

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**VALIDACIÓN DE LA ADICIÓN DE UN SEGUNDO ANTICUERPO AL  
ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMAS (ELISA) DE  
COMPETENCIA, PARA LA MEDICIÓN DE TESTOSTERONA.**

**tesis que para obtener el título de  
Médico Veterinario Zootecnista  
presenta**

**Cipatli García Dalmán**

**Asesores:**

**Carlos G. Gutiérrez Aguilar**

**Lucía E. Rangel Porta**

**Arantza Lassala Iruete**

**México, D.F., 2002.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

PAGINACIÓN

DISCONTINUA



**VALIDACIÓN DE LA ADICIÓN DE UN SEGUNDO ANTICUERPO AL  
ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMAS (ELISA) DE  
COMPETENCIA, PARA LA MEDICIÓN DE TESTOSTERONA.**

Tesis presentada ante la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
de la  
Universidad Nacional Autónoma de México  
para la obtención del título de  
Médico Veterinario Zootecnista

por

**Cipatli García Dalmán**

Asesores:

**Carlos G. Gutiérrez Aguilar  
Lucía E. Rangel Porta  
Arantza Lassala Irueste**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la  
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el  
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Cipatli García

Dalmán

FECHA: 06-Sep-2002

FIRMA: [Firma]

México, D.F. 2002

**Dedico esta tesis a Reyna y Odi,  
porque no puedo tener mejores papás y  
a Ere mi hermana preferida.**

## **AGRADECIMIENTOS**

De manera muy especial a Luci, Arantza y Carlos por compartir sus conocimientos conmigo, así como por la confianza, apoyo y amistad.

A Erla, Francisca, Andrea y Eli por su amistad.

A Ana por su compañía y apoyo en la etapa final de este trabajo.

A todas las personas de la D.G.S.G. que me apoyaron durante la realización de mis estudios, especialmente a Tere.

A mis familiares, amigos o simplemente conocidos que siempre han estado a mi lado.

A los miembros del jurado revisor de tesis, doctores: Antonio Porras, Joel Hernández, Gerardo Perea, Susana Rojas y Carlos Gutiérrez, gracias.

## **CONTENIDO**

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b>	
VALIDEZ DEL MÉTODO. CRITERIOS DE CONFIABILIDAD .....	4
ETAPAS DEL ELISA .....	5
TESTOSTERONA .....	8
HIPÓTESIS .....	10
OBJETIVO .....	10
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
ELISA PARA TESTOSTERONA .....	11
TITULACIÓN DE LOS ANTICUERPOS Y EL CONJUGADO .....	11
DESARROLLO DE LA CURVA ESTÁNDAR .....	12
TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS .....	12
CURVA DE PARALELISMO .....	13
VALIDACIÓN DEL ENSAYO .....	14
CONSERVACIÓN DE PLACAS .....	15
<b>RESULTADOS</b>	
TITULACIÓN DEL PA Y CONJUGADO .....	16
CURVA ESTÁNDAR .....	16
PARALELISMO ENTRE CURVA ESTÁNDAR Y MUESTRA .....	17
TITULACIÓN DEL SA .....	18
CURVA ESTÁNDAR CON SA .....	19
TITULACIÓN DEL PA CON EL SA .....	20
PARALELISMO. ENSAYO CON SA .....	20
EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DE PLACAS	
CUBIERTAS CON SA .....	21
VALIDACIÓN DEL ENSAYO .....	21

<b>DISCUSIÓN</b>	.....	23
CONCLUSIONES	.....	27
<b>LITERATURA CITADA</b>	.....	28
<b>APÉNDICES</b>		
APÉNDICE 1. METODOLOGÍAS	.....	30
APÉNDICE 2. SOLUCIONES	.....	33
APÉNDICE 3. TRATAMIENTO DE MUESTRAS	.....	36
APÉNDICE 4. RESULTADOS	.....	38



## **RESUMEN**

**GARCÍA DALMÁN CIPATLI. Validación de la adición de un segundo anticuerpo al ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de competencia, para la medición de testosterona (Bajo la dirección de: Carlos G. Gutiérrez Aguilar, Lucía E. Rangel Porta y Arantzazu Lassala Irueste)**

En el presente trabajo se adicionó un segundo anticuerpo (SA) como primer paso en el ELISA de competencia, para realizar mediciones de testosterona en muestras de bovino, ovino, canino, equino y gallina. El agregar el SA permite optimizar el uso del primer anticuerpo (PA) al posibilitarse el uso de una mayor dilución. De la misma forma se puede aumentar la sensibilidad del ensayo con lo que se disminuye la cantidad de muestra necesaria y así se evitan posibles interferencias de elementos del suero. Adicionalmente, emplear el SA permite almacenar las placas con un amortiguador de fosfatos sin que se vean afectadas las características del ensayo, para posteriormente utilizarlas en ensayos que usen un PA que proceda de la especie contra la cual se obtuvo el SA. La sensibilidad obtenida en los ensayos hechos en este trabajo (1.7 pg/pozo) permitió realizar mediciones en muestras de bovino, ovino canino y equino, no así las de gallina. Se concluye que el unir el SA en lugar del PA a la fase sólida en el ELISA de competencia permite optimizar el PA así como disminuir la variabilidad del ensayo y la cantidad de muestra necesaria, de la misma forma las placas pueden ser almacenadas durante 41 días sin que se vean afectadas las características del ensayo.

## INTRODUCCIÓN

La medición de los niveles de testosterona, se realiza para determinar el inicio de la pubertad o de la época reproductiva en machos de las especies estacionales (1). Desde un punto de vista clínico, la cuantificación de la testosterona permite identificar anomalías en la producción de ésta hormona, que se pueden presentar asociadas a criptorquidismo, tumores ováricos o en corteza adrenal (2,3).

El método más usado para determinar las concentraciones hormonales es el radioinmunoanálisis (RIA), el cual tiene como principal inconveniente el uso de isótopos radioactivos como marcadores (4).

Por lo anterior, en años recientes otras técnicas han ido cobrando importancia. Una de ellas es el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) que se basa en el mismo principio que el RIA pero utiliza una enzima como marcador y tiene las mismas ventajas del RIA en cuanto a sensibilidad, especificidad y precisión(5). Este ensayo tiene diferentes modalidades. La más común para medir hormonas esteroideas es el ELISA competitivo, donde se une el anticuerpo específico o primer anticuerpo (PA) a una fase sólida (placa de poliestireno) y se ponen a competir cantidades conocidas de la hormona conjugada y cantidades desconocidas de la hormona presente en la muestra (6). Son pocos los reportes de ensayos que unen un segundo anticuerpo (SA) (anticuerpo contra una inmunoglobulina) a la fase sólida (7-9). Sin embargo, su utilización permite disminuir costos al optimizar el uso del PA por requerirse diluciones mayores del mismo. Igualmente la unión del SA permite almacenar las placas sin que pierdan sus características para el ensayo (8).

La validación del ensayo dentro de un laboratorio es esencial, ya que para que este sea reproducible, depende de la especificidad del antisuero y de la sensibilidad, exactitud y precisión del procedimiento. El fracaso de estos requerimientos puede conducir a falsos resultados y diagnósticos incorrectos.

## REVISIÓN DE LITERATURA

Un SA es un anticuerpo producido al inyectar inmunoglobulinas (IgG) como antígeno a animales de una especie diferente a la de procedencia. Así, es posible preparar antisueros (sueros que contienen anticuerpos) que reaccionan contra las inmunoglobulinas (10).

La obtención del SA es de gran utilidad en diferentes técnicas diagnósticas de laboratorio, ya que permite identificar inmunoglobulinas independientemente de la estructura del antígeno para el cual se desarrollaron, permitiendo así cuantificar antígenos o anticuerpos.

El SA al ser específico para la IgG de la especie de la que procede, permite la utilización de éste en ensayos dirigidos contra diferentes antígenos siempre y cuando el PA haya sido producido en la misma especie. Por otro lado la utilización del SA permite modificar la sensibilidad del ensayo facilitando la medición del antígeno en muestras de diferente origen. De la misma forma, al unir primero el SA se disminuyen las variaciones de unión del PA pudiendo así optimizarlo (11). Así mismo, si se toma en cuenta que el tiempo de equilibrio de la unión antígeno anticuerpo se da aproximadamente en tres horas, al utilizar el SA se reducen los tiempos de incubación así mismo el del ensayo.

Tanto Engvall y Perlmann (12), como Van Weemen y Schuurs (13) fueron los primeros en utilizar el ELISA para mediciones hormonales. Esta técnica es un inmunoensayo que permite determinar las concentraciones de un antígeno o un anticuerpo mediante el uso de uno de ellos en fase sólida y el otro en solución, detectándose la formación del complejo antígeno-anticuerpo mediante un marcador enzimático (14-16).

Las ventajas y desventajas del ELISA son:

Ventajas

1. Los reactivos son relativamente baratos y pueden tener una larga vida.
2. Se pueden ejecutar ensayos múltiples simultáneamente.
3. Se puede desarrollar una extensa variedad de configuraciones del ensayo.
4. Se pueden detectar cantidades extremadamente pequeñas de reactivos inmunes.

Desventajas

1. Medir la actividad enzimática puede ser más complejo que medir la actividad de algunos radioisótopos.
2. La actividad enzimática puede ser afectada por algunos componentes del suero (15).

Para desarrollar el ELISA se requiere de una fase sólida en la cual será adsorbido el anticuerpo específico contra la sustancia en estudio, la misma sustancia en estudio pero unida a una enzima (a lo cual se le conoce como conjugado), así como los estándares, que son concentraciones conocidas de la sustancia en estudio altamente purificada (6).

En cada ensayo se debe incluir una curva de calibración, donde los estándares y una cantidad constante de conjugado competirán por unirse al anticuerpo. Así, al aumentar la concentración del estándar disminuye la unión de conjugado y viceversa. La función de esta curva es la de permitir transpolar los valores obtenidos de las muestras problema a los valores conocidos arrojados por la curva. Para conocer la cantidad de conjugado que se une inespecíficamente (UNE) a la fase sólida se incluye un determinado número de pozos con cero concentración de la muestra, del estándar o del anticuerpo específico. Del mismo modo, existen pozos denominados unión total ( $B_0$ ), que se utilizan para calcular la unión máxima del conjugado al anticuerpo en ausencia del antígeno. Pueden añadirse controles de calidad, con concentraciones conocidas de la sustancia a medir, las cuales ayudarán a determinar la variación entre los ensayos (17).

### ***Validez del método. Criterios de confiabilidad.***

Un ensayo que es válido para una especie puede carecer de utilidad en otras especies. El suero puede además tener sustancias no específicas que afecten el procedimiento. Así mismo, se debe tener en cuenta que las concentraciones de una hormona varían entre especies y pueden no estar dentro del rango de sensibilidad del procedimiento. Por otro lado, las prehormonas y los productos de degradación pueden ser detectados y considerados como una sola forma de la hormona. Por lo tanto, todos los ensayos deben tener validez para la hormona que va a ser analizada y para las especies que están siendo estudiadas (18).

La calidad de un ensayo está determinada por su precisión, exactitud, sensibilidad y especificidad; parámetros que son evaluados en la curva estándar que se desarrolla después de conocer las concentraciones óptimas del anticuerpo y conjugado (19).

La sensibilidad se puede definir como la menor cantidad de antígeno que puede ser detectado en el sistema al 90% de la unión máxima. Aumentando la dilución del anticuerpo la pendiente de la curva es mayor, y por lo tanto, también lo es la sensibilidad del ensayo (19).

La especificidad es el grado en el que un ensayo responde a sustancias para las que no fue diseñado, pero que son químicamente similares a las sustancias de interés. Generalmente se expresa como porcentaje de reacción cruzada en el sistema (19). Otra forma de apreciar la especificidad es mediante la inhibición paralela de diluciones seriadas de una muestra a la curva estándar. El paralelismo entre la curva estándar y la muestra sugiere que es el mismo elemento el que se encuentra presente en ambas (20).

La exactitud es definida como la mayor proximidad con la que un método analítico se aproxima al valor verdadero de la muestra cuantificada y se determina a través de la medición de las concentraciones de la sustancia en interés antes y después de añadir

cantidades conocidas de la misma. Se puede expresar como el porcentaje de la cantidad de la sustancia añadida que se logre cuantificar o porcentaje de recuperación (19).<sup>19</sup>

La precisión es la característica que determina la variabilidad de la estimación de las concentraciones de la muestra problema. Para evaluarla se determinan los coeficientes de variación interensayo e intraensayo, en valores conocidos de la curva estándar (20%, 50% y 80%); idealmente deben incluirse controles de calidad bajos, medios y altos de una muestra conocida. Cuanto menor es la variación, mayor es la precisión, así mismo, depende de los errores experimentales y en menor grado de los errores de conteo (19). Una vez establecidas las condiciones óptimas de trabajo, hay que mantenerlas constantes para todos los estudios, tomando en cuenta que cambios metodológicos pequeños que se pueden considerar de escasa importancia pueden modificar los resultados (19).

## *Etapas deL ELISA*

### Unión del anticuerpo a la fase sólida.

Como se mencionó, el ELISA permite determinar las concentraciones de un antígeno y un anticuerpo mediante el uso de uno de ellos en fase sólida y otro en solución. Las fases sólidas más usadas son el poliestireno y el PVC, ambas se utilizan en forma de tubos, esferas, varillas o como placas de microcultivo de 96 pozos de aproximadamente 0.25 ml de capacidad (Microtiter). Estas últimas son la forma más común para el ELISA, por la reproducibilidad obtenida con ellas y el hecho de que existen dispositivos automáticos o semiautomáticos para dispensar reactivos, lavar y leer densidades ópticas que simplifican la técnica. Se ha preferido usar las placas de poliestireno ya que su rigidez las hace más adecuadas para los equipos automatizados (14).

Los parámetros fisicoquímicos que se han de tener en cuenta en la adsorción de proteínas a las fases sólidas son la estabilidad de la unión resultante y la concentración óptima de proteína a adsorber. Su importancia reside en que la pérdida de proteína durante las diferentes etapas del ensayo y la influencia que sobre ella ejerzan las condiciones experimentales, pueden afectar profundamente la sensibilidad, precisión y exactitud de la técnica (14).

La concentración óptima de proteína surge de la necesidad de usar la mejor concentración para lograr la mayor sensibilidad en el ensayo y el riesgo de que una concentración excesiva produzca interacciones proteína-proteína en lugar de proteína-superficie, que por ser más débiles pueden romperse a lo largo del ensayo (14). La forma en que generalmente son adsorbidos los anticuerpos a la fase sólida es a través de interacciones hidrofóbicas (6).

### **Reacción de los inmunoreactivos en solución y en fase sólida**

Para que la unión antígeno-anticuerpo se lleve a cabo adecuadamente, las condiciones experimentales de pH, temperatura y concentración salina deben ser similares a las fisiológicas (pH 7.2, 37°C y 0.15 M NaCl respectivamente). Sin embargo, es posible modificar estos parámetros dentro de un rango razonable sin afectar el equilibrio de reacción (14). La cinética de la unión entre el antígeno y el anticuerpo es dinámica, reversible y es particularmente sensible a variaciones de temperatura. Aunque la temperatura que se considera óptima sea de 37°C, es posible usar entre 15 y 25°C (temperatura ambiente), siempre que se de el tiempo necesario para la reacción. En la mayoría de los sistemas se llega al equilibrio, es decir al punto en el cual ya no se da más unión de los antígenos a los anticuerpos, generalmente en un tiempo de 1 a 3 horas en dicha gama de temperaturas (14).

### **Lavado de la placa**

Es necesario tomar en cuenta que existe el riesgo de que algunas moléculas distintas a las de interés se adsorban a la fase sólida poniendo en riesgo la especificidad y reproducibilidad de la técnica, por esta razón, es necesario efectuar lavados después de cada incubación: tanto para impedir que haya macromoléculas que se unan a ella de forma inespecífica como para eliminar el exceso de reactivos que no se encuentren unidos. Para ello, se añade a la solución de lavado un detergente no iónico (usualmente polioxietileno-sorbitan monolaurato (Tween 20 al 0.05%) (14).

Sin embargo, si los lavados son excesivos, pueden dar lugar a arrastre tanto del reactivo unido inespecíficamente como del complejo antígeno-anticuerpo. Por esto, es recomendable usar métodos de lavado bien estandarizados para que las pérdidas por arrastre sean similares en todos los ensayos (14).

### **Reacción con el conjugado enzimático**

Dado que la enzima marcadora es la porción crítica de los métodos de inmunoensayo enzimático la selección de esta es muy importante (21). Los criterios para una selección apropiada de la enzima son su estabilidad, viabilidad para conjugarla eficientemente al antígeno deseado, sensibilidad con la que se puede determinar su actividad con los sustratos disponibles, inexistencia de una actividad similar en el inmunoreactivo en fase

sólida, no toxicidad de los sustratos a usar, precio y disponibilidad. La enzima generalmente es unida al antígeno por medio de un enlace covalente para formar el conjugado (14). Las enzimas más usadas en el ELISA son la peroxidasa de rábano y la fosfatasa alcalina.

### **Determinación de la actividad enzimática unida a la fase sólida**

Es necesario proporcionar un medio en el que se propicie la actividad de la enzima elegida, que permita que el producto de la transformación del sustrato pueda ser medido. Para la elección del sustrato adecuado para la enzima específica, se toma en cuenta la sensibilidad, estabilidad, toxicidad, costo y disponibilidad del mismo (14).

En el caso de la peroxidasa de rábano, se ha utilizado el ABTS (2,2-azino-di(3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfonato)) como sustrato en combinación con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), aunque también se han estudiado otros sustratos para esta enzima. Entonces, si el antígeno marcado con la enzima es unido serológicamente al anticuerpo en fase sólida, solo es necesario adicionar el sustrato de la enzima en el medio adecuado, seguido de la lectura espectrofotométrica de la apariencia del producto final en un periodo específico de tiempo (14,21).

El ELISA puede desarrollarse utilizando distintas modalidades que se clasifican en dos grandes grupos: competitivos y no competitivos (14). En los primeros, el conjugado estará formado por un antígeno-enzima o un anticuerpo-enzima. Los segundos son el ensayo de sandwich y el indirecto para medición de anticuerpos.

Para este trabajo se utilizó el ELISA competitivo que requiere de un conjugado antígeno-enzima más un anticuerpo específico, y el cual consiste de los siguientes pasos:

1. El anticuerpo específico es adsorbido a la fase sólida.
2. El anticuerpo no unido es descartado mediante un lavado.
3. El antígeno marcado con la enzima se agrega a la placa junto con el estándar o la muestra a medir, y se incuba para que compitan por unirse al anticuerpo específico de acuerdo a sus concentraciones.
4. La placa se lava para retirar la fracción libre tanto de conjugado como del estándar o de antígeno de la muestra.
5. La fase sólida con el complejo anticuerpo-antígeno es incubada a temperatura constante con la solución sustrato que corresponde a la enzima del conjugado para producir la reacción y el cambio de color.
6. La reacción enzimática se detiene y su producto es medido con un espectrofotómetro.

## TESTOSTERONA

A las hormonas esteroideas involucradas en la función reproductiva del macho se les conoce como andrógenos, siendo la principal de ellas la testosterona. Las células de Leydig en los testículos producen más del 95 % de la testosterona que es secretada al torrente sanguíneo, y en muy poca cantidad por la corteza suprarrenal. Se ha observado que los equinos son la única especie que también produce testosterona en grandes cantidades en los túbulos seminíferos (22,1).

La principal función de la testosterona es estimular las últimas etapas de la espermatogénesis y prolongar la vida de los espermatozoides en el epidídimo. Adicionalmente, promueven el crecimiento, el desarrollo y la actividad secretora de los órganos sexuales accesorios del macho, como la próstata, las glándulas vesiculares y las glándulas bulbouretrales, así como el conducto deferente y los genitales externos (pene y escroto). La testosterona induce actividad proteínica anabólica en todo el organismo y se ha encontrado también que aumenta el tamaño de las glándulas sebáceas (1).

Los andrógenos tienen un efecto de retroalimentación negativa en el eje hipotálamo-hipofisiario para el control de la liberación de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículoestimulante (FSH) (1). Así, la LH es el estímulo primario en la liberación de la secreción de la testosterona induciendo a las células de Leydig a producirla. A su vez, la testosterona liberada por los testículos tras la estimulación de LH tiene la propiedad de inhibir la secreción de LH. Por otra parte, la FSH regula la espermatogénesis y activa a las células de Sertoli para que produzcan proteína ligadora de andrógenos (ABP). La ABP se une a la testosterona para transportarla al interior del tubo seminífero, donde la libera para que ejerza su función. La prolactina actúa de modo sinérgico con la LH para estimular la secreción de testosterona por los testículos (23).

Los testículos fetales secretan cantidades considerables de testosterona dentro de la circulación, presentándose el pico de la concentración plasmática antes del nacimiento o justo después, dependiendo de la especie. La acción local de la testosterona en el feto causa el desarrollo de los ductos mesonéfricos para formar el epidídimo, ductos deferentes y vesículas seminales. También durante el desarrollo fetal, la secreción de testosterona es muy importante para la diferenciación de los genitales externos del macho causando su virilización al transformarse en  $5\alpha$  dihidrotestosterona en piel. Después del nacimiento, el nivel de testosterona en sangre baja y aumenta de nuevo como preludeo a la pubertad (24).

La concentración de esteroideos y otras hormonas por unidad de volumen de sangre es muy variable entre especies, entre individuos e incluso dentro del mismo individuo a lo largo del tiempo (cuadro 1).



**Cuadro 1.** Niveles sanguíneos de testosterona en diferentes especies domésticas.

Especie	Rango	Promedio
Toro	6.2 a 7.2	6.7
Garañón	2.0 a 2.2	2.1
Carnero	4.5 a 5.8	5.2
Perro	1.5 a 2.9	2.2
Gallina	0.1 a 0.9	0.5

Adaptado de Pineda MH<sup>25</sup>, R.J. Etches<sup>26</sup> y Cunningham FJ<sup>27</sup>

En mamíferos con patrones estacionales de reproducción, hay diferencias considerables en las concentraciones periféricas de testosterona dependiendo de la estación. En el borrego, la mayor diferencia parece ser en el número de pulsos de testosterona por hora, aunque hay también una tendencia a que los pulsos sean más amplios al iniciar la estación reproductiva (24).

Existen numerosos reportes de que el ambiente social puede afectar la producción de testosterona; por ejemplo, la cópula y en algunos casos, la proximidad de la hembra, aunque sin contacto físico, causa un aumento en la testosterona en machos de diferentes especies. Esto sin embargo, puede ser reflejo de la edad, experiencia sexual de los animales o época del año (24).

El estrés crónico puede tener como consecuencia la disminución de la secreción de testosterona en las diferentes especies. En algunas circunstancias, esta disminución puede asociarse con una falla en la secreción de LH, pero en otras formas de estrés los niveles de LH son normales (24). Así mismo, se conoce que una mala nutrición está asociada con una baja producción de testosterona. Sin embargo, la mayoría de estos cambios son probablemente consecuencia de la disminución en la secreción de LH(24).

## **HIPÓTESIS**

La adición del SA como primer paso en el ELISA puede utilizarse para optimizar la concentración del PA, en un ensayo de competencia para medir las concentraciones séricas de testosterona en animales domésticos (bovino, ovino, canino, equino y gallina).

## **OBJETIVO**

El objetivo de este trabajo fue validar el uso de un SA como primer paso en el ELISA de competencia, para determinar las concentraciones de testosterona en suero de bovino, ovino, canino, equino y gallina.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **ELISA PARA TESTOSTERONA**

Para este ensayo se utilizó un anticuerpo específico contra testosterona producido en conejo mediante inmunización con testosterona-6CMO:BSA, y purificado por precipitación con solución de sulfato de amonio; un conjugado de testosterona a base de peroxidasa de rábano (testosterona-3CMO-HRP) en una concentración 1:100 y estándares de testosterona. Todo ello fue proporcionado por la Dra. Coralie Munro de la Universidad de Davis en California, E.U.

El segundo anticuerpo se obtuvo, a partir de suero de burro inmunizado con una preparación antigénica de inmunoglobulina de conejo en adyuvante de Freund (28). La purificación del SA se realizó por precipitación con solución saturada con sulfato de amonio, según el método descrito por Garvey JS *et al.* (29) y esquematizado en el Apéndice 1.

Como fase sólida se utilizaron placas de poliestireno, MAXISORP (Nunc Immuno Plate). Para determinar las densidades ópticas se utilizó un espectrofotómetro Dynatech Laboratories MRX. Los datos obtenidos del lector se analizaron con el programa Universal Assay Zap y de acuerdo a lo reportado por Bedolla y Ulloa (30).

#### ***Titulación de los anticuerpos y el conjugado***

Para determinar las concentraciones óptimas de PA, SA y conjugado a utilizarse en el ensayo, se procedió a la titulación de los mismos.

Para la titulación del PA y del conjugado se probaron diferentes concentraciones que oscilaron entre 1:12,000 y 1:40,000 para el PA y 1:30,000 a 1:60,000 para el conjugado, utilizando solución amortiguadora de carbonatos como diluyente para el primero y solución de fosfatos para el segundo. Se seleccionaron aquellos  $B_{0}$  que dieron una lectura cercana a una unidad de densidad óptica. Con las concentraciones de anticuerpo y conjugado seleccionadas, se realizó una curva estándar con cada combinación, las que se muestran en el cuadro 2.

Una vez establecida la curva estándar y la de paralelismo, se realizó la titulación del SA purificado y sin purificar diluido en solución amortiguadora de carbonatos. Se utilizaron las concentraciones de PA y conjugado ya determinadas anteriormente. Para ello, se dividió un ensayo en dos secciones a las que se les agregó el SA purificado y sin purificar respectivamente, probando diluciones de 1:160 a 1:400.

**Cuadro 2.** Concentraciones de PA y conjugado utilizadas para realizar la curva estándar.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Conjugado</b>
1:12,000	1:60,000
1:18,000	1:40,000
1:24,000	1:30,000

### *Desarrollo de la curva estándar*

Con la finalidad de evaluar el comportamiento del PA y del conjugado ante diferentes concentraciones de hormona, se realizaron curvas de desplazamiento utilizando 8 concentraciones de testosterona (estándares), que se muestran en el cuadro 3.

**Cuadro 3.** Concentración de testosterona en los estándares de la curva de calibración.

<b>No. Estándar</b>	<b>pg/50 <math>\mu</math>l</b>	<b>ng/ml</b>	<b>No. Estándar</b>	<b>pg/50 <math>\mu</math>l</b>	<b>ng/ml</b>
1	5	0.1	5	100	2
2	10	0.2	6	250	5
3	25	0.5	7	500	10
4	50	1	8	1,000	20

Después de realizar la titulación del SA se procedió a realizar la curva estándar con la utilización de éste para conocer su en el ensayo, para ello en un mismo ensayo se realizó una curva estándar con y sin SA a una concentración de 1:300.

### *Tratamiento de las muestras*

Para extraer la testosterona y eliminar la proteína ligadora de las muestras se probó el método de extracción por solventes, utilizando 100, 1,000 y 3,000  $\mu$ l de suero de bovino. A cada muestra se le agregó una cantidad conocida de testosterona marcada con tritio (10,000 cpm) para calcular los porcentajes de recuperación (ver apéndice 3).

Una vez conocido el porcentaje de recuperación de cada extracción se decidió realizar la extracción agregando 3 ml de éter anhidro por cada ml de suero ó 2 ml de éter por cada 100  $\mu$ l de muestra.

### *Curva de paralelismo*

Con el objeto de determinar la funcionalidad del ensayo en diferentes especies, se elaboraron curvas de paralelismo entre estándares y suero en la que pudiera observarse si existía una semejanza en el desplazamiento de las mismas. Se trabajaron muestras de suero de bovino, ovino, equino y canino. La testosterona de cada muestra se concentró para igualar la concentración de los estándares de trabajo. Cada muestra se extrajo y se resuspendió en amortiguador de fosfatos de acuerdo al cuadro 4, a partir de éstas se realizaron las diluciones correspondientes en la misma solución.

**Cuadro 4.** Cantidad de amortiguador de fosfatos necesaria para resuspender el extracto del suero para realizar la curva de paralelismo.

<b>Especie</b>	<b>Suero Extraído (µl)</b>	<b>Amortiguador de fosfatos para resuspender (µl)</b>
Bovino	1,000	335
Ovino	1,000	260
Canino	1,000	110
Equino	1,000	105

Durante el ensayo la placa se cubrió de la siguiente manera: a los pozos destinados para los diferentes puntos de las curvas paralelas se les agregaron 50 µl/pozo de la dilución del extracto y 50 µl/pozo de conjugado, a los pozos correspondientes a los estándares se les agregaron 50 µl/pozo de amortiguador de fosfatos y 50 µl/pozo del estándar correspondiente diluido en conjugado, finalmente a los pozos correspondientes a los Bo y UNE se les agregaron 50 µl/pozo de amortiguador de fosfatos y 50 µl/pozo conjugado.

Para realizar la curva de paralelismo con SA solo se utilizaron 6 estándares correspondientes a 5, 10, 50, 100, 500 y 1,000 pg/pozo, con muestras de bovino, ovino, equino, canino y gallina. La cantidad de muestra extraída de cada especie se presenta en el cuadro 5, resuspendiendo en la cantidad de amortiguador indicado en el mismo; a partir de estos se realizaron las diluciones correspondientes.

**Cuadro 5.** Cantidad de amortiguador de fosfatos necesaria para resuspender el extracto del suero.

Especie	Suero Extraído ( $\mu$ l)	Amortiguador de fosfatos para resuspender ( $\mu$ l)
Bovino	1,500	502.5
Ovino	2,000	520
Canino	3,500	385
Equino	3,500	367.5
Gallina	14,500	362.5

## VALIDACION DEL ENSAYO

Una vez establecida la curva estándar del ensayo con la adición del segundo anticuerpo se procedió a medir los parámetros de validación en 12 ensayos.

Sensibilidad: Esta se determinó en base a la cantidad mínima detectable del ensayo en valores del 90% del  $B_0$  de la curva estándar.

Especificidad: La especificidad del anticuerpo R156 contra testosterona fue realizada por medio de reacción cruzada por la Dra. Coralie Munro de la Universidad de Davis, quien donó el anticuerpo. Los resultados que obtuvo se muestran en el cuadro 6.

**Cuadro 6:** Porcentaje de reacción cruzada del anticuerpo R156 antitestosterona

Esteroido	% de Reacción cruzada
Testosterona	100
5 $\alpha$ -dihydrotestosterona	57.37
Androstenediona	0.27
Androsterona	0.04
$\beta$ -Estradiol	0.02

**Exactitud:** Para conocer el porcentaje de recuperación se midió una muestra con baja concentración de testosterona, obtenida de un animal castrado, y la misma muestra agregándole testosterona en concentraciones de 50 y 25 pg/pozo para los controles de calidad alto y medio.

**Precisión:** Se desarrollaron 4 curvas estándar independientes para calcular la precisión del ensayo, obteniendo los valores del coeficiente de variación intra e interensayo de la curva estándar en los controles de calidad alto y medio.

## CONSERVACION DE LAS PLACAS

Para conocer el tiempo que una placa cubierta con SA, lavada y almacenada con amortiguador de fosfatos a 4°C puede ser utilizada sin que se vean afectadas las características del ensayo, se cubrieron 8 placas que se utilizaron estableciendo una curva estándar en cada placa, con diferencia de aproximadamente una semana de almacenamiento.

Se agregaron 50  $\mu$ l/pozo de SA sin purificar a una concentración de 1:300 diluido en amortiguador de carbonatos, dejando incubar durante una noche a 4°C. Después de lavadas las placas, se les agregó 50  $\mu$ l/pozo de amortiguador de carbonatos y fueron guardadas a 4°C. Cada placa se cubrió perfectamente con una mica para evitar la cristalización del amortiguador de fosfatos por evaporaciones. Posteriormente en un lapso de una semana de diferencia aproximadamente, se realizó un ensayo con una curva estándar en cada placa.

## RESULTADOS

### *Titulación del PA y del conjugado*

Las lecturas promedio de densidad óptica obtenidas para la unión total con las concentraciones de PA y conjugado probadas se muestran en el cuadro 7. Se puede observar que a mayor concentración de anticuerpo y conjugado se logra una mayor unión.

**Cuadro 7:** Valores de densidad óptica obtenidas en la titulación conjunta del anticuerpo contra testosterona y conjugado (testosterona-3CMO-HRP) en un enzimoimmunoensayo con la incubación a temperatura ambiente.

Titulación del Primer Anticuerpo

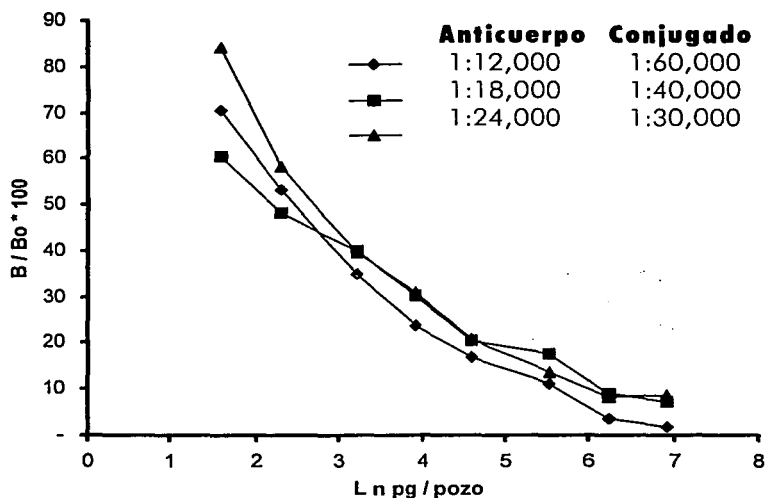
		<b>1:12,000</b>	<b>1:24,000</b>	<b>1:32,000</b>	<b>1:40,000</b>
Titulación del conjugado	<b>1:30,000</b>	1.574	0.862	0.634	0.452
	<b>1:40,000</b>	1.318	0.796	0.597	0.450
	<b>1:50,000</b>	1.185	0.736	0.571	0.392
	<b>1:60,000</b>	1.048	0.666	0.399	0.000

Las lecturas de una unidad de densidad óptica fueron obtenidas con las combinaciones de PA y conjugado de 1:12,000 con 1:60,000 y 1:24,000 con 1:30,000 respectivamente. Posteriormente se desarrollaron tres curvas estándar cuyas concentraciones de PA y conjugado se encontraban dentro de estos rangos.

### *Curva estándar*

Se desarrollaron tres curvas estándar con las concentraciones de anticuerpo y conjugado mencionadas en el cuadro 2. Las curvas estándar que se obtuvieron se observan en la gráfica 1. Puede verse que no hubo diferencia en el 50% de unión. Sin embargo en





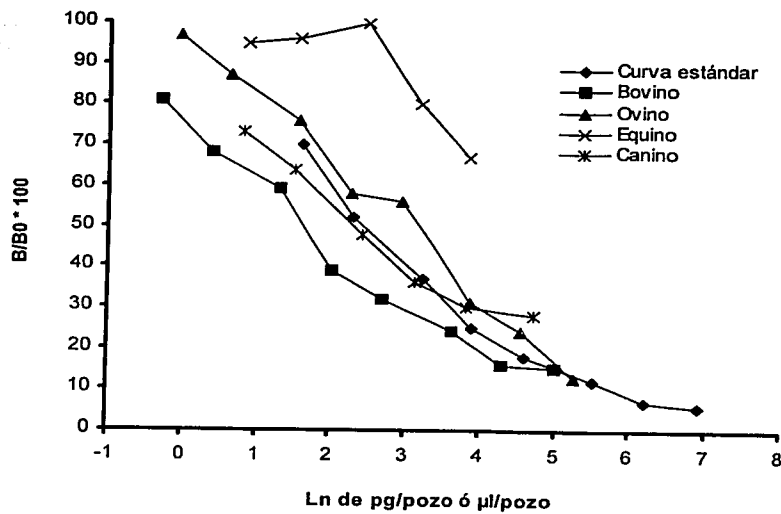
**Gráfica 1:** Curvas estándar de testosterona en un ensayo inmunoabsorbente, utilizando diferentes concentraciones de primer anticuerpo y conjugado.

la curva en la que se utilizó una combinación de anticuerpo 1: 24,000 y conjugado 1:30,000, se alcanzó un 80% de unión de acuerdo a los resultados que se presentan en la gráfica y por ello fue seleccionada para los ensayos subsiguientes.

### ***Paralelismo entre curva estándar y muestra***

Las curvas de desplazamiento que se obtuvieron con las muestras de bovino, ovino, canino y equino se presentan en la gráfica 2. Se puede apreciar que las curvas con muestras de canino, bovino y ovino fueron paralelas a la curva estándar. El 50% de unión se calculó por interpolación de datos y fue para canino de 11  $\mu$ l, 9.4  $\mu$ l para bovino y 19  $\mu$ l para ovino. Por lo cual se determinó que esta cantidad de muestra sería utilizada durante el ensayo.

En el caso de la muestra de equino, esta no logró inhibición de la unión hasta que se agregó por arriba de los 20  $\mu$ l de muestra dado que fisiológicamente es una especie con poca testosterona. Debido a que solo se tenían 2 puntos arriba de 20  $\mu$ l no se pudo determinar paralelismo.



**Gráfica 2:** Curvas de paralelismo que se obtuvieron en un inmunoensayo entre la curva estándar y muestras de bovino, ovino, canino y equino.

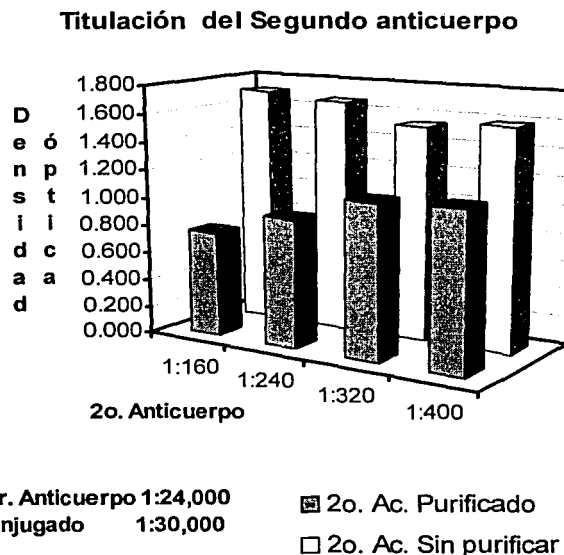
## ADICIÓN DEL SEGUNDO ANTICUERPO AL ENSAYO

### *Titulación del segundo anticuerpo*

En la gráfica 3 se muestra la unión total en el ELISA con la adición del SA utilizando el PA a una concentración de 1:24,000 y el conjugado a 1:30,000.

Puede observarse que después de la adición del SA se logra una unión total que es comparable a la que se obtiene haciendo el ELISA uniendo el PA directamente a la superficie del plato. También puede observarse que el SA purificado y sin purificar lograron la unión del PA. Finalmente, cuando se utilizó el SA purificado se observó una relación negativa entre la concentración en la que se utilizó para cubrir el plato y la unión total obtenida.

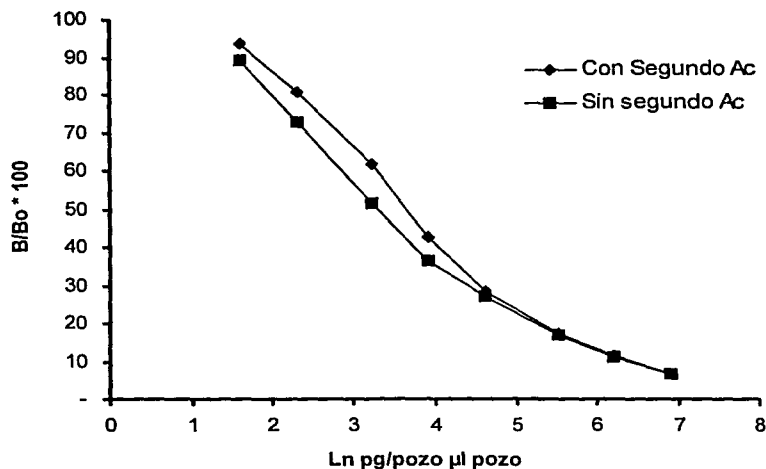
Dadas la ventajas que implica el no tener que realizar la purificación del anticuerpo se decidió utilizarlo sin purificar a una concentración de 1:300 para cubrir las placas previo al PA.



**Gráfica 3:** Efecto de la adición del SA purificado y sin purificar aplicado a diferentes concentraciones, sobre la unión total obtenida en un ELISA. PA concentración 1:24,000 y conjugado 1:30,000.

### Curva estándar con Segundo Anticuerpo

La gráfica 4 muestra la comparación de dos curvas estándar, una sin SA y la otra con SA sin purificar concentración 1:300. La curva estándar obtenida en el ensayo en que se utilizó SA fue igual a la curva estándar donde no se utilizó SA con un 50 y 20% de unión descritos en el cuadro 8.



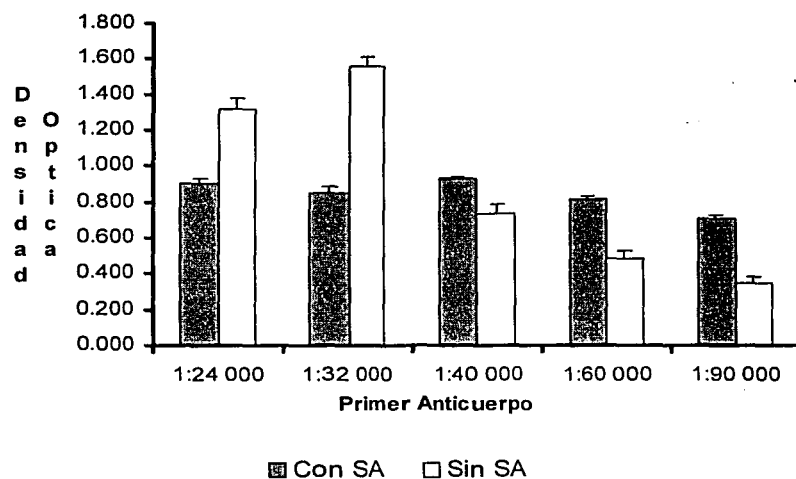
**Gráfica 4:** Curva estándar de un ELISA para testosterona uniendo el primer anticuerpo directamente a la superficie o uniendo previamente un segundo anticuerpo.

**Cuadro 8:** 50 y 20% de unión obtenidos en la curva estándar con y sin la utilización del SA.

	20%	50%
Con SA	150.7	27.4
Sin SA	124.7	20.8

### *Titulación del Primer anticuerpo con Segundo Anticuerpo*

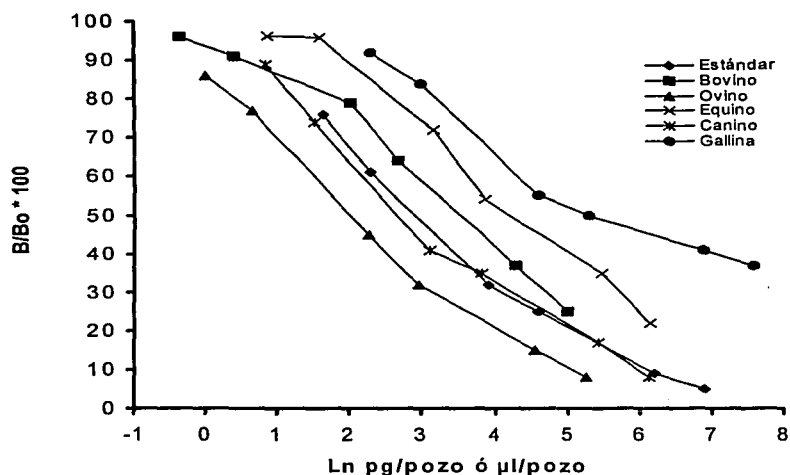
En la gráfica 5, la titulación del PA con el uso del SA a una concentración de 1:300 se muestra que las lecturas obtenidas se mantienen arriba de una unidad de densidad óptica a diluciones mayores del PA. Igualmente la caída en la unión es menor al aumentar la dilución cuando se utilizó el SA. A altas diluciones resulta una mayor unión cuando se utiliza el SA.



**Gráfica 5:** Titulación del primer anticuerpo con la utilización del segundo anticuerpo concentración 1:300 y conjugado 1:30,000 en un ELISA de competencia.

### *Paralelismo – Curva estándar y muestra - Ensayo con segundo anticuerpo*

En la gráfica 6 se observan las curvas de desplazamiento obtenidas con muestras extraídas de las diferentes especies. Los resultados mostraron paralelismo para las muestras de ovino, canino, bovino y equino, sin embargo, esto no fue así con la muestra de gallina. La cantidad de muestra a utilizar en cada una de las especies fue de 8.5, 17.5, 38 y 47.6  $\mu$ l para el ovino, canino, bovino y equino respectivamente.



**Gráfica 6:** Paralelismo entre curva estándar y muestras de bovino, ovino, canino, equino y gallina obtenidos en un ELISA con la utilización del segundo anticuerpo.

### *Efecto del tiempo de almacenamiento de placas cubiertas con Segundo Anticuerpo*

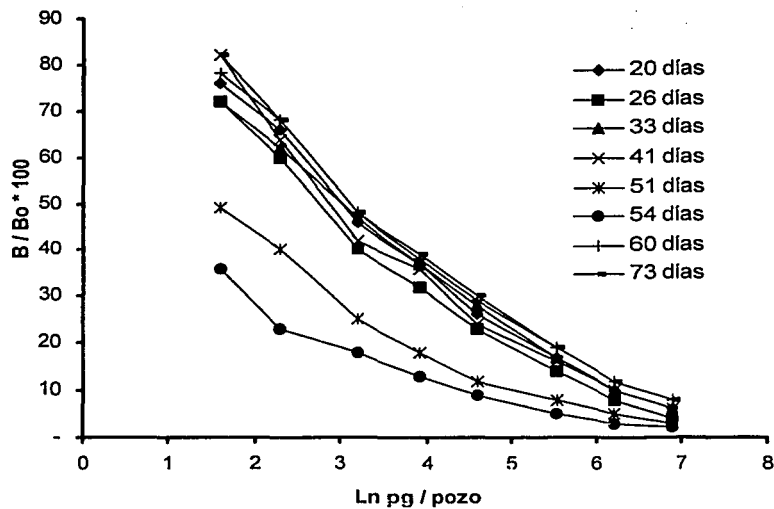
En la gráfica 7 se puede apreciar que el tiempo de almacenamiento de las placas cubiertas con SA hasta por 41 días, no disminuyó la unión total ni modificó los parámetros de la curva estándar. Sin embargo el almacenamiento hasta por 51 días afecta el comportamiento del ensayo.

## VALIDACION DEL ENSAYO

Finalmente los parámetros del ensayo fueron:

**SENSIBILIDAD :** La sensibilidad del ensayo fue de 1.7 pg/pozo.

**EXACTITUD:** La exactitud del ensayo determinada por medio del porcentaje de recuperación se considera como buena, en los controles de calidad alto y medio, ya que se obtuvo el 95.4 y el 95.6%, mientras que para el control de calidad bajo solo se tuvo un 76%.



**Gráfica 7:** Curvas estándar de las placas que fueron almacenadas durante diferentes periodos con amortiguador de fosfatos, después de haberles unido el segundo anticuerpo.

**PRECISION:** La precisión del ensayo se evaluó al determinar los coeficientes de variación intra-ensayo e inter-ensayo, los cuales, se calcularon de 4 ensayos y resultaron ser menores al 10 y 12% respectivamente, cuadro 9.

**Cuadro 9:** Coeficientes de variación intra-ensayo e inter-ensayo.

Control de calidad	Coeficiente de variación	
	Intra-ensayo	Inter-ensayo
Alto	7.73	11.77
Medio	3.97	9.44
Bajo	5.34	8.20

## DISCUSIÓN

El presente estudio demostró que el SA puede ser utilizado para cubrir placas previo a la adición del PA en ensayos de ELISA de competencia.

Se conoce que existen diferentes variantes del ELISA, las cuales se pueden modificar según las necesidades y objetivos que se persigan sin alterar el principio básico, para así obtener mejores resultados al detectar el antígeno o anticuerpo deseado. En algunos de ellas se ha usado el SA, pero generalmente bajo un esquema diferente al aquí propuesto.

En el ELISA indirecto, el SA es marcado con una enzima para identificar al PA que se encontrará en reacción con el antígeno unido a la fase sólida (6).

Por otro lado, en la técnica del sándwich ELISA con doble anticuerpo, el SA se encuentra en fase sólida unido al PA que se adiciona posteriormente, para después incubarlos con el antígeno que será detectado por medio de otro PA, pero que en esta ocasión se encuentra marcado con una enzima. Esta última modalidad generalmente es empleada cuando la obtención del PA es difícil, el cual comúnmente se requiere purificado (31). En el presente trabajo no pudimos observar esta ventaja debido a que el PA que se utilizó ya se encontraba purificado. Sin embargo, el uso del SA puede obviar la purificación del PA sirviendo de manera similar a una columna de cromatografía de afinidad.

Otra alternativa para el uso del SA en el ELISA, es la técnica donde se une el SA a la placa y se realiza un ensayo de competencia como lo reportaron Dhar y col. (8) y Prakash y col. (11). Ellos comprobaron que la adición del SA permite reducir variaciones que se presentan en los ensayos convencionales de competencia, donde se une el PA a la placa y posteriormente se pipetea las muestras, con un desfase de tiempo mientras se completa el proceso. Con el uso del SA se disminuye la variabilidad asociada con la unión desigual del anticuerpo en los pozos y se aumenta la reproducibilidad, al tener el mismo tiempo de incubación en todas las muestras, ya que el PA y la muestra se adicionan simultáneamente (11,8). Aunado a lo anterior, esta variante permite la optimización de los recursos ya que



se puede aumentar la dilución del PA, aumentándose la sensibilidad del ensayo, y disminuir por tanto la cantidad de muestra requerida evitando así posibles interferencias de los componentes del suero en el ensayo. En este trabajo se pudo ver un mejor aprovechamiento del PA, ya que según las indicaciones dadas por la Dra. Munro (quien donó el PA) éste debía utilizarse en una dilución entre 1:10,000 y 1:12,000 y nuestros resultados muestran que puede usarse en 1:24,000.

Lo anterior puede explicarse ya que al realizar la titulación del PA con la técnica del SA se presentó un descenso en las uniones totales de manera paulatina, sin embargo sin el uso del SA se presentó una caída mas pronunciada. Suponemos que al emplear el SA, los sitios de unión de la placa son saturados con el SA, permitiendo la unión del anticuerpo específico o PA con una mejor exposición de los sitios de unión. Lo anterior repercutirá en una mayor unión total y menor cantidad de PA necesario en comparación a la técnica en la que se une el PA directamente a la placa (11).

Adicionalmente, el PA es mas costoso por ser producido mediante la inmunización de especies pequeñas como el conejo, obteniéndose menores volúmenes de suero, que los que se obtienen en especies mayores en los que se produce el SA, como lo comprobó Velasco (28). Por lo tanto el utilizar la técnica del SA permite economizar el PA y por ende bajar los costos del ensayo.

La sensibilidad de la curva estándar obtenida con SA no cambió en comparación a la curva estándar obtenida sin el uso del SA al realizarse bajo las mismas condiciones.

Los rangos de concentración de testosterona así como de otras hormonas varían de acuerdo a la especie (25), para adaptar un ensayo a una especie determinada se puede modificar la sensibilidad de la curva estándar variando la dilución del PA. Sin embargo, el límite de sensibilidad propuesto en este trabajo permite su utilización para la mayoría de las especies domésticas (bovino, ovino, canino y equino), por lo cual es posible su utilización rutinariamente sin necesidad de realizar modificaciones.

Por otro lado, generalmente los anticuerpos empleados en un inmunoensayo requieren de su purificación, la cual se realiza en el laboratorio implicando cierto

tiempo y por tanto un mayor costo. En este estudio se vio que este proceso se puede evitar debido a que al comparar el uso del SA purificado y sin purificar no se observó diferencia o mejoría cuando se sometió a dicho tratamiento (ver gráfica 4).

Se ha informado que el empleo del SA permite que las placas puedan ser guardadas durante 4 semanas al añadir 150  $\mu$ l de amortiguador de fosfatos por pozo (8). Otro trabajo sugiere que es posible almacenarlas con 300  $\mu$ l de amortiguador de fosfatos durante el mismo tiempo, a 4°C o congeladas a -20°C después de haber unido el SA y PA a la placa (7). En este estudio, después de haber unido el SA, las placas se lavaron, se le adicionaron 50  $\mu$ l/pozo de amortiguador de fosfatos y se sellaron con una mica adherible durante 41 días. El almacenamiento no afectó las características del ensayo. El tiempo de almacenaje supera lo propuesto por Dhar y Voss y Cooper y Trunkfield bajo condiciones similares. Sin embargo, es menor al tiempo establecido cuando la placa se almacena sin líquido, tal es el caso de Van de Wiel and Koops (4) quienes al secar las placas con aire después del lavado y almacenarlas en bolsas selladas con un absorbente de humedad a 4°C, informan que los platos fueron estables durante 10 semanas, o el de Dahr y Voss quienes indican una duración de 6 meses sin son liofilizadas y guardadas a 4°C en bolsas de plástico con un absorbente de humedad.

Los periodos de incubación o reacción que se trabajaron en este estudio se basaron en la técnica descrita por Munro y col. (16) y se adaptó la adición del SA. La adsorción del SA a la placa y la primera reacción inmunológica entre el SA-PA ocurrieron durante una noche cada una. Así mismo, la segunda reacción inmunológica del PA-hormona (ya sea de la muestra o del conjugado) y la enzimática se realizaron en 2 y 1 horas respectivamente, siendo la duración aproximada del ensayo de 3 días. Esta es una gran diferencia con Dhar y col. (8) quienes realizaron mediciones de cortisol con la técnica del SA aproximadamente en 5 horas de ensayo en un día de trabajo (90 min de adsorción, 45 min de reacción del SA-PA, 2 horas de reacción del PA-hormona y 30 min del sustrato). Sin embargo, en dicho trabajo aunque se abrevió el tiempo para la realización del ensayo, se obtuvo una mayor dispersión en los resultados (Coeficiente de variación (C.V.) intraensayo: control

alto 3.1 y control bajo 14.7%, C.V. interensayo: control alto 6.8 y control bajo 14.1%), en comparación con los valores obtenidos en el presente trabajo ( C.V. intraensayo: control alto 7.73 y control bajo 5.34 %, C.V. interensayo: control alto 11.77 y control bajo 8.20%). De igual forma la sensibilidad que obtuvieron fue de 5 pg/pozo, mientras que la de este trabajo fue de 1.7 pg/pozo. De acuerdo a estas observaciones, al disminuir el tiempo del ensayo se ven afectadas la precisión y sensibilidad, por lo que es preferible tener mayores tiempos de incubación cuando se realicen las mediciones de testosterona en las que se utilicen muestras de machos bovino, ovino, canino y equino.

## CONCLUSIONES

La utilización del segundo anticuerpo en el ELISA de competencia para medir testosterona permite aumentar la sensibilidad y disminuir la variabilidad del ensayo, de esta forma es optimizado el PA y la muestra en estudio. Además de que las placas cubiertas con SA pueden ser utilizadas para diferentes ensayos y pueden ser almacenadas hasta por 41 días, sin detrimento de las características del ensayo.

## LITERATURA CITADA

1. Hafez ESE. Reproducción e inseminación artificial en animales. 5ª ed. México: Interamericana-McGrawHill, 1989.
2. Smith KD and Rodríguez-Rigau LJ. Laboratory evaluation of testicular function. In: DeGroot LJ. Endocrinology 3. United States of America: Grune and Stratton, 1979: 1539-1546.
3. Nachreiner RF. Laboratory endocrine diagnostic procedures in theriogenology. In: Morrow DA. Currenty terapy in theriogenology 2. Diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals. United States of America: W.B. Saunders, 1986:17-20.
4. Van de Wiel and Koops W. Development and validation of an enzyme immunassay for progesterone in bovine milk or blood plasma. Anim Reprod Sci 1986; 10:201-213.
5. Kimball JW. Introduction to immunology, 3th ed. United States of America: Macmillan Publishing Co., 1990.
6. Burgess GW. ELISA thechnology in diagnosis and research. Australia: James Cook University of North Queensland, 1988.
7. Cooper TR, Trunkfield HR, Zanella AJ and Booth WD. An enzyme-linked immunosorbent assay for cortisol in the saliva of man and domestic farm animals. J Endocrinol 1989; 123: R13-R16.
8. Dhar TK, Voss E and Schöneshöfer M. Simultaneous enzyme immunoassay of cortisol and dehydroepiandrosterone-sulphate from a single serum sample using a transferable solid phase system. J Steroid Biochem 1986; 25:423-427.
9. Prakash BS, Meyer HHD, Schallenberger E and Van de Wiel DFM. Development of a sensitive enzyme immunoassay (EIA) for progesterone determination in unextracted bovine plasma using the second antibody technique. J Steroid Biochem 1987; 28:623-627.
10. Tizard I. Inmunología veterinaria, 3ª ed, México: Interamericana, 1989.
11. Prakash BS, Meyer HHD and Van de Wiel DFM. Sensitive enzyme immunoassay of progesterone in skim milk using second-antibody technique. Anim Reprod Sci 1988; 16:225-235.
12. Engvall E and Perlmann P. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry 1971; 8:871.
13. Van Weeman BK and Schuurs MHWM. Immunoassay using antigen enzyme conjugates. FEBS Lett 1971; 15:235.
14. Nieto A y Carbonetto CH. Enzimoinmunoensayo (ELISA). En: Margni RA. Inmunología e inmunoquímica. Buenos Aires: Médica Panamericana, 1989: 571.
15. Nakamura RM, Voller A and Bidwell DE. Enzyme immunoassays: heterogenous and homogeneous systems. In: Weir DM. Immunochemistry. Great Britain: Blackwell

Scientific Publications, 1986:27.1-27.18

16. Munro C and Stabenfeldt G. Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J Endocrinol* 1984; 101:41-49.
17. Bunch DS, Rocke DM and Harrison RO. Statistical design of ELISA protocols. *J Immunol Methods* 1990; 132:247-254.
18. Henricks DM, Mayer DT. Hormonas gonadales y factores uterinos. En: Cole HH, Cupps PT. Reproducción de los animales domésticos. España: Acribia, 1984.
19. Libertun C Radioinmunoanálisis. Fundamentos y aplicaciones. Argentina: López librerías editores, 1980.
20. Ramírez ILN, Faccio G. Determinación directa de testosterona en suero sanguíneo de machos bovinos. *Revista de Agronomía (LUZ)* 1990;7:255-263.
21. Barrett JT. Textbook of immunology and introduction to immunochemistry and immunobiology. 4<sup>th</sup> ed, United States of America: The CV Mosby Company, 1983.
22. Marckham CL and Donald SC. The male sex accessory tissues. Structure, androgen action and physiology. In: Knobil E, Neill JD. The physiology of reproduction 1. New York: Raven Press, 1994.
23. García SA. Fisiología Veterinaria. España: Interamericana-McGrawHill, 1995.
24. Lamming GE. Reproduction in the male. In: Marshall's physiology of reproduction. 4a. ed. U.K.: Churchill Livingstone, 1990.
25. Pineda MH. Reproducción del macho. En: McDonald LE. Endocrinología veterinaria y reproducción. 4<sup>o</sup> ed. México: Interamericana-McGrawHill, 1989: 1-17.
26. Etches RJ. Reproduction in poultry. Cab. International Cambridge, 1996.
27. Cunningham FJ. The plasma concentrations of testosterone and LH during the ovulation cycle of the hen (*Gallus domesticus*). *Acta Endocrinológica* 1977, 84:357-366.
28. Velasco MJR. Desarrollo y validación de segundo anticuerpo como método de separación entre trazador unido y libre en un radioinmunoensayo de fase líquida (tesis de licenciatura). México: UNAM, 2000.
29. Garvey JS, Cremer NE and Sussdorf DH. Methods in immunology. 3<sup>th</sup> ed. Massachusetts: W.A. Benjamin Inc, 1977.
30. Bedolla TN, Ulloa-Aguirre A, Landeros VJ y Pérez-Palacios G. análisis de datos y control de calidad en el radioinmunoanálisis I. Guía para la evaluación de resultados. *Rev Invest Clin* 1984,36:179-192.
31. Ausubel MF. Current protocols in molecular biology, New York: J Willwy, 1991.

## APÉNDICE 1 METODOLOGÍAS

### *Metodología del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas*

Las soluciones utilizadas en el ensayo se prepararon de acuerdo al apéndice 2.

1. Utilizando pipetas de ocho canales se añadieron 50  $\mu\text{l}$ /pozo del PA diluido en solución amortiguadora de carbonatos, verificando que el fondo quedara cubierto por completo. Dos pozos se dejaron libres de anticuerpo, a los que únicamente se les añadió amortiguador de carbonatos, para obtener la UNE. La placa se incubó a 4°C durante toda una noche.

2. Se vació el contenido de los pozos y se les añadió solución de lavado. El procedimiento se repitió cuatro veces. Al finalizar se sacudió enérgicamente la placa sobre una toalla de papel.

3. Se añadieron 50  $\mu\text{l}$ /pozo de amortiguador de fosfatos a toda la placa.

4. Se añadieron 50  $\mu\text{l}$ /pozo del estándar diluido en el conjugado o de la muestra problema igualmente diluida. A un mínimo de seis pozos por placa se les agregó solo el conjugado para obtener los Bo. Se dejó incubar durante 2 horas a 30°C.

5. La placa se lavó con el procedimiento seguido en el paso 2.

6. Se añadieron 100  $\mu\text{l}$ /pozo de la solución sustrato y se incubó a 30°C durante 1 hora.

7. Se añadieron 100  $\mu\text{l}$ /pozo de la solución ácido hidrofúrico-EDTA a toda la placa para detener la reacción.

8. Se realizó la lectura en un espectrofotometro a una longitud de onda de 405 nm, limpiando previamente por fuera el fondo de la placa para evitar sesgos en la lectura por manchas externas.

***Metodología del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas con la adición del segundo anticuerpo.***

1. Utilizando pipetas de ocho canales se añadieron 50  $\mu$ l/pozo del SA diluido en solución amortiguadora de carbonatos, verificando que el fondo quedara cubierto por completo. Dos pozos se dejaron libres de anticuerpo, a los que únicamente se les añadió amortiguador de carbonatos, para obtener la UNE. La placa se incubó a 4°C durante toda una noche.

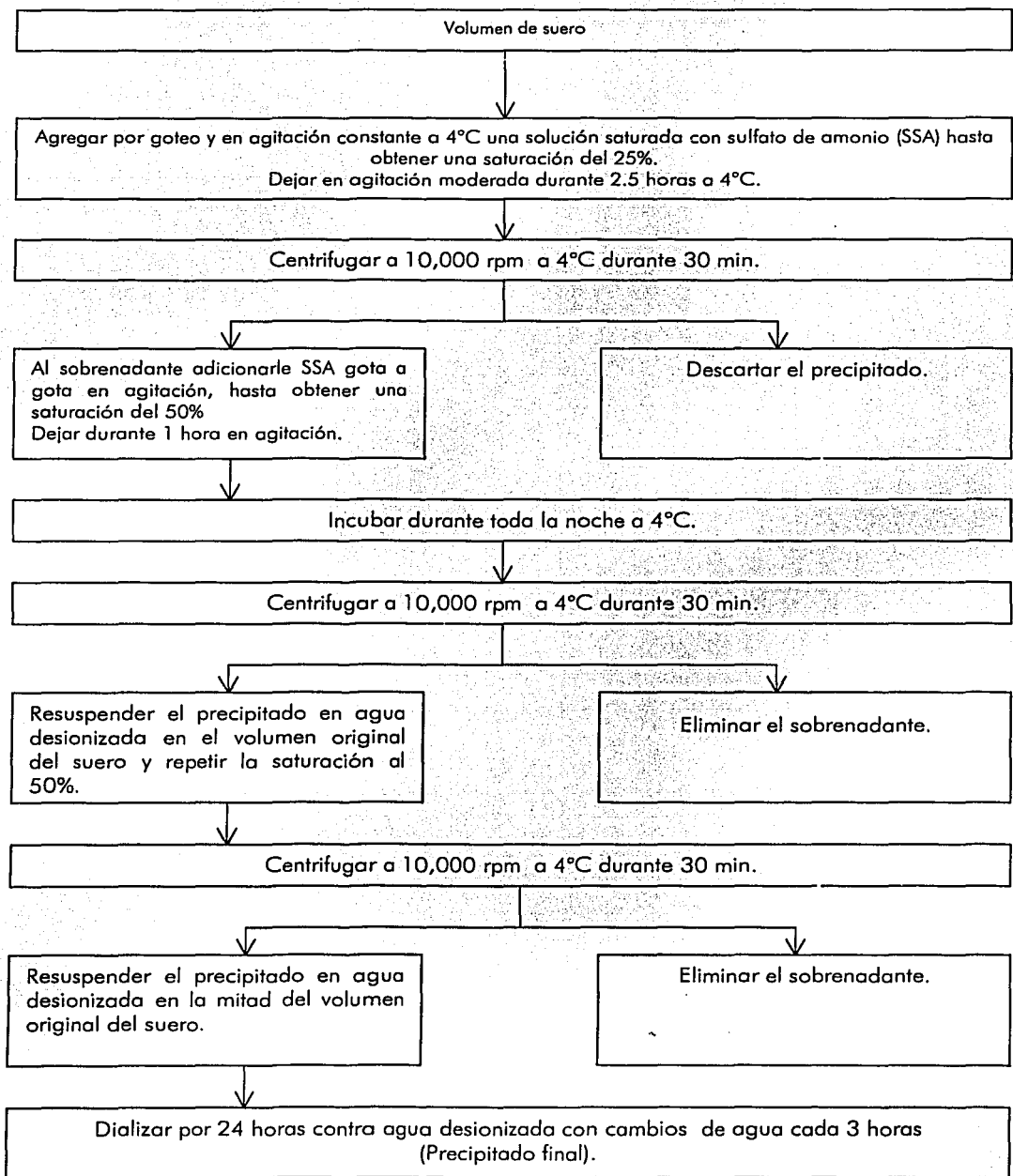
2. La placa se lavó con el procedimiento descrito en el punto dos de la metodología anterior.

3. Se añadieron 50  $\mu$ l/pozo del PA diluido en amortiguador de fosfatos. A las UNE se les agregaron 50  $\mu$ l/pozo de amortiguador de fosfatos, dejando incubar a 4°C durante toda una noche.

4. La placa se lavó y el ensayo se finalizó de acuerdo al procedimiento descrito en la metodología previa.



**Figura 1.** Purificación del SA mediante precipitación con solución saturada con sulfato de amonio.



## APÉNDICE 2

### SOLUCIONES

Solución amortiguadora de carbonatos 0.05 M, pH 9.6		
NaCO <sub>3</sub>	0.795 g	Almacenar a 4°C
NaHCO <sub>3</sub>	1.46 g	
NaN <sub>3</sub>	0.1 g	
H <sub>2</sub> O desionizada	500 ml	

Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.0		
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.2M)	5.421 g	Medir el pH 7.0 antes de agregar el BSA.  Almacenar a 4°C.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.2M)	8.662 g	
NaCl	4.35 g	
BSA	0.5 g	
H <sub>2</sub> O desionizada	500 ml	

Solución madre de lavado (10X)		
NaCl 1.5 M	87.66 g	Almacenar a temperatura ambiente.
Tween 20 0.5%	5 ml	
H <sub>2</sub> O desionizada	1 litro	

Solución de lavado de trabajo		
Sol. Lavado madre	100 ml	Almacenar a temperatura ambiente
H <sub>2</sub> O desionizada	900 ml	

Solución madre de citrato 0.05 M pH 4.0		
Acido cítrico	4.8 g	Ajustar a pH 4.0 con NaOH. Almacenar a 4°C.
H <sub>2</sub> O desionizada	500 ml	

Solución ABTS 40 mM, pH aprox 6.0 Stock		
2-2-azino-di(3-etil-benzo-tiazolina-6-sulfonato) ABTS	0.439 g	Almacenar a 4°C
H <sub>2</sub> O desionizada	20 ml	

Solución de agua oxigenada (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 0.5 M (2%) Stock		
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 8 M (30%)	0.5 ml	Cubrir de la luz. Almacenar a 4°C. Preparar cada mes.
H <sub>2</sub> O desionizada	7.5 ml	

Solución sustrato de trabajo Preparar a partir de las soluciones madre		
Sol. Citrato	12.3 ml	*Añadir momentos antes de cubrir la placa. Debe prepararse después de lavar la placa y debe mantenerse cubierto para evitar la oxidación
Sol. ABTS	125 µl	
Sol. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> *	40 µl	

Solución madre Acido-hidrofluórico 0.15 M		
Acido hidrofluórico (40%)	9.605 g	Ajustar a pH 4.0 con NaOH al 5N. Almacenar a temperatura ambiente.
NaOH 5.0 N	1.2 ml	
H <sub>2</sub> O desionizada	1 litro	

Solución madre EDTA		
EDTA 1M	19 g	Almacenar a temperatura ambiente.
H <sub>2</sub> O desionizada	50 ml	

Solución de parar la reacción de trabajo Preparar a partir de las soluciones madre		
Sol. HF	12.5 ml	Preparar al momento de usar
Sol. EDTA	12.5 µl	

Estándares					
Para formar los estándares, se tomaron 400 µl del estándar original concentración 0.1 mg/ml, que se diluyeron en 3.6 ml de etanol para tener una concentración de 10,000 pg/µl (estándar A). Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas para obtener los estándares B (1,000 pg/µl), C (100 pg/µl), D (10 pg/µl) y E (1 pg/µl).					
Estándar	Concentración final pg/µl	Volumen estándar diluir (µl)	de a ml	Etanol ml	Se mantienen en congelación (-4°C)
A	10,000	400 de 0.1 mg/ml		3.6	
B	1,000	400 de A		3.6	
C	100	400 de B		3.6	
D	10	400 de C		3.6	
E	1	400 de D		3.6	

Estándares de trabajo

Concentración final pg/ 50 µl      ng/ml		Volumen de estándar a diluir(µl)	Volumen de conjugado (ml)	Una vez pipeteados todos los estándares en tubos de vidrio de 12 X 75, evaporar con aire o con nitrógeno, antes de añadir el conjugado. Posteriormente agitar en el vortéx durante 1 minuto
0.5	0.01	25 de E	2.5	
1	0.02	50 de E	2.5	
5	0.1	25 de D	2.5	
10	0.2	50 de D	2.5	
25	0.5	125 de D	2.5	
50	1	25 de C	2.5	
100	2	50 de C	2.5	
250	5	125 de C	2.5	
500	10	25 de B	2.5	
1,000	20	50 de B	2.5	

## APÉNDICE 3

### TRATAMIENTO DE MUESTRAS

Procedimiento para preparar la hormona tritiada y cuantificar la recuperación:

1. A partir de una solución madre, preparar una solución que contenga 10,000 cuentas por minuto (cpm) de testosterona tritiada (T-H<sup>3</sup>) en 100  $\mu$ l de amortiguador de fosfatos con gelatina (EIAB-G).

Tomar 10  $\mu$ l de la solución madre de T-H<sup>3</sup> y agregar 3 ml de líquido de centelleo.

Realizar la lectura en el lector beta para conocer la cantidad de cpm en la solución madre.

Realizar el cálculo para conocer la cantidad necesaria de la solución madre de T-H<sup>3</sup> para preparar una solución con 10,000 cpm en 100  $\mu$ l.

Colocar en un vial la cantidad calculada del stock y evaporarla con nitrógeno.

Resuspender en amortiguador de fosfatos con gelatina e incubar durante 30 min en agua tibia.

2. Colocar la cantidad de suero a extraer, por duplicado, en tubos de vidrio con capacidad de 20 ml.

3. A cada tubo agregar 100  $\mu$ l de la solución que contiene 10 000 cpm de T-H<sup>3</sup>. Por separado colocar 100  $\mu$ l en dos viales de centelleo, para conocer las cuentas totales.

4. Realizar la extracción de acuerdo a la metodología descrita posteriormente.

5. Resuspender en amortiguador de fosfatos de acuerdo a las cantidades indicadas

Cuadro 1

Cantidad de suero a extraer ( $\mu$ l)	Amortiguador fosfatos para agregar ( $\mu$ l) Método 2	Cantidad de éter (ml)		Amortiguador fosfatos para resuspender ( $\mu$ l)		Cantidad de muestra a cuantificar ( $\mu$ l)	
		Método 1	Método 2	Método 1	Método 2	Método 1	Método 2
3,000	10,000	3	5	1,000	2,000	100	100
1,000	4,000	3	5	334	2,000	100	100
100	400	2	5	150	2,000	50	100

en el cuadro 1.

6. En un vial colocar la cantidad de muestra ya resuspendida, indicada en el cuadro 5.

7. Agregar 3 ml de líquido de centelleo a cada vial, incluyendo a los que serán utilizados para determinar las cuentas totales.

8. Realizar la lectura en el contador b para conocer las cpm que reflejarán la recuperación de la T-H<sup>3</sup>.

Los métodos de extracción que se probaron se desarrollaron como a continuación se describe:

#### **Procedimiento 1**

1. A cada tubo agregar éter etílico de acuerdo a las cantidades indicadas en el cuadro 1 de éste apéndice

2. Agitar durante 30 segundos en el vórtex

3. Congelar con hielo seco y acetona

4. Decantar el sobrenadante y dejar evaporar hasta la sequedad durante toda la noche

#### **Procedimiento 2**

1. Agregar al suero la cantidad indicada de amortiguador de fosfatos en el cuadro 1 de este apéndice

2. Agregar la cantidad de éter anhídrido indicada en el cuadro 1 de éste apéndice

3. Agitar durante 30 segundos en el vórtex

4. Congelar con hielo seco y acetona

5. Decantar el sobrenadante y dejar evaporar hasta la sequedad durante toda la noche

De acuerdo a los resultados obtenidos se decidió probar el procedimiento 1 con éter etílico y éter anhídrido, recién abierto y con varios días de estar abierto.

El porcentaje de recuperación al utilizar éter etílico con el procedimiento 1 para 100, 1 000 y 3 000  $\mu$ l fue de 85.3, 5 y 16.7% y para el procedimiento 2 de 76.12 y 28.37 para 100 y 3000  $\mu$ l de muestra. Al obtener estos resultados se decidió que para los ensayos de este estudio se utilizara el procedimiento 1 utilizando los 2 éteres en muestras de 100 y 1 000  $\mu$ l para los cuales con el éter etílico nuevo se tuvo una recuperación de 51.5 y 59.4% y para el éter viejo de 27 y 30%. Con el éter anhídrido nuevo se tuvieron las recuperaciones de 53 y 90.85% y con el viejo de 85 y 93.5%, por lo que se decidió utilizar el procedimiento 1 con éter anhídrido.

## APÉNDICE 4 RESULTADOS

Porcentaje de unión de los diferentes puntos de las curvas estándar de la gráfica 1

Anticuerpo	Conjugado	pg / 50 µl de estándar							
		50	10	25	50	100	250	500	1,000
		Porcentaje de unión en cada estándar							
1:12,000	1:60,000	71	53	35	24	17	11	4	2
1:18,000	1:40,000	60	48	40	30	20	18	9	7
1:24,000	1:30,000	84	58	40	31	21	14	8	9

Porcentajes de unión y cantidades de muestra utilizadas para cubrir los puntos de la curva de paralelismo de la gráfica 2.

	pg / pozo de estándar							
Estándar	5	10	25	50	100	250	500	1,000
% Unión	70	52	37	25	18	12	7	6
	µl de muestra / pozo							
Bovino	0.7	1.5	3.7	7.5	14.9	37.3	74.6	149.3
% Unión	81	68	59	39	32	24	15	15
Ovino	1	1.9	4.8	9.6	19.2	48.08	96.2	192.3
% Unión	100	87	76	58	56	31	24	13
Canino	2.3	4.5		11.4	22.7		45.4	113.6
% Unión	73	64		48	36		30	28
Equino	2.4	4.8		11.9	23.8		47.62	----
% Unión	95	91		100	80		67	----

Porcentaje de unión de los diferentes puntos de las curvas estándar de la gráfica 4.

Curva	pg/50 µl de estándar							
	5	10	25	50	100	250	500	1,000
Con SA	94	81	61	42	27	15	10	5
Sin SA	89	73	51	36	27	17	11	7

Porcentajes de unión y cantidades de muestra utilizadas para cubrir los puntos de la curva de paralelismo de la gráfica 6.

	<b>pg / pozo de Estándar</b>					
Estándar	5	10	50	100	500	1,000
% Unión	77	62	32	25	9	5
	<b>µl de muestra / pozo</b>					
Bovino	0.7	1.5	7.5	14.9	74.6	149.3
% Unión	96	91	79	64	38	25
Ovino	1	1.9	9.6	19.2	96.2	192.3
% Unión	86	77	45	33	16	8
Canino	2.3	4.5	22.7	45.5	227.3	454.5
% Unión	89	74	42	35	18	8
Equino	2.4	4.8	23.8	47.6	238.1	476.2
% Unión	96	96	72	54	36	23
Gallina	10	20	100	200	1,000	2,000
% Unión	92	85	55	51	42	38

Coefficientes de variación de las 4 primeras placas guardadas con amortiguador de fosfatos después de ser cubiertas con SA.

<b>Estándar</b>	<b>Intra-ensayo</b>				<b>Inter-ensayo</b>	
	<b>Semana 1</b>	<b>Semana 2</b>	<b>Semana 3</b>	<b>Semana 4</b>	<b>Promedio</b>	
Alto	11.10	5.34	4.44	9.04	7.48	4
Medio	10.40	5.62	8.45	15.65	10.03	7
Bajo	9.63	3.41	11.00	7.99	8.00	9