3.2.4 <u>Determinación de la Constante de</u> <u>Afinidad de los anticuerpos obtenidos.</u>	37
3.2.5 <u>Diseño del RIA usando los anticuerpos</u> <u>obtenidos en cada fuente.</u>	37
3.2.6 <u>Preparación de la Fase sólida para</u> <u>enzimoinmunoanálisis</u>	41
3.2.7 <u>Diseño del EIA utilizando los</u> <u>anticuerpos de cada fuente.</u>	42
3.3 VALIDACION DE LOS INMUNOENSAYOS.	46
3.3.1 <u>Sensibilidad</u>	46
3.3.2 <u>Especificidad</u>	46
3.3.3 <u>Relación de estimaciones de progesterona</u> <u>realizados con el RIA o EIA diseñado</u> <u>y un estuche comercial.</u>	47
3.3.4 <u>Precisión.</u>	47
3.4 EXTRACCIÓN DE ESTEROIDES A PARTIR DE MUESTRAS DE PLASMA.	48
4. RESULTADOS	50
4.1 RESULTADO DE LA INMUNIZACIÓN DE CABRAS	50
4.2 RESULTADO DE LA INMUNIZACIÓN DE CONEJOS	50
4.3 CARACTERIZACIÓN DEL ANTICUERPO DEL CONEJO CR	50
4.3.1 <u>Análisis electroforético en PAGE</u>	50
4.3.2 <u>Medición de proteínas del dializado</u>	54
4.3.3 <u>Resultado de la titulación del anticuerpo</u> <u>frente a diferentes cantidades de progesterona</u> <u>radiactiva.</u>	54

	<u>Página</u>
4.3.4 <u>Diseño del RIA que utiliza el anticuerpo CRSX87.</u>	55
4.3.5 <u>Cálculo de la Constante de Afinidad del anticuerpo CRSX87</u>	55
4.4 <u>VALIDACIÓN DEL RIA QUE UTILIZA EL ANTICUERPO CRSX87</u>	58
4.4.1 <u>Cálculo de La Sensibilidad del RIA</u>	58
4.4.2 <u>Medición de La Especificidad</u>	58
4.4.3 <u>Precisión del RIA.</u>	61
4.4.4 <u>Relación entre los valores de progesterona estimados con un estuche comercial y el RIA diseñado en el presente trabajo.</u>	62
4.4.5 <u>Rendimiento del anticuerpo CRSX87 para el RIA diseñado.</u>	62
4.5 <u>RESULTADO DEL EIA QUE UTILIZA EL ANTICUERPO CRSX87.</u>	64
4.5.1 <u>Resultado de la titulación del anticuerpo frente a diferentes diluciones del conjugado progesterona: peroxidasa.</u>	64
4.5.2 <u>Diseño del EIA que utiliza el anticuerpo CRSX87.</u>	65
4.5.3 <u>Validación del EIA</u>	67
4.5.3.1 <u>Prueba de Paralelismo</u>	67
4.5.3.2 <u>Determinación de la sensibilidad</u>	67
4.5.3.3 <u>Cálculo de la Precisión</u>	70
4.5.3.4 <u>Relación de valores de progesterona estimados con el EIA diseñado y un estuche</u>	

	<u>Página</u>
comercial.	71
4.5.4 <u>Rendimiento del anticuerpo CR5X87</u> <u>utilizado para EIA.</u>	73
4.6 RESULTADO DE LA INMUNIZACIÓN DE GALLINAS	73
4.6.1 <u>Titulación del suero de gallinas.</u>	73
4.7 CARACTERIZACIÓN DEL ANTICUERPO DE LA YEMA DE HUEVO	73
4.7.1 <u>Análisis electroforético en PAGE</u>	73
4.7.2 <u>Medición de Proteínas del extracto</u>	73
4.8 ESTABLECIMIENTO DEL RIA	76
4.8.1 <u>Resultado de la titulación del anticuerpo</u> <u>frente a diferentes cantidades de</u> <u>progesterona radiactiva.</u>	76
4.8.2 <u>Desplazamiento de la Curva Estándar</u>	77
4.8.3 <u>Cálculo de la Constante de Afinidad</u> <u>del anticuerpo Ig Y</u>	77
4.9 VALIDACIÓN DEL RIA QUE UTILIZA EL ANTICUERPO Ig Y	80
4.9.1 <u>Medición de la Especificidad</u>	80
4.9.2 <u>Sensibilidad</u>	82
4.9.3 <u>Precisión</u>	82
4.9.4 <u>Relación de niveles de progesterona</u> <u>estimados con el RIA diseñado y un</u> <u>estuche comercial.</u>	85
4.9.5 <u>Rendimiento del anticuerpo</u> <u>Ig Y para utilizarse en RIA.</u>	85

	<u>Página</u>
4.10 RESULTADO DE LA INMUNORREACTIVIDAD DEL ANTICUERPO Ig Y ADSORBIDO AL FONDO DE LOS POZO DE LAS PLACAS de EIA.	87
5. DISCUSION.	89
5.1 RESPUESTA INMUNE DE LOS ANIMALES	89
5.1.1 <u>De los cabritos y conejos.</u>	89
5.1.2 <u>De las gallinas.</u>	92
5.2 PURIFICACIÓN DE LOS ANTICUERPOS	95
5.2.1 <u>Purificación de gama globulinas del suero de conejo.</u>	95
5.2.2 <u>Purificación de gama globulinas de la yema de huevo.</u>	96
5.3 DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD DEL ANTICUERPO CR5X87.	98
5.4 DISEÑO DEL RIA CON EL ANTICUERPO DEL CONEJO	99
5.5 VALIDACIÓN DEL RIA QUE UTILIZA EL ANTICUERPO CR5X87	100
5.5.1 <u>Especificidad</u>	100
5.5.2 <u>Sensibilidad</u>	101
5.5.3 <u>Precisión</u>	102
5.5.4 <u>Relación de las concentraciones de progesterona en muestras plasmáticas medidas con el RIA diseñado y con un estuche comercial.</u>	103

	<u>Página</u>
5.6 VALIDACIÓN DEL EIA CON EL ANTICUERPO CRSX87	103
5.6.1 <u>Diseño del EIA.</u>	103
5.6.2 <u>Sensibilidad</u>	104
5.6.3 <u>Precisión</u>	104
5.6.4 <u>Relación de las concentraciones de progesterona en muestras plasmáticas medidas con el EIA diseñado y con un estuche comercial.</u>	106
5.7 DISEÑO DEL RIA CON EL ANTICUERPO Ig Y	107
5.8 DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD DEL ANTICUERPO Ig Y	108
5.9 VALIDACIÓN DEL RIA QUE UTILIZA EL ANTICUERPO DE LA YEMA DE HUEVO Ig Y	109
5.9.1 <u>Especificidad</u>	109
5.9.2 <u>Sensibilidad</u>	109
5.9.3 <u>Precisión</u>	110
5.9.4 <u>Relación de las concentraciones de progesterona en muestras plasmáticas medidas con el RIA diseñado y con un estuche comercial.</u>	111
5.10 DISEÑO DEL EIA CON EL ANTICUERPO Ig Y.	112
5.11 COMPARACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LOS ANTICUERPOS CORRESPONDIENTES A CADA FUENTE.	113
6. CONCLUSIÓN	114
7. LITERATURA CITADA.	115
8. APENDICE	133

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1. Reacción del anhídrido mixto y de la Carbodiimida para la síntesis de conjugados hapteno: proteína	8
2. Gráfica de Michaelis-Menten.	19
3a. Gráfica de Scatchard lineal	20
3b. Gráfica de Scatchard curva	21
4. Resultado de la inmunización contra progesterona conjugada con albúmina sérica bovina realizado en cabritos.	51
5. Resultado de la inmunización contra progesterona conjugada con albúmina sérica bovina realizado en conejos.	52
6. Fotografía de la electroforesis en gel de poliacrilamida del anticuerpo dializado CR5X87.	53
7. Curva estándar del RIA que utiliza el anticuerpo CR5X87	56
8. Gráfica de Scatchard que emplea el anticuerpo CR5X87.	57
9. Curva estándar con su envoltura de error media ± 1 d.e. para calcular la sensibilidad del RIA con anticuerpo CR5X87.	59

10. Desplazamiento de progesterona radiactiva por otros esteroides en el RIA que utiliza el anticuerpo CR5X87.	60
11. Relación de los niveles estimados de progesterona en veinte muestras de plasma sanguíneo de vacas con respecto a un estuche comercial.	63
12. Curva estandar del EIA que utiliza el anticuerpo CR5X87 y conjugado progesterona: 3-(CCMO):HRP	66
13. Paralelismo de una muestra de plasma sanguíneo diluido 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16 en el EIA que utiliza el anticuerpo CR5X87	68
14. Curva estándar del EIA y su envoltura de error media ± 1 d.e. utilizado para calcular la sensibilidad del ensayo.	69
15. Relación de niveles de progesterona entre el EIA diseñado con el anticuerpo CR5X87 y un estuche comercial.	72
16. Resultado de la inmunización contra progesterona conjugada con albúmina sérica bovina realizado en cinco gallinas.	74
17. Fotografía de la electroforesis en gel de poliacrilamida del extracto de la yema de huevo (Ig Y).	75

	<u>Página</u>
18. Curva estándar del RIA que utiliza el anticuerpo Ig Y.	78
19. Gráfica de Scatchard que utiliza el anticuerpo, Ig Y.	79
20. Desplazamiento de progesterona radiactiva por otros esteroides en el RIA que utiliza el anticuerpo Ig Y	81
21. Prueba de Paralelismo que se realizó con un suero control diluido 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16 en el RIA que utiliza el anticuerpo Ig Y.	83
22. Curva estándar del RIA con su envoltura de error media ± 1 d.e. que utiliza el anticuerpo Ig Y para determinar la sensibilidad del ensayo.	84
23. Relación de valores estimados de progesterona en plasma sanguíneo obtenidos con el RIA diseñado con el anticuerpo Ig Y con respecto a un estuche comercial.	85

LISTA DE CUADROS

<u>Cuadro</u>	<u>Página</u>
1. Calendario de Inmunización en cabritos	33
2. Calendario de Inmunización en conejos	34
3. Calendario de Inmunización en gallinas	34
4. Protocolo para la titulación de antisueros	35
5. Combinación de diferentes diluciones de anticuerpo de conejo y cantidades de masa radiactiva.	36
6. Combinación de diferentes diluciones de anticuerpo de yema de huevo y cantidades de masa radiactiva.	38
7. Protocolo del Radioinmunoanálisis que utilizó el anticuerpo de conejo CR5X87	40
8. Protocolo del Radioinmunoanálisis que utilizó el anticuerpo de la yema de huevo (Ig Y)	41
9. Titulación de anticuerpos de conejo y de yema de huevo en combinación con diferentes diluciones de conjugado progesterona: 3 (CMO):HRP.	42
10. Tratamientos empleados para probar el desplazamiento del conjugado por un estándar utilizando el anticuerpo de conejo.	43
11. Tratamientos empleados para probar el desplazamiento del conjugado por un estándar utilizando el extracto de la yema de huevo (Ig Y)	43

	<u>Página</u>
12. Protocolo empleado para medir el desplazamiento del conjugado por un estándar.	44
13. Protocolo del Enzimoimmunoanálisis para medir progesterona plasmática.	45
14. Resultado del desplazamiento de la unión del trazador por un estándar empleando dos niveles de masa radiactiva cuando se utilizan diferentes diluciones del anticuerpo CR5X87.	54
15. Reacción Cruzada del anticuerpo CR5X87.	61
16. Variación intraensayo obtenida en el Radioimmunoanálisis con el anticuerpo CR5X87.	61
17. Variación Interensayo obtenido en el Radioimmunoanálisis con el anticuerpo CR5X87.	62
18. Titulación del anticuerpo CR5X87 frente a diferentes diluciones de conjugado.	64
19. Desplazamiento del E0 por un estándar utilizando el anticuerpo CR5X87.	65
20. Variación Intraensayo del EIA que utiliza el anticuerpo CR5X87.	70
21. Variación Interensayo del EIA que utiliza el anticuerpo CR5X87.	71
22. Resultado del desplazamiento del E0 por un estándar empleando dos niveles de masa radiactiva y diferentes diluciones de Ig Y.	76

	<u>Página</u>
23. Porcentajes de reacción cruzada utilizando el anticuerpo Ig Y.	80
24. Determinación del coeficiente de variación intraensayo del RIA que utiliza el anticuerpo Ig Y.	82
25. Determinación del coeficiente de variación interensayo del RIA que utiliza el anticuerpo Ig Y.	85
26. Inmunorreactividad del anticuerpo Ig Y adherido al fondo de los pozos de la placa de microtitulación.	87
27. Desplazamiento del EO por un estándar utilizando el anticuerpo Ig Y.	88

Cuando la mente inquisitiva del Ser pensante, intenta penetrar en la naturaleza física del Ser Viviente, se enfrenta al primer obstáculo, por no tener el alcance físico necesario y es entonces imperativo construir instrumentos que le permitan esta compenetración y llegar así a la manifestación elemental de su naturaleza viviente.

Distamos aún de entender profundamente la naturaleza del Ser viviente, sin embargo sabemos algo de la constitución de nuestro microcosmos y avanzamos de esta manera en cantidades infinitamente pequeñas hacia el conocimiento del Universo.

La certeza tenemos que nuestros pasos en el Sendero del Conocimiento son reales y progresivos, permaneciendo latente en el raciocinio, la Esperanza de que enriquecidos por mejores medios cognocitivos, hará posible que la Humanidad Pensante alcance el límite de la función progresiva del conocimiento por medio del avance a través de incrementos infinitesimales.

RESUMEN.

RUBEN CORNELIO MONTES PEREZ. Comparación de tres fuentes biológicas para producir anticuerpos contra progesterona para utilizarse en Radioinmunoanálisis o Enzimoimmunoanálisis. (Bajo la dirección de LUIS A. ZARCO QUINTERO).

Se comparó el rendimiento de anticuerpos contra progesterona inducidos en cabritos, conejos y gallinas. Se demostró que la proporción es 2.5 veces mayor cuando se extrajeron los anticuerpos de la yema de huevo de las gallinas inmunizadas con respecto al obtenido a partir del suero sanguíneo de los conejos.

Las características inmunoquímicas de los anticuerpos de la yema del huevo (Ig Y) son iguales a las que presentan los anticuerpos extraídos del suero de los conejos inmunizados, ambos son útiles para cuantificar progesterona mediante RIA de fase líquida en plasma sanguíneo de ganado bovino.

Los anticuerpos del conejo utilizados en el RIA también se utilizaron para el EIA de fase sólida con el mismo propósito, sin embargo el anticuerpo Ig Y no es adecuado para utilizarse en el EIA de fase sólida, se propone realizar adicionales pasos de purificación para estos anticuerpos con el objeto de establecer el EIA correspondiente.

1. INTRODUCCION.

1.1 PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA.

En la actualidad una de las técnicas más utilizadas para el seguimiento de la actividad reproductiva de los animales domésticos es la cuantificación hormonal, a través de las técnicas de los Ensayos de Unión (Cantley et al., 1975; Möstl et al., 1984; Magness and Ford, 1983; Staigmiller et al., 1979; Tribble et al., 1973; Parker et al., 1988; MacDonnell, H., 1976; Franchimont et al., 1986; Perera y Abeyratne, 1979; Booth, 1980).

Entre éstas, las más frecuentes son el Radioinmunoanálisis (RIA) (Yalow and Berson, 1960; Meisterling and Dailey, 1987; Hale et al., 1980/1981; Pichová et al., 1984; Schille et al., 1970; Bourque et al., 1988; Díaz et al., 1988; Pennington et al., 1985; Tjondronegoro et al., 1987; King et al., 1985; Kratzsch et al., 1987), recientemente el Enzimoimunoanálisis (EIA) (Wimpy et al., 1986; Marcus and Hackett, 1986; Wiel et al., 1982; Sauer et al., 1986; Nakao et al., 1983; Allen y Foote, 1988; Elmore, 1988) y el Enzimoimunoanálisis por emisión luminosa (Wang et al., 1984; Khoen et al., 1981; Whitehead et al., 1983).

Los componentes principales de éstas técnicas son tres : el anticuerpo, el trazador o antígeno marcado y el antígeno no marcado o analito. Mediante la combinación de los componentes bajo condiciones fisicoquímicas controladas se pueden cuantificar hormonas en muestras de suero, plasma sanguíneo, saliva o leche (Abraham, 1974).

Para poder establecer la técnica es necesario disponer de anticuerpos dirigidos contra la hormona que se pretende cuantificar, los cuales deben poseer alta afinidad o avidéz y alta especificidad hacia la hormona en estudio (Abraham, 1974).

Hoy día, en México la mayor parte de los anticuerpos utilizados para el Radioinmunoanálisis (RIA) y Enzimoimmunoanálisis (EIA) se compran a distribuidores de productos biológicos de manufactura norteamericana o europea. Son muy pocos los sitios en la República donde se producen anticuerpos para estas técnicas, como por ejemplo el Instituto Nacional de Nutrición o el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M., y en estos sitios generalmente la producción es limitada. Ante la necesidad de cuantificar progesterona para el seguimiento de la actividad ovárica de los animales domésticos, surge el proyecto para inducir la producción de anticuerpos antiprogesterona en varias especies animales, tratando de encontrar una técnica sencilla y de bajo costo, para obtener una fuente con alto rendimiento de anticuerpos policlonales de buena calidad para utilizarse en el RIA o EIA de progesterona.

Los objetivos del presente trabajo son :

1. Comparar las características de anticuerpos policlonales contra progesterona obtenidos a partir de suero de conejos inmunizados, suero de cabritos inmunizados o yema de huevo de gallinas inmunizadas.
2. Diseñar y validar los métodos de radioinmunoanálisis y

enzimoinmunoanálisis para la determinación de progesterona utilizando los anticuerpos descritos en el inciso anterior.

3. Comparar la Exactitud, Precisión, Especificidad y Sensibilidad de los ensayos diseñados.

4. Determinar cuál de las tres fuentes de inducción de anticuerpos probados es la más eficiente y factible para producir grandes cantidades de anticuerpos de adecuada calidad.

2. MARCO TEORICO.

2.1 LOS ESTEROIDES COMO INMUNÓGENOS.

Si la topología y composición de la superficie de una molécula no son reconocidos como propias por el sistema inmunocompetente del organismo, éste produce anticuerpos que enlazan a la molécula extraña, propiedad llamada inmunogenicidad (Weck, 1973; Tizard, 1989). Para que una sustancia sea capaz de inducir la respuesta inmune al entrar en contacto con algún organismo, ésta debe poseer un elevado peso molecular, alrededor de 1000 a 10000 daltones o más (Tizard, 1989). Sin embargo, los esteroides son moléculas cuyo peso molecular oscila entre 300 a 400 daltones (Grant and Reastall, 1983). Por ser tan pequeños no son capaces de inducir la formación de anticuerpos cuando son administrados por cualquier vía (Naegele and Drahovsky, 1980). Para que tengan la capacidad de ser inmunogénicos deben ser conjugados a una proteína, la cual sirve como acarreadora (Naegele and Drahovsky, 1980).

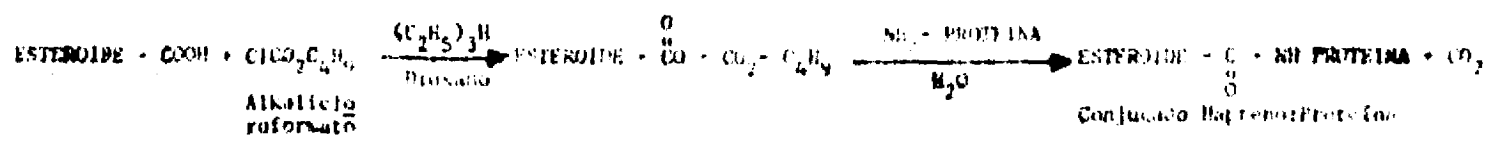
Cuando una sustancia pequeña se conjuga a una molécula grande para adquirir inmunogenicidad se denomina hapteno (Nisonoff, 1984; Tizard, 1989), tal caso corresponde a los esteroides. Para hacerlos inmunogénicos, los esteroides normalmente son conjugados a una proteína acarreadora, generalmente albúmina, a través de un puente. Los puentes más frecuentes son: hemisuccinato, carboximetiloxima, carboximetileter, ácido alcanoico, tioeter y glucurónido (CIAEA, 1984; Naegele and Drahovsky 1980).

En el caso específico de la progesterona, se han usado frecuentemente los enlaces carboximetoxilamina hemi-HCl (Runnebaum B., 1980), 6-carboximetilenticóter (Runnebaum B., 1980), 11 α -OH-hemisuccinato (Capparelli *et al.*, 1987) y 7 α -carboxietilenticóter (King *et al.*, 1985; Wiel and Koops, 1986; Prakash *et al.*, 1986; Wiel and Koops, 1982).

Las técnicas más usadas para realizar la conjugación del esteroide con su proteína acarreadora son la del anhídrido mixto y la reacción de la carbodiimida (Bacigalupo *et al.*, 1983; Erlanger *et al.*, 1957; Parker, 1976) ver figura 1.

Es requisito indispensable que el enlace entre el esteroide y la albúmina sea suficientemente estable, que no produzca alteración molecular del hapteno durante el proceso de conjugación y que permita también la exposición de los determinantes antigénicos, ya que de esta característica depende grandemente la especificidad y afinidad de los anticuerpos generados (Parker, 1976; Naegele and Drahovsky, 1980). Si los grupos característicos de un esteroide específico son ocupados para la conjugación, los anticuerpos producidos pueden tener reacción cruzada con otros esteroides; esto es porque los grupos que hacían diferente a un esteroide del otro ya no están disponibles para su reconocimiento antigénico (Parker, 1976). Por tal motivo es conveniente elegir un sitio de conjugación lo más retirado posible de los sustituyentes característicos de la molécula, que la diferencian de otros metabolitos (Parker, 1976; Naegele and Drahovsky, 1980).

ANHIDRIDO MIXTO:



REACCION DE LA CARBODIIMIDA:

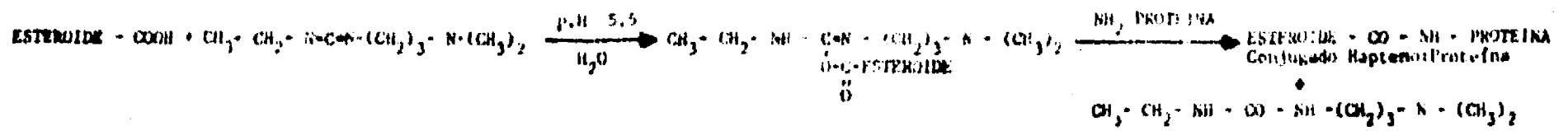


FIGURA 1. Reacción del Anhídrido Mixto y de la Carbodiimida para la síntesis de conjugados Hapteno:proteína

Además es importante mencionar que el puente mediante el cual se hace la conjugación juega un papel importante, ya que puede desencadenar la producción de anticuerpos que podrían llamarse "antipuente" (Nisonoff, 1984). Por estas razones es importante seleccionar el sitio de conjugación más apropiado para cada esteroide, así como el tipo de puente a utilizar. Algunos investigadores consideran que el puente debe tener de 4 a 6 carbonos (Naegele and Drahovsky, 1980) para permitir una suficiente separación entre la proteína acarreadora y el hapteno. Esto permite que los epitopos sean enlazados por linfocitos, evitando así la interferencia por demasiada cercanía de las superficies moleculares (Parker, 1976).

Para el caso de la progesterona, los sitios característicos de la molécula son los grupos cetona de los carbonos 3 y 20, quedando entonces disponibles para conjugación cualquiera de los siguientes carbonos: 1, 6, 7 y 11 (Naegele and Drahovsky, 1980; Abraham, 1974).

Se han utilizado ampliamente los puentes hemisuccinato en posición 11 (Capparelli et al., 1987), carboximetilenoéster en posición 6 (Lindner et al., citado por Runnebaum, B., 1980), y carboxietilenoéster en el carbono 7 (Wiel and Koops, 1986; Prakash et al., 1986) enlazados con la albúmina sérica bovina (BSA) y también con tiroglobulina en posición 11 (Franchimont, et al., 1986).

Dependiendo del número de moléculas de hapteno conjugadas a cada molécula de proteína acarreadora se puede favorecer o disminuir la inducción de anticuerpos. Se ha propuesto que la

mejor relación es entre 5 y 15 moléculas de hapteno por molécula de proteína (Parker, 1976.); sin embargo, existen trabajos que publican la utilización de inmunógenos con proporciones hasta de 30 moles de hapteno por mol de proteína acarreadora (Naegele and Drahovsky, 1980; Thorneycroft and Stone, 1972).

2.2 MÉTODOS DE INMUNIZACIÓN CONTRA PROGESTERONA.

En la inducción de la respuesta inmune contra esteroides conjugados se deben tomar en cuenta los siguientes factores: las propiedades estereoquímicas y el sitio de conjugación con el acarreador, la proporción molar esteroide:proteína, la longitud y tipo del puente, el tipo de proteína acarreadora, la duración y método de inmunización (Naegele and Drahovsky, 1980).

Para la obtención de anticuerpos antiprogesterona generalmente se inmunizan conejos, utilizando diferentes dosis del inmunógeno que van desde 15 μ g por Kg de peso corporal (Abraham y Garza, 1977) hasta 1 mg por animal (Thorneycroft and Stone, 1972). El inmunógeno se ha administrado por vía intradérmica (Vaitukaitis *et al.*, 1971), subcutánea (Thorneycroft and Stone, 1972), intraperitoneal (Capparelli *et al.*, 1987), intramuscular (Bosu *et al.*, 1976) o intraganglionar (Boyd and Peart, 1968, citado por Naegele and Drahovski, 1980).

Existen informes que indican que la mejor respuesta a la inmunización se obtiene cuando se utiliza la vía

intraganglionar (Boyd and Peart, 1988). Sin embargo, el riesgo de fracasar es relativamente alto debido a que la penetración directa del inmunógeno en los ganglios linfáticos produce inflamación severa y atrofia ganglionar. Sin embargo, cuando el ganglio sobrevive a la inflamación se pueden obtener buenos resultados (Naegele and Drahovski, 1980).

También se han producido anticuerpos contra progesterona en borregos mediante la administración de progesterona 11 α hemisuccinato:BSA por vía intramuscular en dosis que varían de 2 a 3 mg de inmunógeno emulsificado con adyuvante completo de Freund (Bosu *et al.*, 1976; Marcus and Hackett, 1986). El uso de adyuvantes tiene por objeto aumentar la respuesta inmune (Vanselow, 1987). Los adyuvantes más utilizados son el completo e incompleto de Freund, mediante los cuales se obtiene una emulsión altamente viscosa, lo que permite que se absorba lentamente a partir del tejido en que se deposita, con lo que se alarga el período de exposición del inmunógeno a los linfocitos (Cox *et al.*, 1984).

En los calendarios de inmunización, la cantidad de refuerzos que se aplican pueden variar desde solo uno hasta seis o siete durante un período de tres a seis meses (Chard, 1978). Los tres o cuatro primeros refuerzos se aplican a intervalos de una a dos semanas entre uno y otro, y los posteriores refuerzos se aplican mensualmente, de tal manera que la mayor parte del inmunógeno se administra en los primeros refuerzos y el resto a lo largo del calendario de inmunización (Chard, 1978; Dawson *et al.*, 1978).

Se ha señalado que el procedimiento de inmunización debe ser planeado cuidadosamente, ya que puede existir el riesgo de ocasionar tolerancia inmunológica (Weck, 1973). Esto ocurre cuando se administran cantidades altas de inmunógeno durante mucho tiempo (Raff, 1973), por lo cual es importante limitar la dosis de inmunógeno que se administre en cada refuerzo. Por ello se recomienda utilizar pequeñas cantidades de inmunógeno, que van desde 100 μ g hasta 1.0 mg por Kg de peso corporal (Parker, 1976).

2.3 TITULACIÓN DEL ANTICUERPO.

Durante el proceso de inmunización es necesario estimar periódicamente los niveles de anticuerpos específicos en suero. Este proceso se llama titulación y se realiza por primera vez en la segunda o tercera semana de inmunización, y luego semanal, quincenal o mensualmente (Morilla y Bautista, 1986; Dawson *et al.*, 1978; Abraham y Garza, 1977). La titulación indica un aumento progresivo de la cantidad de anticuerpos específicos contra el inmunógeno.

Generalmente los títulos de anticuerpos se incrementan después de cada refuerzo, de tal manera que después de tres o cuatro refuerzos se alcanzan títulos elevados. En ocasiones se desarrolla tolerancia inmunológica, y en estos casos se observa un descenso paulatino de los títulos y el animal se vuelve refractario a los refuerzos (Iturbe, 1988; Weck, 1973).

Existe una gran variabilidad en las respuestas a la inmunización, ya que dichas respuestas pueden estar influidas por el estado nutricional del animal, la edad, el sexo y el tipo de inmunógeno (Tizard, 1989). Es bastante conocido que los animales viejos o mal nutridos no poseen un aparato inmunocompetente capaz de desencadenar una síntesis de anticuerpos adecuada (Tizard, 1988). Por otro lado se ha informado que las hembras tienen más capacidad para inducir anticuerpos que los machos (Nieschlag, 1975).

La titulación se realiza utilizando el suero sanguíneo del animal inmunizado, al cual se le añade el trazador, que es el antígeno o inmunógeno marcado por medio de un radioisótopo unido covalentemente. El suero y el trazador se mezclan y se someten a incubación bajo condiciones controladas de temperatura, pH, molaridad y tiempo que permiten la unión del anticuerpo presente en el suero con el trazador. Al finalizar la reacción de formación de complejo antígeno-anticuerpo (Ag-Ac), se separa el trazador que haya quedado libre para que solo se mida la radiación procedente del complejo Ag-Ac. La cantidad de radiación presente en el complejo es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo específico presente en el sistema. Al establecer una relación porcentual entre la cantidad de radiación presente en el complejo con respecto a la cantidad añadida al inicio de la incubación, se obtiene un número que representa el porcentaje de unión del trazador al anticuerpo (IAEA, 1984).

2.4 METODOS DE SEPARACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS A PARTIR DEL SUERO.

Una vez que los títulos de anticuerpo lleguen al máximo se debe extraer una cantidad grande de sangre a partir de la cual se va a obtener el antisuero. Para ello la sangre se deja coagular para separar el suero a 4°C.

Es posible desarrollar métodos de radioinmunoanálisis en los cuales se utilice el antisuero crudo, el cual por su alto contenido de anticuerpos específicos contra el antígeno seleccionado actúa como si se tratara de una solución de anticuerpos (Chard, 1978). Sin embargo, en algunos casos es conveniente purificar los anticuerpos a partir del suero, de tal forma que se eliminen otras sustancias presentes en el suero y que pueden interferir con la reacción. Esta separación de las inmunoglobulinas se realiza mediante precipitación con sulfato de amonio o sulfato de sodio, que disminuyen la solubilidad de las inmunoglobulinas debido a la elevada fuerza iónica del sulfato, produciendo su precipitación (Lehninger, 1978).

Para realizar la precipitación se mezcla una solución saturada de sulfato de amonio con el antisuero, agitándose continuamente durante varios minutos. El precipitado se separa por centrifugación, volviéndose a resuspender el precipitado en la solución de sulfato de amonio, y se repite el procedimiento dos o tres veces (Lefkovits y Pernis, 1979). Para retirar los residuos de sulfato de la fracción de gamaglobulinas se procede a dializar contra agua destilada, o

con amortiguador de fosfatos o boratos a pH cercano a la neutralidad, ya que de otra forma se corre el riesgo de producir desnaturalización de la proteína (Zarco , 1987). Cuando se utiliza el sulfato de sodio el procedimiento es similar, pero la saturación final que se debe alcanzar es del 18%.

Otro procedimiento para extraer las gama globulinas es a través de la precipitación de las proteínas con Polietilenglicol (PEG). Este compuesto se obtiene de la polimerización del etilenglicol. Esta sustancia actúa como un agente polielectrolítico que modifica las cargas eléctricas de la proteína en solución, por lo cual disminuye su solubilidad, lo que hace que precipiten (Cooper, 1977). El peso molecular del polietilenglicol determina grandemente la especificidad de la precipitación proteica. Para precipitar inmunoglobulinas se ha usado ampliamente al PEG 8000. Sin embargo también se informó que el 400 es eficaz para la precipitación (Cooper, 1977).

La proteína A, extraída de la pared celular de *Staphylococcus aureus* también precipita las gama globulinas debido a que la fracción Fc de la Ig G se enlaza específicamente a la proteína A (IAEA, 1984). Esta propiedad permite utilizar a la proteína A en un sistema de cromatografía de afinidad o mezclándola con el antisuero para causar precipitación. En el caso de la cromatografía, la proteína se conjuga por medio de bromuro de cianógeno a microesferas de sefarosa CL-4B. Posteriormente las

microesferas se empacan en una columna a través de la cual se deja correr el antisuero; las inmunoglobulinas G quedan atrapadas en la columna, mientras que otras proteínas séricas caen libremente a lo largo de la columna y salen en cada fracción del eluido (Cooper, 1977).

Otra posibilidad para extraer gama globulinas es a través de la reducción de su solubilidad en medio acuoso, lo cual se logra mediante la mezcla de solventes orgánicos neutros solubles en agua, como el etanol y la acetona (Lehninger, 1978). Estos solventes disminuyen la constante dieléctrica del agua, por lo cual las proteínas se congregan debido a la atracción por cargas opuestas y entonces precipitan (Lehninger, 1978). La separación de mezclas de proteínas se realiza por medio de dos solventes mezclados en proporción definida con las proteínas, ya sea utilizando agua con etanol o agua con acetona, fríos preferentemente para evitar la desnaturalización de las proteínas que se pretenden separar (Cooper, 1977). Este método se ha utilizado últimamente para extraer gama globulinas a partir de la yema de huevo de gallinas inmunizadas (Bade and Stegemann, 1984).

2.5 OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS DE LA YEMA DEL HUEVO.

Se ha informado de la presencia de altas concentraciones de anticuerpos en la yema del huevo (Patterson *et al.*, 1962). El proceso de transferencia de gama globulinas hacia la yema es semejante al que ocurre en la placenta de los mamíferos (Malkinson, 1963), puesto que solo son transferidas las

inmunoglobulinas G desde las células epiteliales foliculares hacia la yema. La concentración de inmunoglobulinas en la yema del huevo es igual o superior a la que presenta el suero materno (Malkinson, 1985). Se ha informado que las gallinas inmunizadas contra antígenos virales, bacterianos, proteínas y haptenos han producido huevos con elevada cantidad de anticuerpos, que son utilizables para análisis inmunológicos como RIA, prueba de antiglobulina, hemaglutinación indirecta, ELISA e inmunolectroforesis (Jensenius *et al.*, 1981; Malkinson, 1985).

Patterson *et al.* (1982) demostraron que las concentraciones de anticuerpos presentes en la yema del huevo de aves inmunizadas son bastante cercanas a las encontradas en el suero de las mismas, y que estos niveles aparecen en la yema cinco a siete días después de que se alcanzan los niveles más altos en el suero.

Una gallina produce alrededor de 300 huevos en su primer ciclo de postura (Gilbert, 1984), por lo que se si considera que cada yema tiene un volumen promedio de 10 ml, se pueden obtener un total de 3000 ml de yema de huevo rica en anticuerpos a partir de cada gallina. Si una gallina inmunizada alcanza títulos elevados de anticuerpos en la yema, que permitan trabajar por ejemplo a una dilución de 1:2000, entonces se tendría un rendimiento final de 6 000 000 ml de antisuero diluido. Es decir 6000 litros de anticuerpo listo para ser utilizado para la

cuantificación hormonal. En un radioinmunoensayo se consumen generalmente 100 μ l de anticuerpo diluido por cada tubo, por lo que con 8000 litros se podrían trabajar 80 millones de tubos, lo que significa que se podría disponer de una fuente casi ilimitada de anticuerpos.

La extracción de anticuerpos a partir de la yema ha involucrado varios obstáculos, principalmente el poder separar eficientemente las lipoproteínas de las proteínas simples (Jensenius *et al.*, 1981). Para esto se han descrito varios métodos, que incluyen la utilización de solventes orgánicos como el éter-dicloruro de etileno (Patterson *et al.*, 1982; Malkinson, 1985); propanol y acetona (Bade and Stegemann, 1984), así como también la utilización de precipitantes como el polietilenglicol y sulfatos de amonio y sodio (Polson *et al.*, 1980a; Polson *et al.*, 1980b), y por precipitación con sulfato dextran y baja fuerza iónica a pH neutro (Jensenius *et al.*, 1981). Sin embargo, las técnicas más utilizadas son las que emplean el Polietilenglicol 8000, o éter y cloruro de etileno.

Jensenius *et al.* (1981) monitoreando con Ig G de pollo marcadas con I-125, registraron que mediante la técnica de extracción con sulfato dextran han logrado extraer del 70 al 80 % de las gamaglobulinas de la yema; Patterson *et al.* (1982) también lograron extraer del 70 al 80% utilizando cloruro de etileno y éter.

2.6 CRITERIOS PARA EVALUAR AL ANTICUERPO.

Los anticuerpos extraídos, ya sea de la yema o del suero, deben presentar ciertas características que permitan utilizarlos en el RIA o EIA. Estas características incluyen un elevado título, una alta afinidad por el antígeno que se va a medir, así como marcada especificidad por dicho antígeno.

El Título indica la dilución del anticuerpo a la que enlaza al 50 % del antígeno presente en el sistema (Naegele y Drahovsky, 1980); se ha elegido tal porcentaje de unión como base del análisis porque es el porcentaje de unión requerido para que un RIA funcione adecuadamente. El título es independiente de la especificidad, pero es proporcional al producto de la concentración del anticuerpo y la afinidad del mismo (Abraham, 1974). Los antisueros con elevado título tienden a presentar también alta afinidad hacia el antígeno. Generalmente los antisueros de conejos y ovejas inmunizadas se pueden utilizar en diluciones de 1:1000 hasta 1:20 000, y eventualmente en diluciones aún mayores (Thornycroft y Stone, 1972; Wiel and Koops, 1986; Abraham, 1974).

La Afinidad es una medida de la fuerza de enlace entre el anticuerpo y el antígeno (Parker, 1976), se calcula a través de la gráfica de Scatchard (IAEA, 1984), de la gráfica de Michaelis-Menten (Naegele and Drahovsky, 1980), o de la gráfica del recíproco de las concentraciones del antígeno contra el recíproco de la concentración del complejo

formado, de acuerdo con la Isoterma de Langmuir (Leslie, 1980). Derivado de ésta última, también se puede determinar la Afinidad mediante la ecuación de Sips transformada a logaritmos para linearizar (Leslie, 1980). Otro método para estimar la constante de afinidad (K) es a partir del principio de que el enlace del antígeno con el anticuerpo disminuye conforme aumenta el volumen total de la reacción. Bajo el modelo cuadrático que expresa la concentración de anticuerpo libre, se asumen valores de K, anticuerpo total y antígeno total para simular los cambios de la cantidad de complejo formado cuando se aumenta el volumen total en la reacción (Griswold and Nelson, 1984); de esta manera se aproximan al comportamiento real del anticuerpo en el sistema.

Los métodos que emplean la gráfica de Michaelis, la Isoterma de Langmuir y la ecuación transformada de Sips, coinciden en asignar a la Constante de Afinidad un valor equivalente a la concentración del antígeno a la cual se ocupan la mitad del total de sitios del anticuerpo -ver figura 2 -(Leslie H., 1980). En el procedimiento de Scatchard, la Afinidad corresponde a la pendiente de la recta (IAEA, 1984) figura 3a. Si la gráfica no es lineal significa que existen varias poblaciones de anticuerpos con diferente afinidad; se obtiene entonces un valor promedio de afinidades entre los anticuerpos de baja y alta afinidad (figura 3b). En el caso del último método se asume que el anticuerpo solo reconoce un sitio de unión con el antígeno y

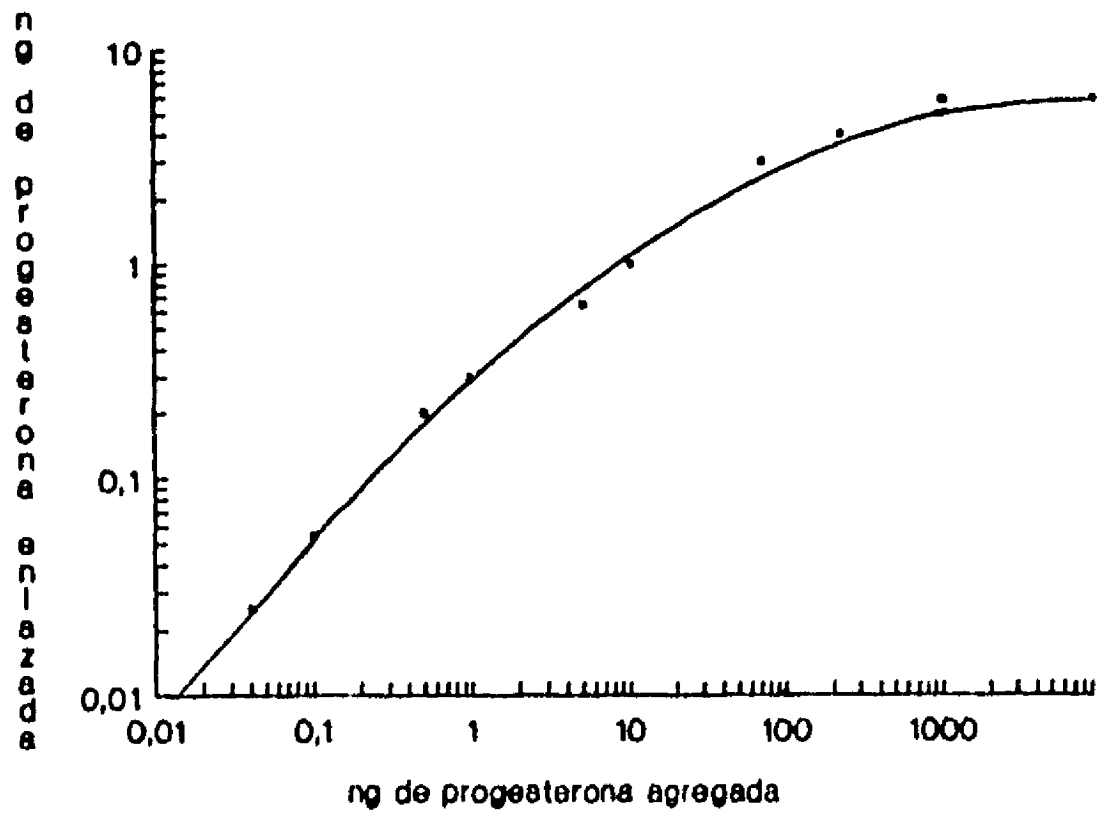


FIGURA 2. Gráfica de Michaelis-Menten.

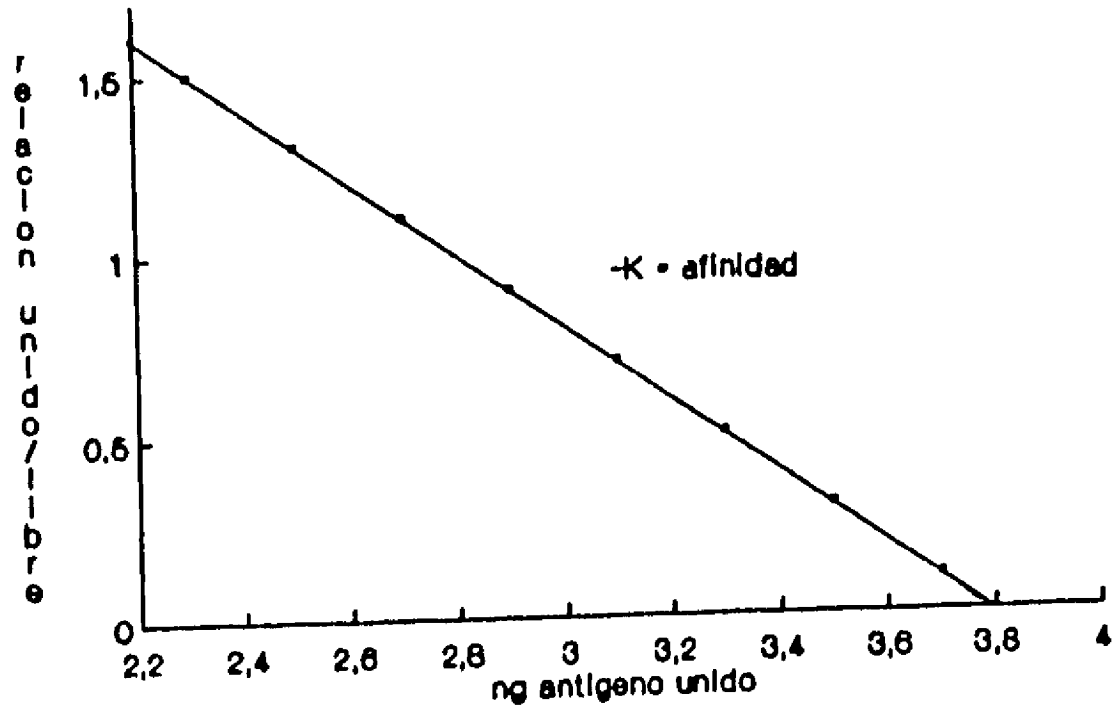


FIGURA 3a. Gráfica de Scatchard lineal.

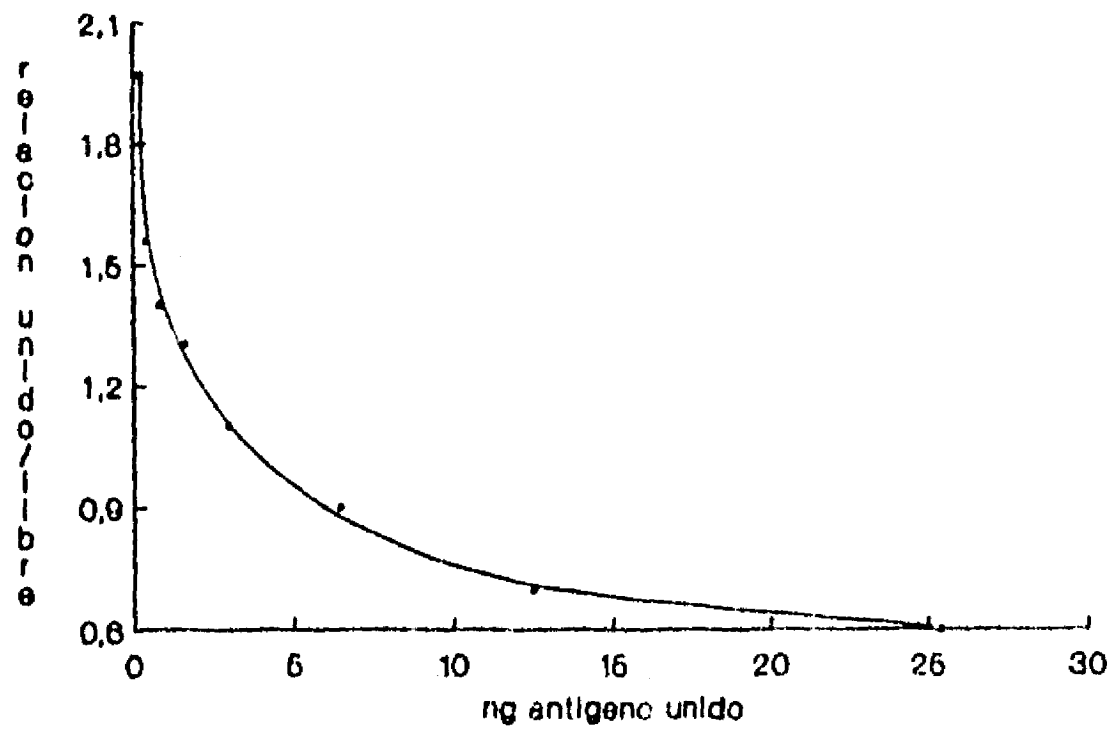


FIGURA 3b. Gráfica de Scatchard curva.

la proporción de enlace del antígeno con anticuerpo es de 1:1 por lo tanto no es efectivo cuando se intenta estimar afinidad de anticuerpos policlonales (Moss et al., 1976). Por esta razón la avidéz es el valor que sustituye a la afinidad cuando se utilizan anticuerpos multivalentes, y la interpretación matemática de ésta es igual que el de la Afinidad (Moss et al., 1976).

La especificidad indica la capacidad que tienen los anticuerpos para diferenciar los epitopos de antígenos estructuralmente semejantes. Los determinantes antigénicos pueden ser comunes a varios antígenos, principalmente cuando éstos son derivados del inmunógeno, por lo que en la realidad la especificidad mide la reacción cruzada que presente el anticuerpo frente a otros metabolitos del inmunógeno o sustancias relacionadas.

La reacción cruzada está definida como la cantidad de masa del antígeno que reacciona con el anticuerpo y es necesaria para desplazar el 50 % del antígeno marcado, en relación a la masa del antígeno original que también desplaza el 50% del antígeno marcado. El valor de reacción cruzada se obtiene de la siguiente fórmula:

$$\%RC = \frac{\text{Masa del esteroide S que desplaza el 50\% de S*} \times 100}{\text{Masa del esteroide X que desplaza el 50\% de S*}}$$

Donde:

S* es el antígeno marcado, S es el inmunógeno original y X es otro antígeno con determinantes antigénicos similares a las

del inmunógeno original (Naegeli and Drahovsky, 1980).

Recientemente, Lauzon, et al (1980) propusieron otro procedimiento para medir la reacción cruzada, basándose en el desplazamiento que produce 1 ng del inmunógeno frente a 1 ng de otro antígeno relacionado con el inmunógeno:

$$\%RC = \frac{\% \text{ desplazamiento de } S^* \text{ producido por 1 ng de X}}{\% \text{ desplazamiento de } S^* \text{ producido por 1 ng de S}} \times 100$$

Cuando se realizan las pruebas de reacción cruzada se establece la especificidad del anticuerpo en relación a una serie de sustancias que el investigador considera que pueden causar reacción cruzada. Sin embargo el anticuerpo puede aun reaccionar con otras sustancias presentes en la muestra y para las cuales no se haya realizado la prueba de reacción cruzada.

2.7 ESTABLECIMIENTO DEL RIA O EIA.

Los inmunoensayos están constituidos por tres componentes principales: el Anticuerpo, el Trazador y el Antígeno no marcado, también llamado Analito frío (Chard, 1978).

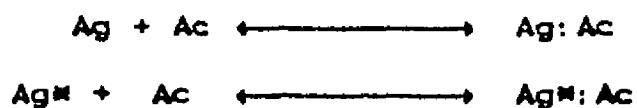
La función del anticuerpo consiste en enlazar específica y firmemente al Trazador o al Analito frío, formando el complejo Antígeno:Anticuerpo (Chard, 1978).

El trazador es una molécula químicamente similar al analito frío, pero contiene una marca que puede ser un radioisótopo en el caso del RIA, o una enzima si es EIA (Kurstak, 1985).

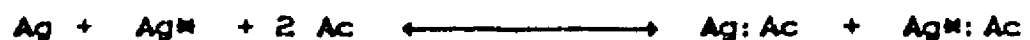
El analito frío corresponde al inmunógeno; es a la vez la

molécula que nos interesa medir en la muestra problema, la cual puede ser una droga, un metabolito, una hormona o una vitamina (Chard, 1978; Ceriotti, et al., 1980).

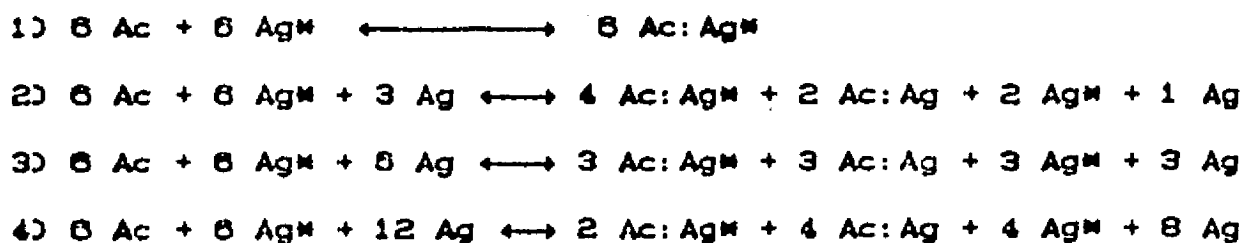
El análisis consiste en colocar conjuntamente el anticuerpo (Ac), el antígeno o analito frío (Ag) y el trazador (Ag^M) en tubos de ensayo o placas con pozos, bajo condiciones de temperatura, volumen, acidéz y molaridad controladas. Se forma de esta manera el complejo Ac:Ag o Ac:Ag^M, como se muestra a continuación:



En caso de que estuvieran presentes el trazador y el analito frío en igualdad de concentraciones efectivas, se obtendría:



Al variar las cantidades de analito frente a cantidades constantes y conocidas de trazador y de anticuerpo, al final de la reacción de unión habrá diferentes proporciones de complejos con trazador y con analito frío, como se muestra a continuación.



Para el primer caso la cantidad de analito frío es cero, por tal razón todo el complejo formado contendrá al trazador. En el segundo caso la presencia de tres moléculas de Ag frente

a seis de Ag^M produce competencia entre Ag y Ag^M para unirse al Ac y consecuentemente existe desplazamiento de dos moléculas de Ag^M por Ag al formarse los complejos.

Para los últimos dos casos ocurre desplazamiento mayor del trazador por aumentar la proporción de analito frío con respecto al trazador. Al medir la cantidad de radiación unida al anticuerpo, se observará que ésta disminuye conforme aumenta la concentración del analito frío incluido en la reacción.

Cuando se representa la gráfica del proceso descrito, se observará desplazamiento del trazador por el analito frío. Esta gráfica se denomina curva estándar, curva dosis-respuesta, o curva de inhibición.

La curva estándar permite estimar la cantidad de analito presente en una muestra problema, ya que ésta es incluida en el análisis bajo el mismo procedimiento de competencia. Como la muestra también experimenta el mismo procedimiento de separación de fracciones, entonces se detectan de éstas las radiaciones, las que se comparan con la curva estándar; al interpolar se infiere la concentración de analito frío en la muestra.

Para poder medir muestras con cantidad desconocida de analito, se necesita establecer el Inmunoensayo. Es necesario probar la dilución a la que se trabajará el anticuerpo, la cantidad de trazador que se añadirá, los tiempos de incubación, el orden en que se agregarán los tres componentes y el procedimiento de separación de la fracción

libre de la unida.

Como un primer paso en este proceso, se prueban simultáneamente varias diluciones del anticuerpo y varias concentraciones del trazador en ausencia del analito (Dobson, 1983). Al hacer esto se encontrarán varias combinaciones de dilución de anticuerpo y cantidad de trazador a las cuáles se obtengan porcentajes de unión adecuadas (entre el 30 y 50%).

El siguiente paso consiste en tomar esas combinaciones y añadirles una cantidad de analito frío equivalente a la mayor concentración que se espera obtener en la muestra ; al medir el porcentaje de unión se encontrará el porcentaje del trazador que fué desplazado por el analito frío (Dobson, 1983).

Una vez hecho esto se decidirá realizar el ensayo utilizando la dilución del anticuerpo y la concentración de trazador que permitieron una unión inicial de entre un 30 y 50%, resultando además en un máximo desplazamiento del trazador por el analito frío. En igualdad de desempeño se escogerá la combinación anticuerpo-trazador en la que se utilice menos anticuerpo, ya que este componente es más difícil de obtener que el trazador (Dobson, 1983).

Cuando se han logrado establecer las condiciones a las que se obtiene el máximo desplazamiento se elabora la curva estandar. Para ello se utiliza una serie de tubos conteniendo la cantidad de trazador y anticuerpo determinados anteriormente. A estos tubos se les añaden cantidades conocidas pero variables del analito frío, y después de

separar las fracciones y medir la radiación emitida, se relaciona con la cantidad de analito frío añadido, de tal manera que se elabora una gráfica donde se puede estimar la concentración del analito en la muestra a partir de la marca presente en la fracción libre o unida.

Uno de los principales inconvenientes del ajuste de las curvas para realizar la estimación de las concentraciones, es el producir error por ajuste, por tal razón se utilizan transformaciones para linearizar éstas. La más común es la transformación logit-log (Abraham, 1974), sin embargo existe controversia sobre esta transformación, ya que se indica que la gráfica generada no es realmente lineal, por lo tanto al transformar las variables se añade al error experimental el error por ajuste; además se dice que no provee información sobre algún cambio en los reactivos que participan en el análisis (Chard, 1978; Rodgers, 1984; Arriguetti and Serio, 1980). A pesar de esto las curvas logit-log son ampliamente utilizadas y valoradas de acuerdo a los siguientes indicadores: el coeficiente de correlación, pendiente de la recta, unión máxima y unión no específica (Feldman y Rodbard, 1971).

Para valorar favorablemente algún RIA o EIA, éste debe mostrar una pendiente aproximada de -1.00 en transformación logit-ln, una unión máxima del 30 al 50%, unión no específica del 5% o menos y coeficiente de correlación entre -0.85 a -0.99 (Moss et al., 1976; IAEA, 1984; Chard, 1978).

2.8 VALIDACIÓN DEL ENSAYO.

Una vez establecidas las condiciones del Inmunoensayo se procede a validarlo, de acuerdo con los criterios de Sensibilidad, Especificidad, Exactitud y Precisión (IAEA, 1984; Abraham, 1974).

La Sensibilidad se define como la cantidad mínima de antígeno que se puede distinguir de una muestra que no lo tiene, es decir del estándar cero al 95% de límite de confianza (Abraham, 1974). La sensibilidad es dependiente de la Precisión, ya que si aumenta el error experimental dentro y entre inmunoensayos hace que se amplíe el intervalo de confianza para cada concentración. Existen otros factores muy importantes que también producen cambio en la sensibilidad; éstos son la afinidad del anticuerpo, la masa del trazador y del anticuerpo y el volumen del medio de incubación (Abraham, 1974).

Los anticuerpos de baja afinidad no enlazan cantidades detectables del analito cuando la concentración de éste es baja, y por lo tanto disminuyen la sensibilidad del ensayo (Griswold and Nelson, 1984; Parker, 1978). Por otro lado, si la actividad específica del trazador es baja, entonces se necesita mayor cantidad de masa de éste para poder detectar el complejo formado, por lo tanto disminuye también la sensibilidad (Chard, 1978).

La especificidad, ya descrita en el apartado sobre caracterización del antisuero forma parte de la validación de cualquier inmunoensayo. Se han informado diversos valores de

reacción cruzada en los antisueros contra esteroides distintos al inmunógeno original, en este caso contra progesterona (Runnebaum, 1980).

La especificidad también debe ser probada a través de las Pruebas de Paralelismo (IAEA, 1984), que consisten en incluir en el ensayo diluciones seriadas de una muestra que contenga cierta cantidad conocida de analito. Las estimaciones de las dosis se grafican junto a la curva estándar con variables transformadas en por ciento de unión contra logaritmo de la dosis. Las gráficas de las series de diluciones deben ser paralelas a la curva estándar, comprobando así que el inmunoensayo es inmunológicamente específico ya que el desplazamiento del trazador por el analito en cada dilución tiene el mismo comportamiento que el de la curva estándar. Otros autores señalan que la prueba de paralelismo también indica identidad entre dos sustancias cuando éstas se caracterizan biológica, fisicoquímica o inmunológicamente (Borth, 1976).

La Precisión es la característica que determina la variabilidad en la estimación de las concentraciones del analito. Existen varios procedimientos para medirla; Abraham (1974) define a la Precisión como los valores de los coeficientes de variación dentro de ensayos (intraensayos) y entre éstos (interensayos). Como la variabilidad es dependiente de la concentración del analito se utilizan como muestras de control de calidad aquellas que contengan cantidades alta, media y baja dentro del rango fisiológico.

La Exactitud es el criterio que indica la veracidad de la cuantificación de analito estimado, para ello se utilizan los experimentos de recuperación (Abraham, 1974), consistentes en añadir cantidades conocidas del analito a muestras de suero o plasma libre del analito a cuantificar, procediendo a realizar la extracción si es un inmunoensayo indirecto o a someter al análisis directo si es una técnica sin extracción, y a correlacionar la cantidad determinada en el análisis con la esperada, que es la que se añadió al principio del experimento. Idealmente se espera un coeficiente de correlación de 1.00. Sin embargo suele haber desviaciones de este valor que pueden ser debidos a error experimental, de cálculo al emplear la curva estándar, o efectos inespecíficos. Los ensayos por extracción normalmente presentan mayor desviaciones entre los valores esperados que los ensayos directos, esto se debe a los efectos del solvente, eficiencia de extracción y sensibilidad de la curva estándar, por tal motivo se prefieren diseñar ensayos directos (Pilo et al., 1986).

Otra forma de medir la Exactitud es comparar las estimaciones de analito en las muestras bajo el inmunoensayo probado contra las estimadas por otros métodos previamente validados, como sería la Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), biensayos, espectrometría de masa, u otro inmunoensayo previamente validado (IAEA, 1984).

3. MATERIAL Y METODO.

3.1. INDUCCIÓN DEL ANTICUERPO.

Se indujo la producción de antisuero antiprogesterona en dos conejos machos raza Nueva Zelanda, en dos cabritos Saen y en cinco gallinas de postura estirpe Daling.

Para la inmunización se utilizó como inmunógeno en todos los casos un conjugado de Progesterona con albúmina sérica bovina a través de enlace hemisuccinato en el carbono 11 de la progesterona (4-pregnane 3,20 dione 11 o hemisuccinato:BSA) (Steraloids, U.S.A.) cuya relación molar esteroide:proteína es de 28:1 (James, 1980).

3.1.1 Inmunización de cabritos.

En los cabritos, la primera inmunización se realizó al año de edad, administrando 2.5 mg del inmunógeno en forma de emulsión subcutánea en el cuello con adyuvante completo de Freund. Posteriormente se administraron refuerzos en dosis de 1.5 mg y un último refuerzo con 2.0 mg. El calendario de inmunización se observa en el cuadro 1. La colección del suero se realizó semanalmente por punción yugular obteniendo 3 ml de sangre en cada ocasión. La titulación se realizó de acuerdo a la técnica descrita por la Agencia Internacional de Energía Atómica (1984) ver cuadro 4, los antisueros fueron diluidos desde 1:100 hasta 1:4000, se realizó la incubación de la mezcla del antisuero con trazador a 4°C durante 18 horas, la fracción unida fué separada mediante suspensión de carbón activado y centrifugación a 3000 rpm durante 10

minutos a 4°C . Los cabritos no produjeron títulos apropiados del anticuerpo, por lo que tuvieron que ser eliminados y no se realizó en ellos el resto del trabajo.

3.1.2 Inmunización de conejos.

En los conejos el calendario de inmunización se inició cuando tenían seis semanas de edad con la inyección subcutánea de 0.1 mg del conjugado de progesterona emulsificada con adyuvante completo de Freund (ACF). Este tratamiento se repitió en las semanas 2 y 4. Posteriormente los refuerzos se aplicaron mensualmente con adyuvante incompleto de Freund (AIF). El calendario completo se muestra en el cuadro 2.

Para monitorear la aparición de anticuerpos, se sangraron los animales semanalmente y se tituló el suero para medir los niveles de anticuerpos contra progesterona. El sangrado se hizo por punción de la vena central de la oreja, colectándose 1 ml de sangre. La titulación se realizó de acuerdo a la técnica descrita por la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA, 1984) ver cuadro 4. Cuando ya no aumentó el título de antiprogesterona se sangró al animal mediante punción cardíaca para obtener la mayor cantidad posible de sangre, de la cual se extrajo el antisuero.

3.1.3 Inmunización de gallinas.

Las gallinas tuvieron un esquema de inmunización semejante a los cabritos, pero la dosis administrada fue de 0.5 mg en

el músculo pectoral, se colectaron 2 ml de sangre de la vena radial de cada gallina semanalmente para llevar el seguimiento de la producción de anticuerpos antiprogesterona. El cuadro 3 muestra el calendario de inmunización. Se colectaron los huevos de todas las gallinas diariamente después de la primera semana de inmunización. Estos se mantuvieron en refrigeración hasta que las gallinas alcanzaron los más altos títulos de anticuerpo. La titulación del suero se realizó de la misma manera que en los conejos y cabritos.

Cuando los títulos de los anticuerpos se estabilizaron se dejó de inmunizar a las gallinas y se procedió a extraer los anticuerpos de la yema de los huevos de las gallinas que mostraron los más altos títulos de anticuerpos en suero.

CUADRO 1
CALENDARIO DE INMUNIZACION EN CABRITOS

Numero de inoculación	Día	Dosis	vía de inoculación	Adyuvante de Freund
1	0	2.5 mg	subcutánea	completo
2	15	1.5 mg	subcutánea	completo
3	30	1.5 mg	subcutánea	completo
4	43	1.5 mg	subcutánea	incompleto
5	58	1.5 mg	subcutánea	incompleto
6	118	2.0 mg	subcutánea	completo

CUADRO 2
CALENDARIO DE INMUNIZACION EN CONEJOS

Numero de inoculación	Día	Dosis	vía de inoculación	adyuvante de Freund.
1	0	0.1 mg	subcutánea	completo
2	15	0.1 mg	subcutánea	completo
3	30	0.1 mg	subcutánea	completo
4	65	0.1 mg	subcutánea	incompleto
5	115	0.15 mg	subcutánea	incompleto
6	145	0.15 mg	subcutánea	incompleto
7	175	0.15 mg	subcutánea	incompleto
8	200	0.15 mg	subcutánea	completo

CUADRO 3
CALENDARIO DE INMUNIZACION EN GALLINAS

Numero de inoculación	Día	Dosis	vía de inoculación	Adyuvante de Freund
1	0	1.0 mg	Intramuscular	completo
2	15	0.5 mg	intramuscular	completo
3	30	0.5 mg	intramuscular	completo
4	44	0.5 mg	intramuscular	incompleto
5	59	0.5 mg	intramuscular	incompleto
6	89	0.5 mg	intramuscular	incompleto
7	110	0.5 mg	intramuscular	completo

CUADRO 4
 PROTOCOLO PARA TITULACION DE ANTISUEROS.

Identificación	amortiguador (ml)	antisuero (0.1 ml)	trazador (ml)	carbón (ml)
Cuentas totales	1.8	0.0	0.1	1.0
Unión no específica	0.8	0.0	0.1	1.0
Antisuero	0.5	1:100*	0.1	1.0
Antisuero	0.5	1:200*	0.1	1.0
Antisuero	0.5	1:500*	0.1	1.0
Antisuero	0.5	1:1000*	0.1	1.0
Antisuero	0.5	1:2000*	0.1	1.0
Antisuero	0.5	1:4000*	0.1	1.0

* DILUCION DEL ANTISUERO QUE FUE EMPLEADA

3.2 EXTRACCION Y CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS.

3.2.1 Extracción de Inmunoglobulinas del suero de conejo.

Se realizó por precipitación mediante salado con sulfato de amonio al tercio de saturación, proceso que se repitió tres veces (Garvey *et al.*, 1977). El último precipitado se resuspendió en Solución amortiguadora de fosfatos salino (PBS) 0.01 M pH 7.1. Inmediatamente después se efectuó la diálisis del precipitado contra amortiguador de boratos salino (BBS) 0.01 M pH 7.8 durante 36 horas a 4 °C, realizándose tres cambios de la solución amortiguadora (Munro y Stabenfeldt, 1964). Finalmente se practicó la prueba de cloruro de bario en solución saturada para asegurar la ausencia de sales de sulfato (Garvey *et al.*, 1977). El dializado se alícuotó en tubos de ensayo y se almacenó a -25 °C. También se midió la cantidad de proteína a través de la absorbancia a 280 nm (Leslie, 1980; Kabat, 1984).

3.2.2 Extracción de Inmunoglobulinas de la yema del huevo.

Se realizó la extracción de Ig Y con 2-propanol y acetona (Bade and Stegemann, 1984) utilizando un proceso modificado a temperatura ambiente. Se colocaron 35 ml de yema en un vaso de precipitado, se añadieron 100 ml de alcohol isopropílico (2-propanol) y se agitó por cinco minutos a temperatura ambiente. Se colocó la suspensión en tubos de ensayo para centrifugarlos durante cinco minutos a 2000 rpm a 15 °C. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió con 2-propanol, repitiéndose el proceso de centrifugación y resuspensión tres veces. Posteriormente se añadieron 100 ml de acetona y se centrifugó por cinco minutos a 2000 rpm, repitiéndose este proceso dos veces. Después de la última centrifugación con acetona se decantó y el precipitado se resuspendió con acetona, se filtró en papel filtro Whatman # 1, se dejó escurrir y los polvos se dejaron secar en campana de extracción durante 48 h. a temperatura ambiente (20°C.).

Posteriormente se pesaron 3.7 g del polvo y se resuspendieron en 20 ml de amortiguador de fosfatos salino 0.01 M (0.1 M de NaCl, 0.01% thimerosal) pH 7.5. Se agitó durante 60 minutos a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo se centrifugó a 20000 x g durante 15 minutos. El precipitado se retiró y el sobrenadante se utilizó para realizar las pruebas de RIA así como para correr electroforesis y medir la cantidad de proteína por absorbancia a 280 nm. La solución de anticuerpos Ig Y se alícuotó y almacenó a 5°C.

3.2.3 Monitoreo del proceso de extracción de gama globulinas de suero y de la yema del huevo.

Se efectuó a través de Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (PAGE) para detectar la presencia de gama globulinas y contaminantes (Cooper, 1977; Gabriel, 1971).

También se estimó la cantidad de proteína presente en los antisueros y extracto obtenidos en cada fuente mediante la medición de la absorbancia a 280 nm (Leslie, 1980; Kabat, 1964; Warburg and Christian, 1941).

3.2.4 Determinación de la Constante de Afinidad de los anticuerpos obtenidos.

Una vez elaborado el Inmunoensayo para cada anticuerpo y del extracto de Ig Y, se estimó la Constante de Afinidad de cada uno de éstos, utilizando la gráfica de Scatchard (Naegele and Drahovsky, 1980).

3.2.5 Diseño del RIA usando los anticuerpos obtenidos en cada fuente.

Se utilizó el método descrito por Dobson (1983) para titular simultáneamente el anticuerpo y el trazador radiactivo, determinando así la dilución del primero y la masa del segundo que se deben usar para lograr del 30 al 50% de unión máxima (B0), y a la vez obtener la mayor diferencia del desplazamiento entre la unión del trazador a concentración cero del antígeno frío (B0) y la unión del trazador a una concentración del antígeno frío equivalente a

2.0 ng/ml para el caso de antisuero del conejo (CR5X87) y a 0.5 ng/ml para probar el extracto de la yema del huevo (Ig Y).

En el cuadro 5 se muestran las diluciones de anticuerpo y concentración de masa radiactiva que fueron probadas para el caso de anticuerpos del conejo, como trazador se utilizó a la progesterona 3 CMO iodotirosina (Diagnostics Products Co.) la cual no mostró otras especificaciones. En el cuadro 6 muestra la misma información para el anticuerpo de la yema de huevo.

CUADRO 5

COMBINACION DE DIFERENTES DILUCIONES DE ANTICUERPO DE CONEJO Y CANTIDADES DE MASA RADIATIVA.

masa radiactiva	Dilución del anticuerpo CRSX87				
	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:15000
3500 cuentas por minuto	A	B	C	D	E
6500 cuentas por minuto	F	G	H	I	J

LAS LETRAS EN EL CUERPO DEL CUADRO INDICAN EL CODIGO QUE SE LE ASIGNO A CADA COMBINACION DE DILUCION DE ANTICUERPO Y CANTIDAD DE MASA RADIATIVA.

CUADRO 6

COMBINACION DE DIFERENTES DILUCIONES DE ANTICUERPO DE YEMA DE HUEVO Y CANTIDADES DE MASA RADIATIVA.

Masa radiactiva	Dilución del anticuerpo Ig Y				
	1:400	1:700	1:1000	1:2000	1:4000
2500 cuentas por minuto	A	B	C	D	E
4500 cuentas por minuto	F	G	H	I	J

LAS LETRAS EN EL CUERPO DEL CUADRO INDICAN EL CODIGO QUE SE LE ASIGNO A CADA COMBINACION DE DILUCION DEL ANTICUERPO Y CANTIDAD DE MASA RADIATIVA.

Una vez determinada la combinación propicia de ambos componentes, se procedió a montar una curva estándar basándose en el protocolo de la Agencia Internacional de Energía Atómica (1984), utilizando estándares realizados por diluciones individuales, a partir de una solución madre que contenía 200 ng/ml de progesterona.

En el cuadro 7 se describe el protocolo que se utilizó para el anticuerpo del conejo, y en el cuadro 8 se describo el protocolo utilizado en el caso de las inmunoglobulinas de la yema de huevo.

Condiciones en que se realizó el ensayo:

Todos los estándares (St), cuentas totales (CT), uniones no específicas (UNE) y uniones máximas (B0), se corrieron por duplicado siguiendo el protocolo del cuadro 7 para el suero de conejo y cuadro 8 para la yema de huevo.

Cuentas totales (CT) se añadieron 1.6 ml de amortiguador de fosfatos 0.01 M con 1 % de gelatina (PBSG), se dejó incubar durante 18 horas a 4° C, al cabo de este tiempo se añadió 100 µl de progesterona marcada con I-125 como trazador diluida en PBS, se dejó incubar 18 horas y se realizó el conteo.

Unión No específica (UNE). Se añadieron 0.6 ml de PBSG se dejó incubar durante 18 horas a 4° C, posteriormente se añadió 100 µl de trazador dejándose incubar nuevamente 18 horas. Al cabo de este tiempo se le añadió 1 ml de carbón en suspensión (0.625 g/100 ml), se agitó y se dejó reposar 5 minutos, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se decantó y se contó el sobrenadante.

Unión Máxima (B0), recibió 0.5 ml de PBSG, también recibió 100 μ l de anticuerpo diluido 1:15000 para el anticuerpo CR5X87 y 1:2500 para Ig Y en PBSG, y se dejó incubar a 4°C durante 18 horas. al cabo de este tiempo se agregaron 100 μ l de trazador, se dejó nuevamente incubar 18 horas a la misma temperatura que la anterior. Posteriormente se añadió la suspensión de carbón, dejando reposar 5 minutos y se centrifugó como el UNE, el sobrenadante se recogió y se midió la radiación en el contador de centelleo gama.

Estándares , recibieron 0.4 ml de PBSG, 0.1 ml de solución de estandar diluido en PBSG y 0.1 ml de anticuerpo diluido, el procedimiento que se siguió fue el mismo que el del B0. Los estándares utilizados son los mencionados en los cuadros 7 y 8.

CUADRO 7

PROTOCOLO DEL RADIOINMUNOANALISIS QUE UTILIZÓ EL ANTICUERPO DE CONEJO CR5X87.

Identificación	PBSG	Estándar o muestra	Anticuerpo 1:15000	Trazador	carbón
Cuentas totales	1.6 ml			3500 cpm	
Unión no específica	0.6 ml			3500 cpm	1 ml
Unión máxima	0.5 ml		0.1 ml	3500 cpm	1 ml
0.12 ng/ml	0.4 ml	0.1 ml	0.1 ml	3500 cpm	1 ml
0.25 ng/ml	0.4 ml	0.1 ml	0.1 ml	3500 cpm	1 ml
0.50 ng/ml	0.4 ml	0.1 ml	0.1 ml	3500 cpm	1 ml
1.0 ng/ml	0.4 ml	0.1 ml	0.1 ml	3500 cpm	1 ml
2.0 ng/ml	0.4 ml	0.1 ml	0.1 ml	3500 cpm	1 ml
4.0 ng/ml	0.4 ml	0.1 ml	0.1 ml	3500 cpm	1 ml
8.0 ng/ml	0.4 ml	0.1 ml	0.1 ml	3500 cpm	1 ml
muestras	0.4 ml	0.1 ml	0.1 ml	3500 cpm	1 ml

CUADRO 8

PROTOCOLO DEL RADIOINMUNOANALISIS QUE UTILIZO EL ANTICUERPO DE LA YEMA DE HUEVO (Ig Y).

Identificación	PBSG	Estándar o muestra	Anticuerpo 1:2500	Trazador	carbón
Cuentas totales	1.6 ml			4500 cpm	
Unión no específica	0.6 ml			4500 cpm	1 ml
Unión máxima	0.5 ml		0.1 ml	4500 cpm	1 ml
0.06 ng/ml	0.4 ml	0.1 ml	0.1 ml	4500 cpm	1 ml
0.12 ng/ml	0.4 ml	0.1 ml	0.1 ml	4500 cpm	1 ml
0.25 ng/ml	0.4 ml	0.1 ml	0.1 ml	4500 cpm	1 ml
0.50 ng/ml	0.4 ml	0.1 ml	0.1 ml	4500 cpm	1 ml
1.0 ng/ml	0.4 ml	0.1 ml	0.1 ml	4500 cpm	1 ml
2.0 ng/ml	0.4 ml	0.1 ml	0.1 ml	4500 cpm	1 ml
4.0 ng/ml	0.4 ml	0.1 ml	0.1 ml	4500 cpm	1 ml
8.0 ng/ml	0.4 ml	0.1 ml	0.1 ml	4500 cpm	1 ml
muestras	0.4 ml	0.1 ml	0.1 ml	4500 cpm	1 ml

3.2.6. Preparación de la Fase sólida para Enzimoimmunoanálisis.

Se utilizó el procedimiento de Munro y Stabenfeldt (1984) utilizando placas de microtitulación. Para cubrir las placas con anticuerpos, éstos se descongelaron hasta que alcanzaran la temperatura ambiental, se diluyeron en amortiguador de carbonatos 0.05 M pH 9.6 y se dejaron reposar por espacio de 15 minutos a temperatura ambiente, se colocaron 50 µl de anticuerpo diluido en cada pozo, se golpeó suavemente la placa para que se distribuyera la solución uniformemente en toda la superficie del fondo de los pozos. La placa se cubrió

con parafilm y se guardó a 4° C. durante 18 horas. Al cabo de este tiempo se decantó el excedente del anticuerpo y se enjuagó tres veces en solución de lavado que contenía Na Cl 1.5 M y detergente Tween 20 al 5%, se dejó escurrir brevemente sobre papel absorbente e inmediatamente se añadió PBSG 0.1 M pH 7.3 con 0.1 % de gelatina.

3.2.7 Diseño del EIA utilizando los anticuerpos de cada fuente

Se utilizó como trazador progesterona conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) a través de un puente 3-carboximetiloxima (3-CMO).

Se probaron varias combinaciones de dilución del conjugado progesterona-3-CMO-HRP con diferentes dilución del anticuerpo para diseñar el Enzimoimmunoensayo con anticuerpos de conejo y con anticuerpos de yema de huevo; el cuadro 9 muestra el procedimiento.

CUADRO 9

TITULACION DE ANTICUERPOS DE CONEJO Y DE YEMA DE HUEVO EN COMBINACION CON DIFERENTES DILUCIONES DE CONJUGADO CONJUGADO PROGESTERONA -3-(CMO):HRP.

Dilución del Conjugado	Dilución del anticuerpo		
	1:500	1:1000	1:2000
1:5000	A	B	C
1:10000	D	E	F
1:20000	G	H	I
1:40000	J	K	L

CONJUGADO : PROGESTERONA 3-CARBOXIMETILOXIMA:PEROXIDASA

Para precisar el diseño del EIA se procedió a titular nuevamente la dilución de conjugado frente al anticuerpo, a través del desplazamiento del trazador por un estandar (E) que contenía 0.4 ng/ml. de progesterona, diluido en la solución de conjugado a probar. Los tratamientos empleados para medir el desplazamiento se observan en los cuadros 10 y 11, la dilución 1:2000 del anticuerpo y 1:5000 el conjugado en el cuadro 10 no se probó, porque se tenía la intención de aprovechar al máximo el conjugado. El protocolo para probar este desplazamiento se muestra en el cuadro 12, en el caso del cuadro 11 se probó una mayor dilución del anticuerpo con el propósito de maximizar la utilización del mismo.

CUADRO 10

TRATAMIENTOS EMPLEADOS PARA PROBAR EL DESPLAZAMIENTO DEL CONJUGADO POR UN ESTANDAR UTILIZANDO EL ANTICUERPO DE CONEJO

Dilución del conjugado	Dilución del anticuerpo CR5X87	
	1:1000	1:2000
1:5000	A	
1:10000	B	C
1:20000	D	E

CUADRO 11

TRATAMIENTOS EMPLEADOS PARA PROBAR EL DESPLAZAMIENTO DEL CONJUGADO POR UN ESTANDAR UTILIZANDO EL EXTRACTO DE LA YEMA DE HUEVO (Ig Y).

Dilución del conjugado	Dilución del anticuerpo Ig Y	
	1:2000	1:4000
1:10000	F	G
1:20000	H	I

CUADRO 12

PROTOCOLO EMPLEADO PARA MEDIR EL DESPLAZAMIENTO DEL CONJUGADO POR UN ESTANDAR.

Identif	anticuerpo	PBSG	conjugado	sustrato	Sol detenedora
UNE		50 μ l	50 μ l	100 μ l	100 μ l
EO	fase sólida	50 μ l	50 μ l	100 μ l	100 μ l
Est	fase sólida	50 μ l	50 μ l ^M	100 μ l	100 μ l

EST = ESTANDARD CON 0.4 NG/ML DE PROGESTERONA
 M CONTIENE AL ESTANDAR CORRESPONDIENTE.
 IDENTIF = IDENTIFICACION
 SOL. DETENEDORA = SOLUCION DETENEDORA DE LA ENZIMA

Desarrollo del protocolo:

Se agregaron 50 μ l de PBSG inmediatamente despues de lavar el excedente de anticuerpo adsorbido al fondo del pozo, la dilución de anticuerpo empleada para preparar la fase sólida, es de 1:2000.

Los pozos EO recibieron únicamente 50 μ l de conjugado diluido 1:20000, los pozos para estandares recibieron el estandar de progesterona añadido en el conjugado previamente diluido.

Se dejaron incubar dos horas a temperatura ambiente.

Al cabo del tiempo se lavaron tres veces con solución de lavado diluida 1:10 con agua destilada poco antes de agregarse a los pozos los siguientes reactivos.

Inmediatamente se añadieron 100 μ l de solución de sustrato, la cual contiene peróxido de Hidrógeno al 2% y 2,2'-azinobis(ácido 3-etilbenz-thiazolinesulfónico) (ABTS) al 40 mM y ácido cítrico 0.05 M a pH 4.0. Se dejó incubar una hora a temperatura ambiente.

Se añadieron 100 μ l de una solución que detiene la actividad enzimática, ésta contiene ácido fluorhídrico al 0.15 M. La absorbancia se leyó a 410 nm.

Se graficó y calculó el porcentaje de unión del estándar en función de cada EO correspondiente.

El anticuerpo Ig Y no fué capaz de unir suficiente trazador en el enzimoimmunoensayo, por lo que dicho anticuerpo no se continuó trabajando.

El diseño final el EIA se realizó con el anticuerpo CRSX87, bajo el protocolo descrito en el cuadro 13.

CUADRO 13

PROTOCOLO DEL ENZIMOINMUNOANALISIS PARA MEDIR PROGESTERONA PLASMÁTICA.

ident.	anticuerpo (1:2000)	PBSG	conjugado (1:20000)	sustrato	solución detenedora
UNE		50 μ l	50 μ l	100 μ l	100 μ l
EO	fase sólida	50 μ l	50 μ l	100 μ l	100 μ l
0.06 ng/ml	fase sólida	50 μ l	50 μ l [*]	100 μ l	100 μ l
0.12 ng/ml	fase sólida	50 μ l	50 μ l [*]	100 μ l	100 μ l
0.25 ng/ml	fase sólida	50 μ l	50 μ l [*]	100 μ l	100 μ l
0.50 ng/ml	fase sólida	50 μ l	50 μ l [*]	100 μ l	100 μ l
1.0 ng/ml	fase sólida	50 μ l	50 μ l [*]	100 μ l	100 μ l
2.0 ng/ml	fase sólida	50 μ l	50 μ l [*]	100 μ l	100 μ l
4.0 ng/ml	fase sólida	50 μ l	50 μ l [*]	100 μ l	100 μ l
muestra	fase sólida	50 μ l	50 μ l [*]	100 μ l	100 μ l

UNE = UNION NO ESPECIFICA

EO = UNION MAXIMA

* CONTIENE EL ESTANDAR O MUESTRA CORRESPONDIENTE.

IDENT. = IDENTIFICACION

3.3 VALIDACIÓN DE LOS INMUNOENSAYOS.

Se escogieron las condiciones del RIA o EIA que presentaron mayor Sensibilidad; requiriéndose como mínima alrededor de 200 picogramos en un mililitro (0.2 ng/ml). Para evaluarlos se utilizaron por lo menos tres curvas estandar, se determinó la curva media y su envoltura de error (una desviación estándar).

3.3.1 Sensibilidad.

Se consideró la sensibilidad como la mínima dosis de progesterona que causó un desplazamiento detectable del trazador con respecto a la unión alcanzada en ausencia del estandar con el 95 % de confiabilidad.

3.3.2 Especificidad.

Para realizar el cálculo de la reacción cruzada del antisuero y de las inmunoglobulinas de la yema de huevo se hicieron diferentes curvas de desplazamiento; en cada caso se sustituyó a la progesterona no marcada por el esteroide a evaluar; se escogieron algunos de aquellos que contienen determinantes antigénicos semejantes a la progesterona. Estos son 17 α -hidroxiprogesterona, 20 α -hidroxiprogesterona, cortisol, 11-desoxicortisol y 11-desoxicorticosterona.

Los porcentajes de reacción cruzada de cada compuesto se calcularon de acuerdo a la siguiente fórmula (Dobson, 1983):

$$RC = \frac{\text{masa de progesterona que desplaza al 50\% del trazador(100)}}{\text{masa de esteroide a evaluar que desplaza al 50 de trazador}}$$

También se realizó la Prueba de Paralelismo (IAEA, 1984) para confirmar la especificidad del anticuerpo en condiciones del RIA o EIA. A partir de una muestra sérica con cantidad conocida de progesterona se hicieron diluciones seriadas a las que también se les estimaron las cantidades de progesterona, las concentraciones se graficaron en la curva estandar.

3.3.3 Relación de estimaciones de progesterona realizados con el RIA o EIA diseñado y un estuche comercial.

Para evaluar este criterio se procedió a medir la cantidad de progesterona plasmática en por lo menos 13 muestras, de vaca Holstein, utilizando un estuche comercial de fase sólida (Coat-A-Count) que ha sido previamente validado en esta especie (Srikandakumar *et al.*, 1986; Pulido, 1989). Se relacionaron las dosificaciones de progesterona entre ambos inmunoensayos por medio de Regresión Lineal Simple (IAEA, 1984).

3.3.4 Precisión.

Se calcularon los coeficientes de variabilidad intraensayo e interensayo (IAEA, 1984). El primer coeficiente fue calculado de las estimaciones de progesterona, en una muestra sérica para validar RIA y dos para EIA, de vacas gestante y

en diestro, colocadas al azar por cuadruplicado en un mismo ensayo. Para el segundo coeficiente se estimaron las concentraciones de progesterona de las mismas muestras analizadas por duplicado en cuatro ensayos consecutivos.

Los ensayos diseñados en esta tesis requieren la extracción de esteroides con éter de petróleo con bajo punto de ebullición; se describe a continuación el proceso de extracción detalladamente.

3.4 EXTRACCIÓN DE ESTEROIDES A PARTIR DE MUESTRAS DE PLASMA.

Se colocaron 0.5 ml de plasma en un tubo de ensayo de 16 x 150 mm., se añadieron 1000 cuentas por minuto de Progesterona 1,2,8,7- H^3 (Amersham, Inc.) a cada tubo, se mezcló en vórtex y se dejó reposar durante 45 minutos a temperatura ambiente.

Se añadieron 5 ml de éter de petróleo a las muestras, se mezcló en vórtex por un minuto y se permitió que se formara la interfase, para esto se dejó reposar por 15 minutos a temperatura ambiente.

Se congeló la fase acuosa en hielo seco y se decantó la fase orgánica a otro tubo de 16 x 150 mm; este procedimiento se realizó dos veces, la fase orgánica se dejó evaporar en campana hasta sequedad a temperatura ambiente.

Al extracto seco se le añadieron 0.5 ml de PBSG 0.1 M al 1% de gelatina pH 7.4, luego se colocó a Baño María por 20 minutos a 45°C, se agitó en vórtex por un minuto y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos, nuevamente se agitó un minuto en vórtex para ser inmediatamente

analizados por RIA o EIA y tambien con el propósito de calcular el porcentaje de recuperación de la siguiente manera: se tomaron dos volúmenes de 50 μ l, uno en cada vial, se añadieron 4 ml de líquido de centelleo, se mezcló, se dejó reposar por lo menos dos horas en cuarto oscuro y se midió la radiación. El porcentaje de recuperación (%Rec), se obtuvo aplicando la siguiente fórmula :

$$\%Rec = \frac{\text{cpm en alicuota contada} \times \text{factor de dilución} \times 100}{\text{cpm CT}}$$

Factor de dilución es la cantidad que ajusta las cuentas por minuto a partir de la alicuota de 50 μ l a todo el volumen en que está resuspendido el extracto.

4. RESULTADOS.

4.1. RESULTADO DE LA INMUNIZACIÓN DE CABRAS.

Al cabo de cuatro meses de inmunización contra progesterona en los cabritos no se observó algún aumento del título de anticuerpos en ningún animal, a pesar de que utilizaron diluciones bajas - alrededor de 1:500-, por lo tanto se desecharon los dos cabritos. Ver figura 4.

4.2. RESULTADO DE LA INMUNIZACIÓN DE CONEJOS.

Los porcentajes de unión obtenidos al titular el suero de los conejos Nueva Zelanda en dilución de 1:500 en diferentes momentos del calendario de inmunización se muestran en la figura 5.

Solamente el conejo CR produjo títulos utilizables de anticuerpos, por lo que fue el único con el que se realizó el resto del proceso. Del antisuero del conejo CR, ahora denominado CR5X87, se colectaron 40 ml de suero, éste se almacenó a -25°C hasta el momento de utilizarse.

4.3 CARACTERIZACIÓN DEL ANTICUERPO DEL CONEJO CR.

4.3.1 Análisis electroforético en PAGE.

El análisis electroforético en gel de poliacrilamida del anticuerpo purificado CR5X87 extraído con sulfato de amonio y dializado contra amortiguador de boratos, muestra una sola banda de proteínas correspondiente a la región de las gama globulinas, ver figura 6.

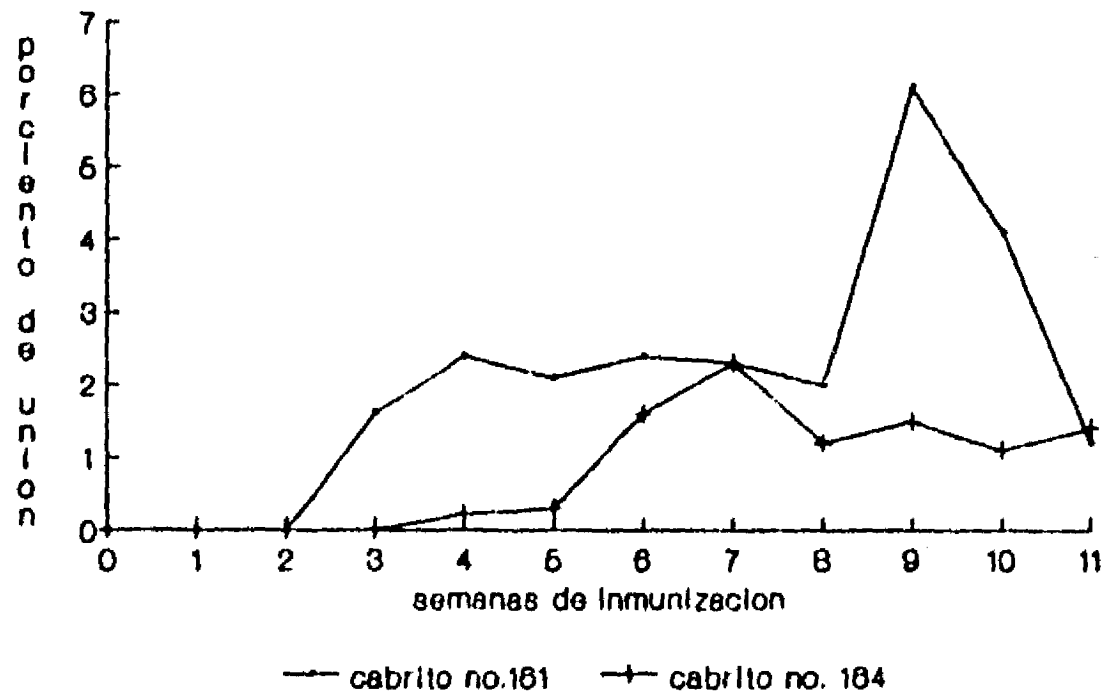


FIGURA 4. Resultado de la inmunización contra progesterona conjugada con albúmina sérica bovina realizado en cabritos.

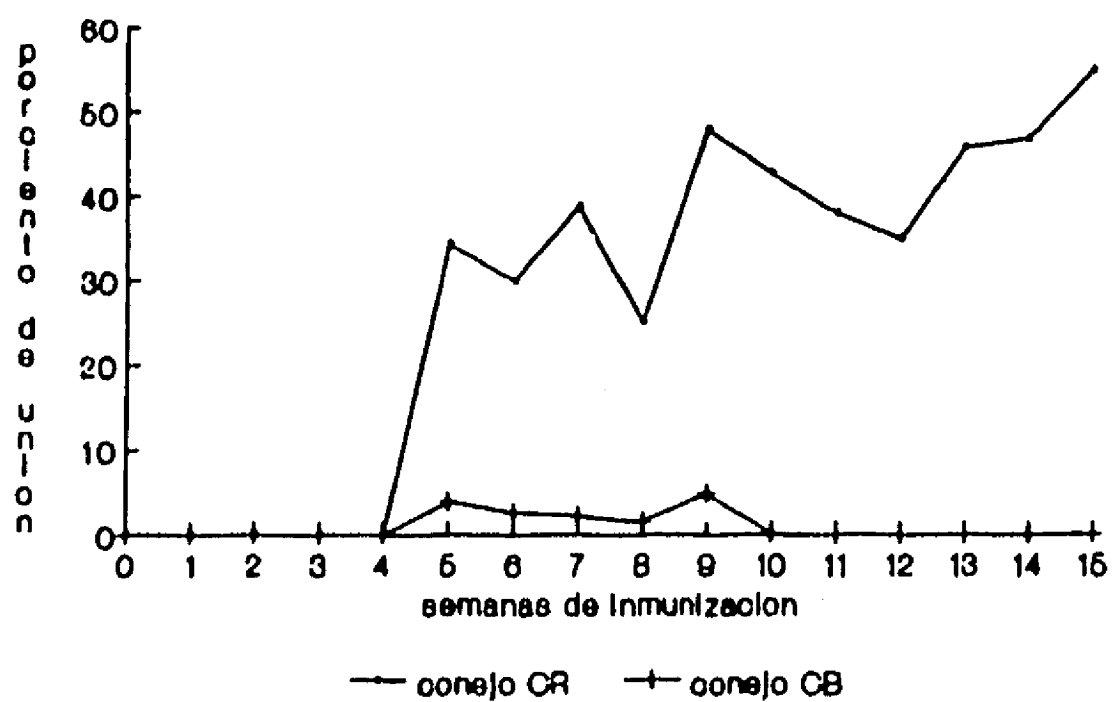


FIGURA 5. Resultado de la inmunización contra progesterona conjugada con albúmina sérica bovina realizado en conejos.

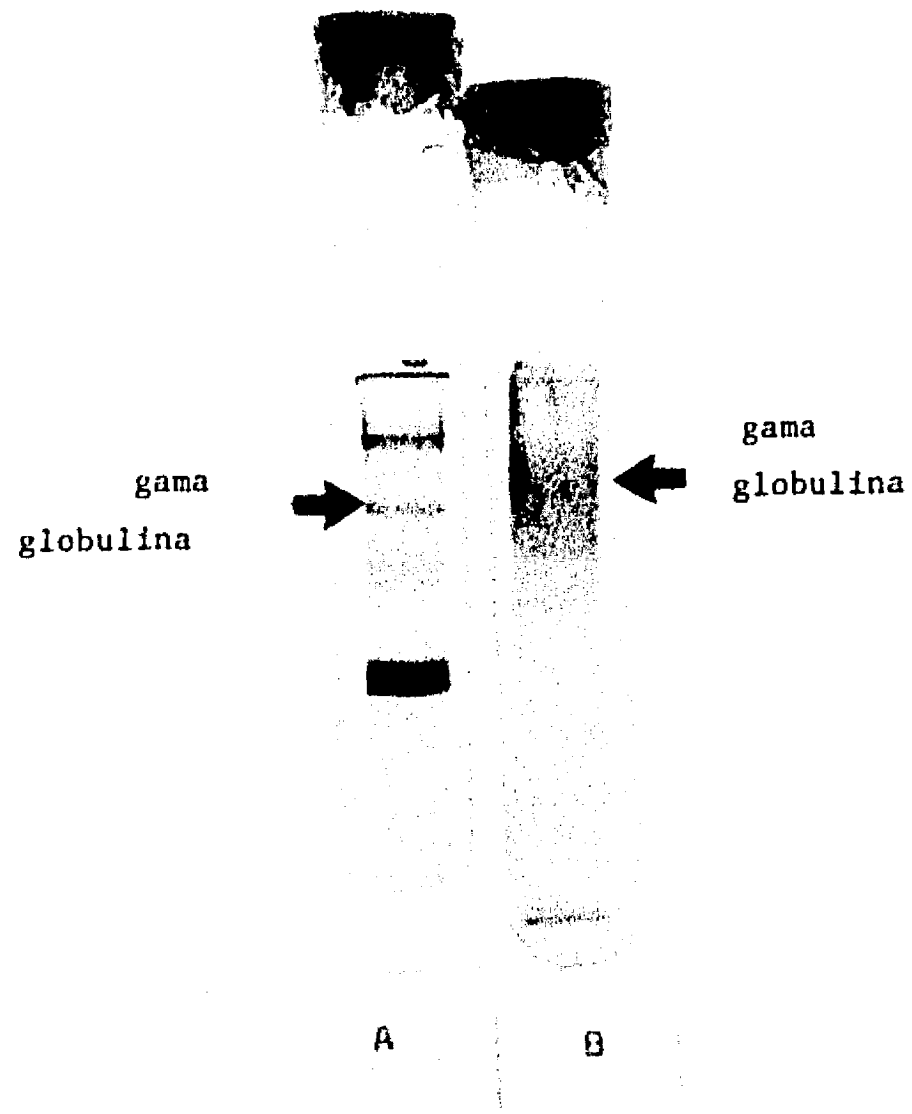


FIGURA 6. Fotografía de la electroforesis en gel de poliacrilamida del anticuerpo dializado CR5X87, la imagen A corresponde a la corrida electroforética de un suero normal de conejo y B a la del anticuerpo CR5X87.

4.3.2 Medición de proteínas del dializado.

La medición de proteínas en solución a través de la absorción a 280 nm de las gama globulinas de los anticuerpos del conejo previamente dializado fué de 2.95 mg/ml.

4.3.3 Resultado de la titulación del anticuerpo frente a diferentes cantidades de progesterona radiactiva.

En el cuadro 14 se muestra el desplazamiento del trazador por el estándar de progesterona con diferentes combinaciones de dilución del anticuerpo CR5X87 y masa radiactiva.

CUADRO 14

RESULTADO DEL DESPLAZAMIENTO DE LA UNION DEL TRAZADOR POR UN ESTANDAR EMPLEANDO DOS NIVELES DE MASA RADIATIVA CUANDO SE UTILIZAN DIFERENTES DILUCIONES DEL ANTICUERPO CR5X87

Dilución del anticuerpo	masa radiactiva	cpm E0	cpm E	%E/E0	Dif
1:1000	3500	2656	2700	----	----
	6500	4472	4270	95	5
1:2000	3500	2380	2161	90	10
	6500	4062	3151	77	23
1:4000	3500	2100	1575	75	25
	6500	3770	2525	67	33
1:8000	3500	1918	1208	63	37
	6500	3185	1560	68	32
1:15000	3500	1218	548	45	55

CPM E0 SON LAS CUENTAS POR MINUTO DE LA UNION MAXIMA CONTENIDAS EN LA FRACCION UNIDA.

CPM E SON LAS CUENTAS POR MINUTO CONTENIDAS EN LA FRACCION UNIDA CUANDO EL TRAZADOR ESTA EN PRESENCIA DE UN ESTANDAR QUE CONTIENE 2.0 NG/ML DE PROGESTERONA.

NE/E0 ES EL PORCIENTO DE UNION DEL TRAZADOR EN PRESENCIA DEL ESTANDAR.

DIF ES LA DIFERENCIA DE UNION ENTRE EL E0 Y EL ESTANDAR.

4.3.4 Diseño del RIA que utiliza el anticuerpo CR5X87.

Se decidió utilizar la dilución de anticuerpo CR5X87 1:15000 y trazador de 3500 cuentas por minuto (cpm) para probar la curva estándar. Los resultados indican un adecuado desplazamiento y el modelo de regresión es significativo. La curva se muestra en la figura 7. Los parámetros de la curva en transformación logit-log son: $Y = 1.18 - 2.19 X$.

El coeficiente de correlación es de -0.96

El coeficiente de determinación es de 0.92

Y es el logit, X es el logaritmo de la dosis.

4.3.5 Cálculo de la Constante de Afinidad del anticuerpo CR5X87.

A partir de la gráfica de Scatchard se calculó la Constante de Afinidad del anticuerpo CR5X87 en Radioinmunoanálisis frente a Progesterona yodada, siguiendo el mismo procedimiento descrito en la sección de la curva estándar.

Considerando que son anticuerpos policlonales, la gráfica no es lineal, ver figura 8, por lo tanto existen varias poblaciones de anticuerpos. Se procedió a calcular la Constante promedio, calculado a través del cociente de la constante mostrada por los anticuerpos de menor afinidad con los de mayor afinidad, se muestra abajo el valor de la Constante de Afinidad.

$$K = \frac{Y}{X} = \frac{1.17}{1.1} \times 10^9 \text{ l/mol} = 1.06 \times 10^9 \text{ l/mol}$$

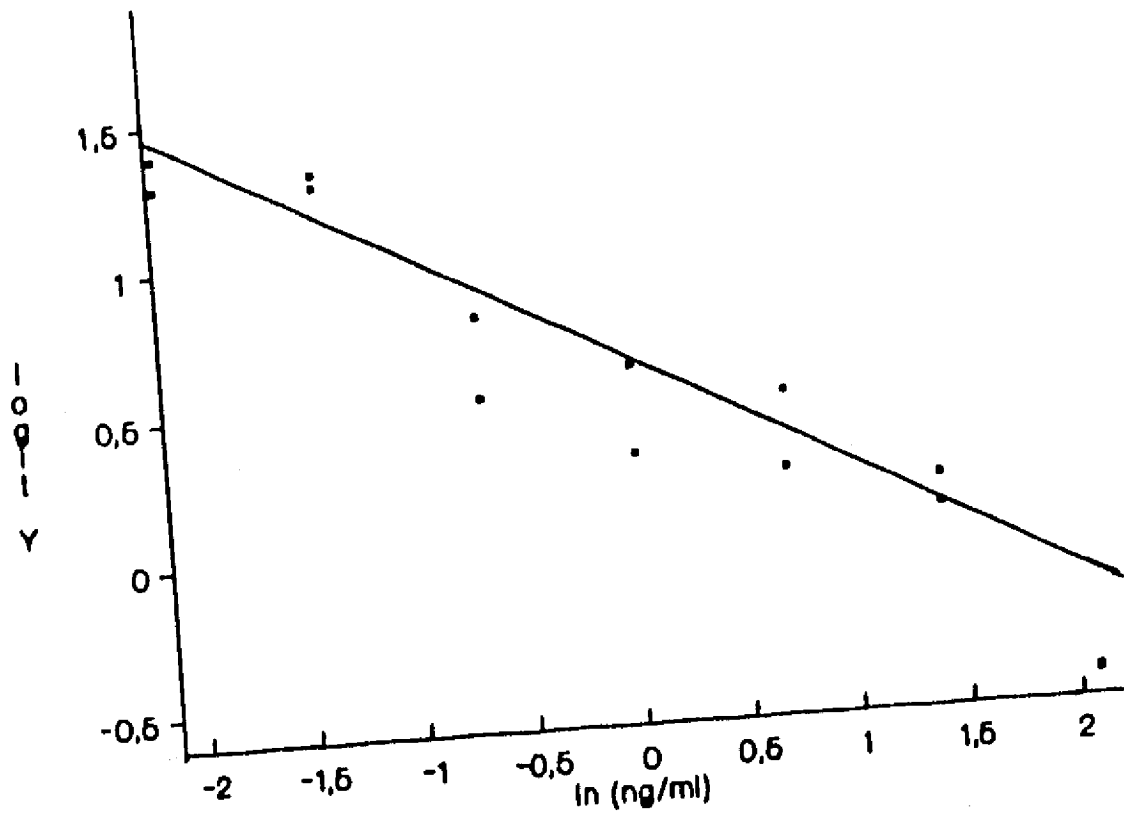


FIGURA 7. Curva estándar del RIA que utiliza el anticuerpo CR5X67.

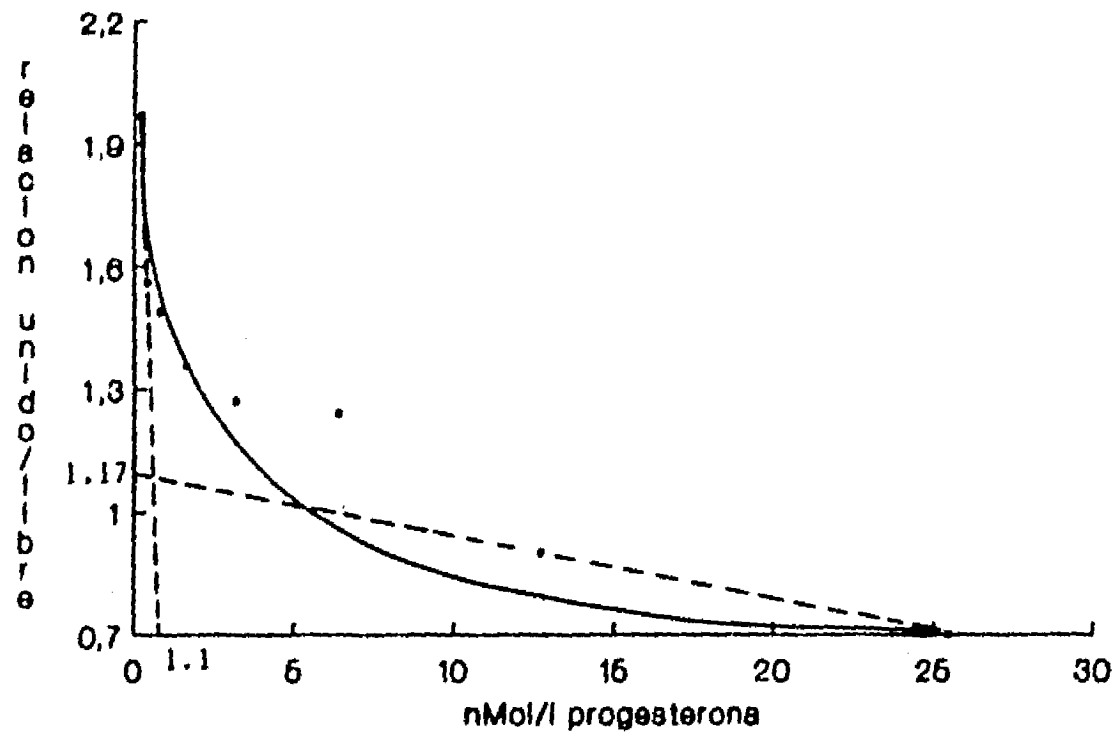


FIGURA 8. Gráfica de Scatchard que emplea el anticuerpo CRSX87.

4.4 VALIDACIÓN DEL RIA QUE UTILIZA EL ANTICUERPO CR5X87.

4.4.1 Cálculo de la Sensibilidad del RIA.

Se determinó la Sensibilidad del RIA elaborado con el anticuerpo CR5X87 diluido 1:15000 en PBSG 0.01 M, pH 7.1 al 1 % de Gelatina, a partir de tres curvas estándar realizados por duplicado, a partir de las cuales se calculó el porcentaje de unión promedio y su desviación estándar para cada concentración de la hormona fría. La envoltura de error resulta de añadir y sustraer una desviación estándar al promedio de unión, los resultados se muestran en la figura 9.

A partir del valor promedio de la unión máxima (B0) se sustrajeron dos desviaciones estándar y se calculó la dosis sobre la curva, dió concentración de 0.32 ng/ml, la cual representa la sensibilidad de la curva estándar.

4.4.2 Medición de la Especificidad.

Los resultados de la reacción cruzada del anticuerpo CR5X87 se observan en la figura 10 y cuadro 15.

En la figura 10 se muestra el desplazamiento de la progesterona marcada producido por diferentes concentraciones de otros esteroides. Como se puede observar, se requieren concentraciones mucho mayores de otros esteroides para lograr desplazamientos similares a los producidos con la progesterona. El porcentaje de reacción cruzada calculado para cada esteroide con respecto a la progesterona se presenta en el cuadro 15; como también se puede observar, la reacción cruzada en ningún caso fué mayor al 2%.

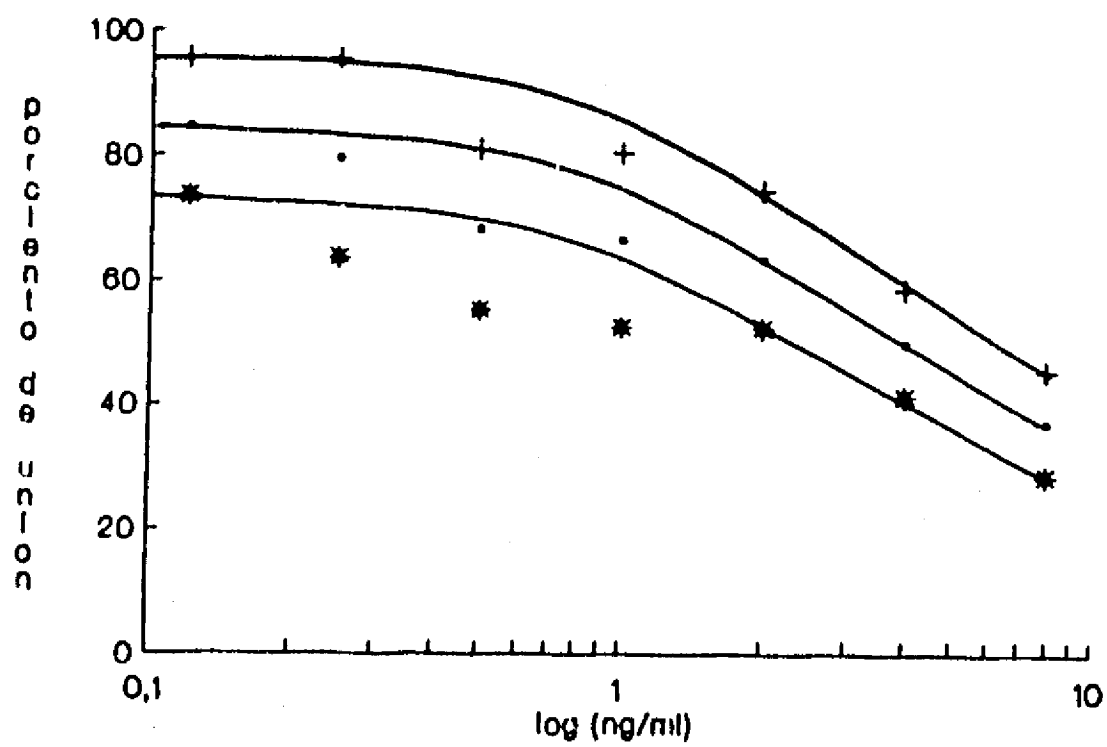


FIGURA 9. Curva estándar con su envoltura de error media \pm d.e. para calcular la sensibilidad del RIA con anticuerpo CR5X87.

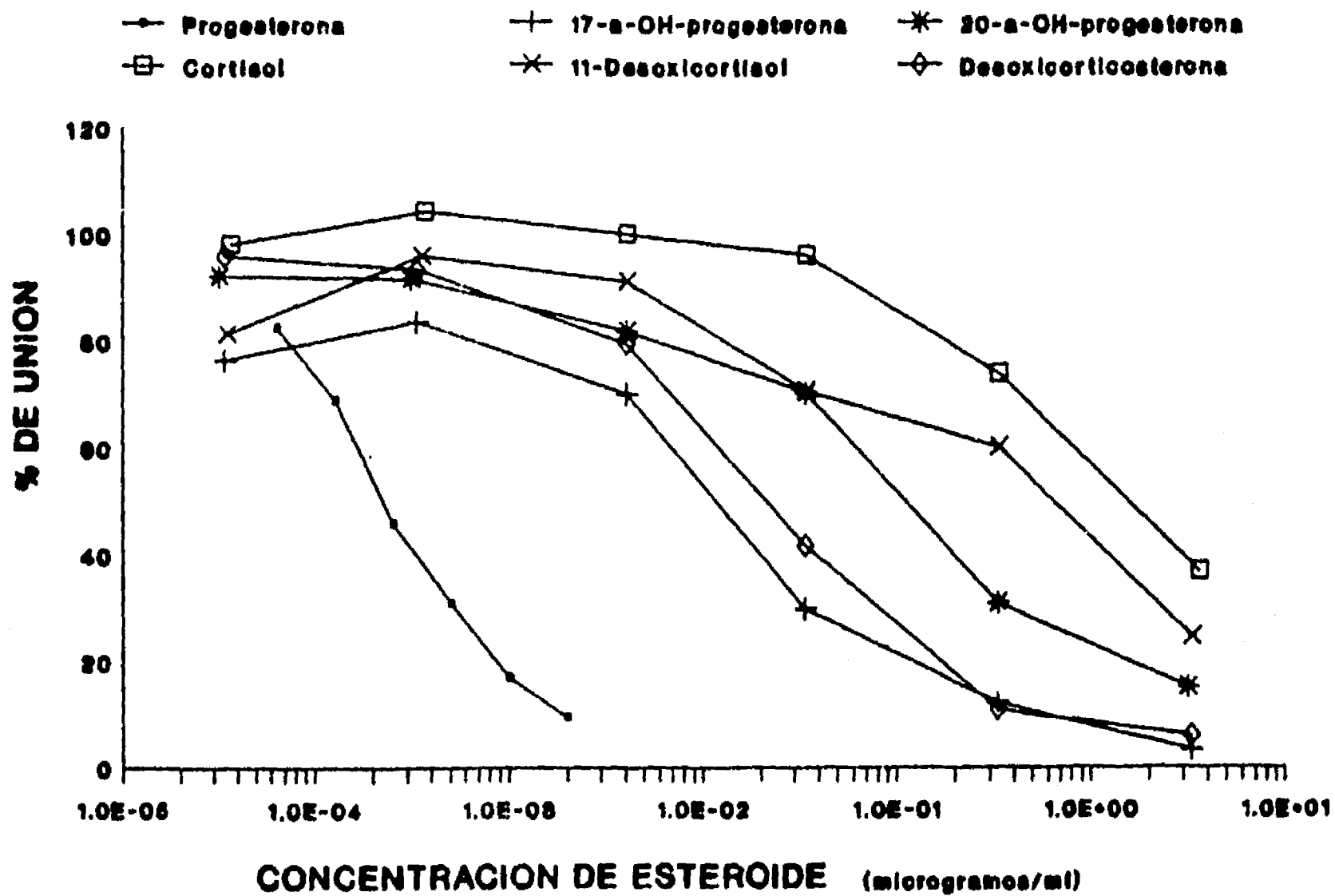


FIGURA 10. Desplazamiento de progesterona radiactiva por otros esteroides en el RIA que utiliza el anticuerpo CR5X87.

CUADRO 15

REACCION CRUZADA DEL ANTICUERPO CR5X87.

Compuesto	% Reacción Cruzada
17 α -hidroxiprogesterona	1.75
20 α -hidroxiprogesterona	0.14
Cortisol	0.02
11 Desoxicortisol	0.03
11 desoxicorticosterona	1.67
Progesterona	100.00

4.4.3 Precisión del RIA.

Los resultados del cálculo de Precisión del anticuerpo CR5X87 utilizado en el RIA se muestran en los cuadros 16 y 17.

El coeficiente de variación intraensayo fué de 14.7 % y el coeficiente de variación interensayo fué de 22.7 %

CUADRO 16.

VARIACION INTRAENSAYO OBTENIDA EN EL RADIOINMUNOANALISIS CON EL ANTICUERPO CR5X87.

Valor determinado en diferentes ensayos				
suero control	ng/ml de progesterona	media	d.e.	CV
CCA	3.33			
	4.20			
	4.27			
	4.8	4.14	0.61	14.7%

CUADRO 17

VARIACION INTERENSAYO OBTENIDO EN EL RADIOINMUNOANALISIS
CON EL ANTICUERPO CR5X87.

Suero control	Valor obtenido en diferentes ensayos		
	Ensayo	ng/ml de progesterona	media d.e. CV
CCA	1	3.43	
	2	6.03	
	3	4.61	
	4	4.45	4.63 1.05 22.7

4.4.4 Relación entre los valores de progesterona estimados con un estuche comercial y el RIA diseñado en el presente trabajo.

Se estimaron los valores de progesterona en 20 muestras de plasma sanguíneo de vacas, utilizando el RIA con el anticuerpo CR5X87 y un RIA comercial.

Se procedió a realizar la Regresión Lineal simple entre los valores de progesterona medidos con los dos métodos. Los resultados se muestran en la Figura 11. El modelo de regresión obtenido es significativo ($P < 0.05$), los estimadores son:

$$Y = 0.25 + 1.72 X$$

El coeficiente de correlación es 0.98

El coeficiente de determinación es 0.93

Y es la cantidad de progesterona estimada con RIA

X es la cantidad estimada con el estuche comercial.

4.4.5 Rendimiento del anticuerpo CR5X87 para el RIA diseñado.

El volumen total del anticuerpo colectado del conejo CR fue

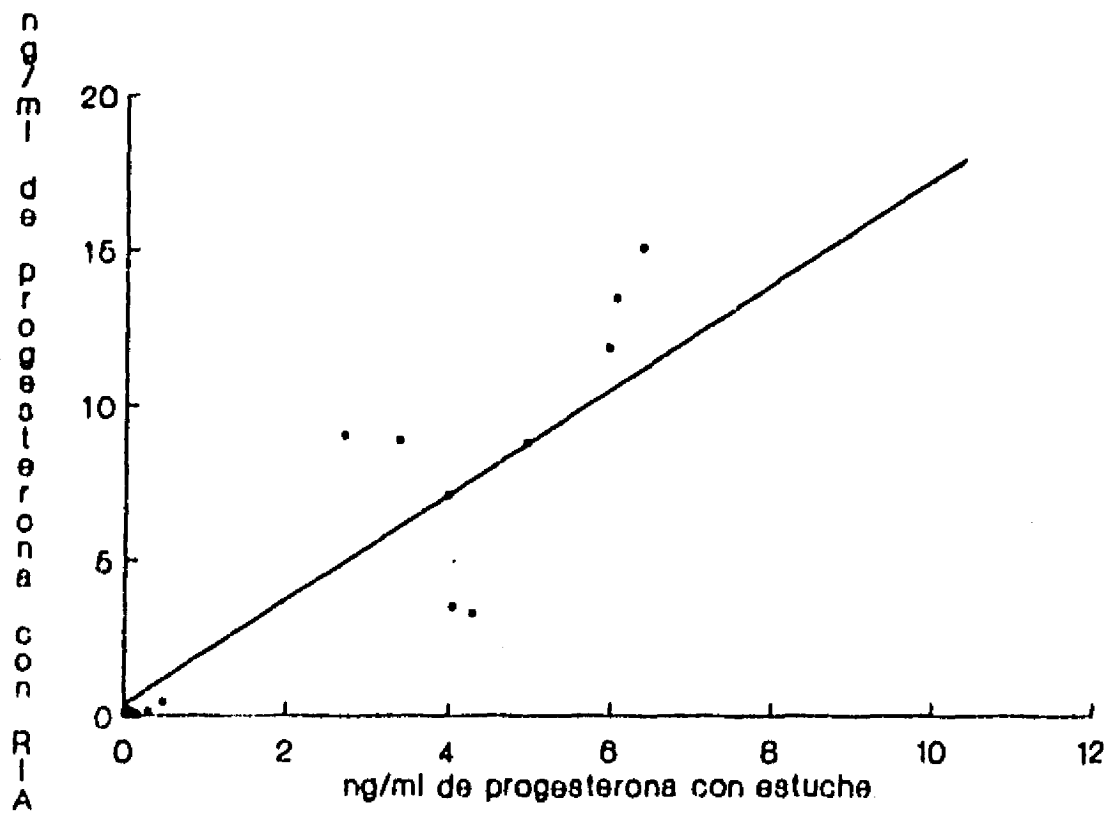


FIGURA 11. Relación de los niveles estimados de progesterona en veinte muestras de plasma sanguíneo de vacas con respecto a un estuche comercial.

de 40 ml, por lo que si la dilución de trabajo del anticuerpo en el RIA es de 1:15000, el volumen total del anticuerpo diluido 1:15000 será de 599 980 ml., que es aproximadamente 600 litros. En el RIA se utilizan 0.1 ml por tubo, de la dilución de anticuerpos, entonces los 600 litros obtenidos alcanzarán para 6 000 000 de tubos.

4.5 RESULTADO DEL EIA QUE UTILIZA EL ANTICUERPO CRSX87.

4.5.1 Resultado de la titulación del anticuerpo frente a diferentes diluciones del conjugado progesterona:peroxidasa.

Los anticuerpos del conejo CRSX87, fueron adsorbidos al fondo de los pozos de las placas de microtitulación y probados como EO, los resultados se muestran en el cuadro 18.

CUADRO 18.

TITULACION DEL ANTICUERPO CRSX87 FRENTE A DIFERENTES DILUCIONES DE CONJUGADO.

dilución del anticuerpo	dilución del conjugado	densidad óptica
1/500	1/5000	1.03
	1/10000	0.86
	1/20000	0.51
	1/40000	0.38
1/1000	1/5000	1.07
	1/10000	0.87
	1/20000	0.58
	1/40000	0.38
1/2000	1/5000	1.13
	1/10000	0.85
	1/20000	0.64
	1/40000	0.46

CONJUGADO ES PROGESTERONA :3-O CARBOXIMETILPEROXIDASA.

Se procedió posteriormente a ensayar simultáneamente las diluciones del anticuerpo y el conjugado para detectar la combinación que produzca el mayor desplazamiento de la unión máxima por un estándar de 0.4 ng/ml de progesterona, los resultados se muestran en la cuadro 19.

CUADRO 19
DESPLAZAMIENTO DEL E0 POR UN ESTANDAR UTILIZANDO EL ANTICUERPO CRSX87.

dilución del anticuerpo	dilución del conjugado	D.O. del E0	D.O. del estándar	%E/E0	Dif
1/1000	1/5000	1.09	1.05	96	4
	1/10000	0.93	0.8	86	14
	1/20000	0.75	0.55	73	27
1/2000	1/10000	0.8	0.64	80	20
	1/20000	0.58	0.39	67	33

D.O. DEL E0 ES LA DENSIDAD OPTICA DE LA UNION MAXIMA
D.O. DEL ESTANDAR ES LA DENSIDAD OPTICA DEL TRAZADOR FRENTE A UN ESTANDAR.
% E/E0 ES EL PORCIENTO DE UNION DEL TRAZADOR CON RESPECTO FRENTE A UN ESTANDAR.
DIF ES LA DIFERENCIA DEL PORCIENTO DE UNION CON RESPECTO A LA UNION MAXIMA (E0).

4.5.2 Diseño del EIA que utiliza el anticuerpo CRSX87.

Se eligió la combinación de dilución del anticuerpo con la del conjugado donde existía el mayor desplazamiento del E0 por el E (estándar); por esta razón se utilizó la combinación de anticuerpo CRSX87 de 1:2000 y conjugado 1:20000 que son las adecuadas para realizar la curva estándar del EIA para progesterona. Los resultados se muestran en la figura 12.

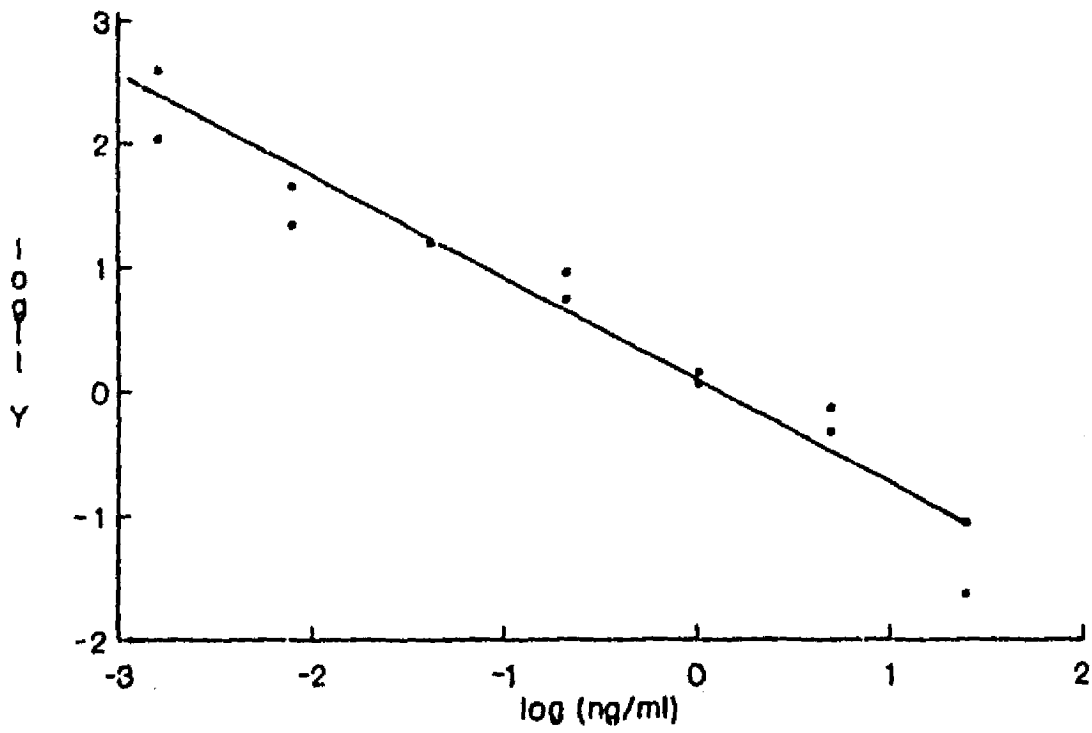


FIGURA 12. Curva estándar del EIA que utiliza el anticuerpo CR5X87 y conjugado progesterona:3-(CMO):HRP.

Los parámetros de la curva estándar usando transformación

logit-log son: $Y = 0.18 - 2.16 X$

El coeficiente de correlación es -0.95

El coeficiente de determinación (R^2) es 0.9

Y es el logit del porcentaje de unión

X es el logaritmo de la dosis.

4.5.3 Validación del EIA.

4.5.3.1 Prueba de Paralelismo.

La prueba de Paralelismo fue realizada en el Enzimoimmunoanálisis de fase sólida. Bajo el procedimiento descrito en la sección de curva de EIA, a partir de la cuantificación de diluciones dobles de un suero sanguíneo de vaca gestante, los resultados se muestran en la figura 13.

4.5.3.2 Determinación de la Sensibilidad.

Se determinó la Sensibilidad del EIA diseñado con el anticuerpo CRSX87 diluido 1:2000 y conjugado 1:20000, a partir de tres curvas estándar realizados por duplicado, las uniones máximas y mínimas resultan de aumentar y sustraer una desviación estándar a los valores medios de unión, los resultados se observan en la figura 14.

A partir del promedio de la unión máxima (B0) se sustrajeron dos desviaciones estándar y se calculó la dosis sobre la curva, dando una concentración de 0.28 ng/ml, esta representa la sensibilidad del ensayo.

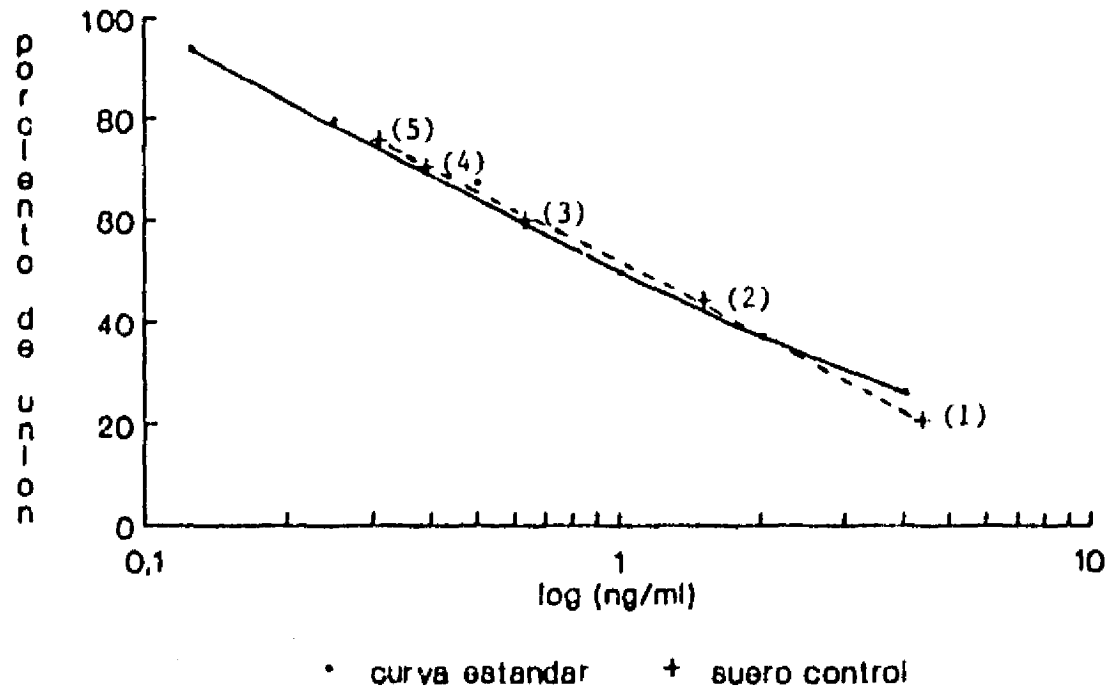


FIGURA 13. Paralelismo de una muestra de plasma sanguíneo diluido 1:1 (1), 1:2 (2), 1:4 (3), 1:8 (4) y 1:16 (5) en el EIA que utiliza el anticuerpo CR5X87.

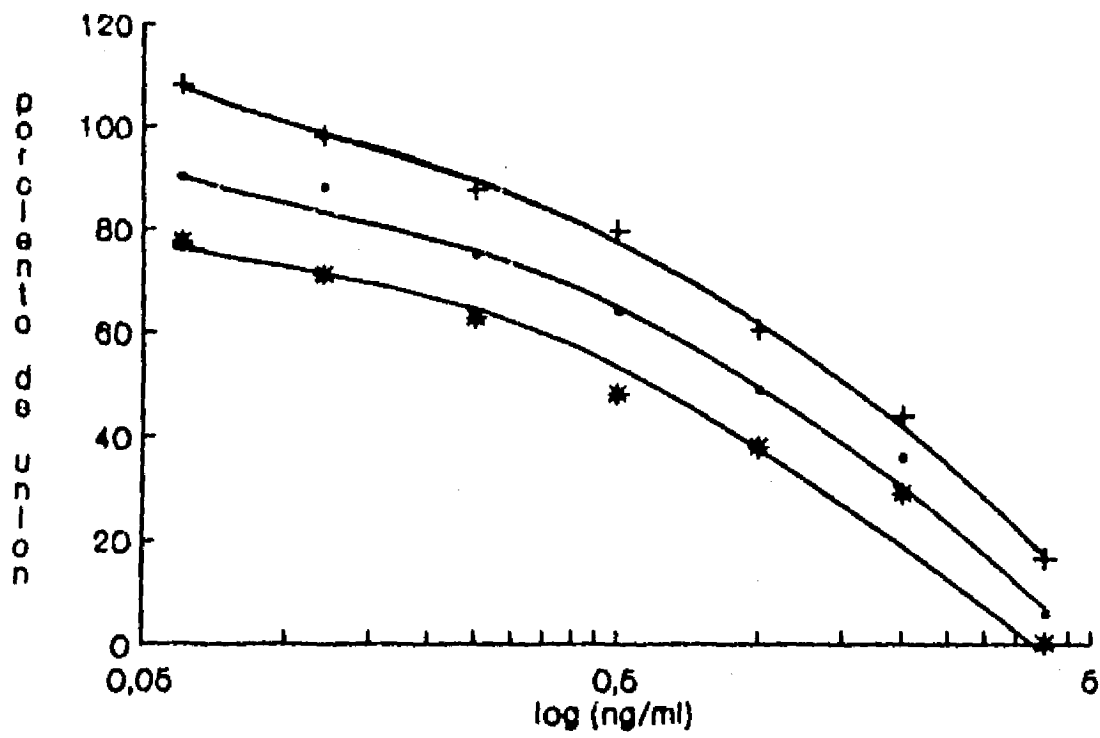


FIGURA 14. Curva estándar del EIA y su envoltura de error media ± 1 d.e. utilizado para calcular la sensibilidad del ensayo.

4.5.3.3 Cálculo de la Precisión.

La Precisión del EIA se calculó a partir de dos muestras sanguíneas. Se estimaron las concentraciones cuatro veces en un solo ensayo para determinar la variación intraensayo y se analizaron las estimaciones de cuatro ensayos para determinar la variación interensayos. Los valores se muestran a continuación en los cuadros 20 y 21. El coeficiente de variación intraensayo varió entre el 22.95 y el 27.73 %, y el coeficiente de variación interensayo varió entre el 18.7 y el 35.9 % a diferentes concentraciones de progesterona.

CUADRO 20
VARIACION INTRAENSAYO DEL EIA QUE UTILIZA EL
ANTICUERPO CRSXB7.

muestra	concentración (ng/ml)	media	d.e.	C.V.
2/148	2.87	2.44	0.58	22.95%
	2.8			
	2.7			
	1.6			
5/148	0.68	0.66	0.18	27.73%
	0.9			
	0.61			
	0.46			

CUADRO 21
 VARIACION INTERENSAYO DEL EIA QUE UTILIZA EL
 ANTICUERPO CRSX67.

Muestra	ensayo	concentración (ng/ml)	media	d.e.	C.V
2/148	1	2.35	2.66	0.5	18.67%
	2	2.25			
	3	2.7			
	4	3.35			
5/148	1	1.0	0.72	0.26	35.9%
	2	0.46			
	3	0.54			
	4	0.88			

4.5.3.4 Relación de valores de progesterona estimados con el EIA diseñado y un estuche comercial.

Se relacionó mediante el modelo de regresión lineal la concentración de progesterona en veinte muestras de suero sanguíneo, medida por un estuche comercial validado con la del presente informe. El coeficiente de correlación fue de 0.95 ($P < 0.05$). La curva se muestra en la figura 15. Los estimadores del modelo de regresión son :

$$Y = 0.14 + 0.97 X.$$

El coeficiente de correlación es 0.91

El coeficiente de determinación (R^2) es 0.95

Y es la concentración de progesterona estimada con EIA

X es la concentración estimada con un estuche comercial.

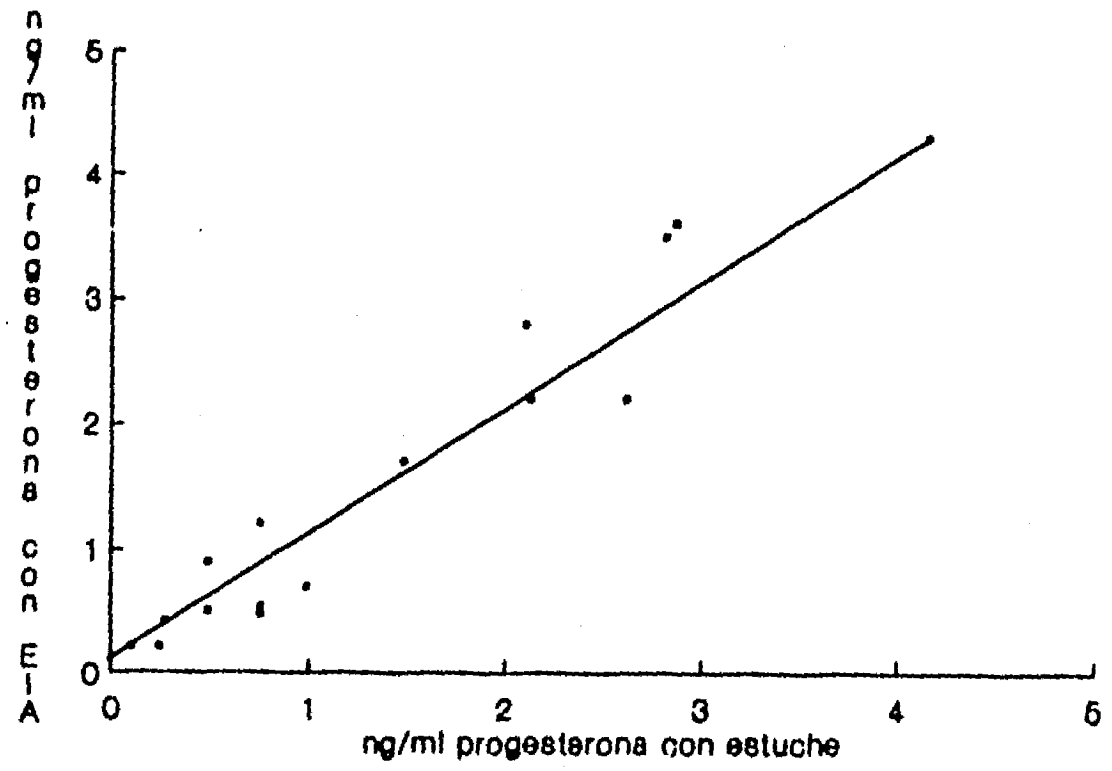


FIGURA 15. Relación de niveles de progesterona entre el EIA diseñado con el anticuerpo CR3X87 y un estuche comercial.

4.5.4 Rendimiento del anticuerpo CRSX87 utilizado para el EIA.

Volumen total del anticuerpo 40 ml.

Dilución de trabajo del anticuerpo en el EIA es de 1:2000

Volumen total del anticuerpo diluido 1:15000 es de 79 900 ml, que es aproximadamente 80 litros.

4.6 RESULTADO DE LA INMUNIZACIÓN DE GALLINAS.

4.6.1 Titulación del suero de gallinas.

La aparición de anticuerpos en suero sanguíneo de las gallinas fue relativamente rápido, la respuesta inmune se observa en la figura 16.

Se utilizaron los huevos de las gallinas 3, 4 y 5 para extraer los anticuerpos y caracterizarlos. Se mezcló el extracto de los huevos de estas tres gallinas. Este extracto se llama ahora Ig Y.

4.7 CARACTERIZACIÓN DEL ANTICUERPO DE LA YEMA DE HUEVO.

4.7.1 Análisis electroforético en PAGE.

El análisis electroforético en PAGE de la corrida con extracto Ig Y indicó la presencia de los mismos contaminantes encontrados en la yema completa, pero en menor proporción, observar figura 17.

4.7.2 Medición de proteínas del extracto.

Después de extraer los anticuerpos de la yema de huevo, la medición de proteínas del mismo extracto en solución a través

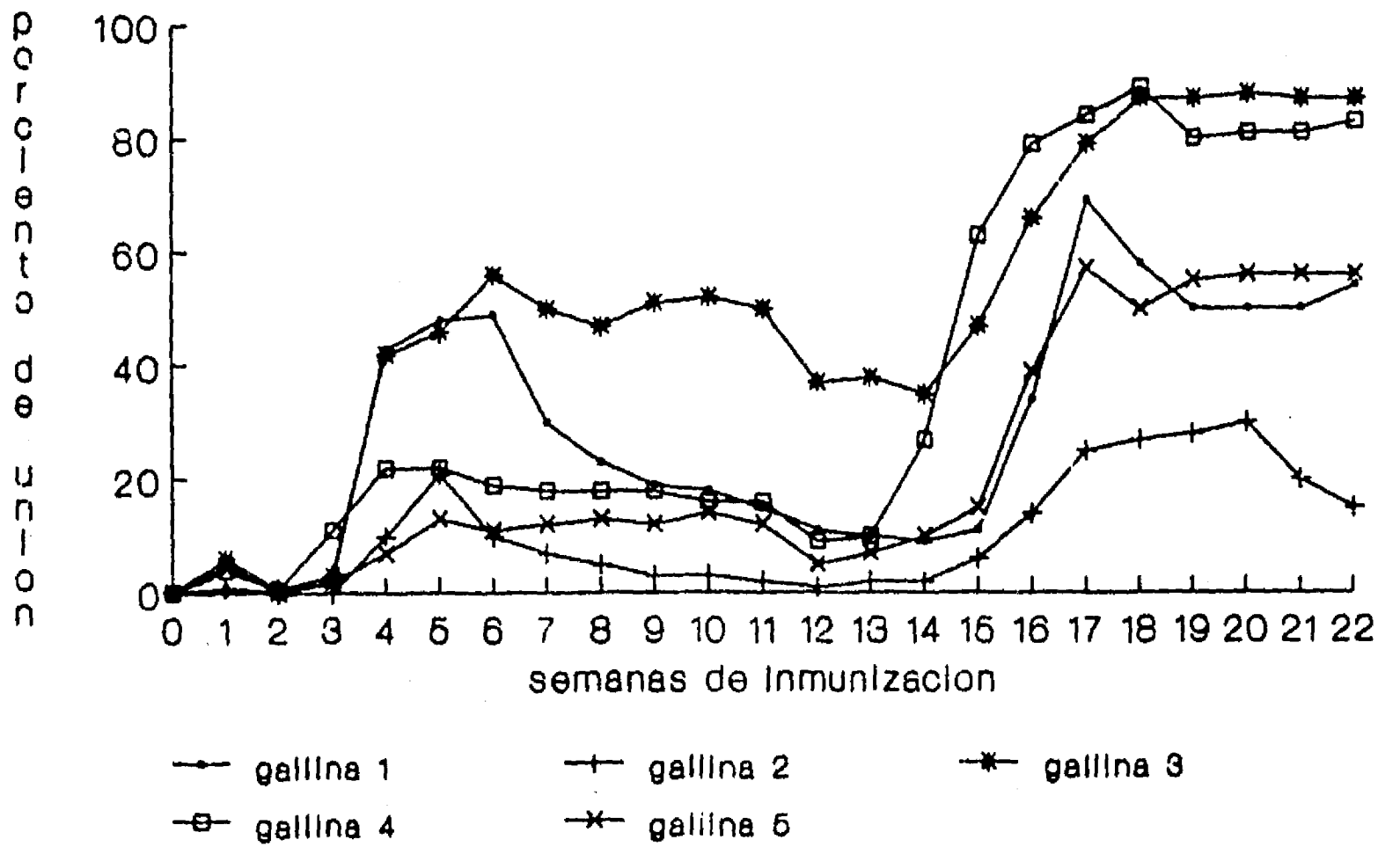


FIGURA 16. Resultado de la inmunización contra progesterona conjugada con albúmina sérica bovina realizado en cinco gallinas.

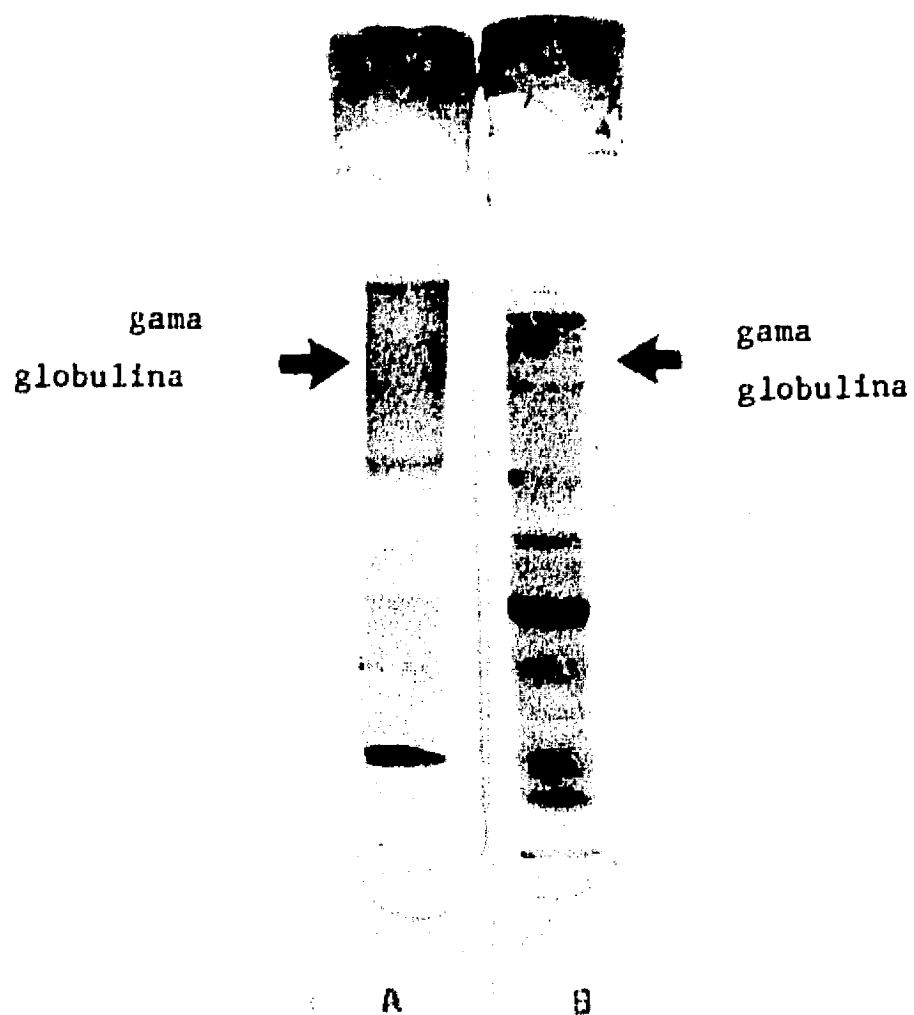


FIGURA 17. Fotografía de la electroforesis en gel de poliacrilamida del extracto de la yema de huevo (Ig Y), la imagen A corresponde a la corrida electroforética del anticuerpo Ig Y y B a la yema de huevo completa.

de la absorción a 280 nm fue de 7.06 mg/ml.

4.8 ESTABLECIMIENTO DEL RIA.

4.8.1 Resultado de la titulación del anticuerpo frente a diferentes cantidades de progesterona radiactiva.

Los resultados de la inmunorreactividad del anticuerpo Ig Y resuspendido en PBSG 0.1 M pH 7.3 se muestran en el cuadro 22.

CUADRO 22

RESULTADO DEL DESPLAZAMIENTO DEL EO POR UN ESTANDAR EMPLEANDO DOS NIVELES DE MASA RADIATIVA Y DIFERENTES DILUCIONES DE IgY

Dilución del anticuerpo	masa radiactiva	cpm EO	cpm E	%E/EO	Dif
1:400	2500	1328	1166	88	12
	4500	1980	1881	95	5
1:700	2500	1150	1190	104	---
	4500	2025	1701	84	18
1:1000	2500	1000	800	80	20
	4500	2070	1656	80	20
1:2000	2500	900	774	86	14
	4500	1575	1244	79	21
1:4000	2500	750	755	---	---
	4500	1305	1265	97	3

CPM EO SON LAS CUENTAS POR MINUTO DE LA UNION MAXIMA

CPM E SON LAS CUENTAS POR MINUTO EN PRESENCIA DEL ESTANDAR

%E/EO ES EL PORCIENTO DE UNION DE ESTANDAR CON RESPECTO A LA UNION MAXIMA.

DIF ES LA DIFERENCIA DEL PORCIENTO DE UNION DEL ESTANDAR CON RESPECTO A LA UNION MAXIMA.

De acuerdo con los resultados, se observa que conforme aumenta la dilución disminuye el porcentaje de unión máxima pero también existe mayor desplazamiento entre la unión

máxima y el estándar en la combinación correspondiente a la dilución del anticuerpo 1/2000 y masa de trazador de 4500 cpm.

4.8.2 Desplazamiento de la curva estándar.

Después de afinar la dilución del anticuerpo alrededor de 1:2000, se decidió utilizar la combinación de dilución del anticuerpo 1:2500 y masa de trazador de aproximadamente 4500 cuentas por minuto (cpm).

El desplazamiento de la curva estándar muestra comportamiento lineal por transformación logit-log, tal como se muestra en la figura 18. Los estimadores de la curva son:

$$Y = 0.52 - 0.94 X$$

El coeficiente de correlación es -0.95

El coeficiente de determinación (R^2) es 0.9

Y es el logit del porcentaje de unión, X es el logaritmo de la dosis.

4.8.3 Cálculo de la Constante de Afinidad del anticuerpo I_0

Para la determinación de la constante de afinidad se elaboró la gráfica de Scatchard en la cual se calculó la afinidad promedio entre las diferentes poblaciones de anticuerpos contra progesterona, los resultados se muestran en la fig 19.

$$K = \frac{y}{x} = \frac{1.24}{2.25} = 0.55 \times 10^8 \text{ l/mol} = 5.5 \times 10^8 \text{ l/mol}$$

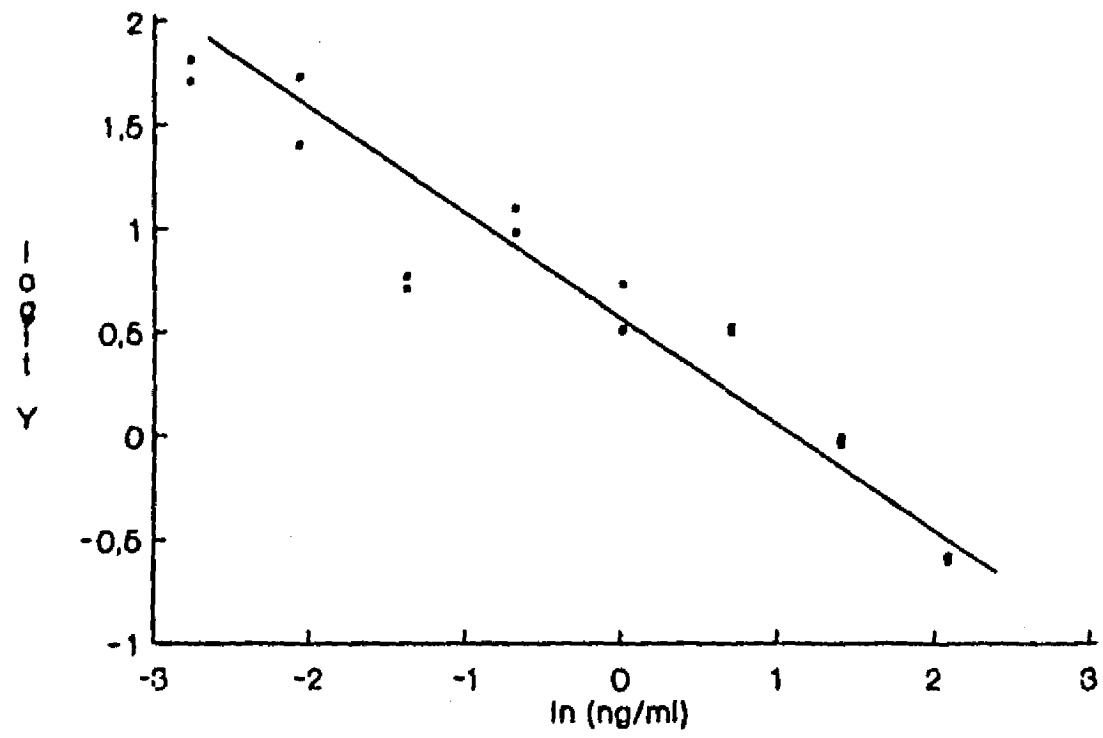


FIGURA 18. Curva estándar del RIA que utiliza el anticuerpo Ig Y.

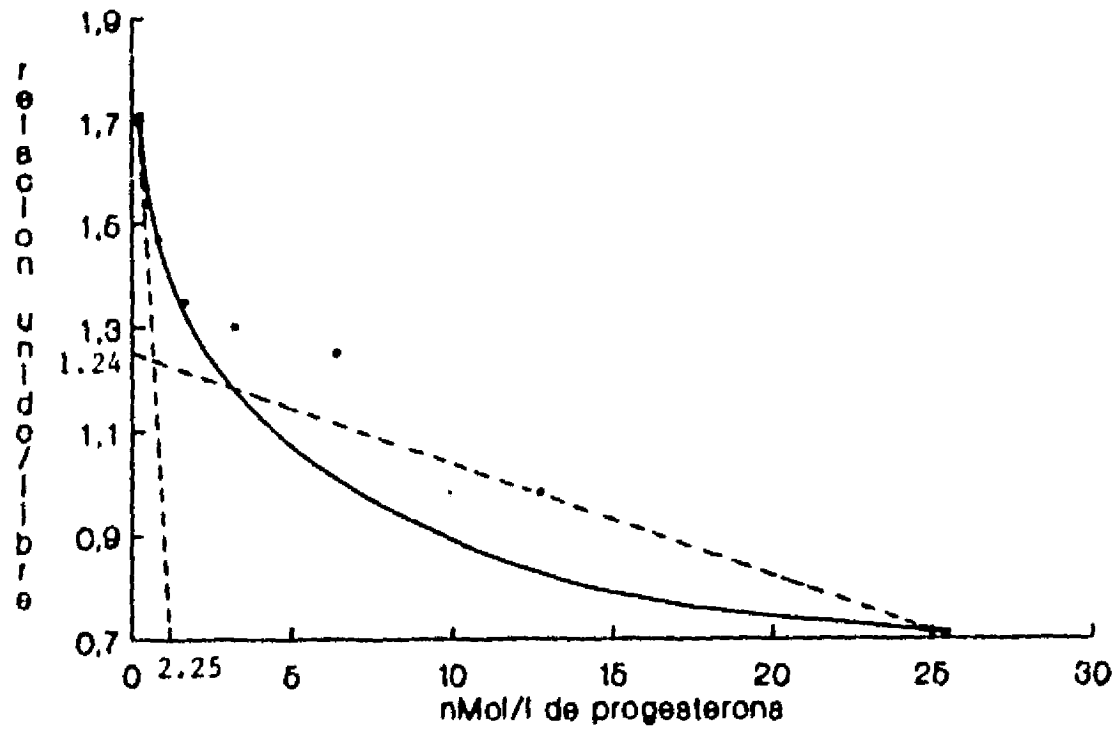


FIGURA 19. Gráfica de Scatchard que utiliza el anticuerpo IgY.

4.9 VALIDACIÓN DEL RIA QUE UTILIZA EL ANTICUERPO Ig Y.

4.9.1 Medición de la Especificidad.

La especificidad fué determinada calculando los porcentajes de reacción cruzada de los siguientes compuestos: 20 α -hidroxiprogesterona, cortisol, 11-desoxicorticosterona, 17 α -hidroxiprogesterona y 11 desoxicortisol, empleando un RIA con progesterona 1,2,6,7- H³. Los resultados se muestran en la figura 20 y cuadro 23.

Estos valores de reacción cruzada indican que ninguno de los metabolitos probados es capaz de unirse con el anticuerpo cuando se emplean dosis fisiológicas, es decir en las muestras normales de suero o plasma el anticuerpo antiprogesterona (Ig Y) enlazará principalmente a la progesterona.

CUADRO 23

PORCENTAJES DE REACCION CRUZADA UTILIZANDO EL ANTICUERPO Ig Y

<u>Compuesto</u>	<u>% de Reacción Cruzada.</u>
Progesterona	100
17 α hidroxiprogesterona	0.83
20 α hidroxiprogesterona	0.65
Cortisol	menor que 0.01
11 desoxicortisol	7.0
11 desoxicorticosterona	6.0

Los resultados de la prueba de paralelismo utilizando al anticuerpo Ig Y con un suero control muestran que existe desplazamiento paralelo entre la curva estandar y las diluciones del suero control, los resultados se muestran en

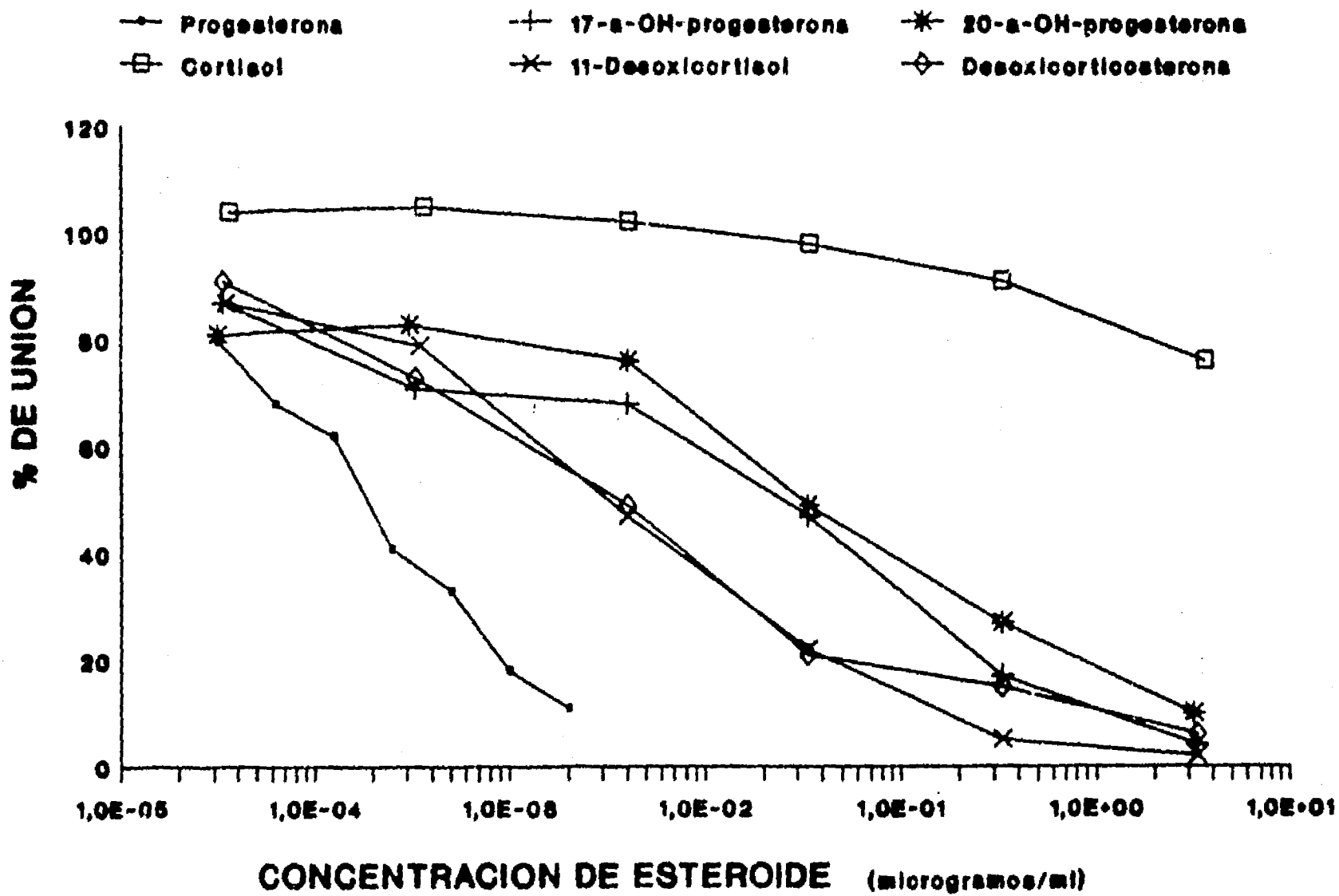


FIGURA 20. Desplazamiento de progesterona radiactiva por otros esteroides en el RIA que utiliza el anticuerpo Ig Y.

la figura 21.

4.9.2 Sensibilidad.

Se determinó la sensibilidad de la curva estandar a partir de cinco curvas estandar realizado por duplicado, las uniones máximas y mínimas resultan de aumentar y sustraer una desviación estándar a los valores medios de unión, la sensibilidad asignada al RIA diseñada con el anticuerpo Ig Y con intervalo de confianza del 95% es de 0.27 ng/ml de progesterona equivalente a 27 pg/pozo, ver figura 22.

4.9.3. Precisión.

Los coeficientes de variabilidad correspondientes al RIA elaborado con el anticuerpo Ig Y se muestran en los cuadros 24 y 25.

CUADRO 24

DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE VARIACION INTRAENSAYO DEL RIA QUE UTILIZA EL ANTICUERPO Ig Y.

suero control	Variabilidad Intraensayo			
	concentraciones	media	d. e.	C. V
CCA	4.06 ng/ml	4.49	0.88	19.6%
	4.89 ng/ml			
	3.5 ng/ml			
	5.5 ng/ml			

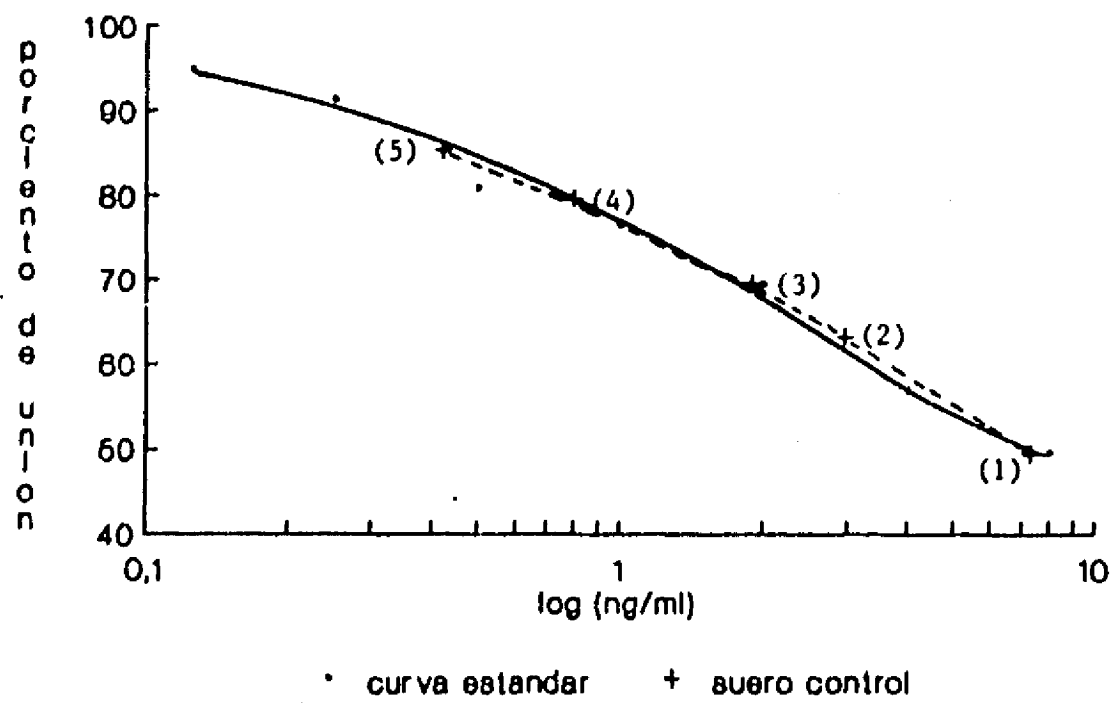


FIGURA 21. Prueba de Paralelismo que se realizó con un suero control diluido 1:1 (1), 1:2 (2), 1:4 (3), 1:8 (4) y 1:16 (5) en el RIA que utiliza el anticuerpo Ig Y.

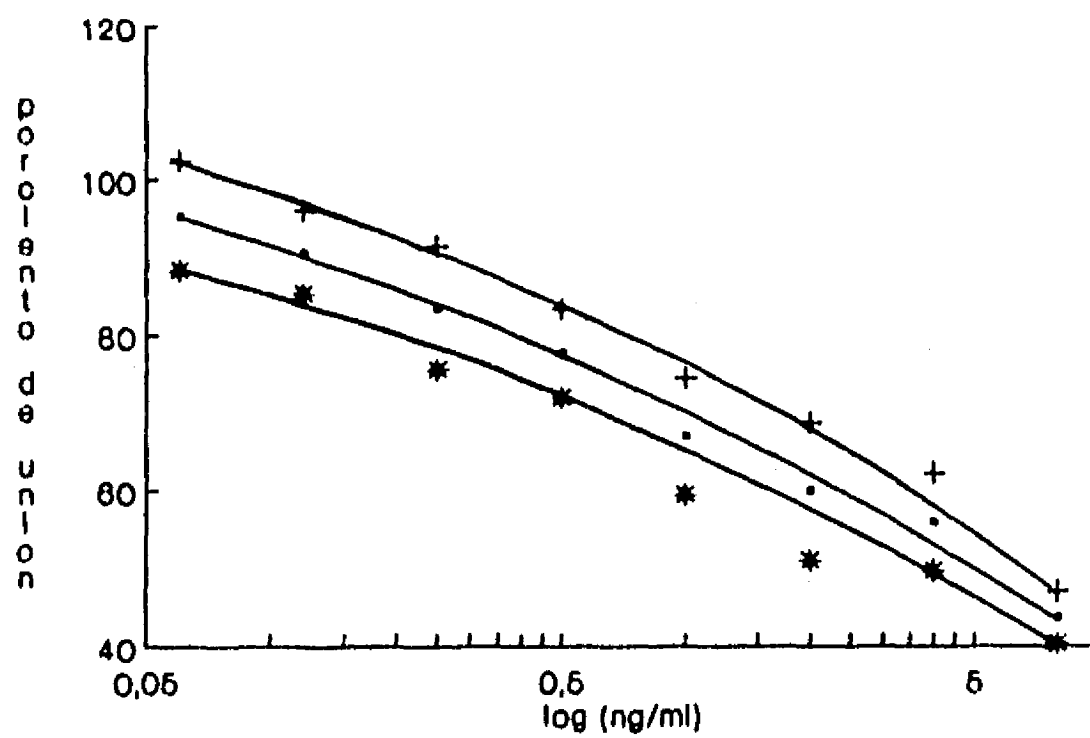


FIGURA 22. Curva estándar del RIA con su envoltura de error media ± 1 d.e. que utiliza el anticuerpo Ig Y para determinar la sensibilidad del ensayo.

CUADRO 25
 DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE VARIACION INTERENSAYO
 DEL RIA QUE UTILIZA EL ANTICUERPO Ig Y

suero control	ensayo	concentracion	media	d.e.	C.V
CCA	1	3.91 ng/ml			
	2	3.80 ng/ml			
	3	5.85 ng/ml			
	4	4.55 ng/ml	4.48	0.99	22.2%

4.9.4 Relación de niveles de progesterona estimados con el RIA diseñado y un estuche comercial.

La cuantificación de trece muestras de plasma sanguíneo mostraron relacionan lineal, mediante mínimos cuadrados. Los resultados y el modelo obtenido se muestran en la figura 23.

Los estimadores del modelo son: $Y = -0.59 + 1.18 X$

El coeficiente de correlación es 0.94

El coeficiente de determinación (R^2) es 0.88

Y es la cantidad de progesterona estimada con el RIA diseñado

X es la cantidad estimada con un estuche comercial.

4.9.5 Rendimiento del anticuerpo Ig Y para utilizarse en RIA.

Volumen total del anticuerpo resuspendido en PBS 0.1 M es de 600 ml.

Dilución de trabajo del anticuerpo en el RIA es de 1:2500.

El volumen total del anticuerpo diluido 1:2500 es de 1500 000 ml, que corresponde a 1 500 litros.

La relación de rendimiento para RIA de anticuerpo de yema de huevo/anticuerpo de conejo es de 2.5

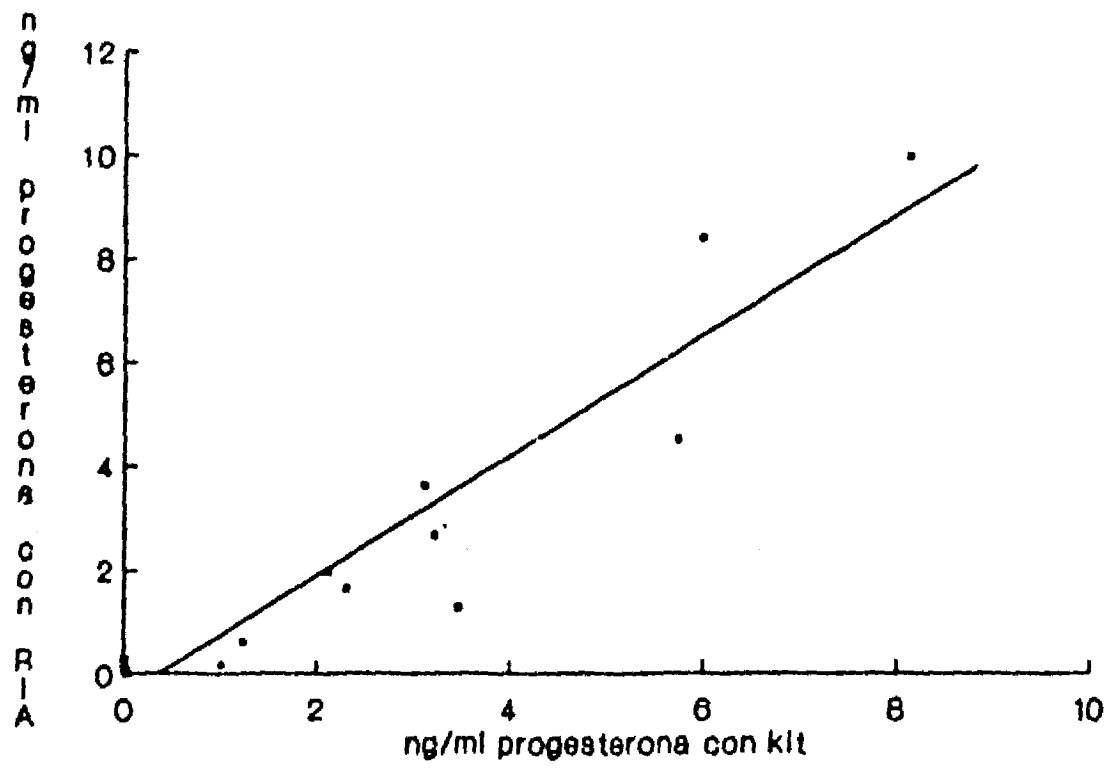


FIGURA 23. Relación de valores estimados de progesterona en plasma sanguíneo obtenidos con el RIA diseñado con el anticuerpo Ig Y con respecto a un estuche comercial.

Como el volumen utilizado para cada tubo en el ensayo es de 0.1 ml. entonces la cantidad de tubos que produciría es de 15 000 000.

4.10 RESULTADO DE LA INMUNORREACTIVIDAD DEL ANTICUERPO Ig Y ADSORBIDO AL FONDO DE LOS POZOS DE LAS PLACAS DE EIA.

La densidad óptica obtenida al utilizar diversas concentraciones de anticuerpo Ig Y para cubrir las placas de microtitulación y diferentes diluciones del conjugado se muestra en el cuadro 26.

CUADRO 26

INMUNORREACTIVIDAD DE ANTICUERPO Ig Y ADHERIDO AL FONDO DE LOS POZOS DE LA PLACA DE MICROTITULACION.

dilución del anticuerpo	dilución del conjugado	densidad óptica
1/500	1/5000	0.12
	1/10000	0.1
	1/20000	0.11
	1/40000	0.07
1/1000	1/5000	0.13
	1/10000	0.1
	1/20000	0.15
	1/40000	0.09
1/2000	1/5000	0.18
	1/10000	0.18
	1/20000	0.09
	1/40000	0.13
1/4000	1/5000	0.15
	1/10000	0.15
	1/20000	0.13
	1/40000	0.13

Se puede observar que en ningún caso se logró una densidad óptica adecuada, indicando que la adhesión del Ig Y a las placas de microtitulación no ocurrió en forma adecuada. Al probar el efecto de añadir un estándar conteniendo 1.0 ng de progesterona por mililitro no se encontró que éste provocara un desplazamiento, los resultados se muestran en el cuadro 27.

CUADRO 27
DESPLAZAMIENTO DEL EO POR UN ESTÁNDAR UTILIZANDO
EL ANTICUERPO Ig Y

dilución del Anticuerpo	dilución del Conjugado	D.O. de EO	D.O. del estándar	%E/EO
1/2000	1/10000	0.008	0.008	0.0
	1/20000	0.003	0.003	0.0
1/4000	1/10000	0.0	0.0	0.0

D.O. DENSIDAD OPTICA

Por esta razón se decidió que el anticuerpo Ig Y no es adecuado para ser utilizado en Enzimoimmunoensayo.

5. DISCUSION

5.1 RESPUESTA INMUNE DE LOS ANIMALES.

5.1.1 De los cabritos y conejos.

Tanto uno de los conejos (CB) como los dos cabritos presentaron tolerancia a la inmunización con el conjugado progesterona:BSA. Entre las causas de tolerancia es posible descartar en este caso la exposición prenatal o neonatal, ya que el conjugado Progesterona:BSA no ocurre naturalmente en los animales. Es poco probable que la alimentación inadecuada, haya influido en la baja respuesta ya que los animales estaban recibiendo alimentos balanceados específicamente para cada especie. Asimismo, la posibilidad de que la administración de sustancias inmunosupresoras haya afectado es nula porque no recibieron tratamiento alguno durante el proceso de inmunización. La dosis administrada a los cabritos fue la normalmente indicada (Bosu *et al.*, 1978), por lo que también se descarta el efecto de excesiva dosis. Por otro lado, la tolerancia inmunológica podría deberse ya sea a que la vía de administración o que el calendario de inmunización no fueron los óptimos para provocar la respuesta inmune en estos animales, a pesar de que sí fueron capaces de inducirla en el conejo CR y en todas las gallinas, donde varió tanto la vía como la dosis del inmunógeno.

El hecho de que la tolerancia se haya presentado en unos animales pero no en otros, así como la intensidad de la respuesta, puede indicar que en algunos individuos se produjo interacción de Linfocitos T supresores sobre los linfocitos B

productores de anticuerpos, situación que se presenta en varios casos de inmunización natural o artificial (Tizard, 1989). Este es de hecho un proceso natural de autorregulación de la respuesta inmune, principalmente cuando se tratan de conservar niveles fisiológicos de anticuerpos al final de la estimulación inmunogénica, o cuando se deben identificar como propios los antígenos de las células componentes del organismo (Alberts *et al.*, 1983).

Es pertinente mencionar que en el caso de los cabritos, la presencia de granulomas en el cuello durante el proceso de inmunización, permite suponer que hubo formación de inmunoglobulinas contra el conjugado (Morilla y Bautista, 1986; Ryan y Majno, 1977). De ser así, dichas inmunoglobulinas no fueron producidas por clonas celulares de elevada afinidad, ya que se ha informado que el título de los antisueros está directamente relacionado con la Afinidad de los anticuerpos producidos (Naegele and Drahovsky, 1980).

Se ha informado que la utilización de borregos para la producción de anticuerpos contra progesterona ha sido satisfactorio (French y Spennetta, 1981; Rosenberg *et al.*, 1987). Bosu *et al.*, 1976 indicó en su informe que la respuesta inmune registrada ocurrió alrededor de los seis meses de inmunización y los títulos alcanzados no fueron notoriamente elevados, ya que se informa en el mismo trabajo que se utilizó la dilución de 1:1500 para establecer el RIA de progesterona, lo que indica que realmente la fuente obtenida en ese trabajo no fue de elevado rendimiento, principalmente

porque los animales fueron sacrificados por presentar abscesos generalizados y severos signos de enfermedad. En el presente trabajo no se realizó un seguimiento a largo plazo de los cabritos, por lo que no se puede descartar que podrían eventualmente haber producido títulos utilizables de anticuerpos.

Las dosis administradas a los conejos fueron las usuales (100 microgramos por animal), lo cual no puede provocar tolerancia por dosis excedente de inmunógeno, ya que se han recomendado dosis desde 15 microgramos por kilogramo de peso hasta 1 mg por animal (Abraham y Garza, 1977; Parker, 1976; Munro and Stabenfeldt, 1984), las cuales son adecuadas para inducir respuesta inmune, ya sea administradas por vía intradérmica, subcutánea, intramuscular o intraganglionar (Naegle and Drahovsky, 1980; Lauzon *et al.*, 1980; Thorneycroft and Stone, 1972). Además, en el presente informe se utilizaron adyuvantes con los conjugados para aumentar la respuesta inmune, por lo cual se prolonga la exposición del inmunógeno a los linfocitos productores de anticuerpos (Vanselow, 1987).

En el presente trabajo se eligió a los adyuvantes de Freund porque se ha informado que son los que provocan títulos más elevados durante la inmunización (Cox *et al.*, 1984; Bomford, 1980; Thomson *et al.*, 1969)

Es también importante mencionar que cuando se pretende producir suero hiperinmune para medición hormonal se requiere que este presente elevada afinidad hacia el antígeno; para

conseguir esto se deben utilizar dosis bajas del inmunógeno para que solo las clonas de linfocitos con receptores de enlace estable con los epitopos desencadenen la proliferación de linfocitos de memoria y los productores de anticuerpo, de tal manera que se alcancen elevados títulos con bajas cantidades del inmunógeno (Parker, 1976). Este tipo de inmunización lleva consigo el riesgo de producir tolerancia inmunológica. Sin embargo, aquellos animales cuyo sistema inmune logre estimular la interacción de linfocitos T colaboradores con linfocitos B que posean receptores de alta afinidad hacia el determinante antigénico desarrollarán suero hiperinmune útil (Abraham y Garza, 1977; Parker, 1976). Es por esta razón que en el presente trabajo se eligieron dosis bajas dentro del rango usual durante el proceso de inmunización en los conejos, cabritos y gallinas.

La respuesta inmune que mostró el conejo CR a la inmunización contra progesterona conjugada fue igual a la registrada por otros autores (Naegle and Drahovsky, 1990; Dawson *et al.*, 1978), el antisuero obtenido presentó las características apropiadas para ser utilizado para el RIA y EIA de progesterona.

5.1.2 De las gallinas.

El comportamiento inmunológico de las gallinas fue más uniforme que el de las otras especies probadas, ya que mostraron niveles de anticuerpos relativamente elevados desde la respuesta primaria comparada con los conejos y cabritos.

En especial las gallinas 1, 3 y 4 conservaron títulos elevados semanas después del último refuerzo, lo cual indica que los linfocitos sensibilizados hacia el antígeno continuaron tardíamente produciendo anticuerpos hacia los haptenos. Esto ha sido mencionado por otros autores para el caso de los inmunógenos peptídicos y proteicos (Polson et al., 1980a; Polson et al., 1980b; Spearow and Trost, 1987; Jensenius et al., 1981).

Es probable que la relativa lejanía filogenética que presentan las aves de los mamíferos facilite la rápida y efectiva producción de anticuerpos contra moléculas proteicas pertenecientes a los componentes bioquímicos de éstos últimos (Benedict and Yamaga, 1976) y por lo tanto a los haptenos conjugados a éstos.

Se ha registrado que existen divergencias estructurales y funcionales entre los sistemas inmunocompetentes de los mamíferos y los de las aves (Leslie and Clem, 1969), en especial con respecto a la producción de isotipos de anticuerpos. Los anticuerpos que corresponderían a las Ig G de los mamíferos son distintas en las aves en lo que se refiere al peso molecular y los fragmentos resultantes por el tratamiento con pepsina (Kubo et al., 1973). En las aves estas inmunoglobulinas tienen la capacidad de formar complejos anticuerpo:antígeno insolubles con soluciones altamente salinas, situación que no sucede con los complejos constituidos por gama globulinas de mamíferos, las cuales normalmente precipitan con soluciones salinas fisiológicas

(Kubo et al., 1973). Esto indica que el comportamiento inmunoquímico de estas gama globulinas es distinto.

Por tal razón a la fracción de anticuerpos de gallina semejantes a las Ig G de mamíferos se las ha denominado Ig Y (Leslie and Clem, 1969). Este tipo de isoanticuerpos está presente en las gallinas, codornices y el faisán (Kubo et al., 1973), y es la principal población de anticuerpos que se producen durante la respuesta inmune secundaria, no siendo así en la primaria, en la que se producen principalmente macroglobulinas del tipo Ig M, tal como sucede en los mamíferos (Márquez, 1988). Además se ha informado que la producción de anticuerpos en las gallinas puede ser provocada por la inoculación de dosis relativamente elevadas del inmunógeno (Benedict and Yamaga, 1976) ya que la inducción de tolerancia inmunológica es tardía y se necesitan dosis que sobrepasan 5g por kilogramo de peso corporal (Mueller and Wolfe, 1961).

Es bastante conocido que el transporte de gama globulinas a través de la placenta en los mamíferos se realiza por medio de transporte activo y pinocitosis (Boyd and Hamilton, 1970) proceso mediante el cual el neonato recibe la dotación de anticuerpos que le permiten resistir durante los primeros días de vida el efecto nocivo de gérmenes presentes en el ambiente extrauterino (Jensenius et al., 1981). Se ha postulado que existe el mismo mecanismo de transferencia de gama globulinas de las células epiteliales ováricas hacia la yema del huevo en las gallinas (Patterson et al., 1962; Sooter

et al., 1954) proceso que tiene la misma función que en los mamíferos (Malkinson, 1965). De esta manera se concentran gran cantidad de Ig Y en la yema del huevo, puesto que este tipo de gama globulinas son las que atraviesan las membranas epiteliales ováricas (Malkinson, 1965).

Se ha informado que la cantidad de Ig Y en la yema es igual o superior a la encontrada en el suero materno (Malkinson, 1965; Johnstone and Thorpe, 1987). Los títulos elevados de gama globulinas normalmente aparecen en la yema del huevo una semana después de haber inmunizado a la gallina (Patterson et al., 1962) indicando que la transferencia de estas proteínas es bastante rápida, lo que solo puede ser explicado por la presencia de transporte activo y endocitosis a través del epitelio ovárico como anteriormente se mencionó.

5.2 PURIFICACIÓN DE LOS ANTICUERPO.

5.2.1 Purificación de gama globulinas del suero de conejo.

La extracción de las gama globulinas del antisuero del conejo CR fue eficiente porque solo se observó una banda de proteínas en el gel, ubicada en la región de menor movilidad electroforética, correspondiente a las gama globulinas (Tizard, 1989).

De esta manera se obtuvo del conejo anticuerpos útiles contra progesterona con sólo el tratamiento de extracción, sin ninguna purificación adicional. El procedimiento empleado, utilizando precipitación con sulfato de amonio, es económico comparado con el Polietilenglicol 6000, el Rivanol

o las cromatografías de afinidad utilizando la Proteína A (Garvey et al., 1977; Leslie, 1980; Dobson, 1983). Este tratamiento se requirió para implementar el EIA de progesterona, ya que antes de inmovilizar el anticuerpo al fondo de los pozos es necesario eliminar otras proteínas presentes en el suero sanguíneo que ocupan espacio en la superficie del pozo y disminuyen la cantidad de anticuerpos antiprogesterona fijados a la misma superficie (Munro and Stabenfeldt, 1984). Esta purificación en cambio no es necesaria al utilizar fase líquida como sucedió al diseñar el RIA, ya que la cinética de la formación de la fracción unida es diferente (James, 1980; Malvano y Roller, 1980).

5.2.2 Purificación de gama globulinas de la yema de huevo.

En el caso de las Ig Y, los gels de electroforesis de acrilamida donde se procesaron las proteínas extraídas de la yema del huevo mostraron varias bandas de proteínas con menor intensidad de coloración, que coinciden con la composición de la yema completa. Esto indica que la extracción de inmunoglobulinas de la yema fue defectuosa, ya que estuvo contaminada con otros componentes que pueden ocupar espacio en la superficie de una fase sólida, situación que se reflejó al implementar el EIA en fase sólida para medir progesterona con el anticuerpo Ig Y, ya que no fue posible utilizar el anticuerpo Ig Y para medir progesterona en EIA a pesar de que el anticuerpo tuvo suficiente afinidad para ser utilizado en RIA de fase líquida. Esto también explica parcialmente el

elevado rendimiento en proteína del extracto de la yema, comparado al anticuerpo CR5X87 del conejo.

El gel de la electroforesis de la Ig Y muestra varias bandas proteicas no identificadas, con diferentes motilidades que probablemente corresponden a fosfovitas, lipovitelinas y livetinas (Powrie, 1977). Martin *et al.*, 1957 demostraron la presencia de α , β y γ livetinas en la yema del huevo, ubicadas en tres bandas al revelar el electroforetograma en papel. Sin embargo, cuando se realizó la electroforesis en gel se encontraron 15 bandas correspondientes a las α , β livetinas, y solo una banda -la de menor motilidad- que correspondía a la γ livetina. Además de las dos bandas que corresponden a la fosvitina; el mismo autor cita la presencia de nueve picos eluidos cuando se realiza la cromatografía por intercambio iónico con DEAE-celulosa en columna de la misma porción de livetinas.

Williams, en 1962 demostró que las α livetinas son similares a la albúmina sérica, la β livetina es similar a la α_2 glicoproteína y la γ livetina a la γ globulina. Es posible que el extracto crudo de Ig Y obtenido en el presente informe necesite ser purificado a través de cromatografía de intercambio iónico con DEAE-celulosa o DEAE-Sephadex G-50 que es un procedimiento indicado para la purificación de gama globulinas de ave o mamíferos (Goel *et al.*, 1980; Chhabra and Goel, 1980). De esta manera probablemente pueda ser utilizado el anticuerpo de la yema del huevo para medir progesterona mediante EIA en fase sólida. No se recomienda, en cambio la

purificación con proteína A porque se ha informado que las Ig Y no son precipitados por esta proteína (Jensenius *et al.*, 1981; Kurstak, 1985).

5.3 DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD DEL ANTICUERPO CR5X87.

La estimación de la Constante de Afinidad o Avidéz demostró que los anticuerpos del extracto de inmunoglobulinas CR5X87 tienen la suficiente energía de enlace para conservar los complejos formados durante la reacción inmunológica (Feldman and Rodbard, 1971; Parker, 1976); estos resultados son coincidentes con la hipótesis de que la afinidad está relacionada con el título del anticuerpo (Naegele and Drahovsky, 1980), es decir que a mayor título del antisuero mayor es el valor de afinidad de los anticuerpos, porque solo aquellas inmunoglobulinas de mayor energía de enlace serán capaces de formar complejos cuando es alta la dilución de la población de anticuerpos presentes en el sistema.

El cálculo de la afinidad se realizó únicamente para el RIA diseñado con el anticuerpo CR5X87 para uniformar los efectos que pueden producir el tipo de trazador, el proceso de separación de fases, el efecto del solvente de extracción o la presencia de algunas moléculas lipofílicas, las cuales pueden hacer variar notoriamente la constante de afinidad (Malvano and Rolleri, 1980).

El valor de afinidad del anticuerpo CR5X87 es el adecuado para ser utilizado en los inmunoensayos para progesterona. Por ejemplo si se midiera la proporción de anticuerpo unido

que podría haber cuando se añadieran alícuotas iguales del anticuerpo con afinidad de 1.06×10^8 M y una concentración muy baja de antígeno, alrededor de 1×10^{-9} M (1 ng/ml), entonces se tendría aproximadamente el 94 % de anticuerpo unido, situación que sería contraria si el anticuerpo tuviera una constante de afinidad de 1×10^7 M, donde solo el 1 % del anticuerpo estaría unido (Nisonoff, 1984).

5.4 DISEÑO DEL RIA CON ANTICUERPO DEL CONEJO.

Los resultados de los ensayos para determinar la dilución del antisuero en combinación con la masa radiactiva necesarios para obtener el mayor desplazamiento del trazador por el antígeno frío indicaron que es conveniente utilizar la dilución del anticuerpo 1:15000 y masa radiactiva de 3500 cpm, con ésta combinación se obtiene el 35 % de unión máxima, y notorio desplazamiento del porcentaje de unión del trazador por la hormona fría, estas son las condiciones en las que los anticuerpos de mayor afinidad son capaces de enlazar hormona fría en bajas cantidades (Zarco, 1987) por lo tanto el anticuerpo CR5X87 purificado contiene poblaciones de anticuerpos de elevada afinidad y especificidad hacia la progesterona que lo vuelven útil para realizar un adecuado RIA.

La curva estándar de progesterona con el anticuerpo del conejo mostró que se ajusta estadísticamente a un modelo de regresión lineal, lo que permite la cuantificación de hormona en extractos lipídicos de muestras plasmáticas. Los valores

de pendiente y de intercepto son los sugeridos por la literatura para poder utilizar la curva con fines de medición hormonal (Feldman and Rodbard, 1971).

5.5 VALIDACIÓN DEL RIA QUE UTILIZA EL ANTICUERPO CRSX87.

5.5.1 Especificidad.

El anticuerpo obtenido del conejo fue muy específico para la progesterona comparado con otros esteroides fisiológicamente importantes como los glucocorticoides y metabolitos de éstos. Los porcentajes de reacción cruzada que exhibió este anticuerpo están dentro de los valores registrados en la literatura como necesarios para emplearse en el análisis (Wiel and Koops, 1986; Abraham and Garza, 1977; Arnstadt and Cleere, 1981; Sauer et al., 1982; Nakao, 1980; Wang et al., 1984; Arnstadt, 1983; Breuel et al., 1988; Munro and Stabenfeldt, 1984; Sauer et al., 1986; Mac Donnell et al., 1988; Marcus and Hackett, 1988; Franchimont et al., 1986; Chang and Estergreen, 1983). En todo caso si hubiera una hiperfunción adrenal, la cantidad de cortisol adrenal que debería alcanzarse para provocar una sobreestimación de los niveles de progesterona tendría que ser 100 veces mayor al valor de los niveles fisiológicos normales (Grant and Reastall, 1983). Este antisuero también registró un desplazamiento paralelo de muestras de suero diluidas con cantidades conocidas de progesterona, lo que confirma la alta especificidad hacia la progesterona.

La especificidad no es dependiente del tipo de

inmunoanálisis, puesto que los anticuerpos están dirigidos contra un grupo restringido de epítomos, entonces cuando se registran los valores de reacción cruzada determinados por RIA, EIA o algún otro inmunoanálisis realizado con el mismo anticuerpo, éstos muestran pequeña diferencia (Sauer *et al.*, 1982; Arnstadt and Cleere, 1981; Nakao, 1980; Sauer *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1984).

5.5.2 Sensibilidad.

La sensibilidad obtenida en el RIA para progesterona con el anticuerpo CR5X87 en el presente trabajo es útil para medir progesterona plasmática en niveles fisiológicos normales y se encuentra bastante cercano a la mayoría de los inmunoensayos registrados en la literatura (Runnebaum, 1980; King *et al.*, 1985; Hillbrand and Elsaesser, 1983), aunque existen algunos cuya sensibilidad es mucho mayor, desde 1.2 picogramos por mililitro (Meisterling and Dailey, 1987), 30 picogramos por mililitro (Arnstadt and Cleere, 1981), 50 picogramos por mililitro (Nakao, 1980), hasta valores relativamente elevados como 400 picogramos por mililitro (Breuel *et al.*, 1988).

Como anteriormente se indicó, la afinidad determina la sensibilidad del ensayo, pero lo mismo influye la precisión del ensayo, sin embargo es posible que la dilución del anticuerpo CR5X87 utilizada todavía sea baja como para poder medir cantidades pequeñas del analito, puesto que a mayor dilución los anticuerpos con más afinidad son los que enlazan antígeno (Griswold and Nelson, 1984), esto se relaciona

directamente con el valor de unión máxima (B0) que está cercana al 50%.

5.5.3 Precisión.

En cuanto a la Precisión de los RIA con los anticuerpos del conejo, en la literatura se han registrado coeficientes de variación intraensayo de alrededor de 3.8 al 19.1%, siendo menor para los sueros control con valores arriba de 5.0 ng/ml de progesterona y los más altos para valores iguales o cercanos a 1.0 ng/ml (Staigmiller et al., 1979; Capparelli et al., 1987; Tho et al., 1983; Franchimont et al., 1986; Thorneycroft and Stone, 1972; Meisterling and Dailey, 1987). En cuanto a la variabilidad entre análisis la literatura también registra un amplio rango que va desde 4.2 hasta 23.0, dependiendo de la cantidad de progesterona presente en las muestras control (Grage et al., 1988; Reimers et al., 1983; Abraham, 1974; Hale et al., 1980/1981; Mac Donnell et al., 1988; Breuel et al., 1988). Los coeficientes de variación intraensayo (14.7) e interensayo (22.7) obtenidos en el radioinmunoanálisis desarrollado con el anticuerpo CR5X87 son relativamente altos. Sin embargo existen informes donde los inmunoensayos utilizados para medir progesterona presentan variabilidades intraensayos del 33% y coeficientes de variabilidad interanálisis de alrededor de 32% aun cuando se utilizan sueros control con 5.99 y 6.53 ng/ml de progesterona (Pilo et al., 1986).

5.5.4 Relación de las concentraciones de progesterona en muestras plasmáticas medidas con el RIA diseñado y con un estuche comercial.

Se encontró una elevada correlación entre las concentraciones estimadas con el RIA diseñado en el presente trabajo y el de un estuche comercial, por lo tanto se puede indicar que no existe variación notable en los valores obtenidos por ambos métodos. No se utilizó la Regresión Lineal ni el Análisis de Varianza para probar la hipótesis de recta de identidad, para intercepto con 0 y pendiente de 1.00, porque existe en la literatura la indicación de que ensayos bastante exactos y precisos no muestran regresión de identidad con otros métodos analíticos sumamente sensibles, exactos y precisos como es la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) o con otros Inmunoensayos igualmente precisos y exactos (Sauer *et al.*, 1986; Wiel and Koops, 1986).

5.6 VALIDACIÓN DEL EIA CON EL ANTICUERPO CR5X87.

5.6.1 Diseño del EIA.

El anticuerpo del conejo no se puede diluir mucho para utilizarse para establecer el EIA en fase sólida. Esto indica el efecto competitivo de otras inmunoglobulinas y proteínas para unirse no covalentemente a la superficie interna de los pozos, produciendo una interferencia estérica (Parker, 1978; Lövborg, 1984) y por lo tanto la necesidad de aumentar la cantidad de moléculas de anticuerpo en el volumen para realizar la adsorción en el fondo del pozo. Esto trae por

consecuencia que se utilice mayor cantidad de inmunoglobulinas para saturar los sitios de unión en la superficie del plástico del fondo de los pozos. Sin embargo esto también ocasiona que disminuya la sensibilidad del EIA, por lo tanto sería necesario retirar los anticuerpos anti-albúmina sérica bovina (anti-BSA) que compiten con los anti-progesterona por los sitios de adhesión (Munro and Stabenfeldt, 1984).

5.6.2 Sensibilidad.

La sensibilidad determinada en el presente informe es equivalente a 27 pg/pozo, bastante cercana a los valores medios registrados por la literatura, que se distribuyen desde 0.25 hasta 30 pg/pozo (Nakao, 1980; Arnstadt and Cleere, 1981; Sauer et al., 1982; Wiel and Koops, 1982; Munro and Stabenfeldt, 1984; Cleere et al., 1985; Sauer et al., 1986; Wiel and Koops, 1986; Wiel et al., 1982; Arnstadt, 1983; Ellis et al., 1986; Nakao et al., 1983; Marcus and Hackett, 1986).

5.6.3 Precisión.

La variabilidad mostrada por el EIA establecida con los anticuerpos del conejo, indican que los coeficientes de variación intra e interensayo, estuvieron por arriba de lo óptimo recomendado. Tal situación no se debe al porcentaje de unión no específica, ya que ésta se ha conservado en valores bajos, sino que tal vez se deba a la deficiente capacidad que tienen los anticuerpos dializados para adherirse al plástico.

Esto puede ser en parte debido a que las uniones que se realizan entre las inmunoglobulinas y el material de polipropileno o polivinilo son de tipo hidrofílico, fuerzas de Van der Waals o puentes de Hidrógeno (Løvborg, 1984; Parker, 1976), las cuales pueden involucrar sitios inactivos como las fracciones Fab de la Ig G, por lo tanto disminuyen su capacidad de enlazar al antígeno específico (Chard, 1978). Además, se ha encontrado que existe variabilidad en la capacidad de unión de anticuerpos entre diferentes pozos de la misma placa, y con mayor razón entre diferentes placas (Løvborg, 1984). Otra posibilidad pudiera ser la deficiente adsorción de los anticuerpos al fondo del pozo, debido a la competencia ejercida por otras proteínas que también son capaces de enlazarse a la superficie plástica, en este caso la presencia de anticuerpos anti-BSA (Parker, 1976). A pesar de esto, la variabilidad no es tan alta como la reportada en la literatura para otros EIA que se utilizan satisfactoriamente (Pilo *et al.*, 1986), tampoco ejerce un efecto notoriamente detrimental sobre la sensibilidad del EIA, ya que aunque ésta es altamente dependiente de la Precisión (Abraham, 1974), la alta afinidad del anticuerpo hacia la progesterona permite conservar dentro de ciertos límites la variabilidad del análisis (Abraham, 1974) por permitir conservar establemente los complejos formados (Malvano y Rollieri, 1980).

Se puede indicar entonces que el EIA diseñado en este trabajo es útil para determinar en forma semicuantitativa la

presencia de progesterona en una muestra, pero no es útil para obtener valores exactos.

5.6.4 Relación de las concentraciones de progesterona en muestras plasmáticas medidas con el EIA diseñado y con un estuche comercial.

Las concentraciones de progesterona determinadas por un estuche comercial de RIA y el EIA presentado en este informe estuvieron bastante correlacionadas, siendo esta correlación significativa, la recta de regresión también es significativa. Los estimadores de la regresión son coincidentes con la mayoría de los registrados, cuyos valores de intercepto varían desde -2.58 hasta 2.4 (Wiel and Koops, 1986; Wang *et al.*, 1984; Nakao *et al.*, 1983) y pendiente desde 0.85 hasta 1.3 (Wiel and Koops, 1986; Wimpy *et al.*, 1986; Sauer *et al.*, 1986; Munro and Stabenfeldt, 1984).

Esta variedad de niveles que se circunscriben a cierto intervalo indican que existe alguna tendencia a conservar alrededor de 0 el intercepto al origen y de 1.00 el valor de la pendiente, dentro del cual existen una variedad infinita de rectas de regresión, de tal manera que cuando se pretende correlacionar las concentraciones del analito en las mismas muestras entre diferentes métodos analíticos se puede esperar que los estimadores del modelo de regresión sean cercanos a los valores arriba indicados.

6.7 DISEÑO DEL RIA CON EL ANTICUERPO Ig Y.

Todos los tratamientos muestran que la unión no específica son uniformes, siendo de 5.9 para aquellos que tienen como masa radiactiva 2500 cpm y alrededor de 3.4 a los que se les añadió 4500 cpm, esto tal vez sea resultado del error de conteo mas que a la cantidad real de trazador adherido a las paredes del tubo o por efecto del solvente o alguno otro. Esto se basa en el hecho de que a menor cantidad de cuentas aumenta el error de conteo el cual sigue una distribución de Poisson (Chard, 1978; Kobayashi and Maudsley, 1974), por lo tanto a 2500 cpm el error se estima alrededor de 2 % y el cálculo de la unión no específica es relativamente más alto comparado con una mayor cantidad de cuentas totales añadidas, aunque permaneciera igual la radiación presente en la fracción unida correspondiente al tubo de Unión no específica; para el caso de la combinación con 4500 cpm, el error por conteo sería de 1.4 % y por lo tanto el porcentaje de unión en la fracción unida del tubo correspondiente a la unión no específica sería menor. Por la razón anterior se escogió a la combinación de dilución de anticuerpo de 1:2500 con masa radiactiva de 4500 cpm, además es importante hacer notar que bajo estas condiciones el valor de unión máxima es de 35% y existe el mayor desplazamiento del trazador por el estándar.

La curva estándar mostró que es bajo el porcentaje de unión inespecífica y que la dosis estimada al 50% de unión es alrededor de 4.0 ng de progesterona en un mililitro de

plasma. La recta de regresión ajustada para la curva muestra una alta correlación que es significativa.

5.8 DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD DEL ANTICUERPO Ig Y.

Los anticuerpos del extracto de la yema de huevo muestran una constante de afinidad hacia la progesterona suficientemente estable, el valor es el indicado para la mayoría de los anticuerpos anti-esteroide (Nisonoff, 1984; Chard, 1978; Parker, 1976; Naegele and Drahovsky, 1980). Sin embargo muestran menor capacidad de enlazar a elevadas diluciones cantidades pequeñas de analito cuando se compara con el anticuerpo del conejo CR5X87, esto se demuestra no nada más en el título empleado para medir progesterona por RIA, sino también en el valor de la constante de afinidad que muestra el anticuerpo Ig Y, el cual es casi la mitad comparado al del conejo. Esto viene a ser producto de la mayor heterogeneidad de poblaciones de anticuerpos presentes en el extracto y a la presencia de contaminantes que de alguna manera afectan la capacidad que tienen los anticuerpos para conservar estable la formación de complejos, principalmente cuando el tipo de sustancias involucradas contienen grupos hidrofóbicos que interactúan con los sitios de unión del anticuerpo y los determinantes antigénicos en la que fuerzas hidrofóbicas dirigen gran parte del formación del complejo (Nisonoff, 1984; Parker, 1976), esto también se apoya en el hallazgo de varias bandas de proteínas que

muestra el análisis electroforético y la mayor cantidad de proteínas presentes en el extracto Ig Y a través de la absorbancia a 280 nm.

5.9 VALIDACIÓN DEL RIA QUE UTILIZA EL ANTICUERPO DE LA YENA DE HUEVO Ig Y.

5.9.1 Especificidad.

El anticuerpo presenta bajo nivel de reacción cruzada con varios metabolitos esteroides, incluyendo a los corticosteroides, los cuales son los más abundantes del plasma o suero sanguíneo (Parker, 1976), incluso presentan menor reacción cruzada que antisueros obtenidos de conejos por Marcus and Hackett (1986), Sauer *et al* (1982), Wiel and Koops (1986), Thorneycroft and Stone (1972), Sauer *et al*, (1986), Wang *et al* (1984).

La prueba de paralelismo realizada con un suero control muestra también un desplazamiento paralelo a la curva estándar, confirmando de esta manera que el extracto de anticuerpos es específico hacia la progesterona.

5.9.2 Sensibilidad.

La mayoría de la literatura registra valores de sensibilidad que varían de 0.0012 ng/ml (Meisterling and Dailey, 1987) hasta 0.8 ng/ml (Boland *et al*, 1985), generalmente los estuches comerciales presentan valores de sensibilidad hasta de 0.1 ng/ml (Grage, *et al*, 1986). Esto indica que el RIA diseñado con el anticuerpo Ig Y se

encuentra dentro del rango esperado de sensibilidad y el cual permite detectar valores fisiológicos pequeños.

A pesar de haber contaminación en el extracto de la yema de huevo y de haber utilizado un procesos de separación de fases por medio de adsorción inespecífica que es altamente dependiente de tiempo y de la concentración de carbón activado, y que por esta razón puede alterar significativamente la precisión de los resultados (Runnebaum, 1980), el RIA se puede considerar suficientemente sensible.

5.9.3 Precisión.

Como anteriormente se ha mencionado, el valor más frecuente para el coeficiente de variación interensayo es de alrededor de 12% para cantidades medias y altas de progesterona y el coeficiente de variación intraensayo de 9 % para las mismas dosis (Tho et al., 1983; Hillbrand and Elsaesser, 1983; Magness and Ford, 1983; Mac Donnell et al., 1988). Sin embargo últimamente se están diseñando RIA sin extracción, llamados ensayos directos, que aumentan la precisión ya que evitan el efecto del blanco por el uso de solventes orgánicos como el éter de petróleo o etílico y también la inestabilidad del complejo formado en la reacción cuando se utilizan partículas que adhieren inespecíficamente al antígeno y trazador de la fracción libre (Runnebaum, 1980; Chard, 1978), tales como el carbón activado recubierto con dextran (Chard, 1978; Moss et al., 1978).

En el presente trabajo se comprobó que el carbón activado sin ser recubierto con dextrán puede ser empleado satisfactoriamente cuando se utiliza el mismo lote y bajo las mismas condiciones de acidez, molaridad, temperatura y tiempos de incubación y exposición al carbón activado. Sin embargo el amortiguador necesita proteínas para contribuir a disminuir la unión inespecífica tal como lo menciona Abraham (1974), en este caso como los anticuerpos utilizados contenían poblaciones de inmunoglobulinas contra BSA, entonces no se puede utilizar a albúmina sérica bovina en la solución amortiguadora, por lo cual es necesario utilizar otra proteína inmunológicamente inerte en este caso la Gelatina, la cual dió resultados satisfactorios.

5.6.4 Relación de las concentraciones de progesterona en muestras plasmáticas medidas con el RIA diseñado y con un estuche comercial.

Existe una relación estadísticamente significativa entre los valores determinados por un RIA comercial con el del presente trabajo, el coeficiente de correlación también es significativo, indicando de esta manera que los valores son relativamente coincidentes aunque no se obtenga una recta de identidad, cuyo argumento ya ha sido previamente discutido en las secciones 5.5.4 y 5.6.4 (Sauer *et al.*, 1986; Wiel and Koops, 1986).

5.10 DISEÑO DEL EIA CON EL ANTICUERPO Ig Y.

Los resultados de la inmunorreactividad que mostró el anticuerpo fueron muy deficientes tanto en la unión máxima como en el desplazamiento del trazador por un estándar de cantidad media de la curva dosis-respuesta, no se realizaron pruebas adicionales para mejorar la inmunorreactividad del anticuerpo adherido a las placas de microtitulación. Las posibles causas de la mala respuesta pueden ser múltiples, desde el efecto de los contaminantes ya previamente discutido en la sección 5.2.1, hasta la incapacidad de lograr realizar una adhesión eficiente de las gama globulinas al fondo del pozo a causa de no probar otras condiciones de acidéz, fuerza iónica o ambas para provocar la aparición de grupos polares en la molécula de Ig Y que permitan establecer múltiples enlaces débiles entre ésta y la superficie de plástico (Løvborg, 1984). Otra alternativa posible para mejorar la adhesión podría ser probar los tiempos de incubación, pues solo se probó uno, que era el mismo al cual el anticuerpo del conejo respondió, a las 18 horas a 4 °C. Sin embargo, prolongar los tiempos de incubación puede traer como consecuencia que las proteínas se desnaturalicen debido al pH alcalino del amortiguador utilizado para adherir el anticuerpo a la placa (Løvborg, 1984). Así como también establecer definitivamente enlaces covalentes entre las Ig Y y el pozo a través de la reacción con el cianógeno (Chard, 1978) o probando un doble anticuerpo en fase sólida (Voller et al., 1980).

5.11 COMPARACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LOS ANTICUERPOS CORRESPONDIENTES A CADA FUENTE.

En cuanto a la disponibilidad de los anticuerpos obtenidos se puede decir que el rendimiento del anticuerpo extraído de la yema del huevo es 2.5 veces que el del conejo, siendo este rasgo importante en la selección de un ligador, conjuntamente con su afinidad y su especificidad (Chard, 1978), puesto que en un solo ciclo de postura se obtuvieron más de 80 huevos en las gallinas inmunizadas, de las cuales se perdieron aproximadamente 30 por contaminación y descomposición del contenido de la yema durante su almacenamiento, que fué de aproximadamente 4 meses. De otra forma el rendimiento total hubiera sido mayor al registrado en este trabajo. Los huevos seleccionados fueron de la etapa de mayor respuesta inmunogénica, por otra parte se conservó viva una de las gallinas con mejor respuesta, la cual mantuvo niveles relativamente altos meses después de la última inmunización para que en el siguiente ciclo de postura se pudiera obtener más huevos y repetir la extracción, lo cual indica que el potencial de producción de anticuerpos contra progesterona es todavía mayor comparado al del conejo inmunizado en este trabajo; esto también se refleja claramente en la proporción de rendimiento de ambos anticuerpos utilizados para el RIA, en el que el valor de 2.5 indica que el rendimiento total del anticuerpo del conejo es menos de la mitad que el de la gallina.

6. CONCLUSION.

Cuando se utilizan los anticuerpos de conejo las características del RIA y EIA de progesterona son cualitativamente iguales. Ambos sistemas son eficientes para medir progesterona en plasma sanguíneo dentro de los rangos fisiológicos, sin embargo no se puede decir lo mismo cuando se utiliza como anticuerpo a la yema del huevo, debido a que este anticuerpo puede ser utilizado en el RIA pero necesita ser purificado para poderse utilizar en el EIA con el mismo propósito.

Los anticuerpos extraídos del suero sanguíneo del conejo presentan características de afinidad y especificidad cualitativamente iguales a los obtenidos de la yema del huevo, por lo cual se puede montar el RIA para medir progesterona plasmática de ganado bovino de igual calidad tanto con los anticuerpos del conejo como del extracto de la yema del huevo.

Se puede indicar que la inducción de anticuerpos contra progesterona y el rendimiento de éstos para establecer el RIA para medir progesterona es mejor en la gallina cuando éstos se extraen de la yema del huevo que con respecto a la obtenida del suero de conejos o cabritos.

7. LITERATURA CITADA

- ABRAHAM G.E. Radioimmunoassay of steroids in biological materials. Acta Endocrinol. Suppl. 183:1-42 (1974).
- ABRAHAM, E.G. AND GARZA, R. Radioimmunoassay of Steroids. In: Handbook of Radioimmunoassay edited by Guy E. Abraham. ed. Morton K. Schwartz. pp: 591-656, Marcel Dekker, Inc. New York and Basel 1977.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. Molecular Biology of The Cell. Third Edition, pp: 10-425. Garland Publishing Inc., Macmillan Inc. 1983.
- ALLEN, S.E. AND R.H. FOOTE : An Enzyme-Linked Immunoassay of milk progesterone as a Diagnostic aid in embryo transfer programs. Theriogenology 29:893-901 (1988).
- ARNSTADT, K.I. Steroid determination in milk by enzyme immunoassay (EIA). J. Steroid Biochem. 19(1): 423-424 (1983).
- ARNSTADT, K.I. and W.F. CLEERE Enzyme-immunoassay for determination of progesterone in milk from cows. J. Reprod. Fert. 62: 173-180 (1981).
- ARRIGUCCI, A. AND M. SERIO : A Theoretical Approach to Automatic Calculation of Radioimmunoassay Results. In: Radioimmunoassay of Steroid Hormones. Edited by Derek Gupta. 2nd. edition pp:19-26 (Verlag-Chemie, Weinheim. Deerfield Beach, Florida . Basel . 1980).

BACIGALUPO M. A., IUS A., MERONI G., SAITA R., AND C. PARINI. Fluoroimmunoassay of progesterone in plasma by phenanthroimidazole-2-amine labelling. J. Steroid Biochem. 19: 1861-1864 (1983).

BADE, H. and H. STEGEMANN. Rapid Method of Extraction of antibodies from hen egg yolk. J. Immunol. Methods. 72: 421-428 (1984).

BENEDICT, A.A. & K. YAMAGA. Immunoglobulins and antibody production in Avian Species. In: Comparative Immunology. Edited by John J. Marchalonis pp. 333-375. (Blackwell Scientific 1978).

BOLAND, M.P.; FOULKES, J.A.; MAC DONNELL, H.F. AND M.J. SAUER Plasma progesterone concentrations in superovulated heifers determined by enzyme immunoassays and radioimmunoassay. Br. Vet. J. 141:409-415 (1985).

BOMFORD, R.A.: A comparative selectivity of adjuvants for humoral and cell-mediated immunity. 1. Effect on the antibody response to bovine serum albumin and sheep red blood cells of Freund's incomplete and complete adjuvants, alhydrogel, *Corynebacterium parvum*, *Bordetella pertussis*, muramyl dipeptide and saponin. Clin. Exp. Immunol. 39:426-434 (1980).

BOOTH, J.M. : Milk progesterone pregnancy testing in cattle and other species. 9th. International Congress on Animal Reproduction and A.I. vol. II Round Tables pp:109-117. (Editorial Garsi, Madrid España 1980).

BORTH, R. : Statistics of Parallel-Line Assay . In: Methods of Hormone Analysis. H. Brøuer, D. Hamel, H.L. Krüskemper Ed. G. Thieme-Verlag, Stuttgart. pp: 500-513. (J. Wiley & Sons, New York. 1976).

BOSU, W.T.K., EDQVIST, L.E., LINDBERG, P., MARTINSSON, K., JOHANSSON, E.D.B. The effect of various dosages of lynestrenol on the plasma levels of oestrogens and progesterone during the menstrual cycle in the Rhesus monkey. Contraception 13:677-684 (1976).

BOURQUE, J.; SULON, J.; DEMEY-PONSART, E.; SODOYEZ, J.C. AND U. GASPARD : A simple, direct Radioimmunoassay for salivary progesterone determination during the Menstrual Cycle. Clin. Chem. 32:948-951 (1986).

BOYD, J.D. AND W.J. HAMILTON : The Human Placenta. (The Mac Millan Press LTD 1970).

BREVEL, K.F., SPITZER, J.C., GIMENEZ, T., HENRICKS, D.M., and S.L. GRAY Effect of holding time and temperature of bovine whole blood on concentration of progesterone, estradiol-17 β and estrone in plasma and serum samples. Theriogenology 30(3):613-627 (1988).

CANTLEY, T.C., GARVERICK, H.A., BIERSCHWAL, C.J., MARTIN, C.E. and R.S. YOUNGQUIST Hormonal responses of dairy cows with ovarian cysts to GnRH. J. Anim. Sci. 41: 1666-1670 (1975).

CAPPARELLI R., IANNELLI D., AND A. BORDI Use of monoclonal antibodies for radioimmunoassay of water buffalo milk progesterone. J. Dairy Res. 54:471-477 (1987).

CERIOTTI, G., PALEARI, C.D., TESTA, G.F., BRUNORO, N., TATTO, I. : Determination of anticonvulsant drugs by homogeneous enzyme immunoassay: analytical and clinical experience. In: Immunoenzymatic assay techniques. Development Clinical Biochemistry vol. 1. Edited by R. Malvano pp: 237-258. (Martinus Nijhoff Publishers-The Hague/Boston/London. 1980 For The Commission of the European Communities).

CHANG, C.F. AND V.L. ESTERGREEN : Development of a direct enzyme immunoassay of milk progesterone and its application to pregnancy diagnosis in cows. Steroids 41:173-195 (1983).

CHHABRA, P.C. AND M.C. GOEL : Normal profile of immunoglobulins in sera and tracheal washings of chickens. Res. Vet. Sci. 29:148-152 (1980).

CHARD, T. An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques. In: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. vol. 8 Part II, pp: 291-534. (Edited by T.S. Work and E. Work North Holland Publ. Co. 1978).

CLEERE, W.F.; GOSLING, J.P.; MORRIS, M.C.; CHARLETON, M.F.; MOLONEY, B.T.; FOTTRELL, P.F.; SREENAN, J.M.: A high-performance, high throughput enzyme immunoassay for the analysis of progesterone in plasma or milk. Irish Vet. J. 39:6-14 (1985).

COOPER, T.G. The Tools of Biochemistry. (Edited by John Wiley and Sons. New York 1977).

COX, J.C., LIEFMAN, C.E., PREMIER, R.R., CHANDLER, H.M., HERRINGTON, R.W., MIDDLETON, H.D. AND J.G.R. HURRELL. Immune response and reaction to various dose regimens for raising hyperimmune antisera in sheep. Vet. Immun. Immunopath. 7: 65-72 (1984).

DAWSON, E.C., DENISSEN E.H.C. and B. K. VAN WEEMEN A simple and efficient method for raising steroid antibodies in rabbits. Steroids 31: 357-366 (1978).

DIAZ, T., MANZO, M., TROCÓNIZ, J., BENACCHIO, N. and O. VERDE. Plasma progesterone levels during the estrous cycle of Holstein and Brahman cows, Carora type and cross-bred heifers. Theriogenology 28: 419-431 (1986).

DORSON, H. A Radioimmunoassay Laboratory Handbook: with special reference to hormones of reproduction. (Liverpool University Press. 1983).

ELLIS S.T., HEAP R.B., PARIS F., STANLEY C.J., AND A. E. WEBB A rapid enzyme-amplified immunoassay for progesterone in bovine milk using a monoclonal antibody. J. Physiol. London 371: 2P. (1986).

ELMORE, R.G. : Rapid progesterone assays: The latest in kit technology. Vet Med. US. July: 659-662 (1986).

ERLANGER B., BOREK F., BEISER S.M., LIEBERMAN S. Steroid-protein conjugates. 1. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone. J. Biol. Chem. 228: 714-727. (1957).

FELDMAN, H., RODBARD, D. Mathematical Theory of Radioimmunoassay. In: Principles of Competitive Protein-Binding Assays. Ed. W.D. Odell and W.H. Daughadey. pp: 158-203. (J.B. Lippincott Company 1971).

FRANCHIMONT, P., HAZEE-HAGELSTEIN, M.T., CHARLET-RENARD, CH. and J.M. JASPAR. Effect of mouse epidermal growth factor on DNA and protein synthesis, progesterone and inhibin production by bovine granulosa cells in culture. Acta Endocrinol. 111: 122-127 (1986).

FRENCH, L.R. AND B. SPENNETTA: Effects of antibodies to progesterone on reproduction of ewes. Theriogenology 16: 407-418 (1981).

GABRIEL, O.: Analytical Disc Gel Electrophoresis, in Methods in Enzymology. Vol. 22 W.B. Jakoby, Ed. pp:565-577. (Academic Press New York, 1971).

GARVEY, J.S., CREMER, N.E. & SUSSDORF, D.H. Eds. Ammonium sulfate precipitation. In Methods in immunology, edn 3, pp. 218-222. (Massachusetts W.A. Benjamin, Inc. 1977).

GILBERT A.B. Aves de corral En: Reproducción e Inseminación Artificial en animales. Por Hafez E.S.E. Cuarta edición pp:405- 425. (Editorial Interamericana, Mexico 1984).

GOEL, M.C., CHHABRA, P.C., and V.K. SHARMA . Preparation of chicken immunoglobulins and their specific antisera. Indian J. Anim. Sci. 50: 983-988. (1980).

GRAGE, H.; NARAG, R.; DAMODARAN, K.; ANAOKAR, S.; SAVJANI, G. Rapid solid-phase assay for progesterone. Clin. Chem. 32:1153 (1986).

GRANT, J.K., and G.H. REASTALL Clinical Biochemistry of Steroid Hormones pp. 99-101. (Edited by Elsevier. USA. 1983).

GRISWOLD, W.R. and D. P. NELSON A rapid method for the determination of antibody affinity. Immunol. Letters 7: 229-232 (1984).

HALE, D.H., MCCABE, C.T. and D.H. HOLNESS. A method to evaluate various parameters of progesterone production in beef cows, using the levels of progesterone in peripheral blood sampled on specific days of the oestrus cycle. Anim. Reprod Sci 3: 279-288 (1980/1981).

HILLBRAND, F.W. and F. ELSAESSER. Concentrations of progesterone in the backfat of pigs during the oestrus cycle and after ovariectomy. J. Reprod. Fert. 69: 73-80 (1983).

IAEA : Laboratory Training Manual on Radioimmunoassay in Animal Reproduction. Technical Reports Series No. 233. International Atomic Energy Agency, Vienna 1984.

ITURBE R. Características Generales de la Tolerancia Inmunológica. Curso de Actualización "Inmunología Aviar" pp: 13-18. (Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1988).

JAMES, V.H.T. Basic Concepts of Steroid Radioimmunoassay. In Radioimmunoassay of Steroid Hormones. Second Edition pp: 1-8 (by Derek Gupta. Verlag Chemie 1980).

JENSENIUS, J.CHR., ANDERSEN I., HAU, J., MONNA, C and C. KOCH Eggs: conveniently packaged antibodies, methods for purification of yolk Ig G. J. Immunol. Methods 46: 63-68 (1981).

JOHNSTONE, A. AND R. THORPE : Production of antibodies in Immunochemistry in Practice. Second edition pp: 54 (Blackwell Scientific Publications. Great Britain 1987).

KABAT, E. A.: Inmunoquímica Experimental. 2a. edición. (La Prensa Mexicana. México 1984)

KING, G.J., WALTON, J.S. and D.J. BELLISSIMO. Anestrus in pigs: confirmation by a solid-phase RIA for progesterone and subsequent response to treatment. Can. Vet. J. 26: 2-6 (1985).

KOBAYASHI, Y.; MAUDSLEY, D.V.: Biological Applications of Liquid Scintillations Counting (Academic Press, USA 1974).

KOHEN, F.; KIN, J.B.; LINDNER, H.R. AND W.P. COLLINS : Development of a solid-phase chemiluminescence immunoassay for plasma progesterone. Steroids 38:73-88 (1981).

KRATZSCH, J; BIER, H.; LEISTNER, E. AND J. HUBALD : Radioimmunologische Bestimmung des Cortisols im serum oder plasma von Rind, Schwein un Schaf. (Radioimmunological determination of cortisol in serum or plasma of cattle, swine and sheep). Arch. Exp. VetMed. 41:506-515 (1987).

KUBO, R.T., ZIMMERMAN, B. AND H.M. GREY. Phylogeny of Immunoglobulins In: The Antigens v.I. edited by Michael Sela. (Academic Press. USA 1973).

KURSTAK, E. Progress in Enzyme immunoassays: production of reagents, experimental design and interpretation. Bull. W.H.O. 63(4):793-811 (1985).

LAUZON, S. de; CITTANOVA, N.; DESFOSES, B. AND M.F. JAYLE: CR: ng, a New Approach for Quantitative Evaluation of Cross-Reactivity of Steroids with an Antiserum in Radioimmunoassay. In: Radioimmunoassay of Steroid Hormones. (Ed. by Derek Gupta. Second edition, Verlag-Chemie 1980).

LEFKOVITS I., PERNIS B. Immunological Methods. (Academic Press. USA 1979).

LEHNINGER A.L. Bioquímica: Las Bases moleculares de la estructura y función celular. Segunda edición. (Barcelona: Omega 1978).

LESLIE H. Practical Immunology. Second Edition. (Blackwell Scientific Publications Great Britain 1980).

LESLIE, G.E. AND L.W. CLEM : Phylogeny of Immunoglobulin structure and Function. J. Exp. Med. 130:1337-1352 (1969).

LØVBORG, U.: Manual Publicado por A/S NUNC Roskilde pp: 1-43 (Dinamarca, 1984).

MACDONNELL, H. Peripheral plasma progesterone in the ewe: its application to the diagnosis of early pregnancy following oestrus synchronization treatment. Irish Vet. J. (January): 11-15 (1976).

MAC DONNELL, H.F., MULLINS, S., and A.C. GORDON Radioimmunoassay and Enzymeimmunoassay of plasma progesterone as monitors of progesterone sponge treatment in ewes. Theriogenology 30(2): 303-321 (1988).

MAGNESS, R.R. and S.P. FORD. Estrone, Estradiol-17 β and progesterone concentrations in uterine lymph and systemic blood throughout the porcine estrous cycle. J. Anim. Sci. 57: 440-455 (1983).

MALKINSON, M. The transmission of passive immunity to *Escherichia coli* from mother to young in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). Immunology 9: 311-317 (1965).

MALVANO, R. AND E. ROLLERI : Methodological aspects of steroid radioimmunoassay in Radioimmunoassay of Steroid Hormones. (Edited by Derek Gupta Second Edition Verlag-Chemie 1980).

MARCUS, G.J. and A.J. HACKETT. Use of enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of bovine serum and milk progesterone without extraction. J. Dairy Sci. 69: 818-824 (1986).

MARQUEZ, M.A. Inmunogenesis Aviar. En: Inmunologia Aviar. Memorias del Curso de Actualizacion pp. 58-68. (Editado por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 1988).

MARTIN, W.G.; VANDEGAER, J.E. AND W.H. COOK : Fractionation of livetin and the molecular weights of the α - and β -components. Can. J. Biochem. Physiol. 35: 241-250 (1957).

MEISTERLING, E.M. and R.A. DAILEY. Use of concentrations of progesterone and estradiol-17 β in milk in monitoring postpartum ovarian function in dairy cows. J. Dairy Sci. 70: 2154-2161 (1987).

MORILLA G. A., BAUTISTA G. R. Manual de Inmunologia . (Ed. Diana Tecnica. México 1986).

MOSS, A.J.Jr.; DALRYMPLE, G.H.; BOYD, C.M.: Practical Radioimmunoassay. (Ed. The C.V. Mosby Company, Saint Louis, 1976).

MOSTL, E., CHOI, H.S., WURN, W. and E. BAMBERG. Pregnancy diagnosis in mares by estrogen determination in faeces: Radioimmunoassay and enzymatic method. Proc. of the Symp. on the Analysis of Steroids Szeged pp:187-190 Hungary (1984).

MUELLER, A.P. AND H .R. WOLFE : Precipitin production following massive injection of BSA in adult chickens. Int. Arch. Allergy 19: 321-325 (1961).

MUNRO, C., and G. STABENFEDLT Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. J. Endocr. 101: 41-49 (1984).

NAEGELE, W., and M. DRAHOVSKY Production of steroid antisera. in Radioimmunoassay of Steroid Hormones. Second Edition pp: 55-72 (Edited by Derek Gupta. Verlag Chemie. 1980).

NAKAO, T. Practical procedure for enzyme-immunoassay of progesterone in bovine serum. Acta Endocrinol. 93: 223-227. (1980).

NAKAO, T.; SUGIHASHI, A.; SAGA, N.; TSUNODA, N.; KAWATA, K.: An improved enzymeimmunoassay of progesterone applied to bovine-milk. Br. Vet. J. 139:109-118 (1983).

NIESCHLAG E. Editors. Immunization with Hormones in Reproduction Research. In: Proceeding of the International Symposium on Immunization with Hormones in Reproduction Research. North-Holland Publishing Co. 1975.

NISONOFF, A. Introduction to Molecular Immunology. (Sinauer Associates Sunderland M.A. 1984).

PARKER, W.CH. Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds. (Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey, 1976).

PARKER, B.M.J., FOULKES, J.A., JONES, P.C., DEXTER, I., STEPHENS, H. Prediction of calving times from plasma progesterone concentration. Vet. Rec. 23: 88- 89 (1988).

PATTERSON, R., YOUNGNER, J.S., WEIGLE, W.O., and F.J. DIXON. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. J. Immunology 89: 272-278 (1962).

PENNINGTON, J.A., SCHULTZ, L.H., HOFFMAN, W.F. Comparison of pregnancy diagnosis by milk progesterone on day 21 and day 24 postbreeding: field study in dairy cattle. J. Dairy Sci. 68: 2740-2745 (1985).

PERERA, B.M.A.O. Y A.S. ABEYRATNE : El empleo de técnicas nucleares para mejorar la aptitud reproductora del ganado doméstico. Rev. Mund. Zoot. 32:2-8 (1979).

PÍCHOVÁ, D., PÍCHA, J., SEVČÍK, B., NOVOTNÝ, L., MÍKA, J., OLSA, T. Stanovení progesteronu, v mléčném tuku a jeho kolísání v průběhu pohlavního cyklu a po aplikaci Oestrophanu inj. Spofa. (Determination of progesterone in milk fat and its variation during the sexual cycle and after administration of Oestrophan Spofa. Biol. Chem. Vet. (Praha) XX (XXVI) 1: 77-83 (1984).

PILO, A.; ZUCHELLI, G.C.; CHIESA, M.R.; FRANCESCHETTI, F.; ALBERTINI, A.: Improvement in the quality of estradiol, progesterone and testosterone RIAs-evaluation of the between kit and within kit contributes to the overall variability. Clin. Chem. 32:1183 (1986).

POLSON, A.; BARBARA VAN WECHMAR, M.H.V.; VAN REGENMORTEL: Isolation of viral Ig Y antibodies from yolks of immunized hens. Immunol. Commun. 9:475-494 (1980a).

POLSON, A.; BARBARA VAN WECHMAR, M. AND G. FAZAKERLEY : Antibodies to proteins from yolk of immunized hens. Immunol. Commun. 9:495-514 (1980b).

POWRIE, W.D.: Chemistry of Eggs and Egg Products in: Egg Science and Technology pp:65-91. Second edition by William J. Stadelman and Owen J. Cotterill (AVI Publishing Company, Inc. Westport Conn. USA 1977).

PRAKASH B.S., MEYER H.H.D., VAN DE WIEL D.F.M: Estimation of progesterone in bovine skim milk by a sensitive heterologous enzymeimmunoassay (EIA) using a double antibody-technique. J. Endocrinol. 111 (Supp):65 (1986).

PULIDO, R.A.: Establecimiento de la Metodología para el manejo óptimo de muestras de sangre y leche de ganado cebú (*Bos indicus*) destinadas a la determinación de progesterona por medio de Radioinmunoanálisis. Tesis de Maestría en Producción Animal. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. (1989).

RAFF, M. C. T and B lymphocytes and Immune Responses. Nature 242 (March):19-25 (1973).

REIMERS, T. J. ; MC CANN, J. P. ; COWAN, R. G. : Effects of storage times and temperatures on T3, T4, LH, Prolactin, Insulin, Cortisol and Progesterone concentrations in blood samples from cows. J. Anim. Sci. 57:683-691 (1983).

RODGERS, R. C. : Radioimmunoassay Theory for Health Care Professionals. Department of Internal Medicine (University of Utah College of Medicine 1984).

ROSENBERG, M. ; AMIR, D. AND Y. FOLMAN : The effect of active immunization against progesterone on plasma concentrations of total and free progesterone, estradiol-17 β and LH in the cyclic ewe. Theriogenology 28:417-426 (1987).

RUNNEBAUM, B. Quantitative Determination of Progesterone by Radioimmunoassay. In: Radioimmunoassay of Steroid Hormones. Second Edition pp:143-151 (Edited by Derek Gupta. Verlag-Chemie Germany 1980).

RYAN, G. B. AND G. MAJNO : Acute inflammation. Am. J. Pathol. 86:183-276 (1977).

SAUER, M. J., FOULKES, J. A., and P. M. O'NEILL Use of microtitre plate EIA for direct determination of progesterone in whole milk: application of heterologous systems for improved sensitivity. Br. Vet. J. 138: 522-532 (1982).

SAUER, M. J., FOULKES, J. A., WORSFOLD, A. and B. A. MORRIS. Use of progesterone 11-glucuronide-alkaline phosphatase conjugate in a sensitive microtitre-plate enzymeimmunoassay of progesterone in milk and its application to pregnancy testing in dairy cattle. J. Reprod. Fert. 70: 375-391 (1986).

SCHILLE, V.M., LUNDSTROM, K.E. and G.H. STABENFELDT.
Follicular function in the domestic cats as determined by estradiol-17 β concentrations in plasma: relation to estrous behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium. Biol. Reprod. 21: 953-963 (1979).

SOOTER, C.H.; SCHAEFFER, M.; GORRIE, R. AND T.D. COCKBURN :
Transovarian passage of antibodies following naturally acquired encephalitis infection in birds. J. Infect. Dis. 95:165-169 (1954).

SPEAROW, J.L. AND B.A. TROST : Development of a sensitive enzyme linked immunosorbent assay for cattle, sheep, rat and mouse luteinizing hormone. Biol. Reprod. 37:595-605 (1987).

SRIKANDAKUMAR, A.; INGRAHAM, R.H.; ELLSWORTH, M.; ARCHBALD, L.F.; LIAO, A. AND GODKE, R.A.: A comparison of a solid phase, no-extraction radioimmunoassay for progesterone with an extraction assay for monitoring luteal function in the mare, bitch and cow. Theriogenology 28:779-793 (1988).

STAIGMILLER, R.B., SHORT, R.E., BELLOWS, R.A. and J.B. CARR.
Effect of nutrition on response to exogenous FSH in beef cattle. J. Anim. Sci. 48: 1182-1190 (1979).

THO, P.T.; SCHOLER, J.; VAN PHUNG, B.; HARR, R.J.; MC DONOUGH P.G.:
Radioimmunoassay of progesterone in saliva: a simplified technique using ¹²⁵I-radioligand. Fert. Steril. 43: 410-416 (1985).

THOMSON, R.O.; BATTY, I.; THOMSON, A.; KERRY, J.B.; EPPS, H.B.G. AND W.H. FOSTER : The immunogenicity of a multicomponent clostridial oil emulsion vaccine in sheep. Vel. Rec. 85:81-85 (1969).

THORNEYCROFT, I.H., STONE, C.S.: Radioimmunoassay of serum progesterone in women receiving oral contraceptives steroids. Contraception 5(2):129-148 (1972).

TIZARD, I.: *Inmunologia Veterinaria*. Tercera edición. (Editorial Interamericana. Mexico 1989).

TJONDRONEGORO, S., WILLIAMSON, P., SAWYER, G.J., ATKINSON, S. Effects of progesterone intravaginal devices on synchronization of estrus in postpartum dairy cows. J. Dairy Sci. 70: 2162-2167 (1987).

TRIBBLE, R.L., SORENSEN, A.M., WOODWARD, T.L., CONNOR, J.S., BEVERLY, J.R., FLEEGER, J.L. Serum progestins and luteinising hormone levels in non-suckled primiparous heifers. Nature 246 (21/28): 494-495 (1973).

VAITUKAITIS, J.L., ROBBINS, J.B., NIESCHLAG, G.E., ROS, C.T. A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. J. Clin. Endocrinol. Metab. 33:988-991 (1971).

VANSELOW, B.A.: The Application of Adjuvants to Veterinary Medicine. Vet. Bull. 57:881-896 (1987).

VOLLER, A., BIDWELL, D.E. AND A. BARTLETT : Microplate ELISA and its applications. In: *Immunoenzymatic Assay Techniques. Developments Clinical Biochemistry* vol. 1 Edited by R. Malvano. pp:104-115. (Martinus Nijhoff Publishers- The Hague/Boston/London. 1980). The Commission of the European Communities.

WANG, H.X., STOTT, R.A., THORPE, G.H.G, KRICKA, L.J., HOLDER, G., and B.T. RUDD An enhanced chemiluminescence immunoassay for serum progesterone. Steroids 44(4): 3294-3303 (1984).

WARBURG, O. AND CHRISTIAN, W. Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. Biochemische Z. 310: 384-421. (1941).

WECK, A.L. de: Low Molecular Weight Antigens. In: The Antigens vol. II pp:209-225 (Edited by Michael Sela. Academic Press 1973).

WHITEHEAD, T.P.; THORPE, G.H.G.; CARTER, T.J.N.; GROUCUTT, C. AND L.J. KRICKA : Enhanced luminiscence procedure for sensitive determination of peroxidase-labelled conjugates in immunoassay. Nature 305:158-159 (1983).

WIEL Van de, D.; KANONPATANA, M., NGRAMSURIJAROY, CH., KOOPS, W. and S. SINGHAJAN. Enzymeimmunoassay of milk-progesterone: its application to oestrus confirmation and early pregnancy diagnosis in cattle. Vet. Q. 4: 72-78 (1982).

WIEL Van de, D.F.M. AND W. KOOPS Direct measurement of progesterone in milk and plasma by a sensitive and simple enzymeimmunoassay. Br. Vet. J. 138: 454 (1982).

WIEL Van de, D.F.M. and W. KOOPS Development and Validation of an enzyme immunoassay for progesterone in bovine milk blood plasma. Anim. Reprod. Sci. 10: 201-213 (1986).

WILLIAMS, J: Serum proteins and the livetins of hen's egg yolk. Biochem. J. 83:346-355 (1962).

WIMPY, T.H., CHANG, C.F., ESTERGREEN, V.L. and J.K. HILLERS. Milk progesterone enzyme immunoassay: Modifications and a field trial for pregnancy detection in dairy cows. J. Dairy Sci. 69: 1115-1121 (1986).

YALOW, R. AND BERSON, S. Immunoassay of endogenous plasma insulin man. J. Clin. Invest. 39: 1157-1175 (1960).

ZARCO, L. Enzimoimmunoanálisis (EIA) para la determinación de progesterona en plasma y leche. Memorias del Seminario destinado a America Latina para mejorar la eficacia reproductora y la sanidad del ganado por medio de radioinmunoanálisis y técnicas conexas. CARCAL, Maracay, Venezuela 1987).

8. APENDICE.

Material Biológico.

conejos machos raza Nueva Zelanda cabritos raza Nubia.
gallinas de postura estirpe Daling.

Reactivos de calidad reactivo analítico.

a) Amortiguador de Fosfato salino con gel (PBSG) 0.1 M con
Gelatina al 1% pH 7.4 para RIA:

Na_2HPO_4 0.852 g

Na HPO_4 0.552 g

Na Cl 9 g

Gelatina 1 g

Azida de sodio o thimerosal 0.1 g

Agua destilada cbp 1000 ml.

b) Suspensión de carbón:

carbón activado 0.625 g

PBSG 0.01 M pH 7.3 cbp 100 ml.

c) Solución saturada de sulfato de amonio pH 7.5:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 76.7 g

agua destilada cbp 100 ml.

ajustar pH con Na OH 2 N.

d) Amortiguador salino de boratos (BBS) 0.01 M pH 7.8:

ácido bórico 6.18 g

bórax (tetraborato disódico) 9.54 g

Na Cl 4.38 g

agua destilada cbp 1000 ml.

Ajustar pH con HCl 5 N.

e) Amortiguador de carbonatos (para recubrir los pozos con anticuerpo) 0.05 M pH 9.5:

Na_2CO_3 0.159 g

NaHCO_3 0.293 g

Thimerosal 0.02 g

agua destilada cbp 100 ml.

f) Amortiguador de fosfatos salino con gel para EIA 0.1 M con gelatina al 1% pH 7.4 :

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.542 g

Na_2HPO_4 0.866 g

NaCl 0.87 g

Gelatina 1.0 g.

Agua destilada cbp 100 ml.

g) Solución de lavado concentrado para EIA:

NaCl 87.66 g

Tween 20 5 ml

Agua destilada cbp 1000 ml.

h) Solución de lavado de trabajo para EIA:

Solución concentrada diluir 1/10 con agua destilada.

i) Solución de sustrato para EIA a pH 4.0

solución de ABTS [2,2 azino-bis(3 ethylbenzthiazoline sulfonic acid)] 40 mM 100 μ l

solución de peróxido de hidrógeno al 2% 32 μ l

solución de ácido cítrico 0.05 M 9.9 ml.

j) Solución detenedora de reacción enzimática:

HF 0.15 M 6.24 g

Agua destilada cbp 1000 ml.

k) Solución de cloruro de bario al 10%

Soluciones para Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (PAGE):

Sol A:

HCl 0.1 N 48 ml

TRIS 36.3 g

TEMED 0.23 ml

Agua Desionizada cbp 100 ml.

Disolver TRIS con HCl, agregar TEMED y ajustar a pH 8.9, aforar a 100 ml con agua desionizada.

Sol B:

HCl 48 ml

TRIS 5.99 g

TEMED 0.46 ml

Agua desionizada cbp 100 ml

Sol C:

Acrilamida 28 g
Bisacrilamida 0.735 g
Agua desionizada cbp 100 ml

Sol D:

Acrilamida 10 g
Bisacrilamida 2.5 g
Agua desionizada cbp 100 ml

Sol E:

Riboflavina 4 mg
Agua desionizada cbp 100 ml.

Sol F:

Sacarosa 40 g
Agua desionizada cbp 100 ml

Sol Decolorante:

ácido acético 5 ml
Agua desionizada cbp 100 ml

Sol Colorante:

Azul brillante de Coomassie R-250 1 g
Agua desionizada cbp 100 ml
Acido tricloroacético al 12.5 % cbp 2000 ml

Sol Fijadora:

Acido Tricloroacético al 12.5 %

Amortiguador para corrida (electrodos):

TRIS 6 g

Glicina 28.8 g
sol azul de bromofenol 1.5 ml
Agua desionizada cbp 1000 ml.

Preparación de geles.

Gel de Separación. Se mezclaron un volumen (vol) de solución (sol) A con dos vol de sol C y un vol de agua desionizada, se desgasificó en matraz quitasato durante 10 minutos, luego se añadió 4 vol de persulfato de amonio, inmediatamente se aplicó a los tubos, se añadió también un poco de agua destilada sobre el gel para evitar la formación de menisco y se dejó polimerizar durante 35 minutos.

Gel de Distribución. Se mezclaron un vol de sol B con 2 vol de sol D, un vol de sol E y 4 vol de sol F, también se desgasificó, se añadió 200 μ l de gel de distribución sobre el gel de separación, inmediatamente se agregó 100 μ l de agua para eliminar la formación de menisco, se dejó polimerizar por 35 minutos.

Una vez polimerizados ambos geles, se colocaron en la cámara de electroforesis y se llenaron los recipientes con amortiguador de corrida (pH 8.3), las muestras se resuspendieron en 50 μ l de sol F y se aplicaron a los geles, la corrida se realizó a corriente constante de 2 mAmp por gel de separación, en cuanto el frente de corrida alcanzó el gel de distribución se aumentó a 5 mAmp.

Al finalizar la corrida, los geles permanecieron en solución

fijadora durante 30 minutos, luego fueron transferidos a solución de colorante por 90 minutos, al cabo de este tiempo se dejaron durante toda la noche en solución decolorante, los geles se almacenaron finalmente en solución de ácido acético al 7%.