

Aplicación de técnicas de inmunoensayos que emplean isótopos radiactivos para la determinación hormonal en la reproducción animal

Malena Gámez González

Centro de Investigaciones para el Mejoramiento Animal de la Ganadería Tropical (Cimagt) km. 21½ Loma de Tierra.
Cotorro, La Habana. Cuba.

douglas@cima-minag.cu

Resumen

Este trabajo tiene como objetivo destacar la importancia de las técnicas de inmunoensayos más usadas que emplean isótopos radiactivos para la determinación de hormonas que participan en la reproducción animal y así poder determinar la baja tasa de concepción, el diagnóstico de enfermedades ováricas, el impacto de los tratamientos utilizados, estudios metabólicos, el diagnóstico temprano de gestación, lo que permite una mayor productividad y eficiencia en la reproducción animal. Se explica los fundamentos del método de radioinmunoanálisis (RIA), el cual se basa en la reacción entre un antígeno (Ag) marcado con un isótopo radiactivo y su anticuerpo (Ac). Mientras que el fundamento del ensayo inmunoradiométrico (IRMA) se basa en la misma reacción, pero el Ac se encuentra marcado radiactivamente. Estos métodos continúan siendo muy importantes para un buen número de pruebas hormonales, siendo el más importante medio en las mediciones biológicas de los últimos 40 años y un invaluable instrumento para la utilización pacífica de los radioisótopos.

Palabras clave: antígenos, anticuerpos, análisis radioinmunológico, cría selectiva de animales, crecimiento animal, sensibilidad.

Hormonal determination technics in the animal reproduction

Abstract

The importance of the immune-essays techniques, that use radioactive isotopes for determination of hormones that participate in the animal reproduction, is the objective of this revision; as well as the advantages and disadvantage of these procedures and their practical application. It is explained the foundations of the method radio-immune-analysis, which is extraordinarily simple and it is based on the reaction among an antigen (Ag) marked with a radioactive isotope and their antibody (Ac). While the foundation of the rehearsal immune-radio-metric (IRMA) it is based on the same reaction but the Ac it is marked radioactively. In spite of the fact that this procedure has been substituted by the rehearsal of bound immune-absorption to an enzyme (ELISA) that measures this reaction Ag-Ac by means of colorimetric, these methods continue being very important for a good number of hormonal tests, being the most important half in the biological mensuration of the last 40 years and an invaluable instrument for the peaceful use of the radioisotopes.

Key words: antigens, antibodies, radioimmunoassay, animal breeding, animal growth, sensitivity.

Introducción

El uso de la Energía Nuclear en el campo de la ciencia y la tecnología animal en nuestro país se ha orientado fundamentalmente a la aplicación de técnicas de diagnóstico de estados funcionales y/o patológicos y a la corrección de la condición sanitaria de productos de origen animal. En este sentido las técnicas de los inmunoensayos han contribuido al conocimiento de la endocrinología veterinaria y fundamentalmente en la reproducción animal [1]. En los últimos años, con el fin

de poder establecer los perfiles hormonales en sangre, se han venido desarrollando múltiples técnicas que establecen el uso de isótopos radiactivos en la determinación de hormonas como son: el radioinmunoanálisis (RIA) y el inmunoradiométrico (IRMA) [2]. Estas técnicas, que constituyen un medio altamente específico y sensitivo para medir hormonas en suero, plasma, leche y otros líquidos corporales; han ayudado a aumentar el conocimiento de eventos endocrinos y metabólicos que ocurren durante el estrés, enfermedades, ciclos reproductivos, crecimiento y desarrollo [3].

En este sentido, el siguiente trabajo está dirigido a destacar los procedimientos básicos de estas técnicas y su aplicación práctica en la reproducción animal.

Técnicas de inmunoensayos que emplean isótopos radiactivos
Radioinmunoanálisis (RIA)

Técnica inmunológica propuesta en 1959 por Yallow y Berson, que permite la cuantificación exacta de compuestos biológicos presentes en el organismo en concentraciones tan bajas como ng/ml (nanogramo= 10^{-9} g) o pg/ml (picogramo= 10^{-12} g). El radioinmunoanálisis requiere de cuatro componentes fundamentales y de cinco procesos básicos [2]. Dentro de los componentes tenemos; Ligando marcado radiactivamente o trazador: Debe ser marcado sin perder su inmunoreactividad y poseer alta pureza. El I_{125} es el isótopo más usado debido a su vida media de 60 días, posee un exceso de energía y para ganar estabilidad se desintegra emitiendo fotones gamma (γ), el cual puede medirse en un contador de centelleo sólido (figura 1) [3]. Anticuerpo específico o ligador: A través de anticuerpos (AC) policlonales y monoclonales) encontrándose en una cantidad constante y limitante, capaz de interactuar con el Ag [2]. Estándares: Son cantidades conocidas del ligando o analito que se desea medir. Muestra: Contendrá el analito no marcado que

será medido y es análogo o idéntico al ligando empleado como estándar. [4]

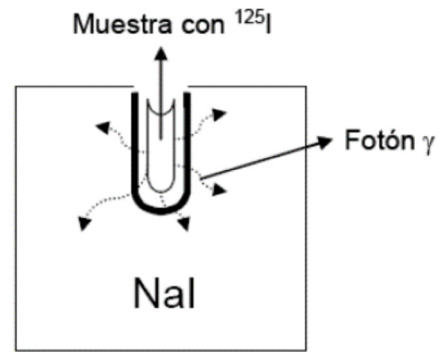


Figura 1. Representación esquemática del principio de funcionamiento del contador del centelleo sólido con muestra de I_{125} .

En los procesos del RIA tenemos varios pasos que se inician con la reacción del RIA, donde el ligando marcado (trazador) y el no marcado compiten entre sí para unirse al Ac hasta alcanzar el equilibrio de reacción, con la formación de los correspondientes complejos Ag-Ac; a partir de esta reacción puede determinarse la radioactividad presente en los complejos inmunes, y asociarlos con las concentraciones de los entandares empleados. (figura 2) [5]. El proceso de incubación tiene una duración de 2-24 horas, con una temperatura que varía de

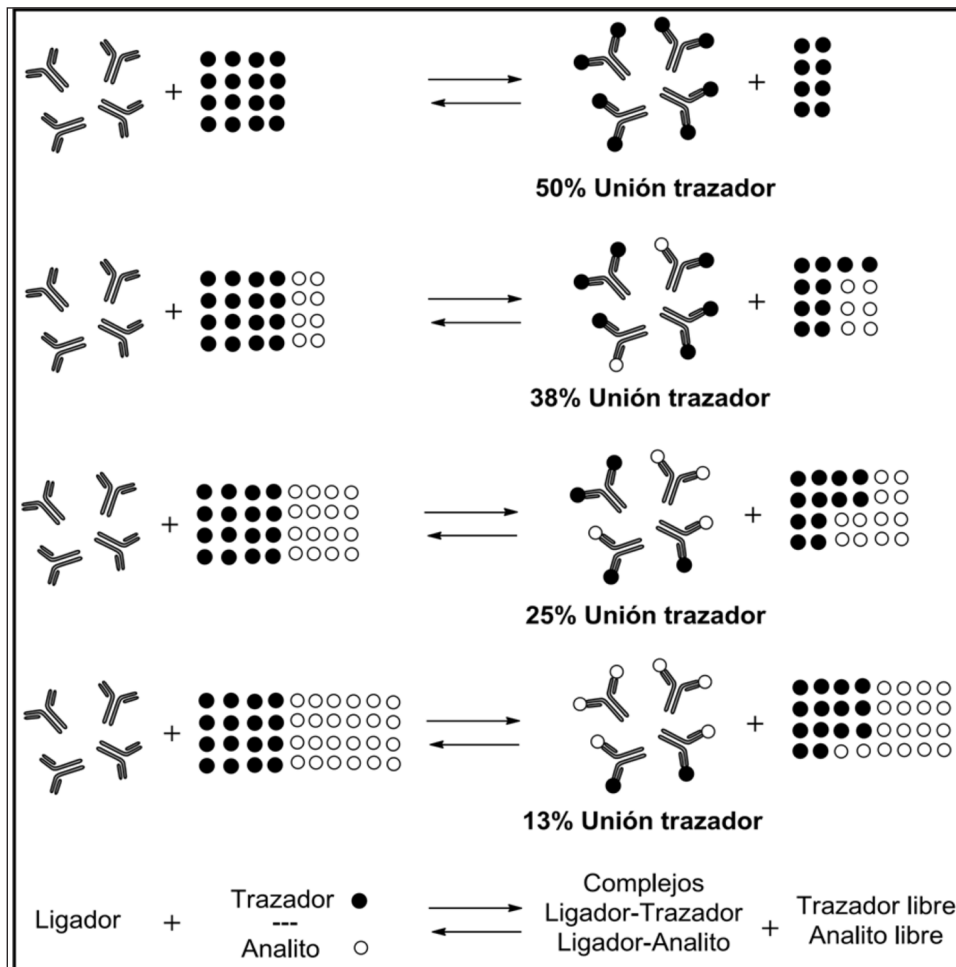


Figura 2. Análisis por enlace en el RIA.

4 - 37 °C, dependiendo del Ac utilizado y el método empleado con la finalidad de establecer un estado de equilibrio entre el trazador y el ligando no marcado en su unión con el Ac [2].

Se produce la separación de las fracciones libre y unida que ocurre por la migración diferencial y la precipitación de los inmunocomplejos formados. El último paso implica la medición de la radioactividad realizándose el conteo de las radiaciones que se expresa mediante la fórmula [5 y 6]:

$$\frac{\text{cpm (cuentas por minutos) de la muestra} - \text{cpm de la UNE (unión no específica)}}{\text{cpm totales}} \times 100 = \% \text{ de Unión Específica}$$

Este conteo es la forma de conocer las concentraciones de las muestras problema que se expresan a través de la respuesta producida en la curva estándar que es esencial para el análisis de los datos (figura 3) [6].

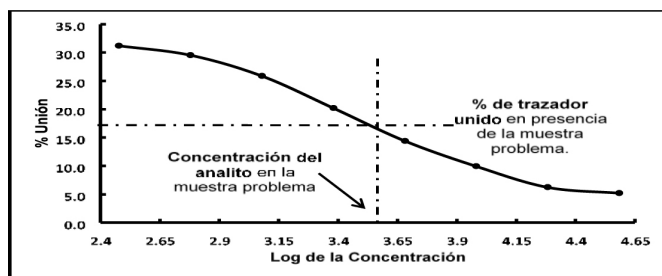


Figura 3. Estimación de la cantidad de analito presente en una muestra desconocida utilizando una curva estándar.

Aplicación de la técnica del radioinmunoanálisis en la reproducción animal

En el plano internacional se ha venido desarrollando disímiles investigaciones con el empleo del radioinmunoanálisis en las diferentes especies domésticas, fundamentalmente en el campo de la reproducción animal. Se han realizado estudios acerca de la caracterización hormonal del ciclo ovárico de las especies equina y bovina. [5 y 6]. En yeguas se ha analizado el comportamiento de estrógenos y progestágenos, donde el comportamiento de los estrógenos en ciclos normales (2º post-parto) varía con valores de 50-250 pg/ml en dependencia del momento del ciclo en que se encuentra. Los progestágenos en ciclos normales los valores descienden progresivamente, desde 15 ng/ml hasta por debajo de 1ng/ml al momento del celo en un período de 9-11 días, mientras que las hembras sincronizadas los valores de progesterona (P4) descienden drásticamente en las primeras 48h [4]. En el bovino se ha estudiado que la actividad ovárica expresa valores de P4 sérica dentro de rangos normales que fluctúan entre 0,45 y > 2,4 ng/ml a lo largo del ciclo [5]. Otra línea de investigación es la utilización del RIA lácteo de P4 para obtener un diagnóstico temprano de gestación, donde el principal problema para la adaptación de la técnica del RIA sanguíneo al análisis lácteo es el raptó del glóbulo de grasa de la leche a la P4. Al superar el problema con la metodología propuesta por estos investigadores se pudo obtener que los valores significativos de preñez variarían entre 14,24 ng/ml y 26,25 ng/ml para los 15 y 60 días de preñez, siendo el

valor promedio para no preñadas a los 15 días post-celo de 6,88 ng/ml. Se demostró una estrecha y significativa correlación positiva entre el valor de progesterona láctea y días de preñez (r = 0,97) [6].

[6 y 7] Posteriores estudios en el campo de esta técnica, realizados por otros autores, aunque con procedimientos diferentes, han demostrado su eficiencia en el diagnóstico positivo de gestación a 21 días de 94,1% con un 90% de certeza en el diagnóstico de negativos a preñez.

[7] Los estudios realizados para el diagnóstico temprano de gestación y detección temprana de microabortos en equino fina sangre de carrera han indicado que en yeguas con preñez normal los valores de P4 sérica varían entre 6,21 ng/ml y 18,30 ng/ml, y en el caso de producirse aborto estos valores caen notoriamente a valores de 0,60 ng/ml a los 40 días post-monta. En base a estos resultados se han realizado estudios tendientes a corregir, mediante terapia de restitución la caída en los valores de P4 pretendiendo de este modo evitar la ocurrencia de aborto. Por otra parte, se ha trabajado en el seguimiento de terapias de reemplazo hormonal en equinos de carrera castrados, donde [8] logró restituir los valores de pre-castración independientemente de la dosis de testosterona utilizada, demostrándose que la dosis de 0,5 g permitió alcanzar la concentración plasmática de la hormona más cercana a la normal, manteniéndose ésta por un período de 2 semanas. Es importante la utilización correcta de las técnicas de RIA ya que permite controlar las concentraciones hormonales durante los tratamientos evitando los excesos que podrían alterar el estado de salud de los animales tratados.

[9] Estudiaron los niveles de leptina en alpacas adultas con el empleo del RIA para cuantificar sus valores y relacionarlos con la condición corporal, evidenciando la presencia de leptina en alpacas con una media de 17.23 ± 0.81 ng/ml.

En Cuba se ha venido desarrollando de forma sostenida desde los años 80 hasta la actualidad numerosas investigaciones con el empleo del radioinmunoanálisis en las diferentes especies domésticas, autores como [10] han estudiado la conducta reproductiva de la hembra ¾ Holstein x ¼ Cebú y los valores de P4 y Hormona Luteinizante (LH) en el postparto, obteniendo como resultado que en los dos primeros meses del posparto los niveles de P4 fueron basales menor de 1ng/ml o no registrables, aumentando a medida que transcurrieron los días. Por otra parte, en los 2 o 3 días antes del celo se produjo un pico alto precedido de una ovulación con valores de 1 y 12ng/ml. Y la LH se comportó de forma similar que la P4 durante el estudio, alcanzando niveles de 40.6ng/ml.

En los avances de las investigaciones con el uso de las técnicas de RIA, [11] realiza un estudio del comportamiento reproductivo de un rebaño de hembras Cebú y evalúa el ciclo estral. Analiza el comportamiento sexual de la Holstein en las condiciones climáticas de Cuba y las variaciones estacionales de la P4 y la LH durante ciclos sucesivos en novillas. [12] Realiza un análisis del perfil de la P4, frecuencia de fertilidad, no fertilidad y alteraciones del desarrollo del embrión en vacas Holstein. [13] Realiza

zan estudios sobre el perfil de hormonas tiroideas (T3 y T4) en vacas Holstein fértiles y repetidoras del servicio durante el ciclo estral determinando las variaciones de estas hormonas de acuerdo a la época del año. [14] Realizaron diagnóstico de preñez positiva en cabras mediante la dosificación de P4 en suero sanguíneo, obteniendo un 2.6% de ciclos anovulatorios y un 77.4% de preñez positiva con niveles de 6.20 ± 2.0 nmol/l y un 95.7% en diagnóstico de preñez negativo. El 4.3% detectando falsos negativos y el 22.6% falsos positivos. [15] Evaluaron el efecto del flushing en la reproducción de las ovejas Pelibuey en el período de sequía, donde los resultados indican que la P4 plasmática se mantuvo similar en los grupos control y los analizados (2.34 y 2.28 nmol/l) indicando una baja actividad del ovario. [16] Estudiaron la relación entre la condición corporal y la actividad ovárica de hembras bovinas en condiciones de pastoreo para evaluar el estado anéstrico mediante el examen clínico y los niveles de P4, donde las concentraciones de P4 3.18nmol/l fueron utilizadas como referencia para discriminar la existencia de un cuerpo lúteo.

Gracias a estas investigaciones realizadas se obtuvieron resultados relacionados con las ciencias básicas, fundamentalmente en el campo de la fisiología reproductiva que permitieron la caracterización de los eventos reproductivos en las diferentes razas y cruza-mientos que se establecieron por la política genética del país. Sirviendo como antecedentes para futuras inves-tigaciones en el empleo de las técnicas nucleares con fines pacíficos dentro de la ganadería.

Ensayo inmunoradiométrico (IRMA)

Es una técnica de tipo no competitivo utilizado en la cuantificación de Ag de alto peso molecular que presentan varios determinantes antigénicos ó epítopes.

Este ensayo no puede emplearse en la determinación de moléculas pequeñas (ej. esteroides) que poseen baja capacidad antigénica, ya que en general se requiere que posean varios epítopes. Este procedimiento requiere de dos Ac específicos: el monoclonal marcado y el hetero-clonal unido a fase sólida, los cuales se encuentran dirigidos contra epítopes diferentes del Ag, figura 4 [6].

Las características del Ac marcado para su uso en el análisis IRMA son las siguientes: Alto grado de inmu-norreactividad, actividad específica media, gran pureza radioquímica y larga estabilidad [6]. Las características de la fase sólida son: El porcentaje de unión del anticuerpo a la celulosa debe ser aproximadamente un 50%, lar-ga estabilidad y al momento de utilizar la suspensión en el ensayo ésta debe ser homogénea [17].

Aplicación de la técnica del IRMA en la repro-ducción animal

A nivel internacional diferentes autores [18 y 19] rea-lizaron un estudio para analizar las concentraciones de IGF1 e insulina en el plasma, útero y fluido uterino en la especie ovina con valores de 1.2ng/ml, 0.5ng/ml y 0.4ng/ml respectivamente. Para la insulina la sensibilidad del ensayo en plasma y fluido uterino fue de 1.3 μ UI/ml y en útero fue de 4.3 μ UI/ml.

En Cuba esta técnica no ha sido utilizada en la re-producción animal por la dificultad que presenta para la detección de moléculas de bajo peso molecular como los esteroides.

Conclusiones

La importancia de la aplicación práctica de es-tas técnicas está dada por su sensibilidad a molécu-las de bajo peso molecular como los esteroides con la

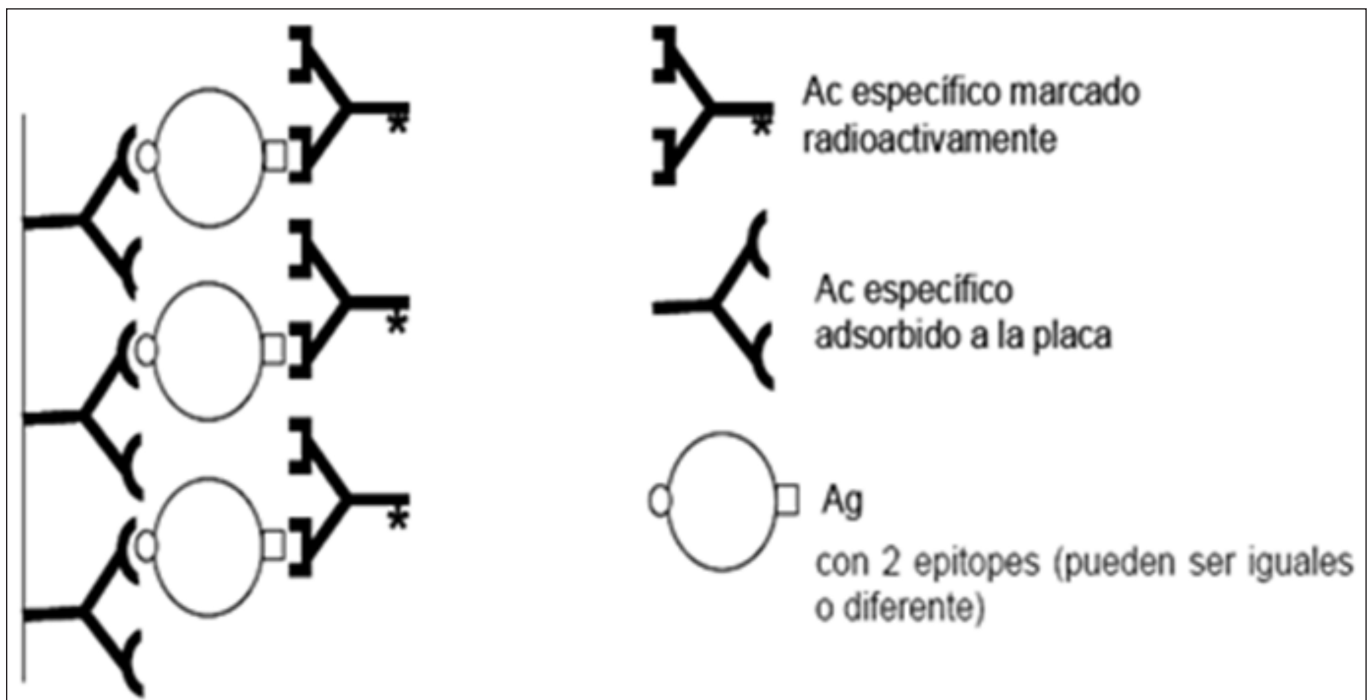


Figura 4. Reacción inmunológica del IRMA.

utilización del RIA, lo que le ofrece un mayor impacto al estudio de la reproducción animal empleándose en el diagnóstico de no gestación, seguimiento de tratamientos de sustitución, la sincronización del estro, entre otros estudios.

Referencias bibliográficas

- [1]. ALGARRA M, GÓMEZ D, ESTEVES DA SILVA J. Current analytical strategies for C reactive protein quantification in blood. *Clin Chim Acta*. 2013; 16(415): 1-9.
- [2]. ANDRADE MA. Metodologías en el laboratorio clínico: el inmunoensayo. Ed. Universidad Santiago de Compostela, 2006.
- [3]. Hartbiomedica. Historia y aplicación de los Kits de RIA [página web]. <http://www.hartbiomedica.com/es/noticias/item/28-historia-y-aplicacion-de-los-kit-ria.html>. 2015.
- [4]. LARISSA R, IRIS L, VÁZQUEZ AM, VIRIDIANA M, MARTÍNEZ JJ. Técnicas inmunológicas [página web]. <http://mesa54dinmuno.blogspot.com.ar/2009/05/tecnicas-inmunologicas.html>; 11:54:26, 2015.
- [5]. HERNÁNDEZ C, CURE C, HERNÁNDEZ J. Fundamentos prácticos de la dosificación hormonal. *Salud Uninorte*. 1988; 1(1).
- [6]. URQUETA B, FERRANDO G. Aplicaciones del radioinmunoanálisis en producción animal y medicina veterinaria en el país. *Revista académica de la Universidad de Chile*. 1985; 7(1).
- [7]. GATICA JL, CARVAJAL S, URQUIETA B, FERRANDO G. Aplicación de PGF 2α y GnRH en yeguas F.S. de Carrera. IV Congreso Nacional de Medicina Veterinaria. Chillán, Chile, 1982.
- [8]. MARTINEZ R, URQUIETA B, ALTIERI E, GARZON L. Efecto de castración y terapia de restitución sobre niveles plasmáticos de testosterona y algunos parámetros sanguíneos en equinos F.S. de C. XXVI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile. Punta de Tralca, Chile, 1983.
- [9]. ENCISO M, PÉREZ R, HUAMÁN H, CÁRDENAS O, HUANCA W. Determinación de leptina y sus valores séricos en alpacas hembras adultas con diferente condición corporal. *Rev. Investig. Vet. Perú*. 2007; 18(2). ISSN 1609-9117.
- [10]. MORALES RJ, MIKA, J, HOLY L, Y MENÉNDEZ A. Conducta reproductiva de las hembras $\frac{3}{4}$ Holstein x $\frac{1}{4}$ Cebú. VI Resultados de la inseminación artificial pospartal, período de servicio e interpartal. *Rev. Cub. Reprod. Anim*. 1983; 10(2).
- [11]. MARTÍNEZ G, SOLANO R., CARAL J, RICARDO E, Y MIKA J. Estudio del comportamiento reproductivo de un rebaño de hembras Cebú. III. Ciclo estral. *Rev. Cub. Reprod. Anim*. 1984; 10(2).
- [12]. SOLANO R, FERNÁNDEZ O, Y MARTÍNEZ G. Comportamiento sexual de la hembra Holstein en las condiciones climáticas de Cuba. II. Variaciones estacionales de la progesterona y de hormona luteinizante durante ciclos sucesivos en novillas Holstein. *Rev. Cub. Reprod. Anim*. 1987; 13(1).
- [13]. PEDROSO R, PÉREZ E, NUÑEZ D, STABLE J, FELIPE N. Diagnóstico de algunas causas de repeticiones del celo en vacas Holstein usando las dosificaciones de progesterona en leche por radioinmunoanálisis. *Rev. Cub. Reprod. Anim*. 1989; 15(2).
- [14]. PÉREZ E, PEDROSO R, GONZÁLEZ N., STABLE J, ORTIZ R, FELIPE N. Perfil de hormonas tiroideas T3 y T4 en vacas Holstein fértiles y repetidoras del servicio durante el ciclo estral. Resúmenes VIII Jornada Interna en el XX Aniversario de su fundación. Cima, 1989.
- [15]. CARMENATE C, PEDROSO R, GONZÁLEZ N, AVENICIBIA J, ALVAREZ T. Diagnóstico de preñez en cabras mediante la dosificación de Progesterona en suero sanguíneo. Resúmenes VIII Jornada Interna en el XX Aniversario de su fundación. Cima, 1989.
- [16]. ACOSTA J, LIMA T, VERDURA N. Flushing en la reproducción de las ovejas Pelibuey en el período de sequía. *Rev. Cub. Reprod. Anim*. 1996; 22(2).
- [17]. PEDROSO R, ROLLER F. Efecto de la condición corporal sobre la fertilidad de las vacas mestizas Holstein x Cebú en clima tropical. *Rev. Cub. Reprod. Anim*. 2004; 30(1 – 2).
- [18]. GRAÑA A. Efecto local del cuerpo lúteo sobre la calidad embrionaria y funcionalidad uterina durante la gestación temprana en ovinos. Tesina para optar por el grado de Licenciado en ciencias biológicas. Laboratorio de endocrinología y metabolismo animal. Facultad de veterinaria, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. 2017.
- [19]. FERNÁNDEZ-FOREN A, ABECIA JA, VÁZQUEZ MI, FARCADA F, SARTORE I, CARRIQUIRY M, MEIKLE A, SOSA C. restricción alimenticia en ovinos: respuesta endocrina metabólica dependiente de las reservas corporales. *ITEA*. 2011; (4): 257-271.

Recibido: 05 de marzo de 2020

Aceptado: 12 de julio de 2021