



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES PARA LA
DETERMINACIÓN DE PROLACTINA OVINA Y SU
VALIDACIÓN EN UN ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA

PAOLA VILLARRUEL GUEVARA

TUTORA PRINCIPAL

ANA DELIA RODRÍGUEZ CORTEZ - FMVZ

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

SARA DEL CARMEN CABALLERO CHACÓN - FMVZ

JUAN CARLOS CARPIO PEDROZA - InDRE

CIUDAD UNIVERSITARIA CD. MX.

ABRIL 2017



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 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.

DEDICATORIAS

Se la dedico especialmente a mi mamá que es la persona que me ha impulsado toda la vida a seguir creciendo personal y profesionalmente, ella que siempre ha creído en mi, ella la persona que más admiro, la mejor mamá del mundo.

A mi tía Margarita, por ser mi segunda madre, por su amor, por apoyarme siempre y por ayudarme a cumplir mis sueños.

A Tulio Lot, mi pareja en más de la mitad de mi vida, gracias a su amor y apoyo incondicional he podido alcanzar esta meta en mi vida, gracias por ser tan afortunada y dejarme crecer junto a ti.

A mis hermanos, Juan Carlos, Edgar, Erika y Erandi N. con los que he compartido toda la vida y que los quiero tanto.

A mis sobrinos, Jorge Emilio, Sara Paulina, Leonardo, Valeria y Daniela Sofía, que mi vida no sería lo mismo sin la sonrisa que me regalan cada día.

A Karina y a Rubén que ahora son parte de mi familia y que sin su ayuda no tendría a esos sobrinos tan hermosos.

A mi Tío Javier por todo su amor y apoyo en mi vida.

A mis primos María Elena, Alejandra, Iván, Diana, Rodrigo y David que me alegran el corazón en cada reunión.

A Lauri, Jaime y Santiago por dejarme ser parte de su familia.

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto PAPIIT IN-219412, por el financiamiento otorgado para desarrollar esta tesis.

Al CONACYT por otorgarme la beca que me permitió realizar mis estudios de posgrado.

A la Dra. Ana Delia por ser mi tutora, mi maestra, mi amiga, por su paciencia y dedicación con la que me enseñó todo en el laboratorio de reproducción.

A la Dra. Yolanda Medina que me recibió como una más de sus hijas que llegan al instituto, por toda la confianza y por todo lo que me enseñó durante mi estancia en el InDRE.

Al Dr. Javier Valencia, gracias por ser mi tutor y por todo su apoyo en la maestría.

Al Dr. Antonio Roldán por su amistad, por la ayuda con mi tesis, por la confianza que me tuvo para realizar este proyecto, que de no haberlo encontrado en el pasillo, no estaría aquí.

Al Dr. Juan Carlos Carpio, por sus comentarios, clases y enseñanzas para mi formación y por estar conmigo en todo este proceso.

A la Dra. Sara Caballero por aceptar ser parte de mi comité tutor de último momento y por su apoyo y por dedicar tiempo para realizar correcciones a mi tesis.

Al Dr. Alfredo Sahagún del departamento de microbiología e inmunología y al Dr. Juan J. Mosqueda de la Universidad Autónoma de Querétaro, por ser parte de mi jurado y por sus sugerencias y comentarios para mi tesis.

A todo el personal del InDRE, a Olguita, a Edith†, al Sr. Mario, a Lolita.

Agradezco a mis amigos del InDRE; Malusita, Argie, Anita, Adri y Jessi, que han estado conmigo en todo este proceso y con los que también he compartido una gran amistad que espero sea para toda la vida.

Con mayor énfasis agradezco a la Biol. Jessica Alemán F. por realizar su servicio social conmigo y que sin su ayuda en este proyecto, no hubiera sido lo mismo.

A Francisco Javier y Luis Daniel por su amistad y por todos esos agradables momentos que compartimos durante mi estancia en el InDRE.

A mis amigos de la FMVZ: Héctor, Fernando, Dafne, Adriana, Jocelyn, Pablo, Liz, Toño, Erika, Angélica, Axel, Andrea y Ceci por las risas que me sirvieron cuando me sentía muy estresada.

Sobretudo gracias a Juan Manuel GH, mi mejor amigo y compañerito de maestría que siempre estuvo conmigo ayudándome con sus conocimientos, apoyo moral y a que el estrés fuera menos durante la maestría.

A Juan MV por sus clases extra de estadística (mi tortura en la maestría).

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
Justificación.....	4
HIPÓTESIS.....	4
Objetivos.....	4
MARCO TEÓRICO.....	5
PROLACTINA.....	5
Sitio de síntesis.....	5
Genes y estructuras.....	6
Estructura primaria.....	7
Estructura secundaria.....	7
Estructura terciaria.....	7
Receptor de prolactina.....	8
Funciones biológicas.....	9
Reproducción.....	9
Lactación.....	9
Comportamiento parental.....	10
Homeostasis.....	10
Respuesta inmune.....	10
Osmoregulación.....	11
Angiogenésis.....	11
ANTICUERPOS.....	11
Anticuerpos policlonales.....	13
INMUNOENSAYOS.....	14
Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).....	15
Ensayo inmunoenzimático de tipo competitivo.....	16
Estandarización y validación.....	17
Aplicaciones del ensayo inmunoenzimático en las determinaciones hormonales en la medicina veterinaria.....	18
ESTACIONALIDAD.....	19
Fotoperiodo.....	20
OVINOS.....	21
Oveja Pelibuey.....	22
MATERIAL.....	23
Reactivos.....	23
Consumibles.....	23
Animales.....	23

METODOLOGÍA.....	24
Inmunización y toma de muestras.....	24
ELISA indirecta para la determinación de anticuerpos.....	24
Obtención del volumen total sanguíneo (sangrado a blanco).....	25
Purificación de los anticuerpos policlonales IgG.....	25
Biotinilación de prolactina ovina.....	26
Ensayo inmunoenzimático de tipo competitivo.....	27
Validación.....	28
Sensibilidad.....	28
Especificidad.....	28
Calidad de la curva estándar.....	28
Precisión.....	29
Repetibilidad (r).....	29
Reproducibilidad (R).....	30
Estabilidad de la muestra ante ciclos de congelación-descongelación.....	30
RESULTADOS.....	31
Especificidad.....	32
Estandarización.....	33
Límite inferior de cuantificación o sensibilidad.....	34
Curva estándar.....	34
Validación del ensayo inmunoenzimático de tipo competitivo.....	35
Precisión.....	35
Reproducibilidad (R).....	36
Repetibilidad (r).....	36
Estabilidad de la muestra ante ciclos de congelación-descongelación.....	36
Prueba de hipótesis.....	38
DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIÓN.....	42
LITERATURA CITADA.....	43
ANEXOS.....	46
Anexo 1. Procedimientos.....	46
Procedimiento para la inmunización del conejo.....	46
Procedimiento para la toma de muestra sanguínea al conejo.....	46
Anexo 2. Soluciones.....	47
Soluciones para la prueba de ELISA de tipo indirecta para determinar anticuerpos	47
Soluciones para la purificación de los anticuerpos policlonales.....	48
Soluciones para la biotinilación para prolactina ovina.....	49
Soluciones para el ensayo inmunoenzimático de tipo competitivo.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Población celular de la hipófisis anterior.....	5
Figura 2. Estructura primaria de la prolactina. Secuencia de aminoácidos de la prolactina ovina.....	6
Figura 3. Estructura terciaria de la prolactina humana.....	8
Figura 4. Estructura básica del anticuerpo IgG.....	12
Figura 5. Actividad reproductiva estacional de las ovejas.....	20
Figura 6. Oveja Pelibuey.....	22
Figura 7. Procedimiento de diálisis realizado en la purificación de los anticuerpos.....	26
Figura 8. Medición de la respuesta inmune del conejo con relación a la inmunizaciones con prolactina ovina.....	31
Figura 9. Purificación de los anticuerpos policlonales contra prolactina ovina.....	32
Figura 10. Reacción cruzada de los anticuerpos policlonales contra PRL _o con GHO y LHO.....	33
Figura 11. Anticuerpos policlonales contra PRL _o 1µg/ml.....	33
Figura 12. Curva estándar de PRL _o	34
Figura 13. Estabilidad de la muestra ante ciclos de congelación-descongelación.....	37
Figura 14. Porcentaje de pérdida del analito en cada ciclo de congelación-descongelación.....	37
Figura 15. Porcentaje restante después de cada ciclo de congelación-descongelación...38	38

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Concentraciones de las fracciones colectadas de la solución de elución.....	32
Cuadro 2. Coeficiente de variación inter-ensayo para blanco, control bajo y alto.....	35
Cuadro 3. Coeficiente de variación intra-ensayo para el control bajo y alto.....	36
Cuadro 4. Valores obtenidos en ng/ml en la prueba de estabilidad.....	36
Cuadro 5. Porcentaje de pérdida de los controles en la prueba de estabilidad.....	37
Cuadro 6. Porcentaje restante de los controles en la prueba de estabilidad.....	37
Cuadro 7. Prueba de hipótesis para control bajo.....	38
Cuadro 8. Prueba de hipótesis para control alto.....	38

RESUMEN

PAOLA VILLARRUEL GUEVARA. Producción de anticuerpos policlonales para la determinación de prolactina ovina y su validación en un ensayo inmunoenzimático. Bajo la dirección de: M en C. Ana Delia Rodríguez Cortez

La prolactina es una hormona proteica involucrada en más de 300 funciones en el organismo, tales como lactación, reproducción, homeostasis, crecimiento, desarrollo, metabolismo, regulación endocrina, funciones inmunológicas, recambio en la actividad de folículos pilosos, producción y muda de pelo; en la mayoría de estas funciones participa como indicador estacional. Por esto, es importante generar un ensayo que permita una rápida y confiable determinación de esta hormona en el plasma. Se produjeron anticuerpos policlonales contra prolactina ovina para establecer, estandarizar y validar su uso en un ensayo inmunoenzimático de tipo competitivo. Este tipo de anticuerpos ofrecen la ventaja de ser más tolerantes a cambios menores en el antígeno que los anticuerpos monoclonales, debido al origen heterogéneo que resultan en una colección con diferentes afinidades, isotipos, grados de especificidad y con una gran diversidad para reconocer epítomos sobre el antígeno, además de producirse de una forma relativamente rápida y económica. Los anticuerpos policlonales se produjeron inmunizando siete veces a un conejo con 1 mg/ml de prolactina ovina, se colectó el suero, se purificó y se comprobó su especificidad al probarlos con estructuras homólogas como la GH. El desempeño del ensayo establecido demostró ser estable, repetible y reproducible según la NOM-177-SSA1-2013. Además, las pruebas de estabilidad de las muestras ante los ciclos de congelación y descongelación demostraron que el analito es muy sensible a ellos. Los coeficientes de variación intra-ensayo fueron de 6.5% para el control bajo y 1.2% para el control alto y para el inter-ensayo de 4.4% para el control bajo y 3.9% para el control alto. La sensibilidad del ensayo fue de 3.104 ng/ml y la curva estándar generada fue de 2.6 a 1,350 ng/ml de prolactina ovina. Con estos resultados, el presente trabajo representa el establecimiento inicial de un panel para la determinación múltiple de analitos de importancia reproductiva en las ovejas con el uso de la técnica Luminex y poder tener un perfil integrado de hormonas que conduzca a dilucidar algunos eventos fisiológicos relacionados con la estacionalidad en las ovejas.

Palabras clave: anticuerpo policlonal, prolactina, ensayo inmunoenzimático de tipo competitivo, oveja.

ABSTRACT

Paola Villarruel Guevara. Production of polyclonal antibodies for the determination of ovine prolactin and its validation in an enzyme-linked immunosorbent assay. Under the direction of: M.Sc. Ana Delia Rodríguez Cortez

Prolactin is a protein hormone involved in over 300 organism functions, such as lactation, reproduction, homeostasis, growth, development, metabolism, endocrine regulation, immunological response, interchange on the hair follicles activity, production and hair moulting; in most of these functions participates as a seasonal indicator. For this reason, it is important to generate a test that allows a quick and reliable determination of this hormone in plasma. Polyclonal antibodies against ovine prolactin was produced in order to establish, standardize and validate its use on a competitive immunoassay. These antibodies offers the advantage of being more tolerant to minor changes on the antigen than the monoclonal antibodies, because of his heterogeneous origin we have a different isotype and affinity spots collection, different specificity degrees and whit a great diversity to recognize epitopes over the antigen, with the advantage of a relatively quick and economical production. The polyclonal antibodies were produced immunizing a rabbit seven times with of ovine prolactin on 1 mg/ml dose, the serum was collected, purified and tested for specificity using homologous structures like GH. The assay proves to be stable and replicable according to NOM-177-SSA1-2013. In addition to the stability tests of sample to cycles of freezing and thawing showed that the analyte is very sensitive to them. The variations coefficient for the intra-assay is 6.5%for the low control and 1.2% for the high control and for the inter-assay 4.4% for the low control and 3.9% for the high control. The assay sensibility was 3.104 ng/ml, and the resulting standard curve was 2.6 at 1350 ng/ml of ovine prolactin. With these results, the present research represents the initial establishment of a multiple analyte determination panel on sheep reproduction using the Luminex techniques and to be able to have an integrated hormone profile that could lead us to elucidate some of the fisiological events directly related to the seasonality in sheep.

Key words: polyclonal antibodies, prolactin, competitive immunoenzymatic assay, sheep.

INTRODUCCIÓN

El ovino doméstico (*Ovis aries*) es una de las especies de animales que han brindado beneficios y satisfactores a la humanidad, durante miles de años sus fibras y pieles se han aprovechado al máximo, de igual forma su carne y leche (López *et al.*, 2012). En consecuencia, es primordial conocer el comportamiento reproductivo de los ovinos para hacer más eficientes las unidades de producción.

La oveja es una especie poliéstrica estacional, reproductora de días cortos, por consiguiente su actividad reproductiva es durante la época de otoño-invierno y su actividad anovulatoria en primavera-verano (Arroyo, 2011). El origen de la raza y la latitud geográfica son los principales factores que determinan el comportamiento reproductivo estacional (López Sebastián *et al.*, 1993); por lo tanto, las razas originarias de latitudes mayores a 50° presentan una marcada estacionalidad reproductiva y los ovinos de origen tropical, expresan estacionalidad reproductiva reducida y en ocasiones nula (Arroyo *et al.*, 2007), como es el caso de la oveja de pelo de la raza Pelibuey, de origen ecuatorial, extensamente distribuida en nuestro país.

La información sobre los cambios en la duración del día a lo largo del año llega a los animales a través de múltiples vías neuronales que determinan los perfiles estacionales de secreción de distintas hormonas como melatonina y prolactina (PRL). El fotoperiodo es la señal ambiental más utilizada por los animales, para poder sincronizar los ciclos estacionales de diversos eventos biológicos, como la reproducción (Lincoln, 1992). El fotoperiodo controla también la secreción de prolactina, una hormona clave involucrada en el proceso de la actividad reproductiva, aumenta durante los días largos (primavera-verano) y disminuye en los días cortos (otoño-invierno), actuando como indicador estacional (Lincoln *et al.*, 1999).

En consecuencia, la determinación de las concentraciones plasmáticas de prolactina en ovejas en las distintas épocas del año, es muy importante para mejorar el conocimiento sobre su papel en la reproducción. Estas concentraciones se pueden determinar mediante diversos tipos de técnicas como RIAh, quimioluminiscencia, ensayos inmunoenzimáticos de tipo directo, indirecto, sándwich o competitivo, usando anticuerpos policlonales, monoclonales o recombinantes. Sin embargo, al no tener la disponibilidad de un ensayo para la medición de esta hormona, surge la necesidad de producir anticuerpos

policlonales contra prolactina ovina para estandarizar y validar un ensayo inmunoenzimático de tipo competitivo, que sea eficiente, sencillo y barato que nos permita determinar el perfil anual de esta hormona, principalmente en ovejas con reducida estacionalidad reproductiva.

Justificación

El propósito del presente estudio es producir y validar anticuerpos policlonales contra prolactina ovina mediante un ensayo inmunoenzimático de tipo competitivo para determinar las concentraciones plasmáticas de prolactina en las ovejas.

HIPÓTESIS

Los anticuerpos policlonales para prolactina ovina son efectivos para la determinación de esta hormona mediante un ensayo inmunoenzimático de tipo competitivo.

Objetivos

1. Producir anticuerpos policlonales contra prolactina ovina.
2. Estandarizar un ensayo inmunoenzimático de tipo competitivo para determinar la concentración de prolactina plasmática en ovejas.
3. Validar los anticuerpos policlonales mediante un ensayo inmunoenzimático de tipo competitivo.

MARCO TEÓRICO

PROLACTINA

La prolactina es una de las primeras hormonas de la hipófisis en purificarse e identificarse, hace cerca de 80 años y se nombró “pro-lactina” por sus acciones estimuladoras en el desarrollo de la glándula mamaria y en promover la lactación en respuesta del estímulo de succión de las crías hambrientas de los mamíferos (Gregerson, 2006). Es una hormona polipeptídica sintetizada y secretada por los lactotrofos células especializadas de la hipófisis anterior, pero no exclusivamente, ya que otros órganos y tejidos en el cuerpo tienen esta capacidad, como por ejemplo el cerebro (en el telencéfalo, corteza cerebral, el tallo cerebral, el cerebelo y la médula espinal), la placenta, el amnios, la decidua, el útero, la glándula mamaria, la próstata, el tejido adiposo y el sistema inmune (Freeman *et al.*, 2000).

Sitio de síntesis

Las células de la hipófisis anterior son las encargadas de sintetizar y secretar prolactina, inicialmente fueron descritas por microscopía usando técnicas de tinción convencional. Estas células, se designaron lactotrofos o mamotrofos y comprenden entre el 20-50% de la población celular de la hipófisis anterior (**Figura 1**), dependiendo del sexo y el estatus fisiológico del animal.

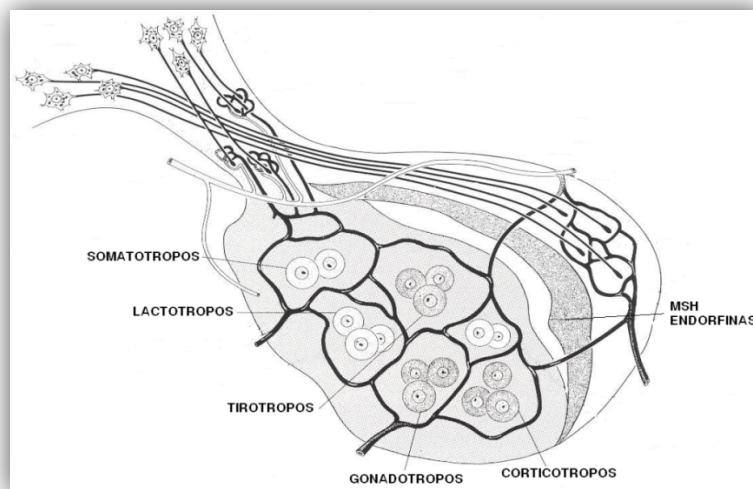


Figura 1. Población celular de la hipófisis anterior.

Los lactotropos fueron subsecuentemente identificados inequívocamente mediante inmunocitoquímica de la hipófisis anterior de ratón, rata y humano, usando anticuerpos específicos para prolactina por especie. Ontogénicamente los lactotropos descienden de Pit-1 dependientes del linaje de las células pituitarias junto con somatotropos y tirotropos (Freeman *et al.*, 2000).

Genes y estructuras

De acuerdo a su característica genética, estructural y funcional, la prolactina pertenece a la familia de la hormona del crecimiento (GH) y lactógenos placentarios. Los genes que la codifican, al igual que para la hormona del crecimiento y los lactógenos placentarios, involucran un gen ancestral común mediante duplicación génica. La diferencia de linaje entre la prolactina y la hormona del crecimiento, ocurrió hace 400 millones de años. En el genoma humano se ha encontrado un solo gen, en el cromosoma 6, que codifica para prolactina, este tiene un tamaño de ~10 kb y está compuesto por 5 exones y 4 intrones, en tanto que el gen de GH es más pequeño (~2 kb), (Gregerson AK, 2006). La transcripción del gen de prolactina es regulado por 2 regiones promotoras independientes. La región proximal de 5,000 bp dirige la expresión específica en hipófisis, mientras que una región promotora más arriba es responsable de la expresión extrahipófisis (Freeman *et al.*, 2000).

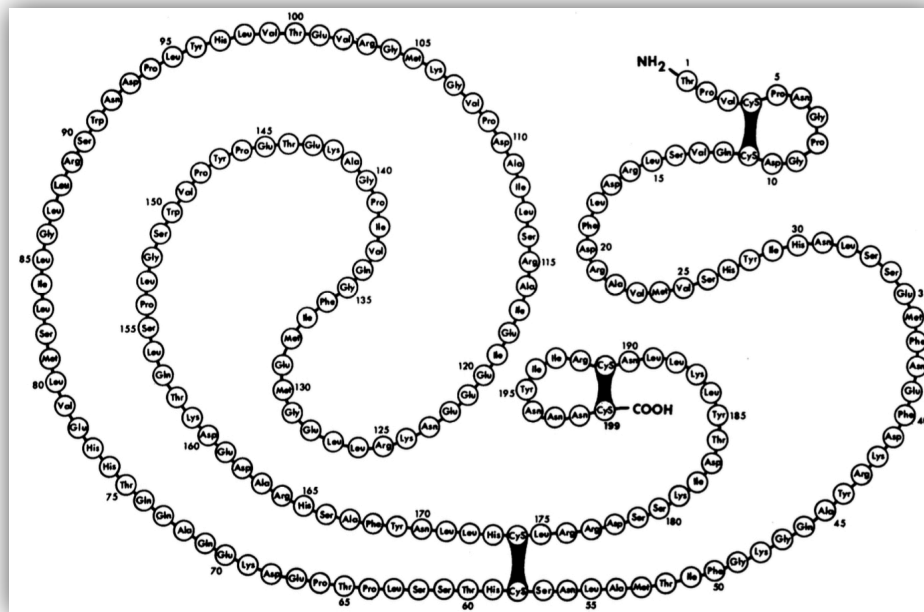


Figura 2. Estructura primaria de la prolactina. Secuencia de aminoácidos de la prolactina ovina (Birk *et al.*, 1978)

Estructura primaria

La estructura primaria de prolactina ovina consta de 199 aminoácidos (**Figura 2**). Es una molécula compuesta por una sola cadena de aminoácidos con 3 puentes disulfuro intramoleculares entre 6 residuos de cisteína (cisteína4-cisteína11, cisteína58-cisteína174, y cisteína191-cisteína199). La homología de la secuencia puede variar desde un 97% entre primates, hasta 56% entre primates y roedores. En ratas y ratones, la prolactina de la hipófisis anterior consta de 197 aminoácidos, mientras que en ovejas, cerdos, vacas y humanos, esta se compone de 199 aminoácidos, con una peso molecular de 23,000 Da (Freeman *et al.*, 2000).

Estructura secundaria

El contenido de la estructura secundaria está compuesta por cuatro grandes α -hélices, los aminoácidos que las conforman van de la leucina15 a arginina43 (Hélice 1), lisina78 a arginina103 (Hélice 2), alanina111 a valina137 (Hélice 3) y ácido glutámico161 a isoleucina193 (Hélice 4). Una hélice corta está presente desde el treonina60 a serina62 (hélice 1') y una α -hélice corta está presente desde la lisina69 a glutamina74 (hélice 1'') (Teilum *et al.*, 2005).

Estructura terciaria

La estructura de la PRL humana está constituida por las 4 principales α -hélices que se enredan ligeramente una con otra (**Figura 3**). Los ángulos helicoidales están entre 18.58° y 38.88°. Los grupos de hélices están en dos pares antiparalelos, hélice1/hélice 4 y hélice 2/hélice 3, cada par están empaquetados más estrechamente y con su eje helicoidal más paralelos en comparación con las hélices de la otra pareja. Las hélices menores se encuentran en la pendiente del bucle, conectadas entre la hélice 1 y hélice 2. La hélice 1' está enlazado a hélice 4 por un enlace disulfuro de cisteína58 (justo antes del comienzo de la Hélice 1') a cisteína174. Un total de 32 aminoácidos entre isoleucina55 a leucina63 para el resto de la molécula determinan la orientación de la hélice de 1' a ser casi paralelos con la hélice 2. La parte N-terminal de la proteína es altamente flexible en relación con el resto de la proteína. La C-terminal está restringida por un puente disulfuro entre los residuos 191 y 199, resultando en el embalaje de los últimos 5 residuos no helicoidales contra la hélice 4 (Teilum *et al.*, 2005).

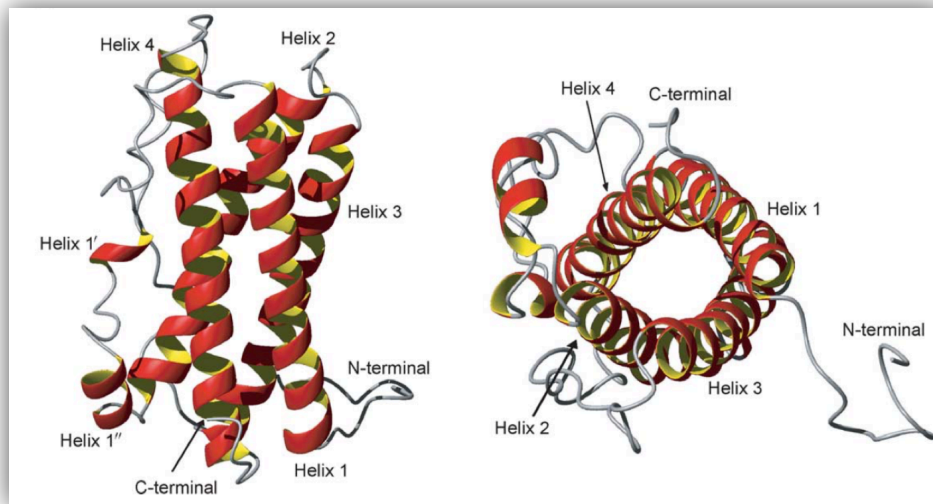


Figura 3. Estructura terciaria de la prolactina humana (Teilum *et al.*, 2005).

Receptor de prolactina

El receptor de la prolactina se conforma por 2 isoformas, una corta y una larga. A pesar que el cerebro contiene principalmente la isoforma larga del receptor, el hipotálamo contiene tanto las formas cortas y largas. En el hipotálamo, el RNAm de la forma larga del receptor de la prolactina se encuentra contenido en las neuronas de la zona anterior, así como en el hipotálamo mediobasal y dentro de los núcleos periventricular, paraventricular, supra óptico, arcuato, ventromedial y en el área preóptica medial. Pruebas inmunocitoquímicas apoyan estas observaciones demostrando que estas áreas del hipotálamo contienen al receptor.

El paso inicial en la acción de la PRL, es similar a todas las otras hormonas, es la unión al dominio extracelular del receptor de prolactina (PRL-R). La PRL se enlaza a su receptor PRL-R que conduce a la fosforilación de las asociadas Janus Kinasa 2 (Jak2), lo cual, a su vez, fosforila múltiples vías de señalización, por ejemplo, un transductor de señal y activador de transcripción (STAT), fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), cinasas reguladas por la señal extracelular (ERK1/2). Estas vías de señalización actúan conjuntamente para contribuir a las acciones generales de PRL (Wang *et al.*, 2016).

Funciones biológicas

Se estima que la prolactina tiene más de 300 actividades biológicas distintas que no representan su nombre, en varias especies y especialmente en mamíferos, esta hormona ejerce funciones altamente especializadas, sobretodo en la reproducción (Teilum *et al.*, 2005). Además, interviene en otras funciones como, promotora de la lactación, también participa en la homeostasis del organismo, incluyendo el balance hídrico y electrolítico, el crecimiento y el desarrollo, el metabolismo y la regulación endocrina, el comportamiento, funciones inmunológicas (Gregerson, 2006), además del recambio en la actividad de folículos pilosos, la producción y muda de pelo.

Reproducción

La prolactina es mejor conocida por sus múltiples efectos sobre la glándula mamaria y sobre otros objetivos importantes para la reproducción de las especies mamíferas, especialmente en roedores, donde la prolactina es importante para el mantenimiento y la actividad secretora del cuerpo lúteo. Además afecta otras acciones, como el apareamiento y el comportamiento materno (Freeman *et al.*, 2000).

Las acciones de la prolactina sobre la función lútea dependen de la especie y la etapa del ciclo estral. En los roedores, la prolactina puede ser luteotrópica después del apareamiento o luteolítica en ausencia de un estímulo de apareamiento. La prolactina aumenta la secreción de progesterona de dos maneras: favorece los efectos esteroideogénicos de la hormona luteinizante (LH), sobre las células lúteas provenientes de la granulosa e inhibe la enzima 20-hidroxiesteroide deshidrogenasa, que inactiva a la progesterona. Además es esencial para inducir la biosíntesis de progesterona luteal y la hipertrofia celular durante la gestación (Gregerson, 2006).

Lactación

La prolactina ejerce diversos efectos sobre la lactación que incluyen; el crecimiento y el desarrollo de la glándula mamaria (mamogénesis), la síntesis de leche (lactogénesis) y el mantenimiento de la secreción láctea (galactopoiesis). En el proceso de lactogénesis, la prolactina estimula la absorción de algunos aminoácidos, la síntesis de las proteínas de la leche como la caseína y la lactoalbúmina, la absorción de la glucosa y la síntesis de la lactosa, así como de las grasas lácteas. Cabe señalar que ninguna de estas acciones es debida únicamente a la prolactina, sino que es una participante más del grupo de

hormonas y factores de crecimiento que afectan la glándula mamaria (Freeman *et al.*, 2000).

Comportamiento parental

En los mamíferos, el comportamiento materno es el más ampliamente estudiado. Este incluyen la construcción del nido, así como reconocimiento, limpieza, cuidado y amamantamiento de las crías por parte de la madre. Además, se conoce que existen efectos de la prolactina en la inducción y el mantenimiento de estos comportamientos maternos en ratones, conejos, hámsteres, y ovejas. Cabe destacar que la prolactina, por sí misma, no inicia el comportamiento materno, sino simplemente reduce la latencia al inicio de la conducta materna (Freeman *et al.*, 2000).

La prolactina puede tener un papel importante en el cuidado paterno. Los datos para esta conducta son más convincentes en peces y aves, pero es algo menos concluyentes en mamíferos. Esto se observa de manera importante en el comportamiento paternal de los vertebrados no mamíferos, por ejemplo en el caballito de mar macho, el cual se encarga de la incubación, mientras que el papel es casi inexistente en la mayoría de los mamíferos (Gregerson, 2006).

Homeostasis

Aparte de sus acciones en el proceso reproductivo, la prolactina juega un papel en el mantenimiento de la constancia del medio interno por parte de la regulación del, equilibrio osmótico y la angiogénesis.

Respuesta inmune

La prolactina es un mediador común de la red inmunoneuroendocrina, donde los sistemas nervioso, endocrino, e inmunológico se comunican unos con otros. La prolactina juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmune humoral y celular, tanto en estados fisiológicos como patológicos, en enfermedades autoinmunes (Gregerson, 2006). Su papel sobre la respuesta inmune en un organismo es de gran interés ya que esta, estimula la mitogénesis de los linfocitos T y su activación, por medio de la interleucina 2 (IL-2) (Freeman *et al.*, 2000).

Osmoregulación

Una de las acciones menos comprendida de la prolactina es la regulación de solutos y el transporte de agua a través de las membranas de las células de los mamíferos. Se ha asociado a la prolactina como la responsable del transporte de electrólitos, como son el sodio, cloro y calcio a través de las membranas epiteliales intestinales, aunque no es la principal mediadora (Freeman *et al.*, 2000).

En los vertebrados inferiores, especialmente en peces, las funciones de prolactina son fundamentalmente en la regulación de la homeostasis del agua y los electrolitos. El papel de la PRL en adaptación de fondo también ha sido reportado en el pez. Similar a la hormona estimulante de melanocitos, la PRL pueden inducir una rápida dispersión del pigmento en las células del epitelio de la piel de los peces (Cheung *et al.*, 2002).

Angiogénesis

La angiogénesis, es el desarrollo de vasos sanguíneos, la cual es inhibida por fragmentos proteolíticos de prolactina nativa. Esta actividad antiangiogénica es inherente al fragmento de 16 kDa, sin embargo, el fragmento de 14 kDa comparte la actividad antiangiogénica de dicho fragmento. En contraste, recientemente se ha encontrado que la prolactina humana intacta, los lactógenos placentarios y la hormona del crecimiento tienen actividad angiogénica. Aunque hay una significancia fisiológica que no ha sido atribuida a estos efectos opuestos, parece probable que pueda haber un uso terapéutico para los fragmentos de la prolactina como inhibidores locales en la tumorigénesis o, a la inversa, como un papel patológico a través de sus acciones antiangiogénicas (Gregerson, 2006).

ANTICUERPOS

Los anticuerpos son proteínas (inmunoglobulinas Ig) que poseen la capacidad de unirse específicamente al inmunógeno que indujo su formación, y son las moléculas de la rama humoral de la respuesta inmune, producidas por las células plasmáticas diferenciadas a partir de linfocitos B coestimuladas con citocinas producidas por linfocitos T cooperadores (principalmente Th2). Están formados por dos tipos de cadenas polipeptídicas, la menor es una cadena ligera con un peso molecular de 25 kDa y la mayor es una cadena pesada de 50 a 77kDa, como se muestra en la **Figura 4**. Las cadenas están unidas por enlaces covalentes y no covalentes formando una estructura compuesta por un par de cadenas ligeras idénticas entre sí y un par de cadenas pesadas también idénticas. Se ha

demostrado que las cadenas ligeras de la mayoría de los vertebrados se presentan en dos formas λ o κ . En el ser humano y en el ratón existen cinco clases diferentes de anticuerpos (IgG, IgM, IgA, IgE e IgD), dependiendo de la isoforma de la cadena pesada (γ , μ , δ , ϵ y α). La estructura encargada de la unión con el antígeno, es el paratopo, que reconoce específicamente al epítipo; esta región está contenida en el denominado fragmento Fab (fracción de unión al antígeno). La otra región del anticuerpo se llama fragmento Fc (fracción cristalizante o constante), encargada de las funciones efectoras, que varían dependiendo de la clase de anticuerpo, tales como la activación del complemento, producción de sustancias pro-inflamatorias, liberación de histamina por células cebadas y la opsonización de células fagocíticas, entre otras. Los extremos amino-terminales de las cadenas se caracterizan por su variabilidad, por lo que se designan como las regiones VH (variable pesada) y VL (variable ligera). El resto de la molécula es relativamente constante; las porciones constantes de las cadenas ligeras se conocen como CLs y la porción constante de la cadena pesada se divide en tres (o cuatro) dominios: CH1, CH2, CH3 y CH4. Estos dominios son regiones globulares que se encuentran estabilizados por enlaces disulfuro intracadena. La región de la bisagra se encuentra entre los dominios CH1 y CH2, y es la encargada de conferir flexibilidad a la molécula (Roitt, 1997).

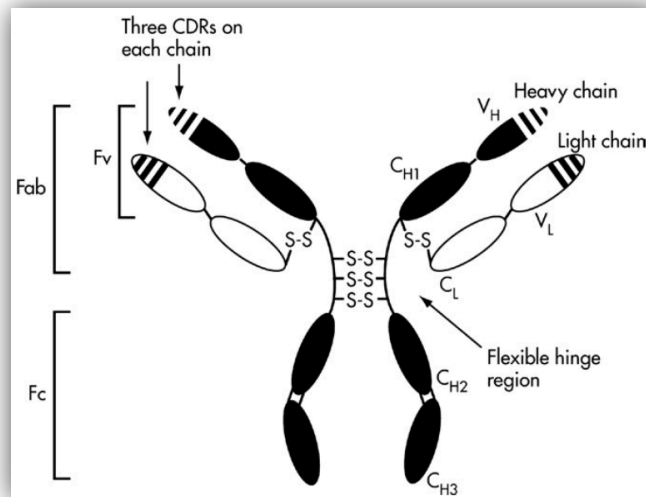


Figura 4. Estructura básica del anticuerpo (IgG). Ilustrando un par de cadenas pesadas idénticas que consta de tres dominios constantes (CH1, CH2, CH3) y una variable pesada (VH) unido a un par de cadenas ligeras idénticas compuesta de un dominio constante (CL) y una variable ligera (VL). Cada variable ligera tiene 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR) que se unen al antígeno (Liddell, 2013).

Anticuerpos policlonales

La respuesta inmunológica hacia un antígeno es heterogénea, resultando la activación de diferentes líneas celulares de linfocitos B (precursores de las células plasmáticas) que producen anticuerpos para el mismo antígeno. Todas estas células se originan a partir de células madre común, pero cada una desarrolla la capacidad individual para hacer un anticuerpo que reconoce un determinante en el mismo antígeno. Como consecuencia de esta respuesta heterogénea, el suero de un animal inmunizado contendrá numerosas clonas de anticuerpos específicos del antígeno, potencialmente de diferentes clases y subclases de inmunoglobulinas (Ig) que comprende generalmente 2-5% del total de Ig. Se llaman anticuerpos policlonales porque contiene esta colección heterogénea de inmunoglobulinas (Liddell, 2013). Debido a que esta mezcla de anticuerpos policlonales reacciona con múltiples epítomos sobre la superficie del antígeno, puede ser una característica de uso especial en algunos procedimientos experimentales, como anticuerpos secundarios marcados en inmunoensayos. Además, los anticuerpos policlonales pueden ser más tolerantes a cambios menores en el antígeno, por ejemplo, polimorfismo, heterogeneidad de glicosilación o ligera desnaturalización, que los anticuerpos monoclonales que son más homogéneos (Cheung *et al.*, 2002).

Al considerar qué tipo de anticuerpo es apropiado para una aplicación particular, hay varios factores a considerar, como por ejemplo: si el anticuerpo está disponible, costos, facilidad de preparación, requerimientos de equipo, tiempo de preparación, especificidad y afinidad requerida.

Dependiendo del antígeno que se haya usado para crear el anticuerpo, cuando se trabaja con anticuerpos policlonales, es importante instruirse acerca del inmunógeno que ha sido elegido para la producción de los anticuerpos policlonales y el potencial para reacciones cruzadas no deseadas dentro de la misma muestra (Liddell, 2013).

A diferencia de los anticuerpos policlonales, los monoclonales pueden ser utilizados directamente, sin una mayor purificación. Sin embargo, se debe considerar que la especificidad del anticuerpo monoclonal es única para un determinado epítomo, no para el conjunto de la molécula. Si el epítomo es común a otras moléculas, el anticuerpo puede unirse con antígenos aparentemente no relacionados.

Liddell E en 2013, comprobó las ventajas que tienen los anticuerpos policlonales, tales como la facilidad, rapidez y economía de obtenerlos, y son mayores que las desventajas,

de estar limitados en su grado de especificidad. Esta desventaja se pudieron superar gracias a la pureza del antígeno utilizado.

En la actualidad la producción de anticuerpos policlonales, monoclonales y recombinantes, es apoyada por técnicas de biología molecular e ingeniería genética, que en conjunto con sus funciones, sirven como una poderosa herramienta biológica de utilidad en el laboratorio de diagnóstico y son instrumentos cada vez más aplicados en áreas de investigación y terapéutica (García, 2010).

INMUNOENSAYOS

Los inmunoensayos, tales como el ELISA, Western blot, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, dot blot, etc., se han convertido en las metodologías más comunes en el diagnóstico clínico y en la investigación científica. Son pruebas analíticas sensibles que aprovechan las propiedades únicas de los anticuerpos. Las técnicas inmunológicas y, en particular, el ELISA, ha provisto de herramientas bioquímicas sofisticadas, que pueden aplicarse para investigar y manejar al momento las concentraciones de moléculas complejas (Wild, 2013).

Las características de los anticuerpos pueden identificarse en: a) su capacidad para unirse a una muy amplia gama de sustancias químicas naturales y artificiales, biomoléculas, células y virus, es debida a que los anticuerpos son proteínas, y sus sitios de unión se derivan de un gran número de posibles combinaciones de secuencias de aminoácidos. Cada uno de los aminoácidos tiene sus propias características únicas para unión y orientación, y las cadenas de aminoácidos pueden torcerse y doblarse para proporcionar unión en varios sitios; b) la especificidad excepcional con la que cada anticuerpo se une a su antígeno, permite evaluar concentraciones mínimas del analito, aún en presencia de muchas sustancias cercanamente relacionadas y c) la fuerza de unión entre un anticuerpo y su blanco, es una prueba de atracción del analito y del anticuerpo, al crear un fuerte enlace no covalente que puede sobrevivir a las etapas de procesamiento y generación de la señal. Los inmunoensayos son exactos y precisos, incluso en las bajas concentraciones a las que se encuentran los fluidos biológicos (Davies, 2013).

Los primeros estudios relacionados con el inmunoensayo fueron expuestos primero por Rosalyn Yalow y Solomon Berson, desde entonces ha habido un continuo crecimiento, no sólo en el ámbito de las aplicaciones, sino también en el número de nuevos e ingeniosos diseños de ensayo. Algunos de estos han resultado en ensayos cada vez más sensibles que han abierto nuevos horizontes de investigación clínica y diagnóstica, mientras que otros se han centrado en la simplificación de los requisitos para fomentar la tecnología, haciéndola accesible a la automatización.

Esta tecnología no se ha limitado al diagnóstico médico, los inmunoensayos han sido aplicados a la industria farmacéutica, veterinaria, ambiental, forense, militar y ciencias de la alimentación. En la investigación en ciencias fundamentales de vida, el inmunoensayo sigue siendo una herramienta invaluable para explicar los fenómenos bioquímicos básicos (He, 2013).

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

El inmunoensayo enzimático, conocido como ELISA, fue descrito en 1971 por Engvall y Perlman. En este sistema el antígeno o el anticuerpo se adsorben a una fase sólida sobre la cual se llevan a cabo las reacciones. Se utilizan anticuerpos conjugados a enzimas; los anticuerpos conservan su capacidad de unión específica al antígeno, mientras la enzima es capaz de catalizar una reacción en la cual el sustrato se transforma en un producto de color.

La capacidad de desarrollar ELISAs en el laboratorio con los materiales que se usan para el inmunoensayo, como son las placas de poliestireno, y los equipos de laboratorio, como incubadoras, lavador de placas y espectrofotómetros, proporciona una técnica económica, sensible y específica para una gama casi ilimitada de analitos, ya que son pruebas fiables para la detección de grandes cantidades de muestras, y esto genera una notable atracción para numerosos investigadores clínicos y bioquímicos que trabajan con presupuestos limitados (Wild, 2013).

La prueba de ELISA se utiliza para la detección y cuantificación de antígenos, anticuerpos, hormonas y otras moléculas. Además de las aplicaciones en el diagnóstico clínico, la ELISA se utiliza como el método de ensayo exclusivo para muchos propósitos de investigación. Por lo tanto existen muchas empresas que se dedican a la fabricación de Kits para realizar diagnóstico *in vitro*, pero no pueden mantener el ritmo con las siempre crecientes necesidades de investigadores. Algunos fabricantes ofrecen servicios

personalizados, pero los requisitos específicos de investigación van a menudo más allá de las capacidades de los ensayos y hace que muchos de estos kits de ELISA sean caros, por lo tanto, esto obliga a los investigadores a desarrollar métodos de ELISA en su laboratorio (He, 2013).

La prueba de ELISA ideal desarrollada en el laboratorio deben cumplir con las características siguientes:

- Sensible: el método debe ser capaz de medir el analito en una concentración suficientemente baja para su uso.
- Específica: el método debe tener una reactividad cruzada baja a moléculas estructuralmente similares al analito que puedan estar presentes en las muestras.
- Simple: el método debe ser fácil de realizar y dar resultados rápidos.
- Estable: Los reactivos utilizados en el ensayo deben ser termoestables y el rendimiento analítico, robusto.
- Seguro: los componentes de los reactivos utilizados en el método no deben ser perjudiciales para la salud.

Existen diversos formatos para la prueba de ELISA, hay de tipo directo, indirecta, sándwich y competitiva (Davies, 2013).

Ensayo Inmunoenzimático de tipo competitivo

El formato competitivo se basa en el uso de un único anticuerpo específico para el analito, es por ello que para obtener resultados óptimos en términos de afinidad, es preferente el utilizar anticuerpos purificados. En comparación con otros formatos, la sensibilidad del ensayo competitivo es más específica por la constante de equilibrio de los anticuerpos, la precisión de la medición de la señal y el nivel de enlace inespecífico. El desarrollo y la validación de un ELISA competitivo requiere una considerable experiencia en el desarrollo de métodos y caracterización de los reactivos. En general, un ELISA competitivo no es tan sensible como un ELISA de tipo sándwich, porque tiene un estrecho rango de concentraciones de trabajo. La sincronización de los diversos pasos de incubación es más crítica en el diseño de un ELISA competitivo (He, 2013).

La competencia sólo puede decir verdaderamente que ocurre si los sitios unión del anticuerpo están totalmente saturados. Para ensayos competitivos la función del antígeno

marcado es simplemente proporcionar un medio de evaluación de la separación relativa del antígeno entre la que está unido y el que está libre (Wild *et al.*, 2013).

Los ensayos competitivos donde el antígeno se marca tienen algunas desventajas prácticas y teóricas. En primer lugar, la sensibilidad de estas determinaciones se rige principalmente por la constante de equilibrio del anticuerpo, y por lo tanto no se podrá explotar plenamente las posibilidades que ofrecen las técnicas inmunoanalíticas con diseños alternativos. En segundo lugar, el marcaje del analito puede reducir o incluso suprimir el reconocimiento por medio de los anticuerpos porque un epítipo crítico se ve afectado u oculto. En algunos casos, el marcaje puede realmente mejorar el reconocimiento cuando se dirige a la misma posición que el hapteno que fue originalmente conjugado con el inmunógeno, un fenómeno conocido como puente el reconocimiento (Davies, 2013).

Estandarización y validación

Como en todas las formas de medición hay una necesidad de estandarización del inmunoensayo. La estandarización es el proceso de garantizar que todos los métodos para la determinación de la concentración de un analito particular, proporcione los mismos resultados al emplear las mismas condiciones de ensayo (NOM-177-SSA1-2013).

Los inmunoensayos estiman la concentración del analito en muestras desconocidas comparando la intensidad de la señal procedente de un reactivo marcado con la de las muestras estándar. Sin embargo, para la mayoría de los analitos determinados por un inmunoensayo, no existen métodos de referencia con el cual calibrar los estándares. Esto presenta un dilema que está lejos de ser resuelto para muchos analitos analizados por un inmunoensayo. La importancia de la estandarización es a menudo subestimado y la falta de esta dificulta la comunicación y el progreso científico (He, 2013).

La estandarización requiere:

- Asignación del valor en unidades significativas.
- Un estándar que es idéntico al analito en las muestras de la prueba.
- Ausencia de interferencias de la matriz de la muestra en la prueba.
- Un método de referencia.

A pesar de estos criterios, no quedan exentos de presentarse problemas en el inmunoensayo y la estandarización de una prueba, causados principalmente por las limitaciones de la tecnología en el inmunoensayo y la heterogeneidad de las muestras de los animales. Por lo tanto, ahora hay una mayor necesidad de estandarización siendo uno de los mayores desafíos enfrentado por los científicos. (Wild *et al.*, 2013)

Todos los métodos analíticos empleados para la cuantificación de muestras biológicas deben ser validados en el sitio de análisis y alcanzar el propósito para el que han sido desarrollados, independientemente si son metodologías desarrolladas por la unidad analítica o se adquieren comercialmente, como es el caso de los métodos basados en técnicas inmunológicas u otras descritos en la Norma Oficial Mexicana (NOM-177-SSA1-2013).

Aplicaciones del ensayo inmunoenzimático en las determinaciones hormonales en la medicina veterinaria

Una de estas herramientas que continúa aumentando en importancia es la prueba inmunodiagnóstica. Las necesidades de evaluar el estado metabólico y reproductivo requieren de pruebas cuantitativas para diversas hormonas. El aumento del uso de esta tecnología en medicina veterinaria refleja los enormes avances que se han logrado en el desarrollo del ensayo, impulsada por las mejoras y los avances en la instrumentación, la química en fase sólida, la tecnología del equipo para el ensayo, la detección de la tecnología y la biotecnología (Davies, 2013).

Durante años se han venido realizando diversos tipos de pruebas basadas en metodologías tradicionales, tales como el RIA. Sin embargo, durante los últimos 25 años han mejorado los inmunoensayos porque están evolucionado las tecnologías que han reemplazado los métodos más tradicionales, lo que resulta en tener mayor exactitud y precisión en las pruebas mientras que requieren menos tiempo y mano de obra.

Las enzimas, la fluorescencia y los sistemas de inmunoensayos basados en las partículas coloidales están sustituyendo a los sistemas de radioinmunoensayos y diversas metodologías de aglutinación y cultivo de tejidos. El uso de anticuerpos policlonales y monoclonales, así como antígenos y anticuerpos recombinantes y péptidos sintéticos ha dado lugar a mejoras en la sensibilidad, la especificidad y la facilidad de uso. La disponibilidad de que sea barato y el uso de sistemas de diagnóstico rápidos, cualitativos

y desechables, ha hecho posible que los veterinarios puedan realizar pruebas en la clínica o en la granja, cuando antes podían realizarse únicamente en laboratorios de referencia (O'Connor *et al.*, 2013).

Por consiguiente, uno de los objetivos proveniente de estandarizar un ensayo inmunoenzimático para determinar la actividad reproductiva estacional o continua de las ovejas Pelibuey.

ESTACIONALIDAD

La estacionalidad reproductiva es un mecanismo natural de adaptación controlado por el fotoperiodo que muestran algunas especies de animales y que asegura los nacimientos de las crías en la época óptima del año para su sobrevivencia (Lincoln, 1992). Existe una gran variedad de especies estacionales que por medio de ritmos endógenos pueden tener épocas reproductivas y de anestro a lo largo del año. (Galina *et al.*, 2010).

Las hembras adultas de varias especies de rumiantes silvestres tienen un periodo anual corto de actividad ovulatoria seguido de un periodo largo de anestro. Sin embargo, para las especies domésticas la presión ambiental llega a disminuirse (como resultado de una selección artificial) y la duración en el período de la actividad ovárica se extiende.

Ciertamente, las ovejas domésticas muestran una gran variabilidad en cuanto al inicio y duración del anestro y difieren de sus primas silvestres en muchos aspectos con su fisiología reproductiva (Gómez-Brunet *et al.*, 2012).

La estacionalidad en la reproducción es una característica común en las razas de ovejas y cabras de zonas con latitudes templadas pero menos marcada en los trópicos (Malpaux *et al.*, 1997). Sin embargo, la oveja es considerada una especie poliéstrica estacional, reproductora de días cortos, lo que significa que su actividad reproductiva es durante otoño-invierno y su actividad anovulatoria en primavera-verano como se muestra en la **Figura 5** (Arroyo, 2011).

El origen de la raza y la latitud geográfica son los principales factores evolutivos que determinan el comportamiento reproductivo estacional (López Sebastián *et al.*, 1993); por lo tanto, las razas originarias de latitudes altas presentan una marcada estacionalidad

reproductiva y los ovinos de origen ecuatorial, expresan estacionalidad reproductiva reducida y en ocasiones inexistente (Valencia *et al.*, 2006; Arroyo *et al.*, 2007).

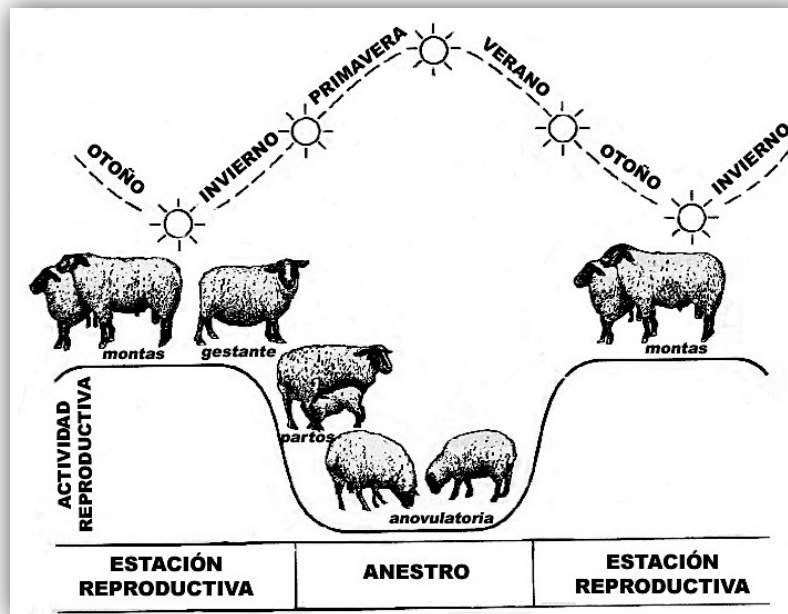


Figura 5. Actividad reproductiva de las ovejas (Karsch, 1984)

Fotoperiodo

El fotoperiodo es la señal ambiental más utilizada por los animales, para poder sincronizar los ciclos estacionales de diversos eventos biológicos, como la reproducción (Lincoln, 1992). La información sobre los cambios en la duración del día llega a los animales a través de múltiples vías neuronales y estas determinan los perfiles estacionales de secreción de hormonas, como melatonina y prolactina. La oveja como otros animales con estacionalidad reproductiva tiene un sistema neurofisiológico capaz de transformar la señal luminosa en una señal hormonal, a través de la síntesis de melatonina, detectando de esta manera, las variaciones anuales en la duración del fotoperiodo. Por lo tanto, la secreción de melatonina aumenta durante los días cortos y sus valores más bajos, se alcanzan durante los días largos, los cuales son determinados por la duración de la oscuridad, demostrando ser el principal de transductor de la información fotoperiódica del eje neuroendocrino reproductivo (Arroyo *et al.*, 2007). En tanto que, el perfil inverso es mostrado por la prolactina (Molik *et al.*, 2013).

Se ha considerado que los efectos del fotoperiodo en la actividad reproductiva, disminuye en latitudes bajas (Hafez, 1952), por lo que la reproducción estacional es reducida o está ausente en zonas tropicales o subtropicales, como en México, donde la diferencia entre el día más largo y el día más corto del año es de sólo 2 h (Cerna *et al.*, 2000), pero si se llegara a presentar, se debe principalmente a la disponibilidad de alimentos por las variaciones estacionales, como es el caso de la oveja de pelo de raza Pelibuey de origen ecuatorial, que se maneja en nuestro país y que expresa una estacionalidad reproductiva reducida o ausente.

OVINOS

Una especie animal que ha brindado beneficios y satisfactores desde etapas muy tempranas a lo largo de su historia es el ovino doméstico (*Ovis aries*), sus fibras y pieles han vestido al hombre durante miles de años, de igual forma su carne y leche han sido parte importante de su dieta. Subproductos como grasas y excretas, sirven para producir abonos o para la fabricación de jabón, su fuerza de trabajo como animal de carga se ha utilizado durante siglos por algunos pueblos asiáticos. Estas virtudes de ser generador de trabajo y riqueza han caracterizado al ovino hasta nuestros días. En Asia Menor se han encontrado las evidencias más antiguas de sistemas organizados de personal que trabaja la lana y rebaños de hace 4 o 5 mil años A.C. (López *et al.*, 2012).

México tiene una de las mayores poblaciones ovinas en América Latina, con una gran diversidad de razas (Sánchez *et al.*, 2016). Siendo la población de las ovejas de pelo aproximadamente el 10% de la población ovina mundial y estas han sido una fuente importante de carne en muchos países de América Latina, además de que representan un recurso genético y un factor importante para la producción de pequeños rumiantes diversificados (Gutiérrez *et al.*, 2005). Las ovejas de pelo tienen ventajas de adaptación al medio en condiciones de calor y humedad, pero tienen tasas de crecimiento inferiores a las de razas de lana tradicionales.

Oveja Pelibuey

Los ovinos de pelo de México son principalmente Pelibuey y Blackbelly. La Pelibuey es la raza que predomina y constituye el 90-95% del total de la población de ovinos de pelo en México (Galina *et al.*, 1996). Los antecedentes históricos de la oveja Pelibuey se originan

en el continente africano, después se difundió a las islas del Caribe y de ahí pasó a México por la península de Yucatán y posteriormente al Estado de Tabasco, por ello es conocido como borrego Pelibuey o Tabasco. Sus principales características son una conformación cárnica con buena masa muscular, piel libre de fibras de lana permanente, cubiertos de pelo espeso y corto, cabeza mediana, con orejas cortas y perfil ligeramente convexo con presencia de arrugas, presenta una coloración más clara en algunos casos, nariz triangular con ollares alargados, puede presentar pigmentación oscura, lengua color rosado sin pigmentación oscura como se observa en la **Figura 6** (López *et al.*, 2012).



Figura 6. Oveja Pelibuey

Esta raza se encuentra ampliamente distribuida en todo el país, y se considera altamente robusta y adaptable (Sánchez *et al.*, 2016). Además, de ser una raza que se ha extendido rápidamente y con éxito tanto en los trópicos y climas templados de México y se ha convertido en una importante fuente económica para los productores mexicanos.

Algunos estudios han informado que las ovejas Pelibuey muestran diferentes patrones en su actividad reproductiva, mientras que algunas presentan un anestro en los meses de primavera, otras continúan ciclando regularmente durante ese periodo (Valencia *et al.*, 2001).

MATERIAL

Reactivos

Prolactina ovina de pituitaria, L6520-1000IU. Sigma-Aldrich Corporation® (St Louis, MO 63103, USA). **Adyuvante completo de Freund**, 10ML, Sigma-Aldrich Corporation® (St Louis, MO 63103, USA). **Adyuvante incompleto de Freund**, F5506-10ML, Sigma-Aldrich Corporation® (St Louis, MO 63103, USA). **Leche descremada Difco Skim Milk**, Ref. 232100 (BD®). **Conjugado Anti-conejo IgG (molécula completa)-peroxidasa, anticuerpo producido en cabra**, A0545-1ML, Sigma-Aldrich Corporation® (St Louis, MO 63103, USA). **O-Phenylene-Diamine**, P-9029-50g, Sigma-Aldrich Corporation® (St Louis, MO 63103, USA). **Suero fetal bovino**, Ref. 16000-044 (GIBCO®). **N-Hydroxysuccinimido-Biotin**. H-1759 100 mg, Sigma-Aldrich Corporation® (St Louis, MO 63103, USA). **Avidina-Peroxidasa**. A-3151 1mg, Sigma-Aldrich Corporation® (St Louis, MO 63103, USA). **Tween® 20**, P1379-500ML, Sigma-Aldrich Corporation® (St Louis, MO 63103, USA). **Proteína A-Sefarosa® de Staphylococcus aureus**, P3391-1.5G, Sigma-Aldrich Corporation® (St Louis, MO 63103, USA). **Biotin Tag™ Micro Biotinylation Kit**, Cat. No. BTAG, Sigma-Aldrich Corporation® (Missouri, USA).

Consumibles

Amicon Ultra®, filtro para centrifuga, ultracel-100K, (Millipore®). **Membrana de poro molecular**, 50mm x 100ft, mw cutoff: 6,000-8,000 (Spectra/POR®). **Placas de 96 pozos, EIA/RIA**, costar 3590 (Corning Incorporated®). **Placas de 96 pozos, MaxiSorp** (Corning Incorporated®). **Placas de 48 pozos**, costar 3548 (Corning Incorporated®). **Tubo para centrifuga 50 ml**, 4558 (Corning®). **Tubos de 15 ml**, SCT-15ML-25-S, Axygen scientific® (California 94587 USA). Jeringas de 1ml, 5 ml, 10 ml y 60 ml

Animales

1 conejo, hembra, de raza Nueva Zelanda, de 5 meses de edad y con un peso de 2.6 Kg. Ubicado y manejado en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE).

METODOLOGÍA

Inmunización y toma de muestras

Se obtuvo el anticuerpo policlonal inmunizando al conejo, con un programa de inmunización semanal, el antígeno utilizado fue prolactina ovina (Sigma Aldrich®), con una concentración de 200 µg a 1000 µg/ml mezclada con adyuvante y ajustando a 1ml con PBS filtrado pH 7.2, administrada por vía subcutánea en 3 diferentes puntos del lomo del conejo, empezando con 300µl de adyuvante completo de Freud en la primera inmunización y con 300µl de adyuvante incompleto de Freud para las subsecuentes 6 inmunizaciones, siendo en total 7 aplicaciones. Se tomaron muestras sanguíneas para obtener suero, con una frecuencia quincenal; las muestras fueron tomadas de arteria central de la oreja como se muestra en el **Anexo 1**. El procesamiento de las muestras sanguíneas para la obtención del suero fue centrifugar a 5,000 rpm, durante 10 min, conservándolo en microtubos a -20°C en hasta su análisis.

ELISA indirecta para la determinación de anticuerpos

La respuesta inmune del conejo fue analizada después de cada inmunización y para evaluar los títulos de los anticuerpos se realizaron pruebas de ELISA indirecta. En una placa de 96 pozos (Costar 3590®) se colocó el antígeno (prolactina ovina) en una concentración de 10µg/ml, diluido en solución de carbonatos con un pH de 9.6, el cual incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de la placa con PBS Tween al 0.05% con 200 µl en cada pozo, posterior a esto, se agregó la solución de bloqueo al 5% (Leche descremada BD® en PBS Tween 20 a 0.05%), e incubó a 37°C por 30 min. Enseguida se realizaron 3 lavados PBS Tween al 0.5% como se indicó previamente. Se agregaron los sueros del conejo diluidos 1/500 en PBS con pH de 7.2 y se hicieron diluciones dobles seriadas subsecuentes que se incubaron a 37° C durante 2 horas. Al término de esta, se lavó la placa 3 veces con PBS Tween al 0.5% y se agregó el conjugado anti-conejo IgG molécula completa-peroxidasa (Sigma Aldrich®), en una dilución 1/2000 en PBS pH 7.2, incubando por 2 horas a 37°C, después se lavó la placa 3 veces con PBS Tween al 0.5% y por último se agregó 100 µl de la solución de revelado, OPD Sigma Aldrich®), ácido cítrico, citrato de sodio y peróxido de hidrógeno, se dejó

actuar la enzima de 5 a 15 min y se detuvo la reacción con 100 μ l de ácido sulfúrico 2N en cada pozo para su posterior lectura con una longitud de onda a 492nm en el lector de ELISA. Véase el **Anexo 2** para consultar el contenido de todas las soluciones utilizadas en la metodología.

Obtención del volumen total sanguíneo (sangrado a blanco)

Una vez que los resultados de las inmunizaciones al conejo alcanzaron mínimo 1 DO (densidad óptica), mediante el seguimiento de los mismos obtenidos en las pruebas de ELISA de tipo indirecta, el conejo fue sangrado por vía intracardiaca hasta obtener el volumen total sanguíneo, previamente fue tranquilizado, se extrajo toda la sangre posible antes de la muerte del animal, la cual fue colectada en tubos de 50 ml y se centrifugó a 4000 rpm por 10 min, se colectó el suero y se conservó a -20°C hasta su purificación.

Purificación del anticuerpo policlonal IgG

Para la purificación de los anticuerpos policlonales IgG se utilizó Proteína A-Sefarosa, (Sigma Aldrich®), la cual se hidrató con 10 ml de etanol al 20%, esta se agregó en el cuerpo de una jeringa de 10ml, en la cual previamente se colocó una base o cama de fibra sintética para evitar que la sefarosa se fugue de la jeringa. La columna se lavó con 20 ml de PBS filtrado mientras se preparaba la muestra de suero, 1ml de suero más 500 μ l de PBS filtrado y esta mezcla se filtró por 0.45 μ m. La muestra filtrada pasó por la columna 3 veces, posterior a esto, se agregaron 10 ml de PBS filtrado para la eliminación de los componentes del suero y se fue recolectando aproximadamente 1ml en una placa de 48 pozos, enseguida se agregaron 10 ml de glicina al 0.1 M con un pH de 2.5 como buffer de elución. Los pozos colectados se leyeron en un espectrofotómetro a 260/280 nm, es importante que esto se haga en el menor tiempo posible para cambiar el pH ácido en el que se encuentran los anticuerpos policlonales a un pH neutro mediante diálisis, como se muestra en la **Figura 7**. Una vez que se obtuvieron los resultados del espectrofotómetro, se seleccionaron los pozos con mayor concentración de anticuerpos, se colectaron y colocaron dentro de la membrana (Spectra/POR) previamente hidratada, formando una cápsula que se sumergió dentro de un vaso de precipitado con PBS pH 7.2, sobre una platina en constante movimiento, se hicieron 3 cambios de un mínimo de 30 min cada uno. Al término de la diálisis se colectó el contenido dentro de la membrana y se determinó la concentración final de los anticuerpos en el espectrofotómetro, se fraccionó en microtubos previamente identificados (tipo de anticuerpo y contra que hormona, fecha

de purificación y concentración) y se congelaron a -20°C hasta su uso. Mientras se realiza la diálisis, la columna se neutraliza con 20 ml de PBS pH 7.2 y se guarda en refrigeración hasta su uso o en etanol al 20% si no se usará por un tiempo prolongado.

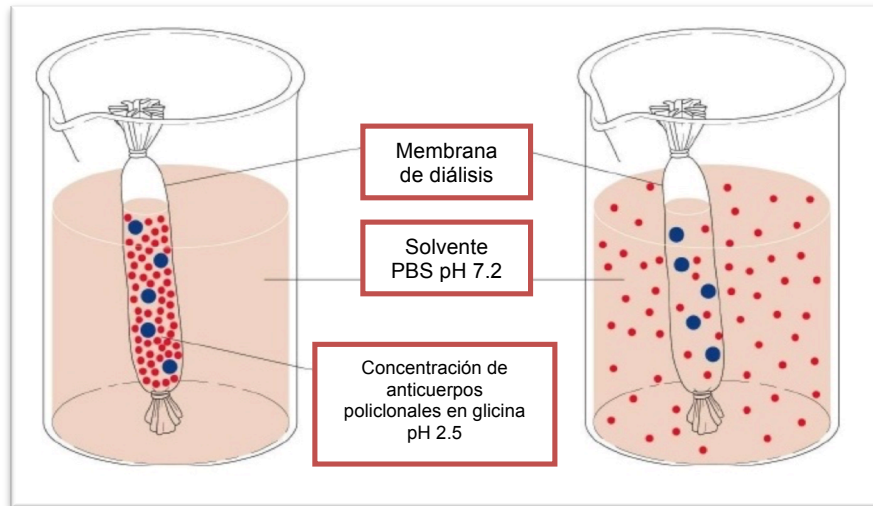


Figura 7. Procedimiento de diálisis realizado en la purificación de los anticuerpos policlonales IgG contra prolactina ovina.

Biotinilación de prolactina ovina

Este proceso se llevó a cabo mediante el Kit Biotin Tag™ Micro Biotinylation siguiendo las indicaciones del fabricante; brevemente, se preparó una solución 0.1ml de proteína o de anticuerpos con una concentración de 10mg/ml en buffer de fosfato de sodio 0.1M con pH 7.2. La solución de marcaje se preparó justo antes de marcar y para esto, se disolvió el contenido de 1 vial del reactivo de biotilación (BAC-sulfo NHS) con 30 μl de DMSO y se agregó buffer de fosfato de sodio 0.1M pH 7.2, ajustando el volumen final a 1ml y se agitó en el vortex. Inmediatamente después, se agregaron 10 μl de la solución anterior a la solución de proteína o de anticuerpos y se incubó con agitación suave por 30 min a temperatura ambiente o 2 hrs a 4°C . Se suspendió la resina de la columna G-50 microspin agitando en el vortex, se quitó el tapón inferior de la columna y en seguida, se colocó en un microtubo de 1.5 ml y se centrifugó por 1 min a 700 x g o 3000 rpm. Para equilibrar la columna, se agregó 0.2 ml de PBS 0.01M pH 7.4 como buffer de equilibrio y se centrifugó por un minuto a 700 x g o 3000 rpm por 2 veces. Se marcaron previamente 4 microtubos de 1.5 ml del 1 al 4, se colocó la columna en el microtubo 1 y se agregó la mezcla de los anticuerpos con la reacción de la biotilación y se centrifugaron por 2 min a 700 x g o 3000 rpm, en este paso se debe tener cuidado de no agitar la cama de la

columna. Para eluir, se colocó la columna en el microtubo 2 y se agregaron 0.2 ml de PBS 0.01M pH 7.4, se centrifugó 1 min a 700 x g o 3000 rpm, este paso se repitió 3 veces más hasta obtener 4 fracciones. Posteriormente, se determinó la concentración de los anticuerpos en cada una de las fracciones y se congelaron a -20°C hasta su uso.

Ensayo inmunoenzimático de tipo competitivo

El ensayo fue estandarizado para determinar prolactina ovina en muestras plasmáticas de oveja mediante un ELISA competitivo. Primero se sensibilizó la placa Maxisorp® utilizando el anticuerpo policlonal IgG contra prolactina ovina en una concentración de 1µg/ml diluido en el buffer de carbonatos y se dejó incubando toda la noche a 4°C. Se lavó la placa agregando a todos los pozos 200 µl de solución de lavado 1x, haciendo 4 repeticiones. Posteriormente se bloqueó la placa agregando a todos los pozos 100 µl de albúmina (BSA) al 1% diluida en buffer de fosfatos e incubó por 30 min a 30°C. En seguida se lavó la placa con 200 µl de solución de lavado 1x a cada pozo, haciendo 4 repeticiones. Mientras tanto, para montar la curva estándar y las muestras plasmáticas de oveja se utilizó una placa reservorio colocada en hielo para trabajar en frío. La curva estándar de prolactina ovina se trabajó en 10 concentraciones distintas que van de 1350 ng/ml a 2.6 ng/ml, haciendo diluciones dobles seriadas en buffer de fosfatos, agregando 50 µl por pozo. Para el caso de las muestras plasmáticas de oveja (control bajo y alto), se hicieron las diluciones 1/20 diluidas en buffer de fosfatos, agregando 50 µl de cada uno a la placa. Una vez que se terminó de preparar la placa reservorio, se traspasa el contenido de la placa reservorio a la placa de ensayo Maxisorp® y se incubó 15 min a temperatura ambiente, en el transcurso de estos minutos, se preparó la prolactina marcada con biotina para toda la placa, a una concentración de 500 ng/ml, se agregaron 50 µl a cada pozo e incubó 2 horas a 30°C. Se lavó la placa agregando a todos los pozos 200 µl de solución de lavado 1x, haciendo 4 repeticiones. Posteriormente se preparó el conjugado avidina-peroxidasa 1/2000, diluido en buffer de fosfatos, se agregaron 50 µl a cada pozo y se dejó incubando 1 hora a 30°C. Se lavó la placa con 200 µl de solución de lavado 1x a cada pozo, haciendo 4 repeticiones. Para la preparación del sustrato, se utilizaron 12.5 ml de solución de citratos, 125 µl de TMB/DMSO previamente preparado y 2.5 µl de peróxido de hidrógeno a 30%, se agregaron 100 µl a cada pozo y se dejó incubando 15 min a 30°C. Una vez transcurrido el tiempo, se detuvo la reacción enzimática con ácido sulfúrico 2N, agregando 50 µl a cada pozo y se leyó la placa a 450nm en el lector de ELISA.

Validación

La validación tuvo como objetivo principal confirmar que el método analítico descrito con anterioridad es confiable y adecuado para el uso al que está destinado, por tanto, se realizaron diferentes pruebas para demostrar que el ensayo inmunoenzimático de tipo competitivo para determinar prolactina ovina en muestras plasmáticas de ovejas, es adecuado para este fin, esto se realizó basándose en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013.

Para realizar la validación de los anticuerpos policlonales contra prolactina ovina, se tuvieron considerados estos ensayos:

- Sensibilidad
- Especificidad
- Evaluación de calidad de la curva de calibración
- Pruebas de reproducibilidad (R)
- Prueba de repetibilidad (r)
- Estabilidad de la muestra ante ciclos de congelación-descongelación

Sensibilidad

La cantidad mínima de prolactina detectada por el ensayo fue evaluada al encontrar el valor mínimo detectado menos dos desviaciones estándar.

Especificidad

Se evaluó realizando una ELISA de tipo indirecta, utilizando los anticuerpos policlonales contra prolactina ovina a una concentración de 1µg/ml y enfrentándolo a hormonas cercanas en homología, como es el caso de hormona de crecimiento ovina (GHO) y lactógenos placentarios.

Calidad de la Curva estándar

Las muestras con concentraciones conocidas del analito son, por lo tanto, incluidas como estándares y se dibuja una curva estándar con el porcentaje de actividad en la fracción dependiente/actividad total contra la concentración del antígeno en los estándares. La

concentración del analito en muestras desconocidas puede entonces ser inferida a partir de la curva estándar.

Se estableció la curva estándar que incluyera los valores similares a las concentraciones esperadas de la hormona durante el análisis de las muestras. Se caracterizaron diez concentraciones distintas que incluyen los rangos mínimos y máximos (1350 a 2.6 ng/ml) en diluciones dobles seriadas.

Los criterios de evaluación para considerar a una curva como válida fueron que el valor absoluto del porcentaje de la desviación relativa son menores o iguales que el 20%, en cada nivel de concentración, excepto para el nivel más bajo, ya que para este punto el valor puede ser menor o igual que el 25%. De igual forma, se consideran los valores de A, B, C, D, ED80, ED50 y ED20.

Así como la calidad de la curva, que fue considerada como resultado válido bajo los siguientes criterios de exclusión:

Los parámetros de la curva estándar representan;

A: El valor más alto que representa la unión máxima en la prueba.

B: El valor de la pendiente deberá ser lo más cercana a un valor a 1.0

C: El valor debe ser lo más cercano al valor de ED50.

D: Este valor representa la unión inespecífica en el ensayo. Debe ser tener la densidad óptica lo más baja posible.

La calidad de la curva deberá ser lo más cercana a un valor de 1.0

Precisión

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea; se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad (NOM-177-SSA1-2013, 4.78).

Repetibilidad (r)

La norma la define como la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (NOM-177-SSA1-2013, 4.86). Se analizó en un mismo día al menos por triplicado las siguientes muestras control bajo y alto. Se calculó la

concentración obtenida para cada nivel interpolando su respuesta analítica en la curva estándar.

El Coeficiente de variación (CV%) del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación.

Reproducibilidad (R)

Se define como la precisión bajo las variaciones que comúnmente pueden ocurrir dentro del laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos (NOM-177-SSA1-2013, 4.87). Se hicieron las diluciones de los controles bajo y alto, 1/20 en solución de fosfatos 1x, que divididas en 3 alícuotas, se analizaron por quintuplicado en tres corridas analíticas diferentes, en 3 días consecutivos, pero en las mismas condiciones de trabajo. En cada ensayo se corrió la curva estándar previamente estandarizada. Para cada control se calculó la concentración recuperada interpolando la respuesta analítica en la curva estándar.

El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación que podrá ser máximo del 20%.

Estabilidad de la muestra ante ciclos de congelación-descongelación

La estabilidad es la capacidad de un analito de permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas, en el envase que lo contiene durante su periodo de vida útil (NOM-177-SSA1-2013). Para evaluar la estabilidad del analito bajo ciclos de congelación-descongelación, se hicieron las diluciones de los controles bajo y alto, 1/20 en solución de fosfatos 1X, que divididas en 5 alícuotas e identificadas del 1 al 5, se hicieron 5 ciclos de congelación-descongelación, de lunes a viernes, se sacaron del congelador y se mantuvieron en hielo por dos horas y posteriormente se regresaron al congelador por al menos 12 horas y así sucesivamente con las demás alícuotas. Al final de la semana, en una corrida analítica, se analizaron por triplicado las 5 alícuotas de cada control de calidad, en las mismas condiciones de trabajo que se manejaron las otras pruebas.

RESULTADOS

En el presente trabajo se logró producir anticuerpos policlonales eficientes para la determinación de prolactina ovina, el cual se llevó a cabo mediante un programa de inmunización quincenal al conejo. Para evaluar la respuesta inmune, se realizaron pruebas de ELISA de tipo indirecto después de cada inmunización con prolactina ovina en el cual se pudo observar una rápida respuesta al antígeno. En la **Figura 8** se puede observar que desde la 4^a inmunización la absorbancia ya alcanzaba 3 densidades ópticas por los anticuerpos ya eran suficientes pero por cuestiones administrativas y ajenas al trabajo se tuvo, que inmunizar tres veces más, llegando así hasta la 7^a inmunización para concluir con el sangrado en blanco del animal.

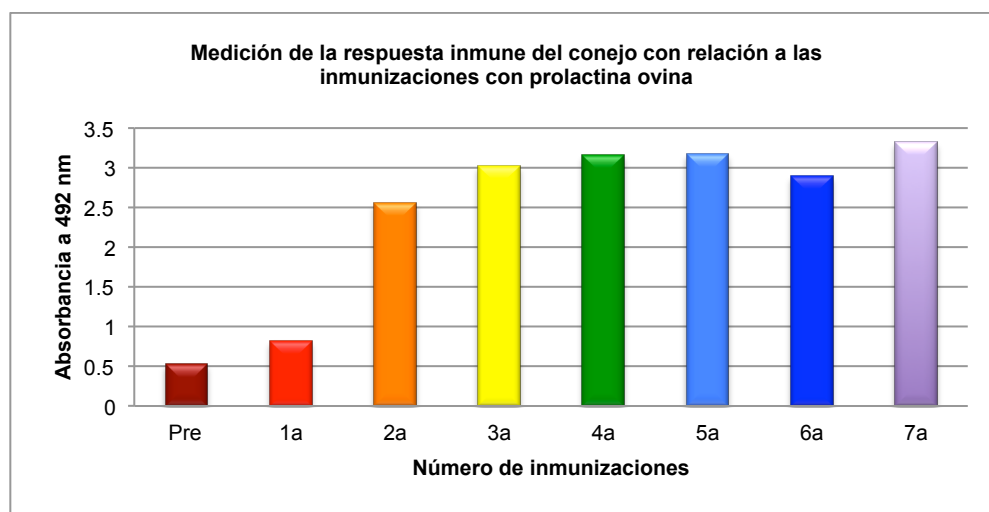


Figura 8. En el eje de X se puede observar en forma cronológica el aumento en la absorbancia con respecto a cada inmunización, esto corresponde al incremento de anticuerpos contra prolactina ovina encontrados en las muestras sanguíneas del conejo que se colectaron quincenalmente de acuerdo con el programa de inmunización establecido. (Pre) suero Pre inmune, colectado antes de la primera inmunización, (1a) suero colectado 15 días después de la primera inmunización, y sucesivamente hasta la (7a) inmunización. Se realizó una prueba ELISA indirecta para hacer la medición de la respuesta de dilución del suero que se usó fue de 1/500.

Se realizó la purificación de los anticuerpos policlonales contra prolactina ovina, mediante cromatografía de afinidad con proteína A de *Staphylococcus aureus* unida a sefarosa, la cual tiene como objetivo separar a los anticuerpos policlonales de los diversos componentes del suero y en consecuencia, obtener una pureza adecuada. En la **Figura 9**, se representan las concentraciones de las fracciones colectadas al momento de la elución con glicina 0.1M, pH de 2.5.

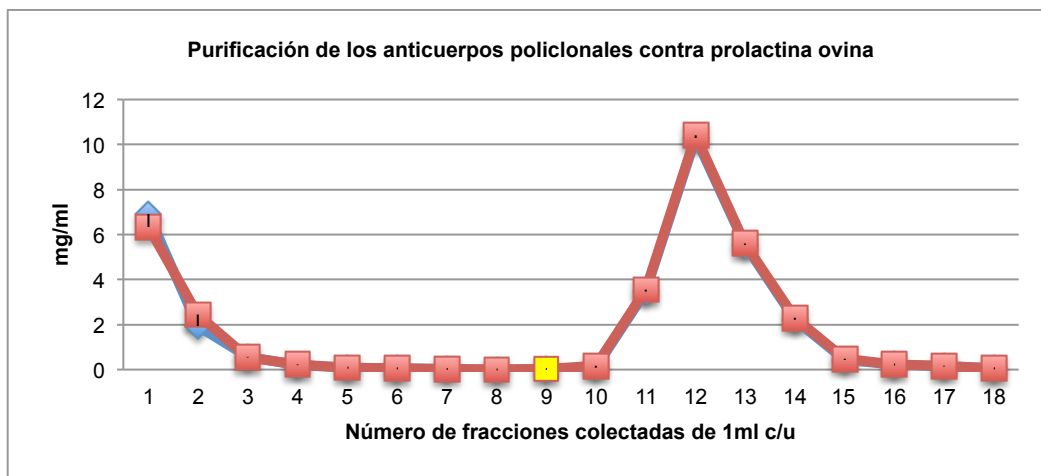


Figura 9. En el eje X están el número de fracciones colectadas de aproximadamente 1 ml cada una. La gráfica se divide en dos partes, la primera va del número de fracciones 1 a 8, con PBS a pH de 7.2 y a partir de la fracción 9 (coloreado de amarillo) se eluyó el anticuerpo policlonal con glicina 0.1M, pH de 2.5. La concentración más alta se puede observar en la fracción 12 que corresponde a 10.395 mg/ml de anticuerpo policlonal.

Se realizaron 5 sesiones de purificación de los anticuerpos policlonales, las concentraciones de las fracciones colectadas se muestran en el **Cuadro 1**. Por efectos de volumen y para tener un lote homogéneo, se realizó una mezcla de dichas fracciones colectadas con concentraciones mayores de 0.2 mg/ml de los anticuerpos purificados, para concluir con una concentración final de 3.8 mg/ml.

Sesión de purificación	Fracción 1	Fracción 2	Fracción 3	Fracción 4	Fracción 5	Fracción 6	Fracción 7	Fracción 8
1	0.041	0.110	4.396	6.279	8.659	4.923	2.693	0.012
2	0.035	0.114	1.515	10.214	8.307	2.563	0.785	0.043
3	0.017	0.087	3.471	10.395	5.609	2.223	0.436	0.217
4	0.005	0.011	2.063	8.142	9.919	2.145	0.484	0.136
5	0.019	0.051	0.446	6.311	8.425	5.536	1.755	0.563

Cuadro 1. Concentraciones de las fracciones colectadas de la solución de elución (Glicina 0.1M, 2.5 pH), cuantificadas en el espectrofotómetro (EPOCH) a una longitud de onda de 280 nm y expresado en mg/ml. Las fracciones unidas en el pool se muestran en las casillas coloreadas en azul.

Especificidad

Se llevó a cabo una ELISA de tipo indirecta para probar la especificidad de los anticuerpos, tanto para la hormona del crecimiento (GHo) como para la hormona luteinizante (LHo), resultando en reacción cruzada con GHo, por el contrario para LHo, la reacción cruzada fue mínima 4.04% (**Figura 10**).

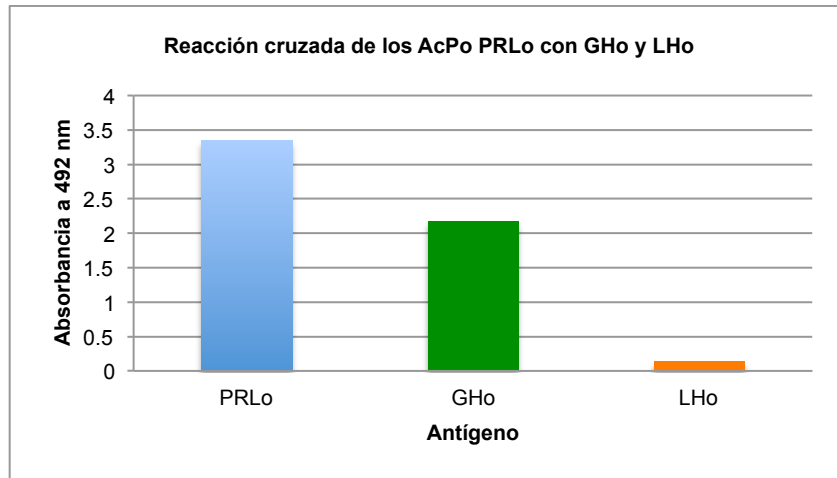


Figura 10. Representan las pruebas de especificidad para los anticuerpos policlonales contra prolactina ovina. La concentración de las hormonas en la que se usaron en esta prueba fue de 10 µg/ml.

Estandarización

En función de este hecho, se realizó la producción de anticuerpos policlonales contra prolactina ovina, obteniendo resultados satisfactorios con su desempeño (**Figura 11**). La estandarización del ensayo comenzó con una ELISA tipo sándwich con la finalidad de estandarizar las concentraciones de los bio-reactivos y se continuó con un sistema Multiplex de Luminex[®] ya que dicha técnica será usada a futuro para desarrollar un panel para determinar hormonas reproductivas relacionadas a estacionalidad reproductiva en las ovejas.

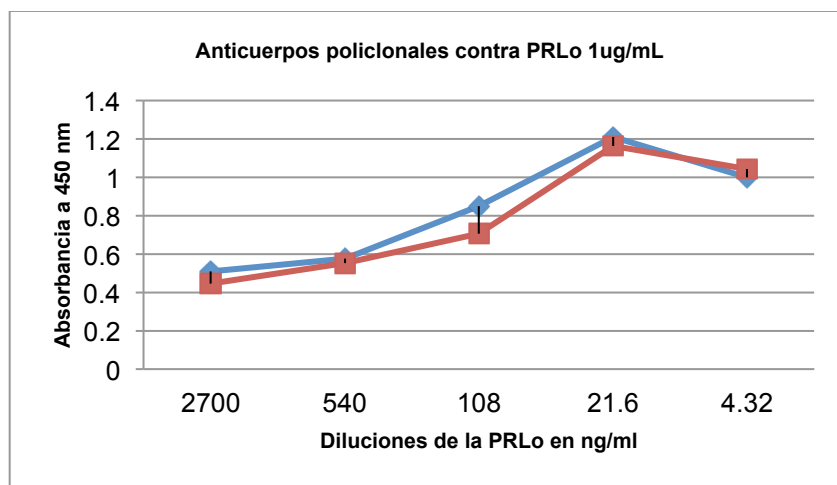


Figura 11. Curva estándar para los anticuerpos policlonales con un sistema Multiplex de Luminex[®]. En el eje de las X tenemos una concentración inicial de 2,700 ng/ml de prolactina ovina haciendo 5 diluciones quintuples seriadas y en el eje Y, se agregaron los anticuerpos policlonales contra prolactina ovina en una concentración de 1µg/ml.

Se realizó un ensayo inmunoenzimático de tipo competitivo, en el que se probaron diferentes concentraciones para los anticuerpos policlonales que fueron desde 0.0001 µg/ml hasta 5 µg/ml. Obteniendo como resultado de la estandarización que la concentración adecuada de anticuerpo fue de 1 µg/ml para sensibilizar la placa, para la estandarización y validación del método para determinar prolactina ovina en ovejas.

Límite inferior de cuantificación

Se determinó con base en el 5% del $C_{máx}$ reportado para el analito de interés. La sensibilidad reportada fue de 3.104 ng/ml lo cual es lo mínimo detectable para este ensayo inmunoenzimático de tipo competitivo (NOM-177-SSA1-2013, 4.55).

Curva estándar

La interpolación de datos de densidad óptica a concentración de prolactina (ng/ml) se realizó por medio del programa AssayZap para evaluar los resultados del inmunoensayo de tipo competitivo y poder validarlo.

La curva estándar para el ELISA de tipo competitivo tiene 10 puntos de medición que va de 1350 a 2.6 ng/ml de prolactina ovina, representado en la **Figura 12**.

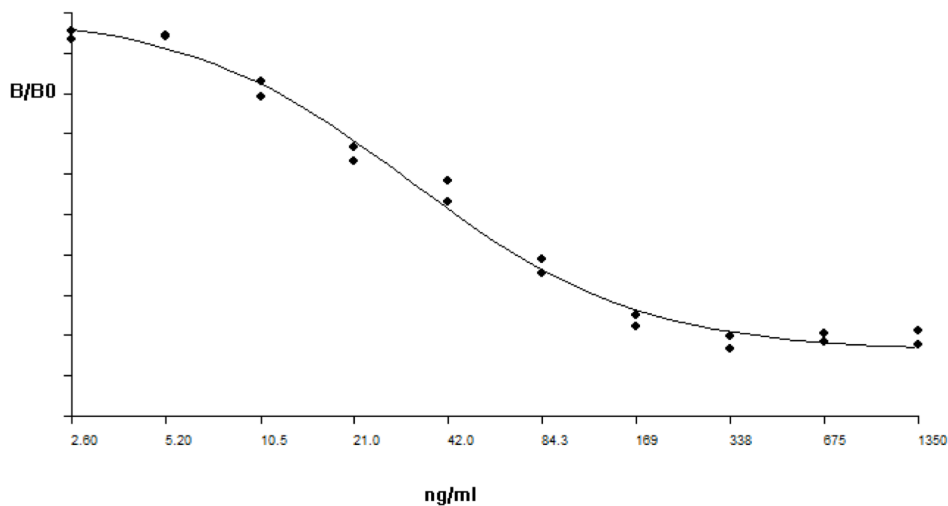


Figura 12. Curva estándar de PRL o, datos interpolados con programa Assay zap se muestran concentraciones desde 2.6 a 1350mg/ml.

Los parámetros resultantes de la curva estándar en este ensayo inmunoenzimático y de acuerdo a lo descrito con anterioridad, se consideran válidos, ya que encontramos el valor

A y D lo más alejado posible, el valor B de la pendiente de 1.1798 y el valor de C y ED 50 son cercanos entre ellos, y la calidad de la curva es bastante cercana a 1.

A: 1480.9372
B: 1.1798
C: 32.2093
D: 289.3532
Calidad: 0.999472

ED 20: 405.48 ng/ml
ED 50: 44.29 ng/ml
ED 80: 11.95 ng/ml

Validación del ensayo inmunoenzimático de tipo competitivo con los anticuerpos policlonales contra prolactina ovina

Determinar los controles bajo y alto de acuerdo a la norma NOM-177-SSA1-2013. Estos los define la norma como;

- Muestra control baja, a la muestra adicionada de analito en concentración equivalente hasta 3 veces el límite inferior de cuantificación.
- Muestra control alta, a la muestra adicionada de analito en concentración entre el 75-85% de la concentración del límite superior de cuantificación.

Los controles usados en este proyecto corresponden a las muestras:

- **Control bajo;** muestra plasmática de oveja Pelibuey en época reproductiva tomada el 21Dic.
- **Control alto;** muestra plasmática de oveja Dorset, lactante a 9 días del parto.

Precisión

Los controles bajo y alto se analizaron por triplicado en tres corridas analíticas diferentes, en 3 días consecutivos, en las mismas condiciones de trabajo y en cada ensayo la curva estándar de prolactina ovina (**Cuadro 2**).

Controles	Ensayo1	Ensayo2	Ensayo3	Promedio	DS	CV	CA	Resultado
Bajo	8.175	8.758	8.074	8.336	0.369	4.430	<15%	✓
Alto	67.397	71.288	66.123	68.269	2.690	3.940	<15%	✓
Blanco	0.06	0.061	0.061	0.060	0.0006	1.088	<15%	✓

Cuadro 2. Coeficiente de variación inter-ensayo para el blanco, control bajo y alto.

Repetibilidad (r)

Los controles bajo y alto se analizaron en un mismo día por quintuplicado. Los coeficientes de variación intra-ensayo se acepta (**Cuadro 3**).

Control bajo		Control alto	
	4.180		52.621
	4.180		52.785
	4.534		53.781
	4.700		53.948
	4.812		53.948
Promedio	4.481	Promedio	53.417
DS	0.292	DS	0.657
CV %	6.524	CV %	1.230

Cuadro 3. Coeficiente de variación intra-ensayo para el control bajo y alto.

Estabilidad de la muestra ante ciclos de congelación-descongelación

Para la evaluación del analito ante la congelación y descongelación que puedan afectar las concentraciones del anticuerpo en la muestra plasmática durante su almacenaje se hicieron 5 ciclos de congelación - descongelación de los controles de calidad, el cual no soporta los ciclo de descongelación ya que a partir del primer ciclo hay un porcentaje de perdida mayor al 15% para el control bajo y alto. Los datos se encuentran en los **Cuadros 4, 5 y 6**, y se representan en las **Figuras 13, 14 y 15**.

Controles	1 descongelación	2 descongelación	3 descongelación	4 descongelación	5 descongelación
Bajo	12.969	12.343	9.971	12.726	11.819
Alto	90.218	75.755	68.225	67.143	61.985

Cuadro 4. Valores obtenidos en ng/ml en la prueba de estabilidad de la muestra ante los ciclos de congelación y descongelación.

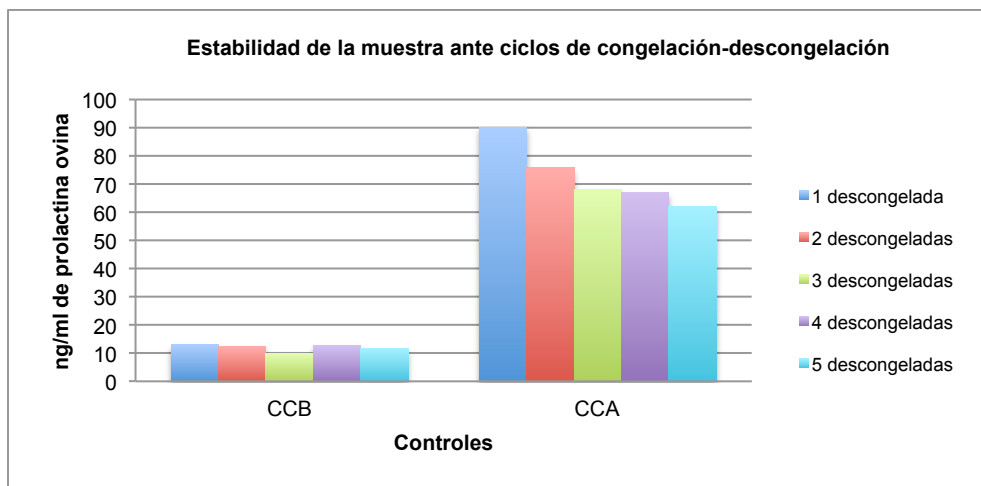


Figura 13. Comportamiento de los controles bajo (CCB) y alto (CCA) ante los ciclos de congelación y descongelación. Se observa que la concentración de prolactina ovina en las muestras plasmáticas va disminuyendo con forme va aumentando el número de ciclos de descongelación.

Controles	% perdido 2ª descongelación	% perdido 3ª descongelación	% perdido 4ª descongelación	% perdido 5ª descongelación
Bajo	4.824	23.111	1.868	8.861
Alto	16.031	24.377	25.576	31.294

Cuadro 5. Porcentaje de pérdida de los controles ante los ciclos de congelación y descongelación.

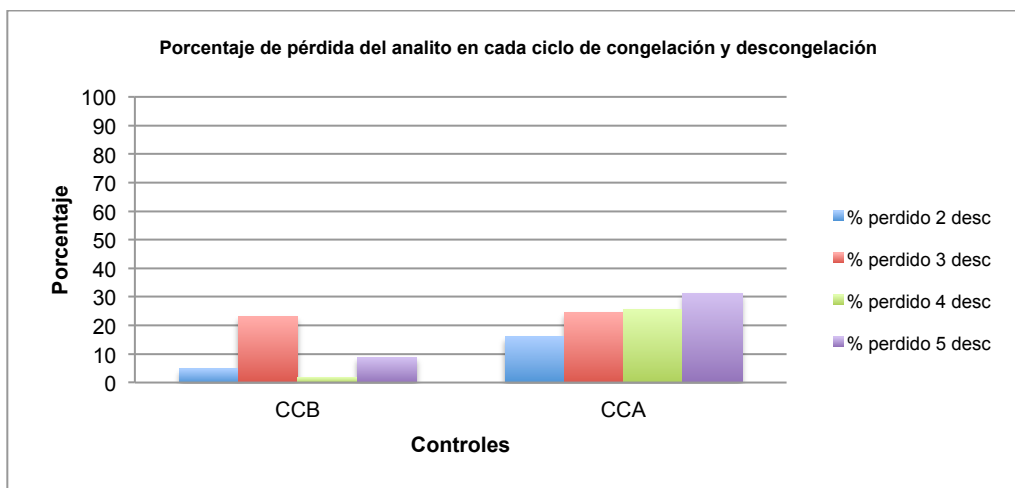


Figura 14. Se representa gráficamente la pérdida expresada en porcentaje de cada controles bajo (CCB) y alto (CCA) ante los ciclos de congelación y descongelación.

Controles	% restante en 2ª descongelación	% restante en 3ª descongelación	% restante en 4ª descongelación	% restante en 5ª descongelación
Bajo	95.175	76.888	98.131	91.138
Alto	83.968	75.622	74.423	68.705

Cuadro 6. Resultados de los controles ante los ciclos de congelación y descongelación expresados en porcentajes.

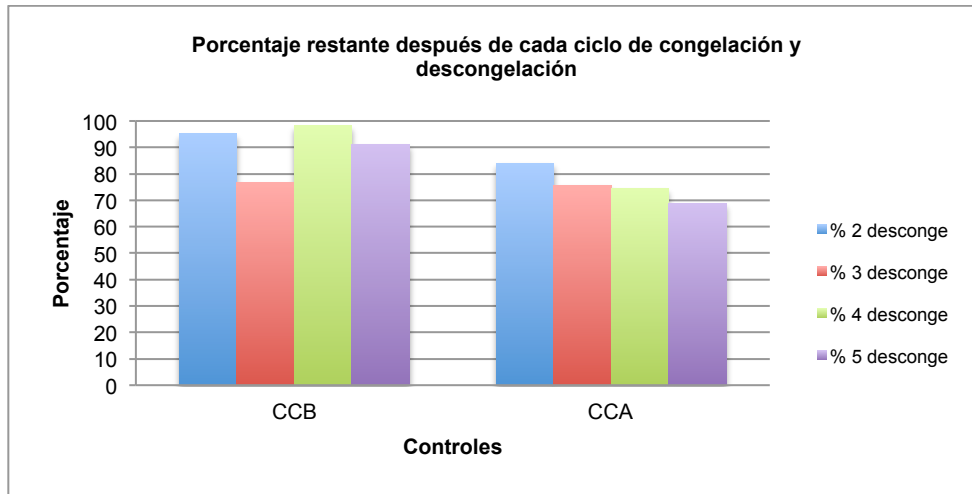


Figura 15. Porcentaje restante de los controles bajo (CCB) y alto (CCA) ante los ciclos de congelación y descongelación.

Prueba de hipótesis

Se realizó la prueba de hipótesis para los controles bajo y alto, mostrados en el **Cuadro 7** y **8** respectivamente. La n corresponde a 5 repeticiones de la muestra control y el valor de la raíz es de 2.24, para los dos controles.

Suero muestra control bajo				
	Ensayo del día 1	Ensayo del día 2	Ensayo del día 3	
prueba Ho	0.031384912	0.03125873	0.03125873	
Sesgo	0.068	0.024	-0.093	pgen-pgrupo
n	7.357844067	7.357844067	7.357844067	promedio general
	7.426	7.382	7.265	promedio grupo

Cuadro 7. Prueba de hipótesis para el control bajo, se observa que dos de tres de los ensayos realizados resultan válidos.

Suero muestra control alto				
	Ensayo del día 1	Ensayo del día 2	Ensayo del día 3	
prueba Ho	0.195355883	0.245749278	0.03125873	
Sesgo	-6.093	11.329	-5.236	pgen-pgrupo
n	70.20566767	70.20566767	70.20566767	promedio general
	64.113	81.534	64.970	promedio grupo

Cuadro 8. Prueba de hipótesis para el control alto, se observa que dos de tres de los ensayos realizados resultan válidos.

En conclusión, la hipótesis nula se rechaza y se acepta la hipótesis alterna, indicando que el ensayo es repetible, puesto que en dos de tres de los ensayos realizados en las mismas condiciones establecidas, no muestran variación significativa en los resultados, por lo tanto, hay linealidad y resulta válido el ensayo inmunoenzimático de tipo competitivo para determinar prolactina ovina.

DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados en las pruebas de validación, se concluye que los anticuerpos policlonales contra prolactina ovina que fueron producidos en este trabajo, son efectivos para determinar esta hormona en muestras plasmáticas de las ovejas. Así mismo, se logró desarrollar, estandarizar y validar un ensayo inmunoenzimático de tipo competitivo, el que se ha descrito como sencillo, económico, específico y sensible para la determinación de prolactina ovina en plasma (Wild *et al.*, 2013).

Ben-Jonathan y Hnasko en 2004 reportan que prolactina comparte 40% o más de homología con hormona de crecimiento y los lactógenos placentarios en humanos. El resultado obtenido en la prueba de especificidad de los anticuerpos policlonales para prolactina ovina (PRL_o) y hormona de crecimiento ovina (GHO) fue de 65.2% de homología, por ser estrechamente parecidas en estructura, esto se debe a que su origen proviene del mismo gen ancestral común (Fernández *et al.*, 2000). Aunque la homología reportada es alta, esta no interfiere con el ensayo inmunoenzimático de este trabajo para la determinación de prolactina ovina, ya que para esta prueba se necesitan ovejas en etapa reproductiva y que no estén gestantes, es decir, cuando las concentraciones de la hormona de crecimiento se encuentran basales.

El presente ensayo ha sido una clara mejora con respecto del procedimiento de radioinmunoanálisis homólogo en fase líquida (RIA_h) desarrollada por Hernández y colaboradores en 1997 en el departamento de reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, esta prueba anteriormente se caracterizó, para determinar el perfil anual de prolactina plasmática en la oveja Pelibuey. La sensibilidad del ensayo fue de 0.25 ng/ml por tubo y los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 5.0% y 11.0% respectivamente. Sin embargo, aunque el procedimiento de RIA_h es más sensible que el ELISA reportado en el presente trabajo, se conoce que RIA_h utiliza reactivos radioactivos, los costos son mayores porque los kits necesarios se están dejando de producir, además se necesita personal altamente capacitado para realizar el ensayo y para manejar los reactivos, debido a esto, la prueba cada vez disminuye más su uso. Por otra parte, para ese trabajo se adquirió un anticuerpo comercial en el NIDDK (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases) contra prolactina ovina,

sin embargo no hay datos de la concentración usada del anticuerpo. En tanto que para el presente proyecto se produjeron los anticuerpos policlonales y el anticuerpo monoclonal para determinar este analito.

La validación del ELISA de tipo competitivo se realizó de acuerdo a la NOM-177-SSA1-2013. La norma dice que los primeros pasos para la validación de los métodos analíticos son estandarizar y evaluar la curva estándar, que se define como el conjunto de concentraciones que describen el intervalo en el cual se cuantifica el compuesto por analizar. Para la curva estándar que se realizó en este proyecto, se determinaron concentraciones entre 1350 a 2.6 ng/ml de prolactina ovina.

El límite inferior de cuantificación o sensibilidad de mi ensayo fue de 3.104 ng/ml, definida por la norma como la concentración más baja del analito que puede medirse cumpliendo con la precisión y exactitud, determinada en función de las necesidades de cuantificación del estudio.

De igual forma, los ensayos realizados para evaluar la precisión del ensayo inmunoenzimático de tipo competitivo, tienen como resultado, el coeficiente de variación inter-ensayo de 4.4% para el control bajo y 3.9% para el control alto, el coeficiente de variación intra-ensayo de 6.5% para el control bajo y 1.2% para el control alto.

Las pruebas de estabilidad de la muestra ante los ciclos de congelación-descongelación que se realizaron en este, demostraron que el analito es altamente sensible a estos ciclos, resultando no apto para soportar varios ciclos de congelación y descongelación.

De igual importancia, se realizó una prueba de hipótesis para confirmar que los valores de los controles alto y bajo utilizados del ensayo tienen linealidad y que la prueba es reproducible, por tanto, se determinó válido el ensayo inmunoenzimático de tipo competitivo para determinar prolactina ovina.

Así mismo, Roy KS y colaboradores en 2007, que anteriormente realizaban las mediciones de prolactina mediante el procedimiento de RIA, tuvieron la necesidad de desarrollar y validar una prueba de enzoinmunoanálisis (EIA) para cuantificar prolactina plasmática en Búfalo, que fuera sencilla, directa, sensible y rentable. Los resultados de validación obtenidos fueron, para los coeficientes de variación intra e inter-ensayo, del 6.4 y 8.5%, respectivamente. El anticuerpo usado en ese ensayo fue altamente específico

para la prolactina, la reactividad cruzada con GHb fue de 0,001% y <0,0001% con FSHb, LHb y TSHb.

El sistema Luminex® es un instrumento basado en citometría de flujo, permite cuantificar la intensidad de las reacciones bioquímicas que tienen lugar en la superficie de las microesferas teñidas internamente con una combinación de dos fluorocromos en proporciones conocidas. Esta tecnología posibilita el análisis simultáneo de hasta 100 analitos distintos de una misma muestra en un solo pocillo. Ello supone una elevada productividad, reduciendo drásticamente el tiempo requerido, el volumen de muestra necesario y los costos.

CONCLUSIÓN

Con base en los resultados de las pruebas realizadas se concluye que el ensayo inmunoenzimático de tipo competitivo es válido para determinar prolactina ovina a partir de muestras plasmáticas de ovejas, considerando esta prueba como el inicio para la estandarización y validación de un inmunoensayo en un sistema Multiplex de Luminex® (Austin, TX, EEUU) con el que ya se cuenta en el departamento de reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, en el cual se podrá determinar un panel hormonal, razón por el cual se produjeron a la par de este proyecto, 4 anticuerpos policlonales, contra estradiol, progesterona, cortisol y testosterona, que están en proceso de ser probados.

LITERATURA CITADA

Arroyo LJ, Gallegos-Sánchez J, Villa-Godoy A, Berruecos JM, Perera G, Valencia J. 2007. Reproductive activity of Pelibuey and Suffolk ewes at 19° north latitude. *Animal Reproduction Science* 102: 24–30.

Arroyo, L.J. 2011. Estacionalidad reproductiva de la oveja en México. *Tropical and subtropical Agroecosystems*. 14: 829-845.

Ben-Jonathan N, Hnasko R. 2004. Prolactin (PRL). *Encyclopedia of endocrine diseases*. Vol. 4: 99-103.

Birk Y, Li CH. 1978. Two fragments from fibrinolysin digests of ovine prolactin: characterization and recombination to generate full immunoreactivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. Vol. 75, No. 5: 2155-2159. *Biochemistry*

Cerna C, Porrás A, Valencia MJ, Perera G, Zarco L. 2000. Effect of an inverse subtropical (19° 13'N) photoperiod on ovarian activity, melatonin and prolactin secretion in Pelibuey ewes. *Animal Reproduction Science* 60–61: 511-525.

Cheung YSH, Chan KM, Cheng HKC. 2002. Production of a polyclonal antibody against recombinant goldfish prolactin and demonstration of its usefulness in a non-competitive antigen-capture ELISA. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* (131): 37-46.

Davies C. 2013. Principles of competitive and immunometric assays. Chapter 2.1. *The Immunoassay Handbook*. 4.

Fernández ML, Cymes GD, Curto LM, Wolfenstein-Todel C. 2000. Ovine placental lactogen and ovine prolactin: partial proteolysis and conformational stability. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 32: 597-608 pp.

Freeman EM, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. 2000. Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiological Reviews* 80 (4): 1523-1631.

Galina MA, Morales VR, Silva E, López B. 1996. Reproductive performance of Pelibuey and Blackbelly sheep under tropical management systems in Mexico. *Small Ruminant Research* 22: 31-37.

Galina C, Valencia J. 2010. Reproducción de animales domésticos. LIMUSA, 3ª edición, capítulo 5: 105-108.

García M.A. 2011. Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. *Neurología*. 26 (5): 301-306.

Goff JK, Knight WJ, Pelzer DK, Akres MR, Notter RD. 2013. Circannual changes in progesterone secretion in intact ewes, luteinizing hormone secretion in ovariectomized estradiol-implanted ewes, and prolactin secretion in three sheep breeds anticipated to differ in seasonality of reproduction. *Animal Reproduction Science* 138 (3-4): 194-202.

Gómez-Brunet A, Santiago-Moreno J, Malpaux B, Chemineau P, Tortonese DJ, López-Sebastián A. 2012. Ovulatory activity and plasma prolactin concentrations in wild and domestic ewes exposed to artificial photoperiods between the winter and summer solstices. *Animal reproduction science*. 132: 36-43.

González C, García-Berrocal B, Talaván T, Casas ML, Navajo JA, González-Buitrago JM. 2005. Clinical evaluation of a microsphere bead-based flow cytometry assay for the simultaneous determination of anti-thyroid peroxidase and anti-thyroglobulin antibodies. *Clinical Biochemistry* 38: 966-972.

Gregerson AK. 2006. Prolactin: structure, function and regulation of secretion. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Third edition. Chapter 32: 1703-1729.

Gutiérrez J, Rubio MS, Méndez RD. 2005. Effects of crossbreeding Mexican Pelibuey sheep with Rambouillet and Suffolk on carcass traits. *Meat Science* 70 (1): 1-5.

He J. 2013. Practical guide to ELISA development. Chapter 5.1. *The Immunoassay Handbook*. 4.

Hernández M.X. 1997. Perfil anual de prolactina plasmática en la oveja Pelibuey. Tesis de Licenciatura en MVZ. Universidad Nacional Autónoma de México.

Krasch, FJ, Bittman LE, Foster LD, Goodman LR, Legan JS, Robinson EJ. 1984. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Progress in Hormone Research*. 40: 185-231.

Liddell E. 2013. Antibodies. Chapter 3.1. *The Immunoassay Handbook*. 4

Lincoln GA. 1992. Photoperiod-pineal-hypothalamic relay in Sheep. *Animal Reproduction Science*. 28: 203-217.

López SA, Santiago MJ, G. de Bulnes A, García LM. 1993. Aspectos característicos de la fisiología reproductiva de la oveja, *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. III, N° 2, México* 123-132.

López RR, Canizales DK, Medina MS, Ballesteros DF, Flores IF, Rivera MM. 2012. Determinación de la rentabilidad de la producción de ovinos de raza Pelibuey en el norte de Sonora. *Revista Mexicana de Agronegocios*. Vol. XVI (30): 887-896.

Machado NP, Téllez GA, Castaño JC. 2006. Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. *Infectio* 10 (3): 186-197.

Malpaux B, Tricoire H, Maillet F, Daveau A, Migaud M, Skinner DC, Pelletier J, Chemineau P. 2002. Melatonin and seasonal reproduction: understanding the neurocrine mechanisms using the sheep as a model. *Reproduction*. 59 (Suppl): 167-179.

Medina FY, Medina EE, Mata RO, Manzo A, Gavilondo CJV, Carpio PJC. 2016. Manual de producción de anticuerpos monoclonales. XVII Taller Internacional de Producción de Anticuerpos Monoclonales contra Agentes Infecciosos y otras Moléculas. *INDRE*.

NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Diario oficial (primera sección) 2013

O'Connor TP, Lawrence J, Andersen P, Leathers V, Workman E. 2013. Immunoassay applications in veterinary diagnostics. Chapter 8.1. The Immunoassay Handbook. 4

Roy KS, Prakash BS. 2007. Development and validation of a simple, sensitive enzyme immunoassay (EIA) for quantification of prolactin in buffalo plasma. Theriogenology 67: 572-579.

Sánchez HJ, Martínez AH, García MM, Garrido G, Gómez L, Aguilar AJ, de Andrés FD, Reina R, Ramírez H. 2016. The presence of small ruminant lentiviruses in Mexican Pelibuey sheep. Theriogenology 86 (8): 1953-1957.

Teilum K, Hoch JC, Goffin V, Kinet S, Martial JA, Kragelund BB. 2005. Solution structure of human prolactin. Journal of Molecular Biology. Vol. 351: 810-823.

Valencia J, Porras A, Mejía O, Berruecos JM, Zarco L. 2001. Estacionalidad reproductiva de ovejas Pelibuey (madres e hijas) seleccionadas para ciclar de forma continua. Mem. XXV Congreso Nacional de Buiatría. Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC. Veracruz, México 16-18/08: 1-5.

Valencia J, Porras A, Mejía O, Berruecos JM, Zarco L. 2006. Estacionalidad reproductiva de ovejas Pelibuey durante la época del anestro: influencia de la presencia del macho. Revista Científica, FCV-LUZ/ Vol. XVI, Nº 2: 136-141 pp.

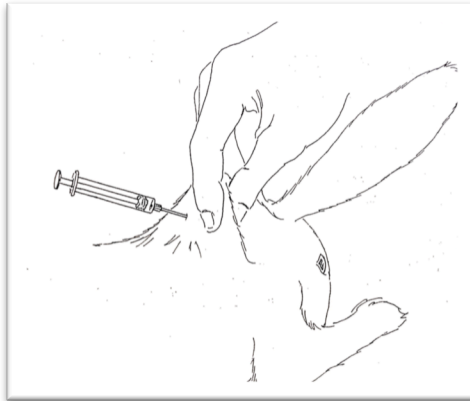
Wang M, Zhang D-C, Wang S-T, Li M-L. 2016. Development of a Novel, anti-idiotypic monoclonal anti-prolactin antibody that mimics the physiological functions of prolactin. Asian Australas. J. Anim. Sci. Vol. 29, No. 4: 571-579.

Wild D. 2013. Immunoassay for beginners. Chapter 1.2. The Immunoassay Handbook. 4

ANEXOS

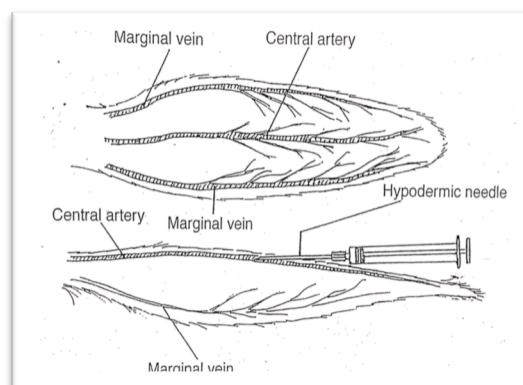
Anexo 1. Procedimiento para la inmunización del conejo

1. Para el manejo y transporte del conejo, se toma con la mano derecha por la piel del dorso, a nivel de la región lumbar y con la izquierda immobilizando los miembros traseros, hasta su caja de contención.
2. Se inyecta el antígeno por vía subcutánea, en tres diferentes puntos del lomo.
3. Se jala la piel del dorso y se inyecta.



Procedimiento para la toma de muestra sanguínea al conejo

1. Una vez que el conejo se encuentra en una caja de contención, se toma la oreja y se desinfecta con una torunda con alcohol al 70% la zona de la vena marginal o arteria central.
2. Se introduce la aguja de forma paralela a la vena y se toma la muestra sanguínea.



Anexo 2. Soluciones

Soluciones para la prueba de ELISA de tipo indirecta para determinar anticuerpos

Amortiguador de Carbonatos 0.1M, pH 9.6

Reactivo	Cantidad por litro
Na ₂ CO ₃	3.18 g
NaHCO ₃	5.86 g
H ₂ O bidestilada (cbp)	1 L

Ajustar pH y almacenar a 4°C.

Solución de fosfatos 10x (PB)

Reactivo	Cantidad por litro
NaH ₂ HPO ₄ .H ₂ O	2.62 g
Na ₂ HPO ₄	11.5 g
H ₂ O bidestilada (cbp)	1 L

Almacenar a 4°C.

Solución salina de fosfatos 1x (PBS), pH 7.2

Reactivo	Cantidad por litro
PB 10x	100 ml
NaCl 0.15M	8.75 g
H ₂ O bidestilada (cbp)	1 L

Ajustar pH y almacenar a 4°C.

Solución de lavado (PBS-tween 20, 0.05%)

Reactivo	Cantidad por litro
PBS 1x	1L
Tween 20	500 µl

Almacenar a 4°C.

Solución de bloqueo (leche descremada al 5%)

Reactivo	Cantidad por placa
PBS-Tween	20 ml
Leche descremada en polvo, Difco Skim Milk (BD®).	1 g

Almacenar a 4°C.

Solución de cromógeno/sustrato (ELISA) para peroxidasa

Reactivo	Cantidad por litro
----------	--------------------

orto-fenilendiamina (OPD)	4 mg
Ácido cítrico 0.1M	5 ml
Citrato de sodio 0.1 M	5 ml
H ₂ O ₂ al 30%.	4 µl

La solución se prepara inmediatamente antes de usarla y se mantiene en la oscuridad antes y durante su uso.

Soluciones para la purificación del anticuerpo policlonal

Solución de fosfatos 10x (PB)

Reactivo	Cantidad por litro
NaH ₂ HPO ₄ .H ₂ O	2.62 g
Na ₂ HPO ₄	11.5 g
H ₂ O bidestilada (cbp)	1 L

Almacenar a 4°C.

Solución salina de fosfatos 1x (PBS), pH 7.2

Reactivo	Cantidad por litro
PB 10x	100 ml
NaCl 0.15M	8.75 g
H ₂ O bidestilada (cbp)	1 L

Ajustar pH y almacenar a 4°C.

Solución Glicina 0.1M, pH 2.5

Reactivo	Cantidad por litro
Glicina (C ₃ H ₈ O ₃)	9.2 g
H ₂ O bidestilada (cbp)	1 L

Ajustar pH y almacenar a 4°C.

Soluciones para la Biotinilación de la prolactina ovina

Biotin Tag™ Micro Biotinylation Kit

Todos los reactivos y soluciones usados en este proceso, provienen del kit.

- Buffer de fosfato de sodio 0.1M, pH 7.2.
- Reactivo de biotilación (BAC-Sulfo NHS).
- PBS 0.01M.

Soluciones para el ensayo inmunoenzimático de tipo competitivo

Amortiguador de Carbonatos 0.05M, pH 9.6

Reactivo	Cantidad por litro
Na ₂ CO ₃	1.59 g
NaHCO ₃	2.93 g
NaN ₃	0.2 g
H ₂ O destilada (cbp)	1 L

Ajustar con NaOH y almacenar a 4°C.

Amortiguador de fosfatos salinos (PBS) 0.1M, pH 7

Reactivo	Cantidad por litro
NaH ₂ PO ₄ 0.2M	10.842 g
Na ₂ HPO ₄ 0.2M	17.324g
NaCl	8.7 g
BSA	1 g
H ₂ O destilada (cbp)	1 L

Antes de agregar el BSA, debe medir el pH ajustar con NaOH y almacenar a 4°C.

Solución de lavado 10x

Reactivo	Cantidad por litro
NaCl 1.5 M	87.66 g
Tween 20 0.5%	5 mL
H ₂ O destilada (cbp)	1 L

Almacenar a temperatura ambiente.

Solución de citratos

Reactivo	Cantidad por litro
Ácido cítrico	9.605 g

H ₂ O destilada (cbp)	1 L
----------------------------------	-----

Ajustar a pH 4.0 con NaOH y almacenar a 4°C.

Sustrato (TMB)

Reactivo	Cantidad por litro
Solución de citratos	12.5 ml
0.0025 g TMB +250 µl DMSO	125 µl
Peróxido de Hidrógeno 30%	2.5 µl

Almacenar a 4°C.