

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

✓ CBS

095102

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

✓ PRODUCCION DE ANTISUEROS POLICLONALES ESPECIFICOS PARA LA
CUANTIFICACION DE HORMONAS ESTEROIDES POR RADIOINMUNOA-
NALISIS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

✓ MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA DE
LA REPRODUCCION ANIMAL.

P R E S E N T A:

✓ JORGE A. HERNANDEZ ZARAGOZA.

DIRECTOR DE TESIS:

DR. VICENTE DIAZ-SANCHEZ.

México, D.F.

SEPTIEMBRE 1988.

095102

I N D I C E

Introducción	1
Antecedentes	6
Objetivos	37
Material y Métodos	38
Preparación de los Inmunógenos	38
Esquema de Inmunización	38
Esquema de Trabajo	41
Evaluación de los Antisueros	45
Análisis de Resultados	59
Discusión y Conclusiones	104
Referencias	113

I N T R O D U C C I O N

La investigación biomédica y la prestación de servicios médicos en el área de reproducción humana, particularmente en la regulación de la fertilidad (planificación familiar e infertilidad), es una prioridad en materia de salud en nuestro país. Por otra parte, la investigación y mejoramiento de los sistemas de producción animal para consumo humano no se han desarrollado con la velocidad que el crecimiento sociodemográfico impone.

La reproducción debe ser siempre considerada como uno de los mayores factores limitantes en producción animal y muchos de los métodos modernos para mejorar la reproducción se basan sobre la habilidad para medir niveles hormonales en sangre y leche (1). La evaluación del aspecto funcional de los diferentes órganos (glándulas de secreción interna) que participan en el fenómeno reproductor, se realiza mediante la producción de hormonas específicas y/o la respuesta que manifiestan a estímulos hormonales o farmacológicos específicos. Las concentraciones en el plasma sanguíneo de las denominadas hormonas

esteroides, en la mayoría de los mamíferos incluido el hombre, son del orden de nanogramos o picogramos por mililitro (1×10^{-9} y 1×10^{-12} g/l) lo cual implica que para su cuantificación se requiera de un método analítico que sea sensible, específico, re--producibile, preciso, exacto y principalmente econó--mico. En la actualidad, el uso de antisueros especí--ficos y radionúclidos con alta actividad específica, hace posible que se cumplan los requisitos antes --mencionados a excepción del último punto.

El aspecto económico es aún más limitante que el --tecnológico para que el Radioinmunoanálisis sea una metodología accesible a la mayoría de los centros --de investigación y asistencia que trabajan en el --área de la reproducción humana y animal.

En México no se dispone de antisueros específicos --contra hormonas esteroides ni de soluciones valoradas de concentraciones conocidas de las mismas - --(estándares) de producción nacional. En efecto, la--gran mayoría de los laboratorios que cuantifican este grupo de hormonas en instituciones del sector sa--lud obtiene el material mediante representantes de--compañías transnacionales o por importación directa.

Un costo estimado promedio por determinación oscila entre \$ 2.00 y \$ 5.00 U.S. Dolares, dependiendo del volumen de reactivos adquiridos y si la presentación es en estuche o a granel.

Un número limitado de laboratorios obtiene el material mediante donaciones de agencias internacionales, pero siempre en apoyo a programas establecidos de investigación. A este respecto es importante mencionar que la demanda de reactivos es tan grande -- que algunas agencias, como la Organización Mundial de la Salud ha decidido que para poder continuar su apoyo a los solicitantes debe de cargar una cuota de recuperación que ha estimado en \$ 0.35 U.S. Dolares por muestra a analizar. Aún cuando los costos son notablemente inferiores a los comerciales, la adquisición de material de consumo en divisas fuertes representa una erogación de recursos y una continua dependencia tecnológica.

En nuestro país, existe la tecnología e infraestructura para iniciar la producción de los antisueros específicos y la preparación de estándares, quedando solamente como material de importación los trazadores radiactivos.

El desarrollo del trabajo experimental de tesis aquí presentado significa un avance en la sustitución de importaciones y en la autosuficiencia para el abasto de los insumos requeridos para la investigación y la asistencia en el área de la fisiología de la reproducción. El mismo, forma parte de un programa de producción de reactivos primarios para radioinmunoanálisis que recibe apoyo de la Organización Mundial de la Salud (Ginebra, Suiza) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México, D.F.).

La coordinación de todo el proceso es responsabilidad del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ) y tiene la perspectiva de proporcionar estos a muy bajo costo en los centros de investigación del país.

Se planea producir antisueros policlonales específicos contra Cortisol, Progesterona, Testosterona y Estradiol por su relevante importancia en el desarrollo de investigaciones, monitoreo de tratamientos, diagnóstico, etc., en el fenómeno de la reproducción. Esta acción es parte del programa de "fortalecimiento" a los centros de colaboración que la OMS tiene establecidos y cuya finalidad es el de regionalizar-

la producción de reactivos primarios para el radioinmunoanálisis y crear un banco mundial de reactivos de igual calidad. Otros programas nacionales de producción de reactivos semejantes al aquí presentado-- se han iniciado en la República Popular de China, India y Cuba.

En este trabajo participan diversas instituciones -- con instalaciones adecuadas y experiencia en las diferentes etapas que requiere la realización del mismo.

La síntesis química de los inmunógenos se realiza en el Departamento de Química Orgánica de la División de Estudios de Postgrado de la Facultad de Química de la U.N.A.M., por el Dr. Gustavo García de la Mora. La inmunización de los animales de laboratorio y la obtención de los antisueros se lleva a cabo en el bioterio del Departamento de Biología de la Reproducción de la U.A.M-Iztapalapa.

La caracterización y evaluación de los antisueros se realiza en el laboratorio de Hormonas Esteroides del Departamento de Biología de la reproducción del I.N.N.S.Z.

A N T E C E D E N T E S

Desde el desarrollo de Análisis Radioinmunológicos, ha ce algunos 20 años, todo el campo de la endocrinología en animales y humanos ha sido revolucionado. La habili dad para medir las extremadamente pequeñas cantidades de hormonas que existen en sangre y tejido ha incremen tado nuestro conocimiento de la función reproductiva - en animales domésticos a una enorme extensión (1).

Los análisis radioinmunológicos permiten monitorear -- concentraciones hormonales en fluidos corporales y te- jidos, por ejemplo, durante las varias fases reproduc- tivas. Estas técnicas consecuentemente se han vuelto - poderosamente útiles en estudiar el control endocrino- de procesos reproductivos en especies domésticas de -- animales y elucidar factores que afectan su eficiencia reproductiva. Los métodos que presentan uso derivan de aquellos reportes de Berson y Yalow y Ekins, por el -- cual Berson y Yalow reciben el premio nobel de medici- na en 1977.

Con análisis radioinmunológicos, los niveles hormona- les cuantificables se hayan en el rango de nanogramos- (10^{-9} gr); picogramos (10^{-12} gr) y eventualmente fento gramos (10^{-15} gr) en un mililitro o menos de suero o -- plasma.

Una extensa clase de compuestos pueden ahora ser medidos por análisis radioinmunológicos: Proteínas, Esteroides y otras hormonas.

Se incluyen también drogas, antibióticos, nucleóticos cíclicos, neurotransmisores, derivado de aminoácidos y vitaminas. Específicamente, el análisis radioinmunológico puede ser dividido en los siguientes tipos:

a) Análisis por competencia de unión a proteínas.

Las hormonas esteroides son pobremente solubles en agua y son transportadas en sangre fijadas a proteínas acarreadoras específicas. Dos proteínas semejantes: Globulina Ligadora de Corticosteroides (CBG) y Globulina Ligadora de Hormonas Sexuales (SHBG), han sido usadas para el ensayo de hormonas esteroides.

Estas proteínas no unen esteroides con un alto grado de especificidad, por ejemplo, CBG une Progesterona, 17α -OHP₄ y Corticosteroides; SHBG une Estrógenos y Andrógenos.

Principalmente por su falta de especificidad y sensibilidad, los análisis por competencia de unión a proteínas pueden en muchos casos ser reemplazados por radioinmunoanálisis más específicos.

b) Análisis Radio-Receptor.

Varias hormonas, por ejemplo FSH, LH y Prolactina - (PRL), son proteínas que son transportadas en un estado libre en la sangre, si bien cuando alcanzan su órgano blanco, son fijadas a receptores de membrana celulares relativamente específicos. Muchos receptores han sido usados para la determinación de hormonas proteicas por aplicar el principio general del Análisis Radio-Ligando. Los radioinmunoanálisis son generalmente usados para la determinación de hormonas proteicas.

c) Radioinmunoanálisis (RIA).

Por su especificidad y sensibilidad, el radioinmunoanálisis es la técnica más extensamente usada para determinación de las concentraciones hormonales (1). Este método (RIA) por sus características de sensibilidad, precisión y especificidad en la medición de la concentración de sustancias en sangre es empleado principalmente en dos situaciones: para investigar la distribución interna, metabolismo y farmacocinetica de hormonas y medicamentos y, cada vez más frecuentemente para vigilar tratamientos (2). En la actualidad, nuevos análisis para cuantificación de hormonas esteroides basados en esta técnica

aparecen en casi todas las ediciones de las principales revistas de endocrinología (3).

Los antisueros generalmente reaccionan en grado variable con compuestos estructuralmente semejantes y con metabolitos de la droga nativa, algunos de los cuales pueden ser terapeuticamente activos (4). Para la mayoría de las drogas hasta aquí investigadas, aparte de los esteroides sintéticos, interferencia de compuestos endógenos es mínimo o no existe (2).

Cuando se requiere una especificidad mayor que esconferida por el uso del agente unidor, sólo puede usualmente ser obtenida por introducir un grado de separación utilizando Cromatografía de capa fina - (TLC), Cromatografía Líquida de Gas (GLC), Columna de Cromatografía o Extracción Diferencial con Solventes antes de medir por Radioinmunoanálisis (5). Teóricamente, la aplicación del análisis de saturación para medición de drogas en fluidos biológicos es limitada. Sin embargo, el entusiasmo por la técnica no debe ser permitido para obscurecer el relativo mérito de otros métodos adecuados, Métodos Fotométricos, Colorimétricos y Espectrométricos son -

frecuentemente sensibles para propósitos clínicos- y son usualmente rápidos y baratos para realizarse. La técnica de Cromatografía Líquida de Gas (GLC) - es suficientemente sensible y específica para uso- clínico, si bien técnicamente exigentes. Las úni- cas propiedades del RIA son, a saber, su exquisita sensibilidad y potencial para completa o parcial - automatización, tiene la mejor herramienta disponi- ble para la medición de drogas que están presentes únicamente en cantidades pequeñas y para un gran - número de trabajos (por ejemplo, número de peticio- nes analíticas) existentes o esperados. El número- de drogas por lo cual el RIA ha sido desarrollado- es todavía menor, si bien, crece rápidamente.

El obstáculo principal que afronta el RIA para pro- teínas y hormonas polipeptídicas es desarrollar la producción de anticuerpos específicos por su bajo- peso molecular (generalmente en la región de 200-- 300), la mayoría de las drogas, hormonas esteroi- des análogas, no son naturalmente inmunogénicas. - En la totalidad de ellas son compuestos bastante - inreactivos (2).

En la producción de antisueros a ser utilizados en

el radioinmunoanálisis es necesaria la consideración de varios factores que juegan un papel trascendente. Primero habrá que considerar los principios básicos inmunológicos y posteriormente toda la gama de factores que participan para el logro de este objetivo.

Los anticuerpos son moléculas fijadas en el suero y secreciones de animales, usualmente en respuesta a la presencia de sustancias extrañas ("antígenos), a los cuales se combinan y frecuentemente ayudan para eliminarlos. Sin embargo, su utilidad en proteger contra enfermedades por producción "activa" o transferencia "pasiva", ha sido conocido y aplicado desde hace 80 años. Recientes evoluciones han revelado nuevas y valiosas aplicaciones en otros campos como la síntesis de proteínas, estudios genéticos y, actualmente, la alta precisión, detección y cuantificación de sustancias antigénicas específicas (6).

La competencia inmunitaria, o sea, la capacidad de desarrollar la inmunidad bajo una estimulación apropiada, es una característica única de los animales vertebrados. Ningún otro tipo de organismos-

posee esta extraordinaria capacidad de reconocer -- bioquímicamente una variedad aparentemente ilimitada de sustancias extrínsecas (7,a).

Las respuestas inmunitarias se han clasificado en dos tipos: aquellas determinadas por los factores humorales circulantes (los clásicos anticuerpos en el suero) y los que dependen de ciertas células (inmunidad celular). Aunque estos tipos de respuesta inmunitarias son casi totalmente separables una de la otra, están íntimamente interrelacionadas y a menudo ocurren en forma simultánea.

Tanto la respuesta inmunitaria celular como la humoral se han dividido en tres ramas fisiológicas:

La rama aferente: comprende todos los procesos participantes en el transporte del antígeno hacia el sistema inmunitario; La Rama Central abarca todos los procesos (de ambas divisiones del sistema inmunitario) que culminan con la producción de los efectores de la inmunidad (es decir, las células sensibilizadas o los anticuerpos humorales); La Rama Eferente: implica todos los procesos que ocurren desde la liberación de los efectores hasta que tiene lugar la acción final de estos contra el antígeno pro

vocador . El esquema fisiológico presentado en la figura # 1, representa un concepto útil en el intento de comprender los complejos acontecimientos que suceden a la introducción del antígeno en el cuerpo del vertebrado (7,b).

La evolución temporal de la respuesta se puede establecer como sigue: Después de la inyección de antígeno a un animal que nunca estuvo en contacto con él, pasan varios días sin que se manifieste ninguna respuesta. Se habla en este caso de período de latencia (8,a). Por lo general, los anticuerpos son rápidamente demostrables al cuarto o quinto día, -- después de la exposición antigénica. Inicialmente -- consisten sólo de IgM.

Al sexto o séptimo día, casi siempre son demostrables los anticuerpos IgG, que llegan a alcanzar títulos mucho mayores que los anticuerpos IgM. Generalmente, la concentración de anticuerpos IgM comienza a disminuir antes que los IgG lleguen a su máximo (habitualmente al decimocuarto o decimoquinto día). Después que el título de IgG alcanza una cúspide, el título total de anticuerpos comienza a declinar y puede volverse virtualmente impercepti--

respuesta primaria. También está acelerado el componente IgG de la respuesta secundaria. La concentración se eleva a un valor muy superior y permanece elevado durante mucho más tiempo que durante la respuesta primaria (fig.#3) (7,e).

Las incidencias serias de infecciones, especialmente bacterial, en animales o seres humanos en que la producción de anticuerpos es deficiente muestran -- que los anticuerpos son vitales para la salud de -- los organismos superiores (9) (10). El término agammaglobulinemia fué aplicado para transtornos causados por defectos de la producción de anticuerpos, -- pero, las inmunoglobulinas no están completamente -- ausentes, hipogammaglobulinemia es un término más -- correcto para describir esta afección (9).

Aunque muchas células actualmente secretan anticuerpos, las principales células responsables de la síntesis de anticuerpos son, morfológicamente, miembros de la serie plasmacítica, el precursor esencial es un linfocito de una clase particular derivado de la médula osea en mamíferos y de la bolsa de fabricio en aves, y hoy en día llamados generalmente linfocitos "B" (11). Estas células se hallan en-

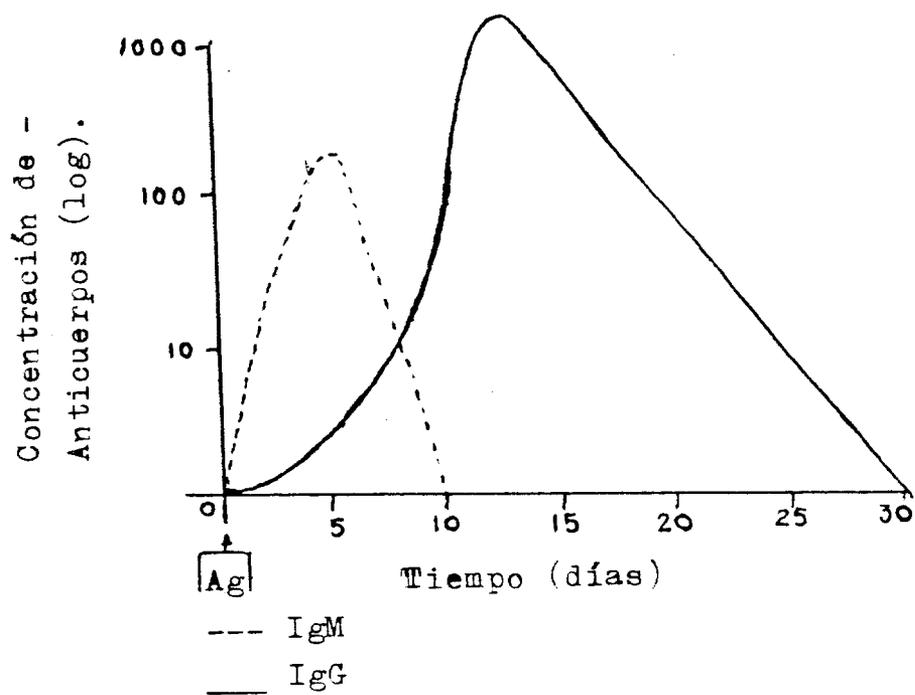


Fig. # 2 Respuesta Primaria

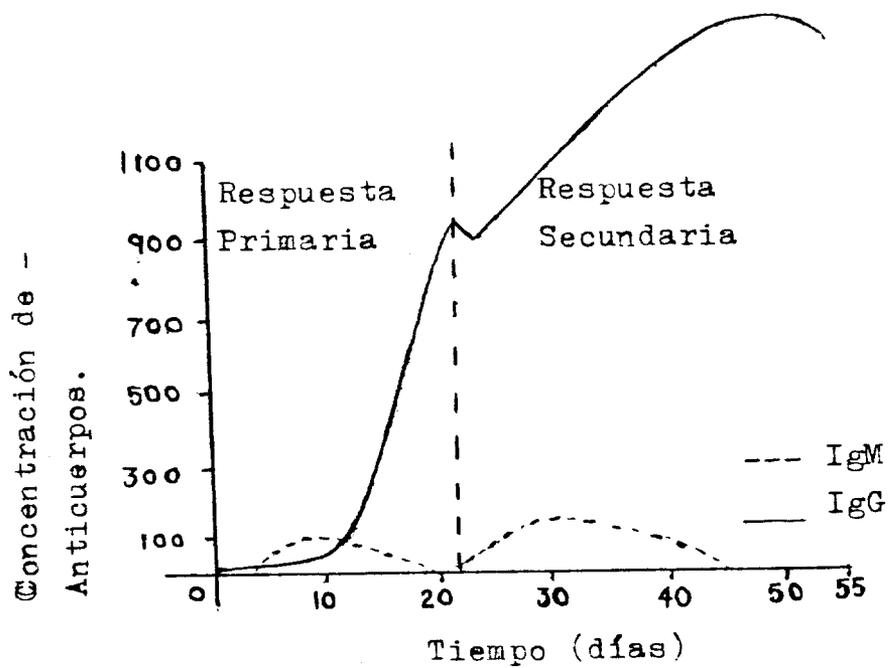


Fig. # 3 Producción de IgG e IgM en las respuestas Primarias y Secundarias.

médula, bazo, organos linfoides intestinal y sangre de muchos animales (6). Estas células linfoides proliferan y producen anticuerpos después de la estimulación antigénica. El sistema de inmunidad celular desarrolla del timo embrionario. Comprende células circunvecinas de los centros germinales de nodos linfoides y los cordones paracortical de linfocitos en aquellos nodos. Estas células son conocidas como "competentes inmunológicas". Rechazo de injertos y retraso de reacciones de hipersensibilidad dependen de inmunidad mediada por células, mientras que ---- transferencia pasiva de sensibilidad requiere competencia inmunológica celular o sus productos. Los mismos anticuerpos pueden bien ser implicados en la destrucción final de células. En una respuesta inmunológica el antígeno es tomado por el sistema macrofago. El antígeno es alterado y su contacto con linfocitos pequeños induce una respuesta proliferativa resultando en la formación de anticuerpos y células (12).

Propiedades Físicas Generales.

Los anticuerpos son globulinas conteniendo 3-2% de carbohidratos, tienen cuatro cadenas de polipéptidos por unidad. La ultracentrifugación separa en --

dos extensos grupos, con coeficiente de sedimentación de 19 S (macroglobulinas: peso molecular de 900 000) y 7-8 S (peso molecular: 150 000-200 000) (13). En cualquier molécula de las inmunoglobulinas, las cadenas de polipéptidos son de dos tipos, conocidos como cadenas -H (cadenas pesadas con peso molecular alrededor de 50 000) y cadenas -L (cadenas livianas con peso molecular alrededor de 20 000). Las regiones hipervariables de una cadena ligera y una pesada actúan concertadamente para formar un sitio de unión de antígeno (fig. #4). Las cinco principales clases de inmunoglobulinas reconocidas han sido llamadas IgM (19 S); IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, - IgD e IgE (7 S); IgA (7-11 S) y cada clase posee de terminantes antigénicos especiales llamados μ , γ , α y ϵ respectivamente, y localizados en la cadena -H, por otra parte, las cadenas -L aparecen en dos tipos antigénicos principales, designándoseles como cadenas -K y cadenas - λ , en todas las clases de inmunoglobulinas (6) (7,d) (8,c).

Como la IgG es, cuantitativamente, la clase más importante de las inmunoglobulinas en el suero (representa bastante más del 80% de las inmunoglobulinas en el suero), es también la que más se ha estudiado

(7,d).

La estructura IgG, tratadas con las enzimas proteolíticas Pepsina, rompe la molécula en tres fragmentos de tamaño aproximadamente igual, que corresponden a los dos brazos y a la cola de la molécula en forma de Y. Dos de los fragmentos correspondientes a los "brazos" de la molécula son idénticos y conservan la capacidad de fijar los antígenos, por lo cual se les llama fragmentos Fab. El tercer fragmento, desde la "cola" no puede fijar antígenos, pero es cristizable y se le llama fragmento Fc (necesario para la activación del complemento) (8,c).

Al comparar la composición en aminoácidos de una gran variedad de proteínas de mieloma, que son convenientemente Ig homogéneas, han revelado gran variabilidad en la terminal -N (el extremo donde se encuentra un grupo amino libre) de la pieza Fab. (cadenas -H y -L, variable o regiones V) y la terminal -C (el extremo de la cadena peptídica que posee un grupo carboxilo libre) mostraba composición y orden relativamente constantes (fig. #4) (14).

Cada molécula de inmunoglobulina presenta regiones variables en los brazos de la Y a través de los cua

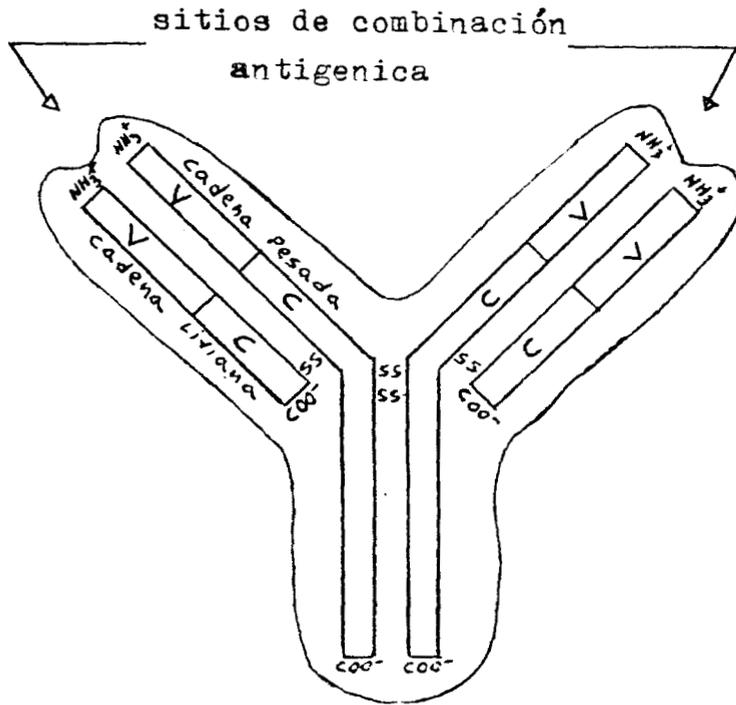


Fig. # 4

les la inmunoglobulina se une al antígeno y determinan la especificidad de los anticuerpos. Estas regiones determinan la formación del sitio de combinación antigénica de cada cadena. El sitio completo tiene una medida de 3.5 X 1.5 X 1.0 nm (15).

Las regiones constantes de las inmunoglobulinas com

prenden las mitades correspondientes al extremo -C de cada cadena ligera, y las tres cuartas partes corresponden también al extremo -C de cada cadena pesada (-H). La región constante de las cadenas ligeras (C_L) comprende aproximadamente 110 aminoácidos mientras que la región constante de cada cadena pesada (C_H) tiene 330 aminoácidos (8,c).

Generalmente hablando, una respuesta inmune también incluye anticuerpos de todas las clases y subclases, aunque las proporciones pueden variar acorde a las condiciones; IgM es característica de respuestas primarias (y de animales primitivos) e IgG de respuestas secundarias (6).

La especificidad de un anticuerpo para su determinante antigénico complementario depende únicamente de la estructura de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada.

La codificación de las moléculas de inmunoglobulinas se logra por lo menos mediante dos grupos de genes: para la región variable, que rigen dichas regiones, y para la región constante, que gobiernan el resto de la molécula (8,c).

En la producción de anticuerpos habrá que conside-

rar que animales individuales o de una misma raza - algunas veces fallan para producir un anticuerpo - en particular y esto puede ser debido a falta genética del apropiado gene V o más frecuentemente a - una inhabilidad genética del linfocito T para reconocer la porción acarreadora de la molécula antigénica (16).

En animales genéticamente capaces de una respuesta, la dosis antigénica y la forma pueden ser críti -- cas. Una dosis demasiado grande o demasiado solu-- ble en su forma pueden guiar una insensibilidad especifica. Usualmente agregando o uniendo a particulas coloidales, tales como $Al(OH)_3$, se favorece - la formación de anticuerpos. Algunas substancias - pueden estimular linfocitos B no específicamente, - si bien otros adyuvantes pueden actuar produciendo un estímulo extra para los linfocitos T (17). No - especificidad e hiposensibilidad es frecuente que - ocurran en animales que responden a varios antigenos de una vez (competición antigénica) y pueden - también ser inducidas por muchos factores dañando - la síntesis de proteína o la división celular, --- siendo este especialmente vulnerable a muchas drogas y a radiaciones X (12).

Resulta obvio que para asegurar la producción de anticuerpos, un animal de una especie y raza conocida que responda bien, en buena salud y no sujeto a otro estímulo antigénico, excepto tal vez -- por adyuvantes seleccionados, es deseable. Es posible que, donde sea accesible, animales libres de germenés, que inicialmente tengan baja o ausente Ig sérica, pueden ser el productor ideal de anticuerpos específicos (6).

Aunado a todo ello, hay que considerar otros factores que influyen en la producción de anticuerpos y que se refieren a:

El Inmunógeno:

Un antígeno (o inmunógeno) se define como toda molécula que produce una respuesta inmunitaria celular o humoral. Aunque puede predominar la estimulación de células B o células T en cualesquiera circunstancias, habitualmente ambos tipos de células linfoides son estimuladas hasta cierto grado por la mayoría de los antígenos. Aunque la mayor parte de los antígenos son proteínas, ciertos carbohidratos altamente polimerizados pueden provocar respuestas inmunitarias de uno o ambos tipos. Otras -

macromoléculas biológicas como los ácidos nucleicos y los ácidos grasos polimerizados no han demostrado concluyentemente ser inmunogénicos (antigénicamente activos) cuando son administrados en forma altamente purificada. Sin embargo, estas moléculas aunque inactivas cuando se administran solas, pueden provocar formación de anticuerpos específicos cuando se administran como conjugados proteicos -- (7,c).

Para tener poder antigénico, las moléculas deben ser grandes, rígidas y químicamente complejas. Por tanto, aunque algunas moléculas pequeñas también pueden actuar como antígenos, la regla es que las moléculas grandes sean mejores antígenos (8,b).

Generalmente hablando, las proteínas tienen un peso molecular superior a 5 000 que fácilmente estimulan la producción de anticuerpos; algunas proteínas (tales como insulina) pueden formar dímeros o agregados extensos en solución y esto resulta en un incremento en su inmunogenicidad. Péptidos de moléculas de menor peso que 5 000 son correspondientemente menos inmunogénicos. Compuestos no peptídicos (tales como esteroides, iodotironinas, glicosidos) son poderosamente inmunogénicos después -

de acoplar químicamente a un portador tal como Albumina Bovina; el antisuero resultante reacciona con las tres formas antes mencionadas de no peptidos que son conocidas como Haptenos (6).

En la superficie de las macromoléculas existen zonas contra las cuales van dirigidas las respuestas inmunes, y con las cuales tienden a unirse los anticuerpos. Estas zonas se llaman Determinantes Antigénicos o Epitopos (fig. #5). Los determinantes antigénicos de proteínas contienen alrededor de -- cuatro a seis aminoácidos y se sitúan en regiones expuestas o prominentes de la superficie molecular. En general, el número de determinantes antigénicos sobre una molécula esta en relación directa con el tamaño de la misma; existe aproximadamente un determinante antigénico por cada 5 000 de peso molecular. Pueden producirse anticuerpos sumamente específicos de un hapteno dado, y que pueden combinarse con este hapteno sin que importe la molécula portadora del mismo (8,b).

Síntesis de Conjugados.

Las técnicas básicas no han cambiado desde el trabajo original de Erlanger, Borek, Beisser y Lieber

man (1957) (18). Sin embargo, modificaciones del método tiene lugar en un esfuerzo para producir antisueros de alta especificidad (2).

Para producir antisueros, los esteroides tienen -- que estar en una forma químicamente reactiva antes de su conjugación. Estas incluyen Oximas de grupos Cetónicos, Hemisuccinatos y Ácidos Cloridos derivados de la reacción de Carbonil Clorido con grupos-Hidroxilo Esteroides (18).

Acoplamiento de los derivados esteroides al grupo-amino- ϵ de residuos lisina de Albúmina Sérica Bovina o Humana, ha sido el método más extensamente usado (Reacción Anhidrida). La Albúmina tiene 59 grupos más un grupo α -amino, si bien, muchos de estos residuos lisina son estéricamente opuestos e inutilizables para conjugación. Aquellos que son utilizables son preparados en una variedad de vías relativas a la superficie de la molécula de Albúmina y estas guían a antisueros heterogéneos con una mezcla de anticuerpos de diferente avidéz (19).

Acorde a ello, el uso de polímeros sintéticos con una regular estructura como acarreadores inmunogénicos para esteroides pueden guiar a más antisue-

ros homogéneos (19). Aunque polilisina ha sido mo
trado para ser un pobre acarreador inmunogénico pa
ra esteroides (20).

Consecuentemente, en orden para promover antisueros
es necesario primeramente acoplar la droga covalen
temente a una proteína acarreadora (3).

Los esteroides en general no contienen grupos fun-
cionales que unan directamente a aquellas molécu--
las acarreadoras. Por esta razón, la síntesis de -
un derivado esteroide conteniendo, por ejemplo, un
grupo ácido carboxílico (-COOH) es necesario para-
realizar covalentemente la unión del esteroide a -
la cadena polipéptida (21).

Dos clases de esteroides naturales, los ácidos bi-
liares y los glucuronidos esteroides ya contienen-
un grupo ácido carboxílico y no requieren forma---
ción de derivados y pueden ser unidos directamente
a proteínas acarreadoras (22).

Reacción de Conjugación.

La mezcla reacción anhídrida (Erlanger Et al, 1957)
(18) es más comunmente usada que la reacción Carbou
di-imida que puede resultar en unión cruzada den--;
tro y entre moléculas de Albúmina. El número de mo
las de esteroide por mola de Albúmina raramente ex

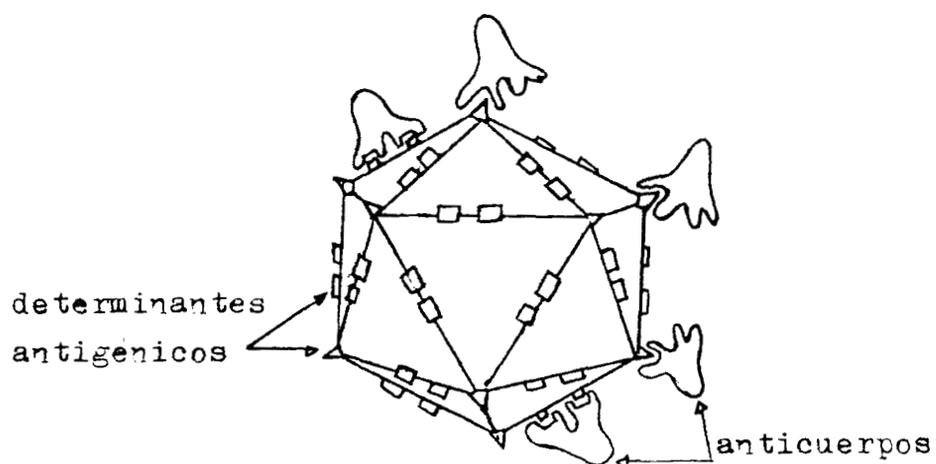


Fig. # 5

cede 30, si bien, esto no es evidencia de que el título, afinidad o especificidad del antisuero es dependiente del número de moléculas de esteroide en el conjugado (2).

Las hormonas esteroïdes o prostaglandinas contienen grupos OH (hidroxilos) o C=O (cetonicos), que son usados para preparar derivados conteniendo gru

pos activos tales como grupos aminos o carboxilicos. Estos grupos son entonces activados para que ellos reaccionen con grupos amino o carboxilico de la molécula proteica (1).

Todos los procedimientos de conjugación generalmente utilizables producen conjugados de variable capacidad hapténica. Existe evidencia que tanto más pequeño el número de haptenos tanto más inmunogénico el conjugado (23).

Sitios de Conjugación.

Muchos esteroides biológicamente activos tienen -- grupos reactivos únicamente en posición 3 en el -- anillo A y en posición 17 en el anillo D. Inicialmente, los conjugados fueron preparados con esteroides acoplados mediante una u otra de estas posiciones (3).

La especificidad del antisuero obtenido por inmunización con un conjugado proteina-esteroide es dependiente del sitio usado para conjugar el esteroide a la proteina y de la naturaleza del puente covalente. Antisueros más específicos son obtenidos si el hapteno (esteroide) es fijado a la proteina en un sitio remoto del grupo funcional característico de la hormona (1).

Así, un antisuero específico para posición 17 en Testosterona tiene reacción cruzada con una variedad de Δ^4 -3-oxoesteroides y fué incapaz de distinguir entre Testosterona, Epitestosterona, Androstenediona y Progesterona, que difieren únicamente en la posición 17 (24).

En un estudio de Testosterona unida a través del carbón 3 vía una Oxima para los residuos de lisina de Albúmina Sérica Humana (T_3 -HSA) y preparándose también los derivados 3-Oxima (T_3 -OX) y 3- ϵ -lisina (T_3 -Lys), se muestra que los anticuerpos reconocen no únicamente la Testosterona, sino también la Oxima puente y el residuo lisina de la albúmina (25).

Similarmente el antisuero: Estradiol-17, reacciona cruzadamente con otros anillos A de Estrogenos Fenólicos (26).

Estos hallazgos guían al desarrollo de conjugados de esteroides a proteínas acarreadoras mediante posiciones fuera de los anillos A y D. La más productiva de estas es el Estradiol-6 conjugado, anti-anticuerpos para el cual muestran baja reacción cruzada (del orden de 1% o menos) con Estrona o Estriol (27) (28). Los antisueros análogos Estriol-6 tiene

una gran reacción cruzada (más del 20%) con Estradiol. Parece ser que el antisuero esteroide es más confundido por la ausencia de un grupo químico (el antisuero de Estriol por la ausencia de un grupo -16-hidroxilo en Estradiol) que por la presencia de un grupo extra (29).

El antisuero para Progesterona-11 conjugado, muestra una alta especificidad para Progesterona a diferencia del Progesterona-3 conjugado (30) (31). - En estudio preliminar que describe la síntesis y - completa caracterización espectroscópica del hapte no 11 α -Hemissuccinil-Progesterona, se destaca -- que la distancia entre el sitio de unión en el núcleo esteroide de este derivado y su grupo funcional es mayor que en derivados esteroideos en las posiciones C3, C6, C7 o C20 y que un anticuerpo mas-especifico es obtenido (21).

Para Testosterona, sin embargo, el antisuero para anillo B o C conjugados (posición 6, 7 u 11 por -- instancia) son decepcionantemente menos especifi--cos que aquellos de Testosterona-3 conjugados que muestran de 30 a 100% de reacción cruzada con DHT-(2).

095102

El Adyuvante.

En ciertas circunstancias, se considera importante aumentar la respuesta inmune normal. Las substancias que consiguen este objetivo se llaman adyuvantes. Se han empleado como adyuvantes gran variedad de compuestos. Los más sencillos son los que hacen más lenta la liberación del antígeno en el cuerpo. El sistema inmunitario es impulsado -- por antígenos, reacciona a la presencia de éstos, pero deja de hacerlo en cuanto son eliminados. Esta eliminación puede hacerse más lenta si el antígeno se mezcla con otro insoluble para formar un "depósito". Son ejemplos de adyuvantes formadores de depósito las sales insolubles de Aluminio: Hidróxido, Fosfato y Sulfato Potásico. Cuando un antígeno mezclado con alguna de estas sales se inyecta a un animal, se forma en los tejidos un granuloma rico en macrófagos. El antígeno contenido en la lesión escapa lentamente hacia el cuerpo, - proporcionando así un estímulo prolongado. Mediante esta técnica pueden retenerse varias semanas - en el cuerpo antígenos que normalmente sólo per-sisten unos cuantos días. Dichos adyuvantes infl

yen únicamente sobre la respuesta inmune primaria, y tienen poco efecto sobre la secundaria clásica. Otro método para formar un depósito consiste en mezclar el antígeno con una emulsión de agua en aceite. Este último estimula una reacción inflamatoria local con formación de tejido granulomatoso en torno al sitio de la inyección, en tanto que el antígeno sale lentamente (por lixiviación) de la fase acuosa. Cuando a una emulsión de éstas se le añaden micobacterias muertas, se conoce con el nombre de Adyuvante Completo de Freund's (FCA) su mamente poderoso. El FCA actúa mejor por vía subcutánea o intradérmica, y la facilitación óptima se obtiene con dosis de antígeno relativamente bajas (8,b).

Los adyuvantes pueden no sólo incrementar la respuesta inmune, ellos pueden también inducir cambios de un tipo de respuesta inmune a otras. Por ejemplo, dosis de ASB, que en la ausencia de adyuvantes inducen tolerancia, en la presencia de adyuvantes inducen formación de anticuerpos (32). Actúan de manera específica estimulando la función de linfocitos T, así que sólo facilita la --

respuesta a antígenos dependientes del timo. Favorece la producción de IgG sobre la IgM, inhibe la inducción de tolerancia, favorece las reacciones de hipersensibilidad retardada y acelera el rechazo de injertos (8,b).

Las células inicialmente envueltas en la acción de adyuvantes son Macrófagos que interaccionan con linfocitos T, requeridos para potenciación de anticuerpos contra albúmina sérica bovina. La respuesta inmune para muchos antígenos requiere cooperación de linfocitos T y linfocitos B (32).

Bordetella Pertussis actúa como endotoxina para fomentar la producción de anticuerpos estimulando la actividad de linfocitos B y causan linfocitosis en algunas especies (8,b).

Especies Animales.

La mayor parte de los antisueros para radioinmunonálisis (RIA) han sido preparados en cerdos guinea o conejos. Hay muy pocos casos donde las especies son de importancia; la virtual necesidad de usar cerdos guinea para producción de antisueros de insulina es una rara excepción. Los relativamente pequeños volúmenes de suero obtenidos de es

tos animales son por lo general enteramente suficientes por las altas diluciones con que se trabaja en el radioinmunoanálisis (6).

Muchos animales en su respuesta individual a diferentes inmunógenos muestran variaciones debidas, - por lo menos en parte, a función de la constitución genética (33).

La raza innata de animales tiene un restringido - pool genético y en teoría puede, por lo tanto ser esperado el exhibir una relativamente restringida clase de respuestas inmunológicas. A menos que -- una raza innata sea conocido que responda bien a -- una partícula inmunogénica específica (6).

Ruta de Inmunización.

Es práctica común inyectar adyuvantes oleosos en emulsión de manera subcutánea o intramuscular, La ruta primera tiene la desventaja de que usualmente forma pequeños abscesos y úlceras, si bien ningún conejo o cerdo guinea parece estar incomodo - por ello (6).

Más productivo y simple, es el procedimiento de - inyección intradérmica múltiple, que consiste en rasurar varios conejos en el dorso y borde proxi-

mal y administrar intradermicamente una emulsión - en 30-50 sitios de modo que cada animal reciba un total de 2 ml de la emulsión. En un sitio separado es inyectado subcutáneamente 0.5 ml de Bordetella-Pertussis. La respuesta de anticuerpos es relativamente rápida y la economía en el inmunógeno es notoria (34).

Resultados indeterminados después de varios meses de trabajo generalmente son demasiado comunes y esta es una de las mayores razones por lo cual tan pocos intentos son hechos para comparar procedimientos de inmunización para obtención de antisueros - para RIA y aunado a ello no todos los intentos hechos son reportados (6).

Dosis, Tiempo de Inyecciones y Colección de Antisueros,

Las rutas fundamentales para el logro de máxima avidéz son hechas para reducir la cantidad de inmunógeno al mínimo nivel efectivo y para incrementar el intervalo entre inyecciones hasta el máximo que el paciente permita. Generalmente, dosis del orden de 100 μ g de inmunógeno son suficientes, aunque puede ser necesario incrementarla si el material es de baja pureza. No es aconsejable inyectar emul

siones de adyuvante completo de Freund's más frecuentemente que a intervalos mensuales y tiene ventajas permitir un descanso de algunos meses entre inmunizaciones.

La respuesta máxima después de la aplicación del inmunógeno en inyecciones múltiples intradérmicas parece ser después de un intervalo de algunas 8-10 semanas, si bien, los niveles parecen quedar altos por algún tiempo y el tiempo de colección no es crítico (6).

Una vez que un conjugado ha sido preparado, generalmente no es problema la obtención de antisueros con altos títulos (2).

Después de la inmunización, los títulos de los anticuerpos desarrollados son monitoreados y el sangrado final es realizado cuando un título adecuado ha sido logrado. El antisuero parece ser completamente estable cuando se almacena a menos 20°C, aunque se prefiere usualmente una temperatura de menos 70°C. Unos pocos mililitros de un antisuero con un título alto es frecuentemente suficiente para millones de determinaciones por RIA (1).

O B J E T I V O S

El presente trabajo se planteó los siguientes objetivos:

Producir Antisueros Policlonales específicos-
contra:

- a) CORTISOL
- b) ESTRADIOL
- c) PROGESTERONA
- d) TESTOSTERONA

Estandarizar los reactivos producidos contra-
el material de referencia internacional usado
por la Organización Mundial de la Salud.

MATERIAL Y METODOS.

PREPARACION DE LOS INMUNOGENOS.

Se han sintetizado cada uno de los siguientes derivados de esteroides:

- 1.- Testosterona-3-Carboximetiloxima
- 2.- Cortisol-3-Carboximetiloxima
- 3.- 17 beta Estradiol-6-Carboximetiloxima
- 4.- Progesterona-11-Hemisuccinato

La síntesis química se realizó en el Departamento de Química Orgánica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el Dr. Gustavo García de la Mora, quien tiene amplia experiencia en estos procesos y está reconocido como experto en síntesis de compuestos orgánicos por la Organización Mundial de la Salud. Se ha logrado la conjugación con Albumina Sérica Bovina de cada uno de los derivados mencionados anteriormente.

ESQUEMA DE INMUNIZACION.

Los inamunógenos (derivados de esteroides acoplados con Albumina Sérica Bovina), han sido inoculados en conejos machos de tres meses de edad de la raza Nueva Zelanda, con el objeto de inducir una respuesta inmunológica en los animales, que se manifieste por

la producción de inmunoglobulinas específicas contra la hormona esteroide en su forma pura.

En la inmunización de los conejos es necesario contar con el siguiente Material y Equipo:

- 1) Conjugado Esteroide-ASB
- 2) Buffer de Fosfatos
- 3) Adyuvante Completo de Freund's
- 4) Bordetella Pertussis Detoxificada
- 5) Jeringa de vidrio (10 ml)
- 6) Conejos machos de tres meses de edad de la raza Nueva Zolanda
- 7) Llave de dos vías para emulsión
- 8) Jeringas para insulina (1 ml)

Preparación de Materiales:

Buffer de Fosfatos: Hervir un litro de agua desionizada, una vez hecho esto, se agregan 2.35 gr de Fosfato de Sodio Monobásico Anhidro (NaH_2PO_4); 11.6 gr de Fosfato Dibásico Anhidro (Na_2HPO_4); 8.8 gr de -- Cloruro de Sodio (NaCl); 0.1 gr de Thimerosal y 1 gr de gelatina. Se deja reposar en el cuarto frío. El pH debe estar entre 7.2 y 7.4

Emulsión para Inmunización (Individual): Disolver 300 μg del inmunógeno (Conjugado esteroide-ASB) en 350 μl de amortiguador de fosfatos y mezclar con un volumen semejante-

de una suspensión de Bordetella Pertussis detoxificada que contenga 0.5 millones de bacterias. A la mezcla resultante se agregan 1.5 ml de Adyuvante -- Completo de Freund's. Mezclar bien el material usando dos jeringas de cristal de 10 ml y una llave de dos vías aspirando alternadamente, hasta obtener -- una consistencia viscosa y un color blanco.

Procedimiento de Inmunización:

- a) Rasurar los conejos desde el dorso y borde proximal.
- b) Usando las jeringas para insulina, inocular en forma intradérmica en 25 diferentes sitios (100- μ l).
- c) Aplicar 0.5 ml por vía subcutánea de Bordetella-Pertussis detoxificada.

Pasadas tres semanas, se aplican 2 ml de Adyuvante-Completo de Freund's por vía intradérmica en 20 sitios del dorso. A la cuarta semana se inicia la colección de sangre (toma de muestras) de cada uno de los animales inoculados, mediante punción de la vena marginal de la oreja. Se separa el suero y se busca la presencia de anticuerpos específicos contra las hormonas esteroideas.

095102

ESQUEMA DE TRABAJO.

El Departamento de Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, proporcionó la totalidad de conejos que se -- utilizaron, mismos que fueron instalados en el bioterio con que cuenta el departamento.

En una primera etapa, se trabajo con 5 conejos con los siguientes pesos:

Conejo # 1: 2.300 Kg
2: 1.800 Kg
3: 2.150 Kg
4: 2.000 Kg
5: 1.900 Kg

Estos conejos fueron inoculados siguiendo el esquema de inmunización anterior, excepto que no se aplicó el conjugado esteroide-ASB. La finalidad de ello fué para establecer las condiciones físicas y materiales con que se estaría trabajando; establecer si los conejos respondían de manera adecuada en la formación de granulomas; si no existía una respuesta hiperinmune y, en general, conocer el manejo y alimentación así como aspectos de sanidad con que cuenta el bioterio. Al respecto, cabe señalar que no hu

bo problemas en el bioterio y si gran disposición de colaboración por todos los elementos encargados del mismo. El alimento proporcionado de marca comercial (Conejina de Purina) fué del agrado de los animales; la formación de granulomas en el dorso de los conejos fué positiva y de un número adecuado; no se observó síntomas de trastornos fisiológicos en el transcurso de este período mismo que se inició el 3 de noviembre de 1986 y concluyó seis semanas después, el día 15 de Diciembre del mismo año.

Una vez realizada esta primera etapa, se procedió a desarrollar el programa de trabajo para obtener los antisueros específicos contra cada derivado esteroide.

Siguiendo el esquema de inmunización señalado anteriormente, se procedió a inocular a 4 conejos contra 17 beta Estradiol. El miércoles 17 de Diciembre de 1986, se pesaron cuatro conejos machos de la raza Nueva Zelanda de tres meses de edad. Los pesos fueron los siguientes:

Conejo # 1: 1.900 Kg

2: 2.400 Kg

3: 2.400 Kg

4: 2.100 Kg

El mismo día fueron rasurados desde el dorso y borda proximal. Al día siguiente, jueves 18, se preparó la emulsión y se aplicó intradermicamente a cada uno de los conejos un total de 2.5 ml de la suspensión. así como 0.5 ml de una solución que contenia Borletella Pertussis y se aplico por vía subcutánea. Se les clasificó como EI, EII, EIII y EIV. Tres semanas después (3-I-87), se les aplicó el refuerzo con 2 ml de adyuvante completo de Freund's por vía intradérmica a cada animal. Se apreciaron ya algunos granulomas (15 a 17 por animal). A partir del jueves 15 de enero de 1987, se tomaron --- muestras sanguíneas de la vena marginal de la oreja de cada uno de los conejos y se sacrificaron el 19 de Febrero. En el transcurso de este periodo murió el conejo EII por desnucamiento al estar colectando sangre.

Se continuó el martes 17 de marzo con la inmunización de cuatro conejos contra Progesterona-11-Hemisuccinato, y cuyos pesos fueron los siguientes:

Conejo # 1: 2.600 Kg

2: 2.400 Kg

3: 2.300 Kg

4: 2.300 Kg

Se los clasificó como PI, PII, PIII y PIV. El refuerzo fué aplicado el 7 de Abril, observándose un promedio de 15 granulomas por animal.

La primera muestra se tomó el 14 de abril y se sacrificaron el 25 de julio. Hubo necesidad de reinmunizar el 25 de junio. En el transcurso de la sexta semana murió el conejo PII.

El 4 de junio de 1987, se inmunizaron tres conejos contra Cortizel-3-CMO. Los pesos fueron los siguientes:

Conejo # 1: 3.250 Kg

2: 3.400 Kg

3: 3.500 Kg

Estos conejos contaban ya con cuatro meses de edad y se clasificaron como CI, CII y CIII. El 25 de junio se aplicó el refuerzo con AGE y a partir del 1 de julio se comenzó a tomar las muestras sanguíneas, mostrando un promedio de 15 granulomas por animal.

Fueron sacrificados el 15 de octubre únicamente -- los conejos CI y CII, el CIII se sacrificó el 30 -- de Noviembre. Se reinmunizaron el 17 de agosto y -- el 19 de octubre recibió una segunda reinmuniza--- ción el conejo CIII.

El 17 de agosto de 1987, se inmunizaron tres cone- jos contra Testosterona-3-CMO. Los pesos fueron -- los siguientes:

Conejo # 1:	2.400	Kg
2:	1.300	Kg
3:	2.200	Kg

El 7 de septiembre se aplicó el refuerzo usando -- ACF, mostrando los animales 17 granulomas en promo dio. El 14 de septiembre se inició la toma de ---- muestras. Se reinmunizaron los conejos II, TII y - TIII el 19 de octubre y se sacrificaron el 30 de - noviembre.

EVALUACION DE LOS ANTISUEROS.

A partir de la cuarta semana de haber iniciado la- inmunización de los animales, se evaluó una aliqu e ta del suero para identificar la presencia de anti- cuerpos específicos contra la hormona esteroide -- inoculada. La evaluación se hace a intervalos sema

nales hasta que se logren los títulos de antisue-
ro óptimos, en cuyo caso el animal es sacrifica-
do para coleccionar la mayor cantidad de suero san-
guíneo posible.

La estrategia de evaluación del suero comprende
las siguientes etapas:

a) Curvas de Dilución del Suero (Ensayos de Unión).

Para cada alícuota de suero obtenida se preparan
curvas de dilución del suero, empleando como tra-
zador a la hormona esteroide marcada con tritio.
Se busca una dilución del suero de por lo menos-
1:4 000 que demuestre una adecuada unión al tra-
zador (50%). Una vez logrado esto, serán se-----
leccionados para el resto de las pruebas.

b) Tiempos de Incubación.

A fin de mantener un mismo manual de procedi-----
mientos para todos los análisis que involucren -
la cuantificación de hormonas esteroides, se de-
termina el tiempo óptimo para el equilibrio de -
la reacción antígeno-anticuerpo a 4°C (1).

c) Especificidad de los Antisueros y Reacción --
Cruzada a 50% B/Bo.

Las diluciones escogidas de acuerdo a la sensibi

lidad y estabilidad de la reacción, son sometidas a pruebas de especificidad, empleando esteroides naturales como semejanza estructural a la hormona que se empleó como inmunógeno.

Se determina el porcentaje de la reacción cruzada al 50% de unión del trazador, seleccionando para las pruebas de equivalencia los sueros que resultan altamente específicos.

a) Curvas de Dilución del Suero: Las muestras sanguíneas tomadas de cada animal a intervalos semanales, fueron analizadas en el laboratorio de Hormonas Esteroides del departamento de Biología de la Reproducción del I.N.N.S.Z.

Como primer paso, se procede a centrifugar las muestras a 2500 rpm, por espacio de 20 minutos. Posteriormente se retira el coagulo y se colecta el suero en unos viales de cristal; se rotula cada vial anotando la fecha, número de sangrado y hormona contra la que fué inmunizado el conejo. Para cada suero colectado se practica una curva de dilución empleando los siguientes Materiales y Equipos:

- 1.- Suero Colectado
- 2.- Buffer de Fosfatos

- 3.- Trazador (hormona³H)
- 4.- Sol. de Carbón Dextran
- 5.- Líquido de Centelleo
- 6.- Pipetas Oxford graduada de 200-1000 ul
- 7.- Pipeta graduada de 200 ul
- 8.- Puntas para pipetas
- 9.- Vortex (Sybron Thermoline)
- 10.- Gradilla para tubos de ensayo
- 11.- Tubos de ensayo
- 12.- Contador de Centelleo Líquido de Batas
- 13.- Viales de Cristal (Cajas de 100)
- 14.- Centrífuga refrigerada a 4°C para 100 tubos.
- 15.- Refrigerador (4°C)
- 16.- Recipientes para el hielo escarchado
- 17.- Hielo escarchado

Preparación de Materiales.

Buffer de Fosfatos: Como lo descrito anteriormente.

Trazador (hormona³H): Diluir con Buffer para obtener 10 000 cpm. Sol. Carbón Dextran: En 100 ml de Buffer se agregan 0.0625 gr de Dextran y 0.625 gr de Carbón Activado Lavado.

Líquido de Centelleo: Se mezclan 21 mililitros de Alcohol Etilico Absolute y 42 ml de Liquifluor y -

después se agrega Tolueno hasta obtener un litro.

Protocolo:

Marcar los tubos de ensaye anotando la dilución de que se trate.

En el presente trabajo, se prepararon las siguientes diluciones:

Dilución	Vol.Inicial (suero)	Vol.Diluyente (Buffer)	Vol. Final
1:10	0.2 ml	1.8 ml	2 ml
1:100	0.2 ml(1:10)	1.8 ml	2 ml
1:1000	0.2 ml(1:100)	1.8 ml	2 ml
1:2000	1 ml(1:1000)	1 ml	2 ml
1:4000	1 ml(1:2000)	1 ml	2 ml
1:6000	1.333 ml(1:4000)	0.667 ml	2 ml
1:8000	1.500 ml(1:6000)	0.500 ml	2 ml
1:10000	1.600 ml(1:8000)	0.400 ml	2 ml
1:12500	1.600 ml(1:10000)	0.400 ml	2 ml
1:15000	1.666 ml(1:12500)	0.334 ml	2 ml
1:20000	1.500 ml(1:15000)	0.500 ml	2 ml
1:25000	1.600 ml(1:20000)	0.400 ml	2 ml
1:30000	1.666 ml(1:25000)	0.334 ml	2 ml

TABLA # 1.

Para la obtención de la dilución 1:10, se toman -- 200 µl del suero sanguíneo y se agregan 1.8 ml de Buffer, se agita en el vortex y se sacan 200 µl de

esta dilución, se agregan 1.8 ml de buffer y obtenemos la dilución 1:100. Las siguientes diluciones son obtenidas de forma similar considerando las cantidades correspondientes a cada una. Para la preparación de cada una de las diluciones es necesario considerar antes las siguientes formulas:

Volúmen Inicial X Dilución Final = Vol.Final X Dil.Final.

De lo que se desprende:

$$V_i = \frac{V_f \times D_f}{D_i}$$

$$V_f = \frac{V_i \times D_i}{D_f}$$

$$D_i = \frac{V_f \times D_f}{V_i}$$

$$D_f = \frac{V_i \times D_i}{V_f}$$

Una vez obtenidas las diluciones elegidas, se procede a realizar los Ensayos de Unión para establecer el porcentaje de unión del antisuero con el antígeno marcado. Teóricamente se establece la siguiente reacción:

095102

Ag* (10,000 cpm) + Diluciones
 del suero → Ag*Ac+Ag*
 (Ac) Fracción Fracción
 unida (1) libre

Primeramente se procede a marcar por duplicado - una serie de tubos de ensaye anotando la dilu- - - ción y la clasificación del conejo al que pertenece el suero y los tubos de Unión no Especifica. Los Ensayos de Unión comprenden:

1.- Antisuero diluido en presencia del trazador.

2.- Cuentas Totales

3.- Unión No Especifica

1.- Por duplicado, a cada tubo se introduce 0.3 - ml de Buffer Fosfatos; 0.1 ml de marca (hormona-³H) y 0.1 ml del antisuero a cada dilución. Se agitan en el vortex y se incuban por 18 horas a 4°C.

2.- Por duplicado, en cada vial se introducen -- 0.1 ml de marca 0.4 ml de Buffer; 5 ml de líquido de centelleo. Se agitan y se limpian cada --- vial con alcohol. Se guarda en la caja de viales protegiéndolo de la luz. (Esto representa las --- cuentas totales adicionadas).

3.- Por duplicado, en cada tubo de ensaye se introduce 0.1 ml de marca y 0.4 ml de Buffer Fosfa

tos. Se agitan y se incuban 18 hrs a 4°C. Se tapa la gradilla con papel aluminio y se rotula anotando el nombre del usuario y el trabajo realizado, se llevan al refrigerador junto con los tubos que corresponden a la unión no específica. En la tabla # 2 se muestra el esquema de trabajo.

Pasadas las 18 hrs a 4°C de incubación, se pone la gradilla con todos los tubos sobre hielo escharchado y se les agrega a cada tubo 200 µl de una solución de carbón dextrán al 1 % y se agitan en el vortex. Se les deja reposar por espacio de 30 minutos. Se llevan a la centrifuga refrigerada a 4°C y se centrifugan a 3000 rpm por 15 minutos. Se sacan de la centrifuga e inmediatamente después se decantan en viales, se agregan 5 ml de líquido de centelleo por vial. Se rotula la tapa indicando la dilución y el antisuero usado así como los que corresponden a las uniones no específicas. Se agitan en el vortex, se limpia cada vial con alcohol y se dejan reposar por un mínimo de 4 hrs, posteriormente, se llevan al contador de centelleo junto con los viales de las cuentas totales.

El orden que deben seguir en el contador es como sigue: primero los viales de las cuentas totales, después los que corresponden a las uniones no específicas y luego los viales con cada dilución, (los menos diluidos primero). El contador está programado para contar cada vial -- por espacio de un minuto.

TUBOS NUMERO O NOMBRE	ul de Buffer	ul del Trazador	ul de cada Dilución
C. Totales	400	100	- - - - -
U.N.E.	400	100	- - - - -
1,1"	300	100	100 (1:1 K)
2,2"	300	100	100 (1:2 K)
3,3"	300	100	100 (1:4 K)
4,4"	300	100	100 (1:6 K)
5,5"	300	100	100 (1:8 K)
6,6"	300	100	100 (1:10 K)
7,7"	300	100	100 (1:12.5 K)
8,8"	300	100	100 (1:15 K)
9,9"	300	100	100 (1:20 K)
10,10"	300	100	100 (1:25 K)
11,11"	300	100	100 (1:30 K)

Tabla # 2

Esquema de Trabajo realizado para los ensayos de Unión.

El antisuero puro y la dilución 1:100 deben ser conservados a menos 70°C.

Pruebas de Especificidad y Reacción Cruzada a - 50% B/Bo.

Continuando con la caracterización de los anticuerpos producidos, se procedió a determinar -- que tan específicos eran en base al porcentaje de reacción cruzada que presentaban con otros - esteroides semejantes estructuralmente.

Además de los materiales y equipo utilizados en los ensayos de unión es necesario contar con lo siguiente:

- 1.- Estandar del Antígeno
- 2.- Estandares de las hormonas esteroides con - semejanza estructural.

Preparación:

1.- Para el estandar 1, se toman 500 µl del --- stock A (estandar más concentrado) y se agregan 4.5 ml de Buffer. De este se toman 0.5 ml y se agregan 4.5 ml de Buffer para formar el estandar 2 y así sucesivamente hasta tener el estandar 6.

2.- Para el stock A, se prepara una solución 10 mM como sigue:

17 B Estradiol: PM 272.4
 Solución 10 mM 2724 mg/litro
 2.724 mg/ml
 68.1 mg/25 ml

68.1 mg es lo que se pesa para diluirlo en 25 ml de alcohol absoluto. Se toman 100 µl de la solución alcoholica y se evapora a sequedad en un vial. Se reconstituye en 10 ml de buffer de fosfatos.

A continuación se realizan una serie de diluciones como sigue:

0.5 ml del Stock A más 4.5 ml de buffer	Estandar 1
0.5 ml del estandar 1 más 4.5 ml de buffer	Estandar 2
0.5 ml del estandar 2 más 4.5 ml de buffer	Estandar 3
0.5 ml del estandar 3 más 4.5 ml de buffer	Estandar 4
0.5 ml del estandar 4 más 4.5 ml de buffer	Estandar 5
0.5 ml del estandar 5 más 4.5 ml de buffer	Estandar 6

Cada antisuero fué probado con un grupo de hormonas que le son semejantes al antígeno contra el cual fué producido.

A continuación se señala cada antisuero y su grupo de hormonas contra los cuales fué probado:

17 B Estradiol

1.- Estrona

- 2.- Estriol
- 3.- Cortisol
- 4.- 17α Estradiol
- 5.- Etinil Estradiol

Cortisol

- 1.- Desoxicorticosterona
- 2.- Corticosterona
- 3.- 11-Desoxicortisol
- 4.- 17 alfa hidroxiprogesterona
- 5.- Progesterona

Testosterona

- 1.- Androstendiol
- 2.- Δ^4 Androstendiona
- 3.- 5 Alfa Dihidrotestosterona
- 4.- Cortisol

Procedimiento:

Se marcan por duplicado los tubos de ensaye anotando los que corresponden a los Bo, a los de UNE y al número de estandar.

Para cada reactante a cruzar se desarrolla una curva estandar como sigue:

TUBOS

1 - 2	Bo →	100 μ l	As + 100 μ l ^3H + 500 μ l de buffer
3 - 4	UNE →	100 μ l	^3H + 600 μ l de buffer
5 - 6	Std	1	} 100 μ l As + 100 μ l ^3H + 500 μ l de cada Std.
7 - 8	Std	2	
9 - 10	Std	3	
11-12	Std	4	
13-14	Std	5	
15-16	Std	6	
17-18	Bo →	(igual que los anteriores)	
19-20	UNE →	(igual que los anteriores)	

El antisuero es usado a la dilución elegida y el trazador con 10 000 cpm aproximadamente.

La curva estandar para el antígeno se realiza de la misma forma. En el desarrollo de esta etapa se sigue el mismo esquema de trabajo que en los ensayos de Unión, es decir, el tiempo de incubación es de 18 hrs a 4°C; se agrega Carbon Dextran, se centrifuga a 3000 rpm durante 15 minutos, se decanta, se agrega líquido de centelleo y se ponen a contar los viales.

La concentración de cada estandar de los antígenos

usados es la siguiente:

Cortisol:

<u>Estandar</u>	1	2175.0	pg/0.5 ml
"	2	1087.5	pg/0.5 ml
"	3	543.75	pg/0.5 ml
"	4	271.87	pg/0.5 ml
"	5	135.93	pg/0.5 ml
"	6	67.96	pg/0.5 ml
"	7	33.98	pg/0.5 ml

17 β Estradiol:

Estandar	1:	204.8	pg/0.5 ml
"	2:	102.4	pg/0.5 ml
"	3:	51.2	pg/0.5 ml
"	4:	25.6	pg/0.5 ml
"	5:	12.8	pg/0.5 ml
"	6:	6.4	pg/0.5 ml

Testosterona:

Estandar	1:	316.8	pg/0.5 ml
"	2:	158.4	pg/0.5 ml
"	3:	79.2	pg/0.5 ml
"	4:	39.6	pg/0.5 ml
"	5:	19.8	pg/0.5 ml
"	6:	9.9	pg/0.5 ml

ANALISIS DE RESULTADOS.

Con los valores de las cuentas totales, uniones no especificas y cuentas de cada dilución se --
procede a obtener los datos referentes al por--
centaje de unión en cada dilución trabajada, pa
ra ello se aplica la siguiente formula:

$$\frac{\bar{X} \text{ de cada dilución} - \bar{X} \text{ de las U.N.E.}}{\bar{X} \text{ de las C.T.}} \times 100 = \% \text{ de Unión}$$

Todo este protocolo de trabajo se realizó de ma -
nera individual para cada suero obtenido por ca-
da conejo y de manera semanal hasta lograr la --
dilución elegida con el porcentaje de unión de -
seado. Una vez logrado esto se procede al sacri-
ficio de los conejos a través del sangrado total
por punción cardiaca.

El curso de la producción de antisueros contra -
17 beta E₂-6-CMO-ASB (tabla #3), de los conejos-
inoculados que sobrevivieron siempre fué en for-
ma ascendente. En la tercera semana de muestreo;
los sueros de los conejos EI, EIII y EIV, mostra
ban un 31%, 21% y 50% de unión al trazador res--
pectivamente, en una dilución de 1:4 000.

En la quinta semana de muestreo, los sueros de -

Inmunización: 13-XII-86 17^B ESTRADIOL-6-CMO-ASB Refuerzo: 8-I-88
 Conejos Diluciones 15-I-87 22-I-87 29-I-87 5-II-87 12-II-87 19-II-87

EI	1 K	13.75	35.14	65.97	67.51	76.85	79.83
	2 K	8.62	19.08	48.88	53.27	66.75	75.60
	4 K	5.9	12.46	31.76	35.43	46.20	69.02
	8 K	3.73	7.35	20.30	19.08	32.15	51.52
	16 K	3.03	5.82	12.32	14.83	25.63	33.90
	32 K	2.03	3.24	7.29	5.50	7.35	19.99
EII	1 K	3.49					
	2 K	2.32					
	4 K	1.96					
	8 K	1.49					
	16 K	1.45					
	32 K	1.41					
EIII	1 K	9.16	20.26	52.66	58.48	71.18	84.18
	2 K	3.90	11.15	35.34	40.20	62.78	80.29
	4 K	2.37	8.09	21.78	24.30	46.80	73.46
	8 K	2.02	4.48	12.64	12.51	35.17	62.49
	16 K	1.76	3.86	7.75	6.19	24.35	38.42
	32 K	1.20	2.58	4.57	2.41	15.12	22.14
EIV	1 K	18.28	48.04	76.87	81.03	92.08	98.18
	2 K	10.81	31.65	70.72	76.09	88.91	95.26
	4 K	5.91	19.78	50.54	63.60	85.78	93.02
	8 K	4.40	12.26	32.98	40.45	60.54	77.88
	16 K	2.40	7.48	19.15	24.45	36.12	52.08
	32 K	1.85	4.15	10.61	12.14	18.88	28.83

095102

estos conejos alcanzaban a unir 32%, 35% y 60% - respectivamente con el trazador en una dilución 1:8 000. En base a lo anterior se determinó sacrificarlos el 19 de febrero de 1987 (sexta semana), tratando de obtener el máximo de sangre posible.

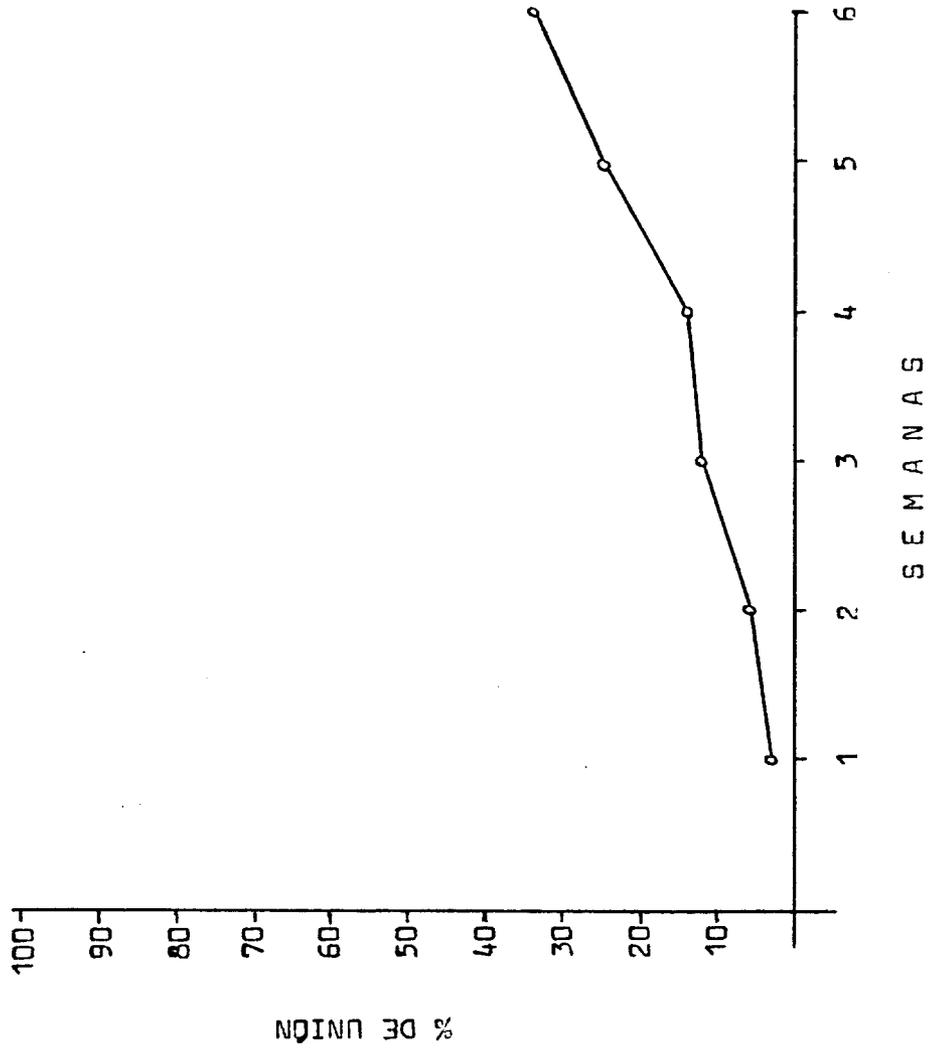
Los datos del sangrado final indicaron que el suero de los conejos EI, EIII y EIV, unían 33%, 38% y 52% respectivamente en una dilución 1:16 000.

Como se podrá apreciar, los resultados obtenidos fueron superiores a lo exigido en un principio. De los tres sueros, fué elegido el del conejo EIV para continuar la etapa siguiente de caracterización por haber sido el que mejor respondió de todos. De este conejo se colectó un total de 30 ml de suero, se tomaron aliquotas de 500 µl - cada una y el resto fué almacenado con los demás a -70°C.

Las gráficas 1, 2 y 3, muestran el comportamiento que siguió la producción de anticuerpos en una dilución 1:16 000 de cada conejo y las graficas 4, 5 y 6 la curva de dilución de los sangrados -

17 β ESTRADIOL-6-CMO-ASB .

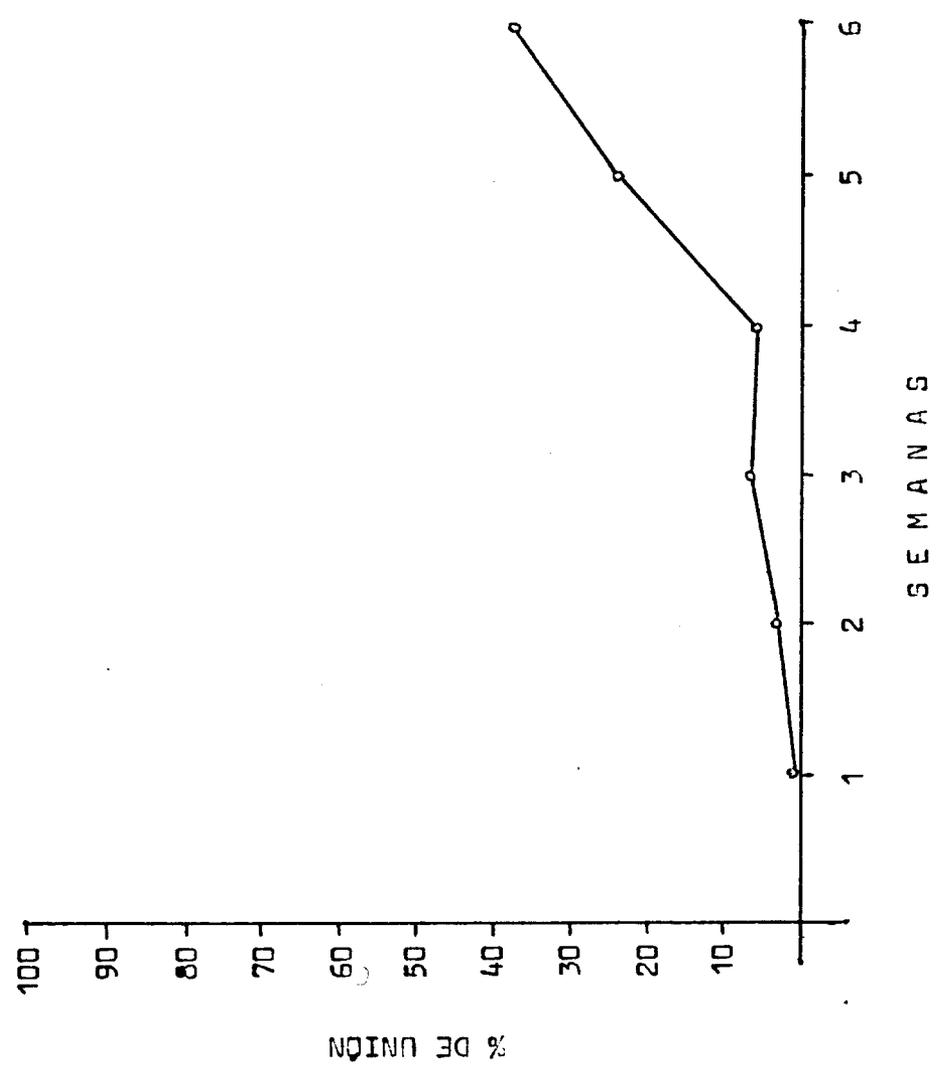
E I 1:16 000



Gráfica # 1

17 β ESTRADIOL-6-CMO-ASB

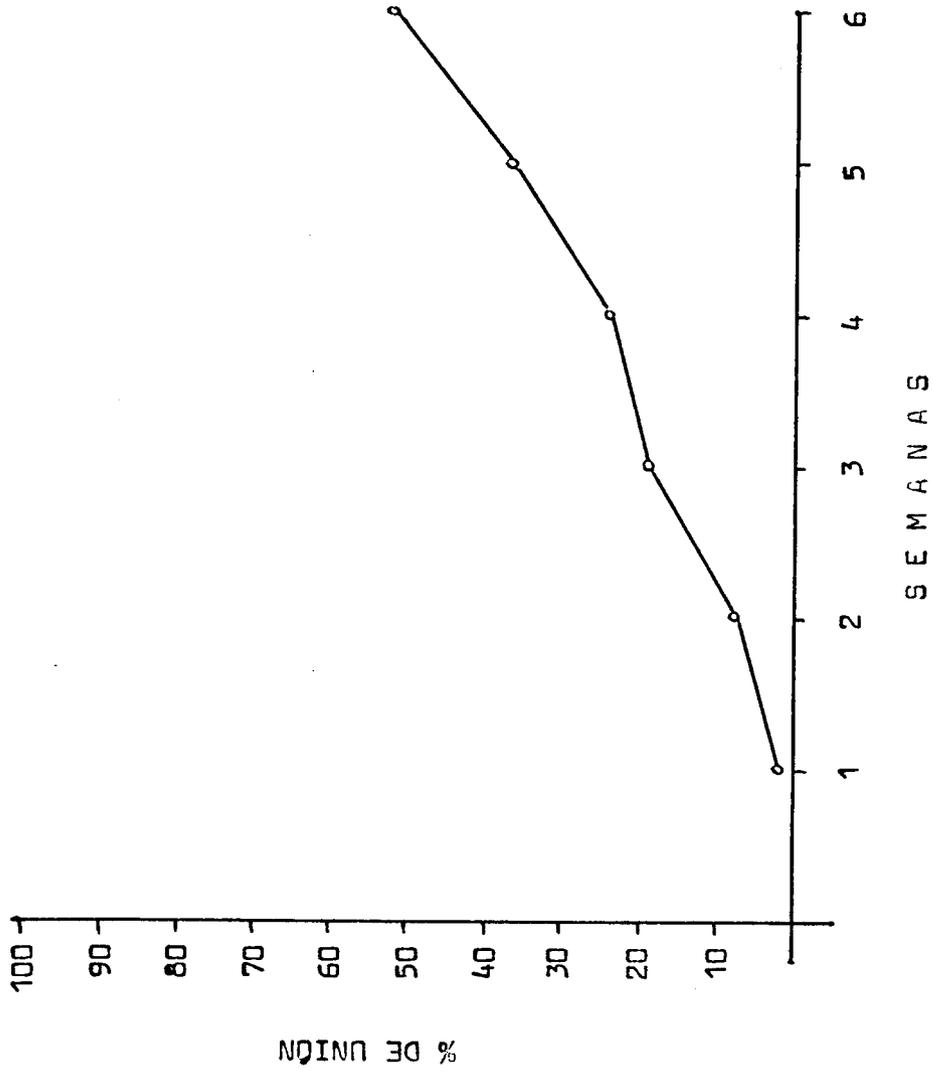
E III 1:16 000



Gráfica # 2

17 β ESTRADIOL-6-CMO-ASB

E IV 1:16 000



Gráfica # 3

17 β ESTRADIOL-6-CMO-ASB

E I SANGRADO FINAL

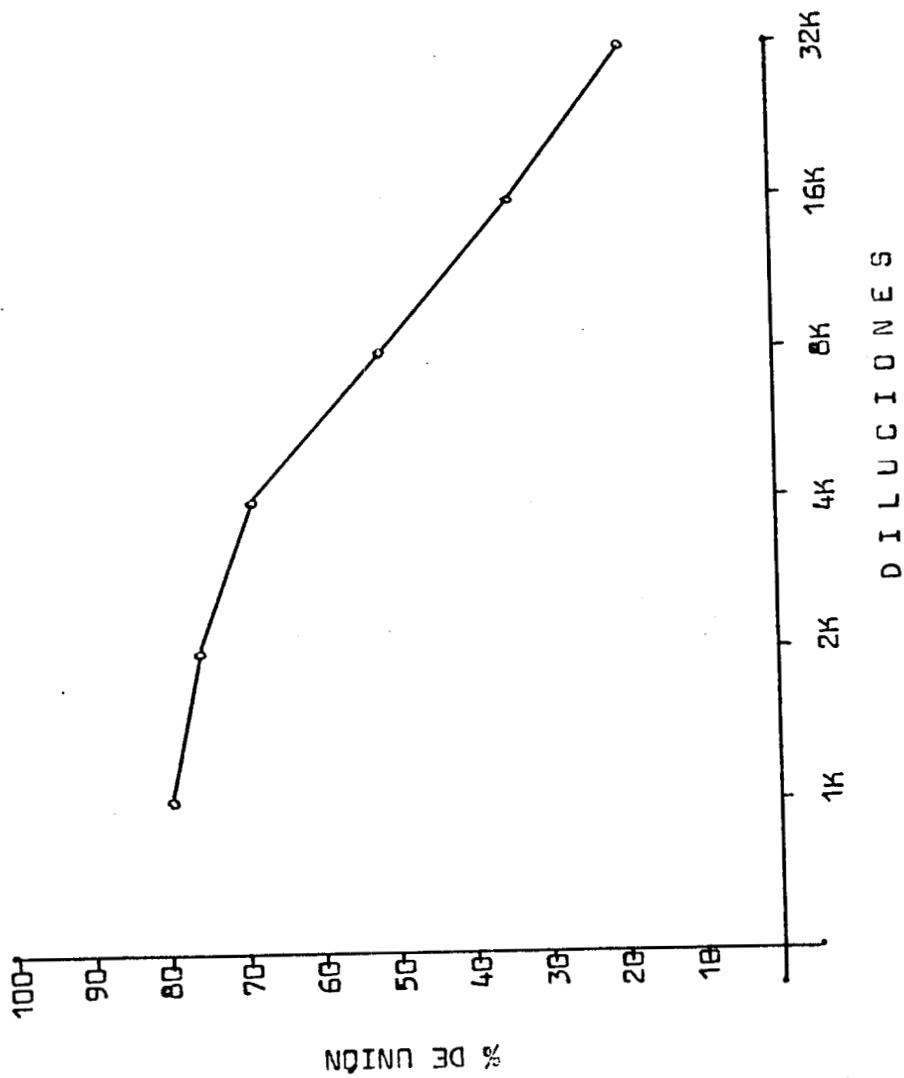
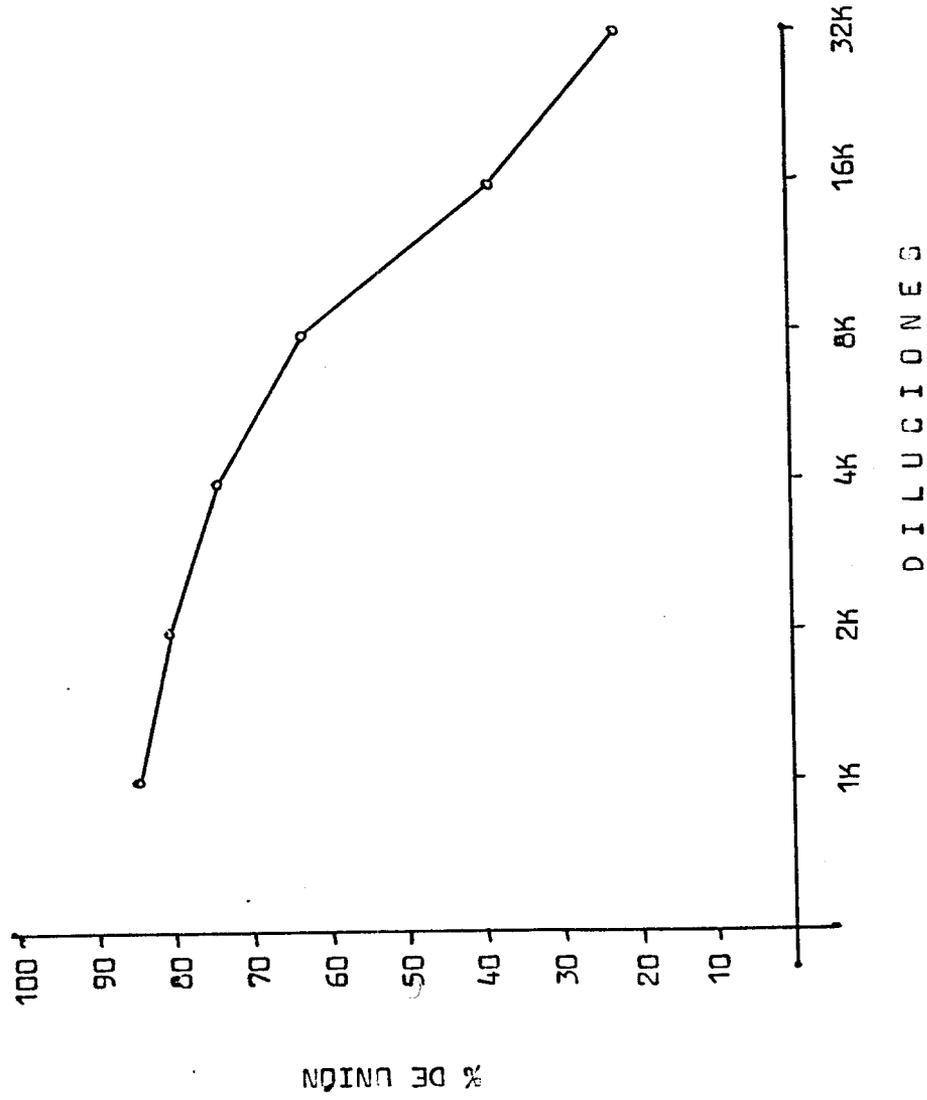


Gráfico # 4

17 β ESTRADIOL-6-CMO-ASB

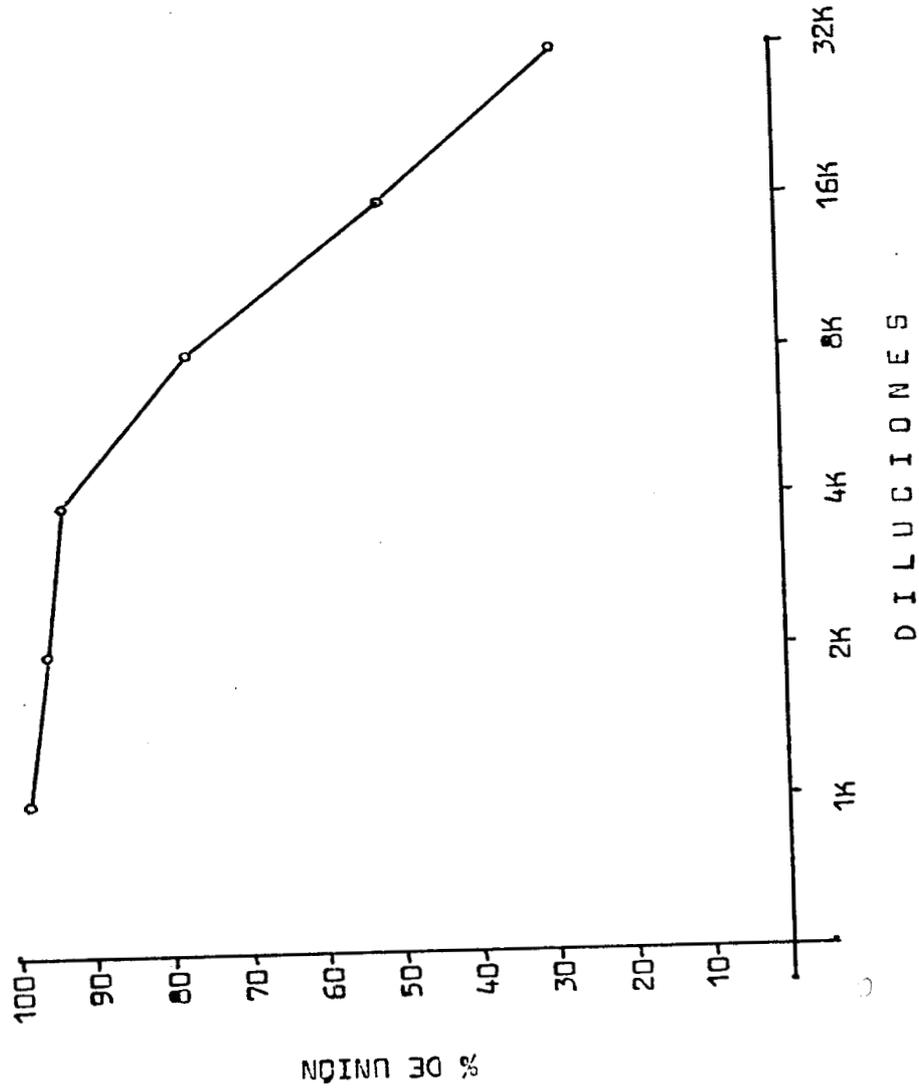
E III SANGRADO FINAL



Gráfica # 5

17 β ESTRADIOL-6-CMO-ASB

E IV SANGRADO FINAL



Gráfica # 6

finales de cada conejo.

Los otros sueros obtenidos fueron guardados en refrigeración en calidad de segunda o tercera opción de uso para RIA.

En el caso de P₄-11-hemisuccinato-ASB (tabla #4), la respuesta inmunológica fué muy pobre hasta la octava semana de muestreos en que se consideró necesario reinmunizar a los tres conejos que sobrevivieron.

En la cuarta semana, el suero del conejo PII unia 28% y parecía poder alcanzar el mínimo requerido de unión (30%) en una dilución 1:4 000, desgraciadamente en la quinta semana bajó su porcentaje de unión drásticamente hasta un 9%, para fallar en el transcurso de la sexta semana, cabe señalar que no se practicó necropsia alguna dado que el conejo ya había sido retirado del bioterio cuando se paso a inspeccionarlos.

El resto de los conejos mantuvo oscilante su producción de inmunoglobulinas, pero siempre por debajo del 15% de unión en dilución 1:4000.

Después de haber reinmunizado a los tres conejos restantes, se dejó pasar una semana para posterior a ella comenzar nuevamente a tomar muestras

Imunización: 17-III-87 PROGESTERONA-11-HEMISUCCINATO-ASB

Conejos Dil. 14-IV-87 21-IV-87 28-IV-87 5-V-87 12-V-87 19-V-87 26-V-87 2-VI-

1 K	3.82	4.54	5.14	6.30	4.77	5.60	5.90	6.4
2 K	3.23	3.47	4.38	4.56	3.43	3.88	3.65	4.0'
4 K	2.43	3.07	3.97	4.27	2.48	3.22	3.02	3.2'
6 K	2.75	2.98	3.54	3.64	2.48	2.59	2.69	2.8'
8 K	2.37	2.84	3.10	2.95	2.32	2.46	2.44	2.6'

1 K	9.85	41.99	59.17	59.09	26.37			
2 K	6.43	25.51	40.72	44.16	15.61			
4 K	4.69	14.85	26.03	28.55	8.96			
6 K	3.59	10.97	17.82	20.12	6.20	M		
8 K	3.58	8.68	15.14	15.89	5.23			

1 K	3.80	5.87	8.43	10.73	9.40	12.60	13.28	13.8'
2 K	3.13	3.89	6.17	6.88	6.00	8.08	7.45	8.2'
4 K	2.79	3.13	4.48	4.20	3.95	5.41	4.85	4.7'
6 K	2.39	2.73	3.91	4.04	3.44	4.14	4.23	4.5'
8 K	2.63	2.56	3.50	3.40	2.91	3.99	4.08	4.1'

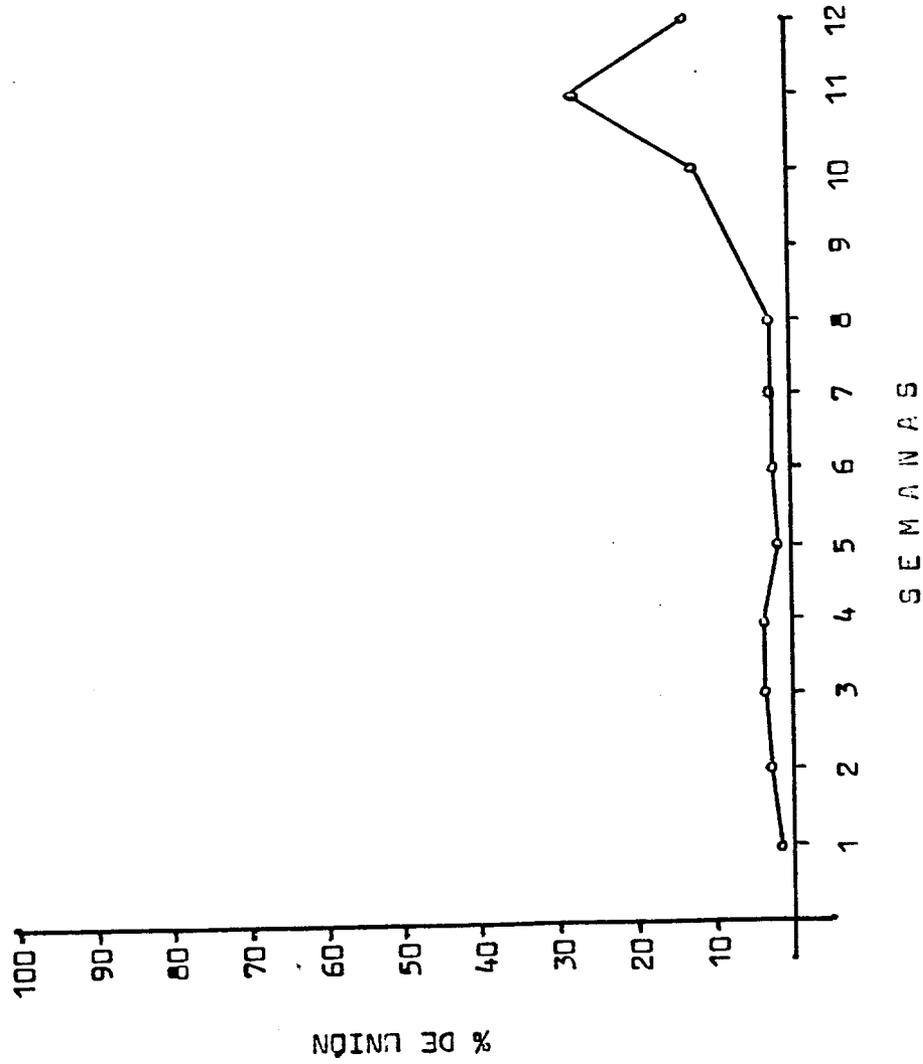
1 K	7.30	11.04	28.17	38.48	35.97	35.15	30.92	30.2'
2 K	4.21	7.85	15.63	25.22	21.84	21.55	19.32	19.5'
4 K	3.48	5.02	10.82	15.13	13.73	13.18	10.80	10.6'
6 K	3.30	2.97	7.89	11.05	9.01	9.16	8.54	8.1'
8 K	2.71	2.62	7.21	8.84	8.12	7.70	6.24	7.3'

FIV

sanguíneas semana a semana. En la primera muestra de este período se observó que los conejos PI y PIII, respondieron satisfactoriamente, en tanto que el conejo PIV se mantuvo casi en el mismo nivel; en la segunda semana postreinmunización, se logró una franca respuesta de los tres conejos alcanzando porcentajes de unión al trazador en dilución 1:4000 de 28%, 38% y 23% respectivamente. Se decidió en base a estos resultados, sacrificarlos a la siguiente semana (tercera postreinmunización), pues ya se tenía la experiencia de los conejos tratados contra Estradiol, en el sentido de que este porcentaje de unión se vería aumentado. Desafortunadamente, sucedió todo lo contrario, los niveles de unión al trazador cayeron a niveles tan bajos como 13%, 10.62% y 11% para los conejos PI, PIII y PIV respectivamente. Como ninguno de los tres sueros obtuvo el mínimo de unión deseado a la dilución 1:4000 no se continuó con la caracterización de ellos. Las gráficas 7, 8, 9 y 10 muestran la curva de producción de anticuerpos de cada conejo inoculado, en una dilución 1:4000. Se puede apre---

PROGESTERONA-11-HEMISUCCINATO-ASB

P I 1:4 000

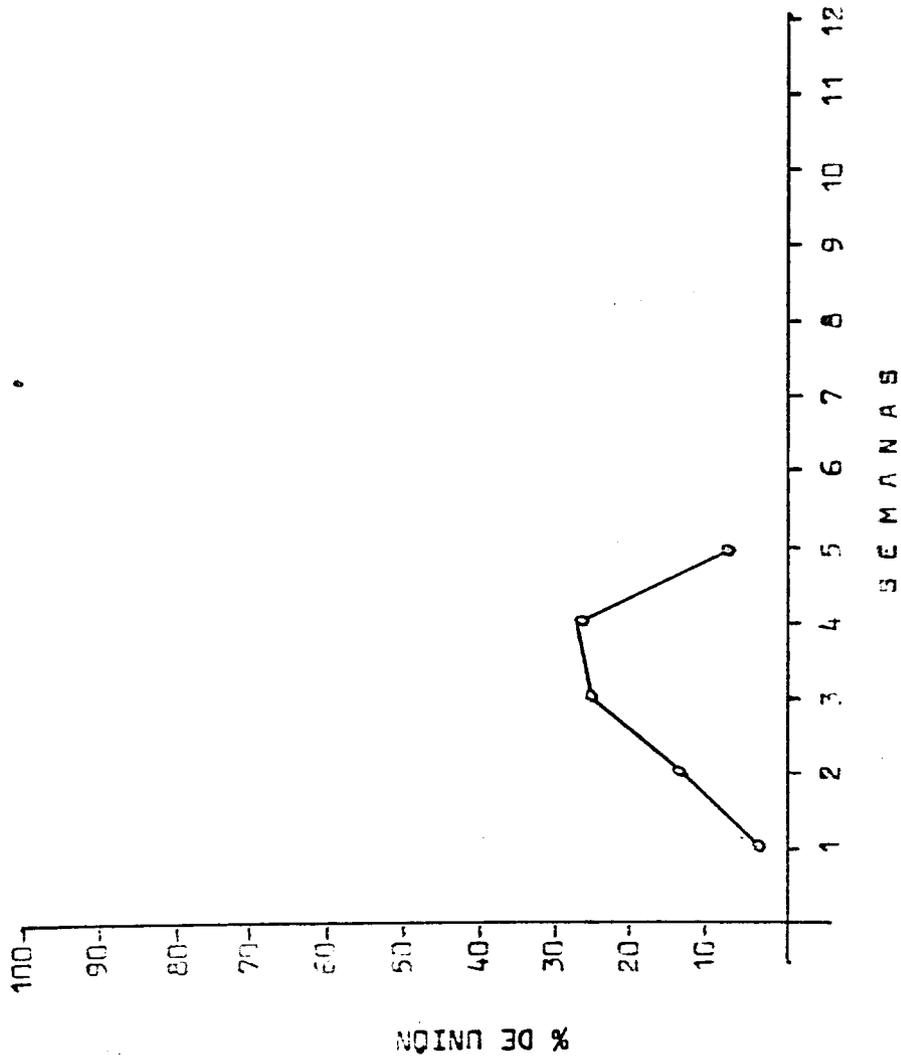


Gráfica # 7

PROGESTERONA-11-HEMISUCCINATO-ASB

- 72 -

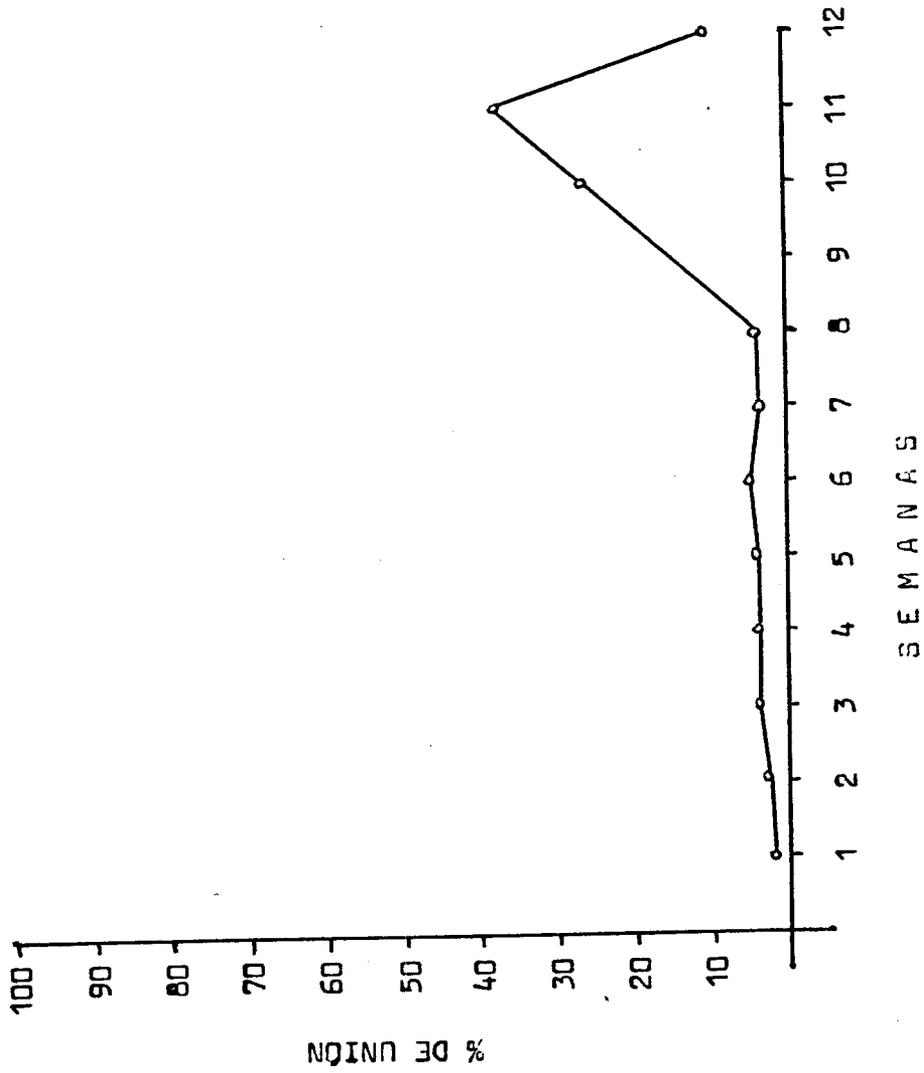
P II 1:4 000



Gráfica # 0

PROGESTERONA-11-HEMISUCCINATO-ASB

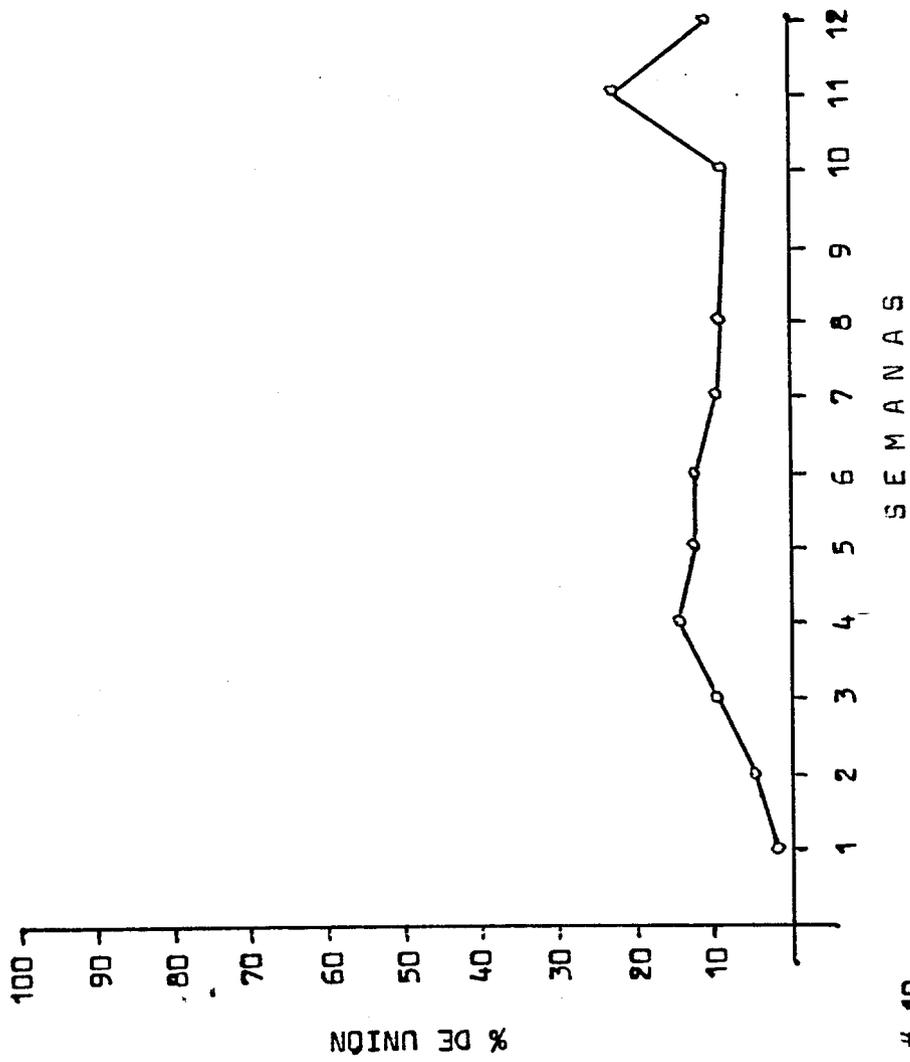
P III 1:4 000



Gráfica # 9

PROGESTERONA-11-HEMISUCCINATO-ASB

P IV 1:4 000



Gestacion # 10

ciar la oscilación que mostró la producción de anticuerpos a lo largo de todo el período y en todos los animales, pero siempre en niveles muy bajos. Muestra, además, el efecto que tiene una reimmunización cuando las condiciones lo requieran.

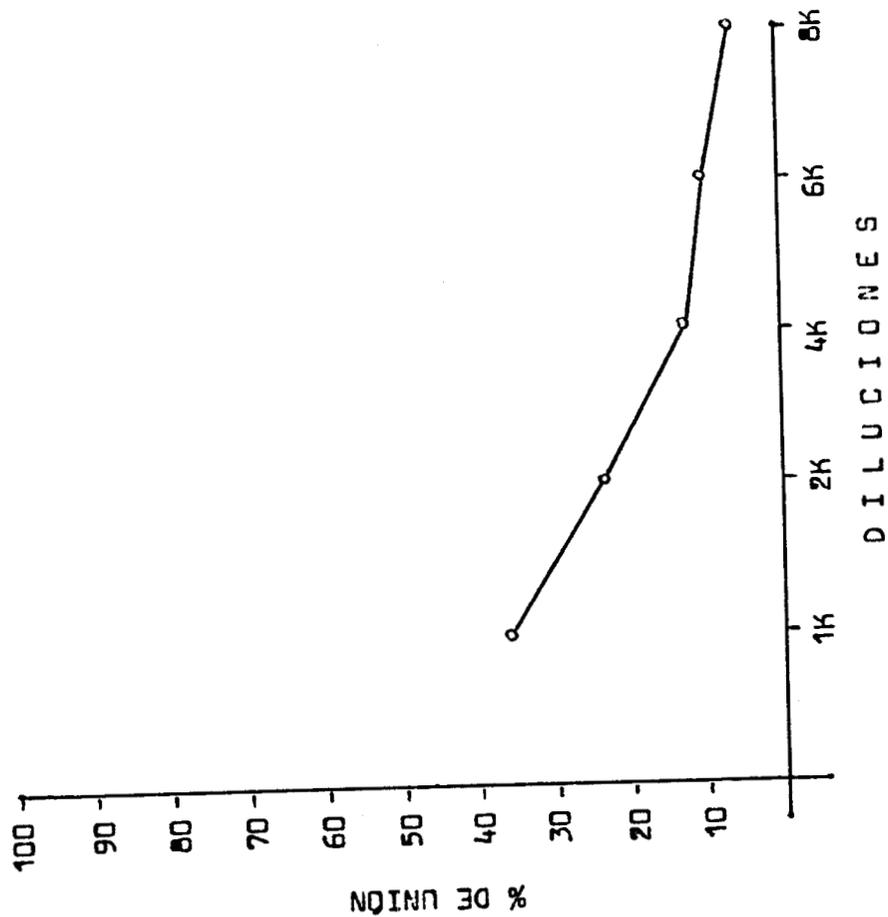
Las gráficas 11, 12 y 13, muestran la curva de dilución del sangrado final de cada conejo inmunizado y nuevamente resalta la pobre producción de anticuerpos que se alcanzó en cada dilución probada y, desafortunadamente, por todos los conejos tratados.

Continuando el orden con que fueron inmunizados los conejos contra cada hormona, la tabla # 5 muestra el curso que siguió la producción de anticuerpos contra Cortisol-3-CMO-ASB. Una vez más es notoria la ausencia de una respuesta totalmente positiva después de seis semanas de muestreo sanguíneo.

Aún cuando la respuesta en los tres animales tratados es relativamente uniforme, esta se mostró por debajo de los niveles deseados de unión al trazador en dilución 1:4000, por ---

PROGESTERONA-11-HEMISUCCINATO-ASB

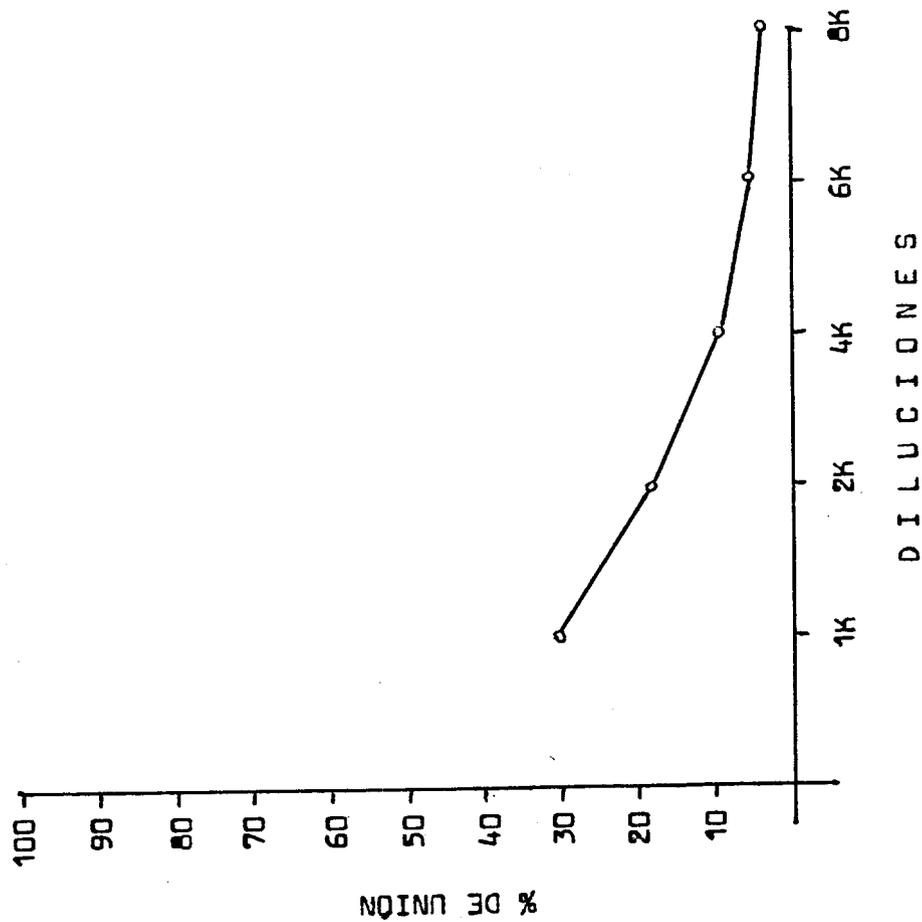
P I SANGRADO FINAL



Gráfica # 11

PROGESTERONA-11-HEMISUCCINATO-ASB

P III SANGRADO FINAL



Gráfica # 12

PROGESTERONA-11-HEMISUCCINATO-ASB

P IV SANGRADO FINAL

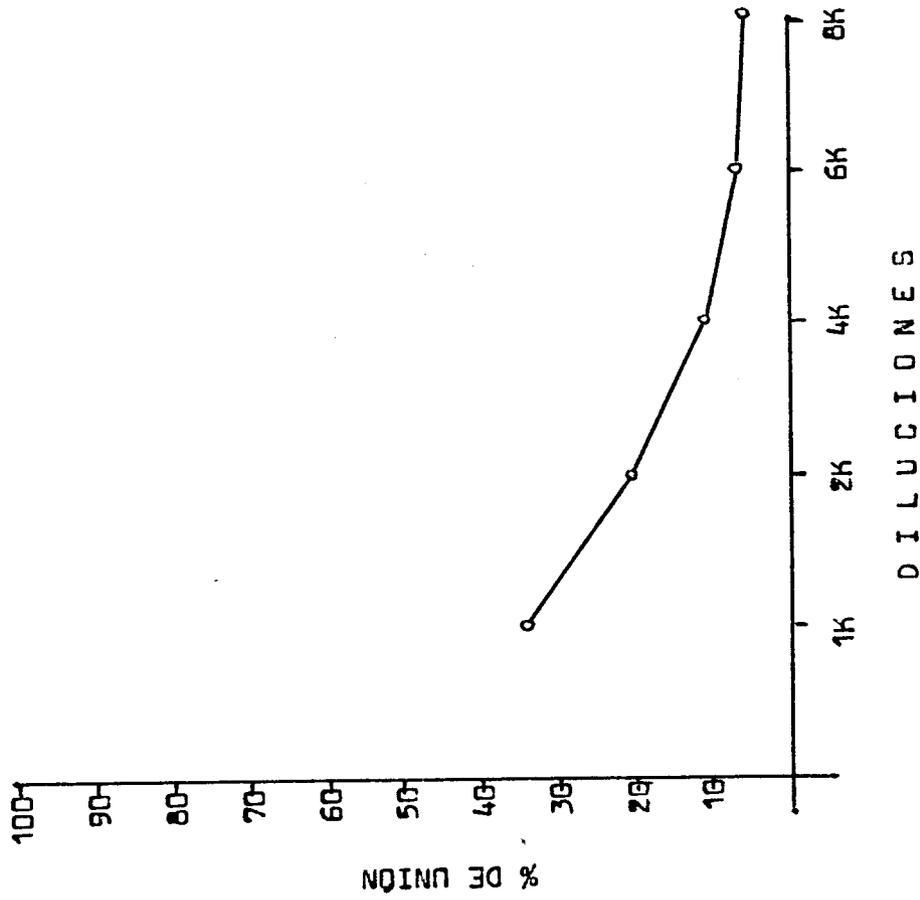


Gráfico # 13

Inmunización: 4-VI-87		CORTISOL-3-CMO-ASB					
Dil.	1-VII-87	9-VII-87	16-VII-87	23-VII-87	30-VII-87	6-VIII-87	17-VIII-87
1 K	4.59	7.14	11.68	15.06	23.07	16.18	
2 K	2.78	3.77	6.51	10.35	14.89	8.19	
4 K	1.74	2.38	4.61	7.99	7.29	3.29	
6 K			2.90	4.35	5.25	1.13	
8 K			1.55	3.82	4.53	1.03	
10 K				1.53	3.13		
12.5K					3.8		
15 K					2.13		
20 K					1.73		
25 K							
30 K							
CI							
1 K	5.75	10.46	19.60	28.68	22.92	26.15	
2 K	2.53	5.86	11.88	19.18	13.59	14.89	
4 K	1.89	2.15	10.80	12.01	6.30	8.47	
6 K		2.14	3.28	6.54	4.54	4.79	
8 K			2.44	5.29	2.83	3.46	
10 K			1.82	3.68	2.70	2.56	
12.5K					1.66		
15 K							
20 K							
25 K							
30 K							
CII							
1 K	6.91	9.99	15.06	15.88	14.81	17.28	
2 K	3.85	3.70	9.40	7.33	6.84	8.08	
4 K	1.17	2.40	8.02	6.59	4.51	4.46	
6 K			4.48	3.64	1.32	3.48	
8 K			3.34	1.96	1.03	3.27	
10 K			2.50	1.13		2.53	
12.5K							
15 K							
20 K							
25 K							
30 K							
CIII							
1 K							
2 K							
4 K							
6 K							
8 K							
10 K							
12.5K							
15 K							
20 K							
25 K							
30 K							

R

R

R

28-IX-87 5-X-87 12-X-87 15-X-87 19-X-87 9-XI-87 16-XI-87 23-XI-87 30-XI-87

45.13
39.34
27.65
20.98
15.35
13.44

46.02
42.99
33.58
23.02
17.11
15.53

44.79
39.37
30.41
23.43
15.27

50.42
38.83
28.17
18.65
14.60
10.21

60.66
45.31
29.6
20.66
16.15
13.04

56.03
48.61
29.83
21.57
17.13
13.66

51.17
40.73
30.00
21.86
16.49
13.19

61.39
52.64
37.05
23.17
16.62
14.52

48.12
34.26
19.99
13.18
9.10
7.93

44.47
30.30
19.44
14.02
11.89
7.42

47.59
35.98
23.74
17.06
12.22
8.85

45.04
31.61
20.79

48.85
37.24
23.96

11.48
9.32

43.57
33.76
19.46

13.60
8.97

10.58
7.57

42.18
35.42
24.54

12.76
8.25

R

ello, el 17 de agosto de 1987 se procedió a -- reinmunizar a la totalidad de los animales si-- guiendo el esquema de inmunización original, ex cepto que no se aplicó refuerzo alguno posterior_{mente}, se dejó pasar una semana y a la siguiente se volvió a continuar con la toma de mues--- tras. Se puede apreciar que los conejos, en general, respondieron bien a esta reinmunización; pese a que el conejo CIII siguió mostrando los niveles más bajos de unión en relación a los de mas.

Después de analizar los resultados del sangrado de la séptima semana postreinmunización, se tomo la decisión de sacrificar los conejos CI y - CII que mostraban ya el mínimo deseado de por-- centaje de unión, siendo sacrificados a la sema na siguiente (15 X-87). Al conejo CIII se le aplicó una segunda reinmunización con la espe-- ranza de aumentar la respuesta al inmunógeno, - sin embargo, cuatro semanas después, esto no -- fué suficiente para alcanzar el porcentaje de - unión en la dilución deseada, por lo que se sa- crificó el 30-XI-87.

Los resultados del sangrado final de los cone--

jos CI y CII en dilución 1:4000 unieron 28.37% y 37.05% respectivamente. El conejo CIII unió --- 24.54% al analizarse su sangrado final. Se tomaron aliquotas del suero del conejo CII, que alcanzó el mayor porcentaje de unión, para continuar con su caracterización. El resto de los -- sueros fueron desechados para uso en pruebas de Radioinmunoanálisis.

Las gráficas 14, 15 y 16 muestran la curva de - producción de anticuerpos de cada conejo en dilución 1:4000 y las gráficas 17, 18 y 19 que corresponden a la curva de dilución del sangrado-final.

El último inmunógeno aplicado fue Testosterona-3-CMO-ASB, y como se puede apreciar en la tabla #6, que muestra el comportamiento que siguieron los tres conejos en la producción de anticuer--pos después de cinco semanas de muestreo, los - porcentajes de unión continuaban aún bajos por lo que se reinmunizó en la sexta semana (19-X--87) a todos los animales. La primera muestra -- sanguínea tomada postreinmunización, indica una respuesta positiva en los tres animales, elevándose considerablemente el porcentaje de unión - al trazador en cada una de las diluciones tra--

CORTISOL-3-CMO-ASB

C I 1:4 000

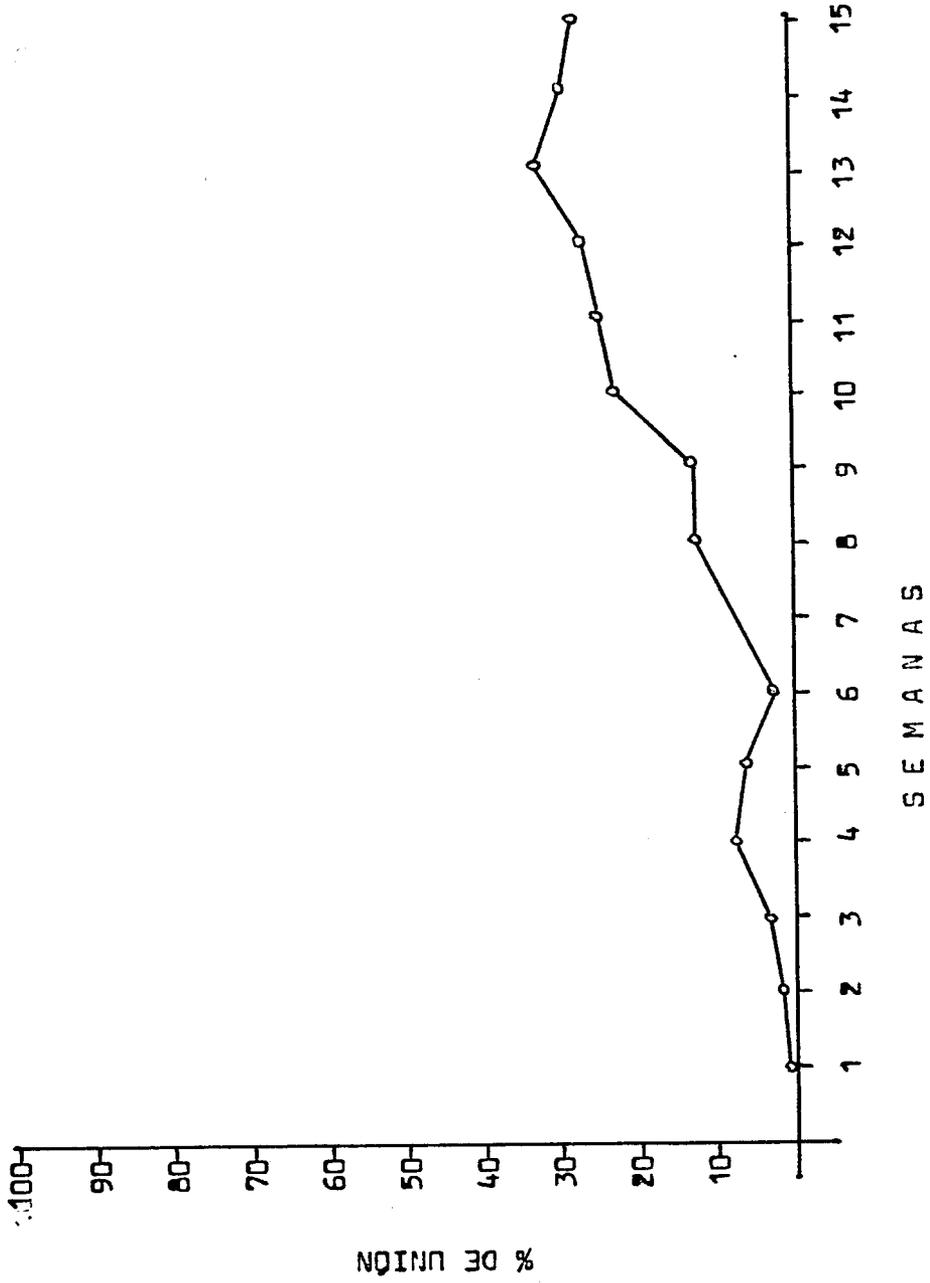


Gráfico # 14

CORTISOL-3-CMO-ASB

C II 1:4 000

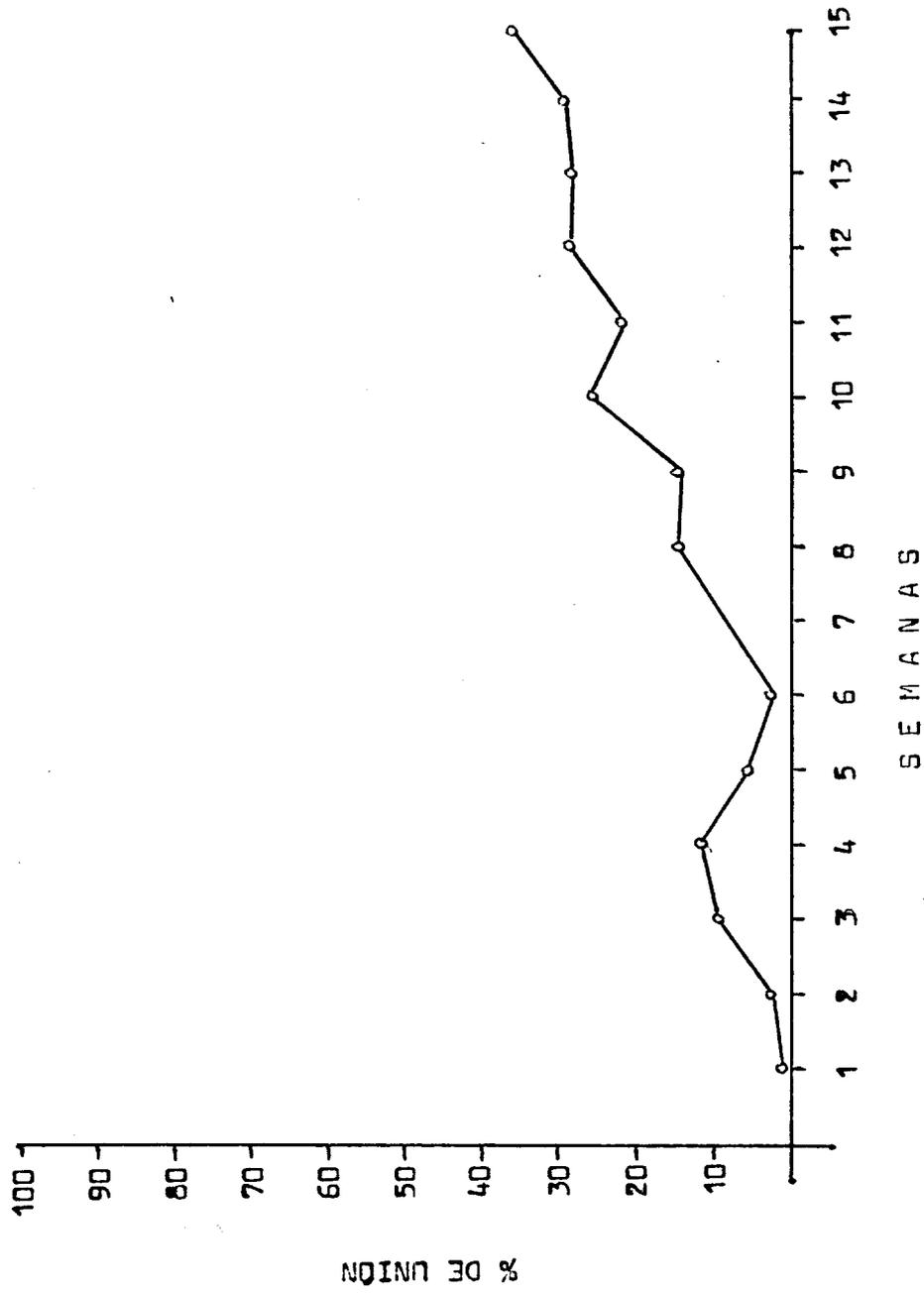
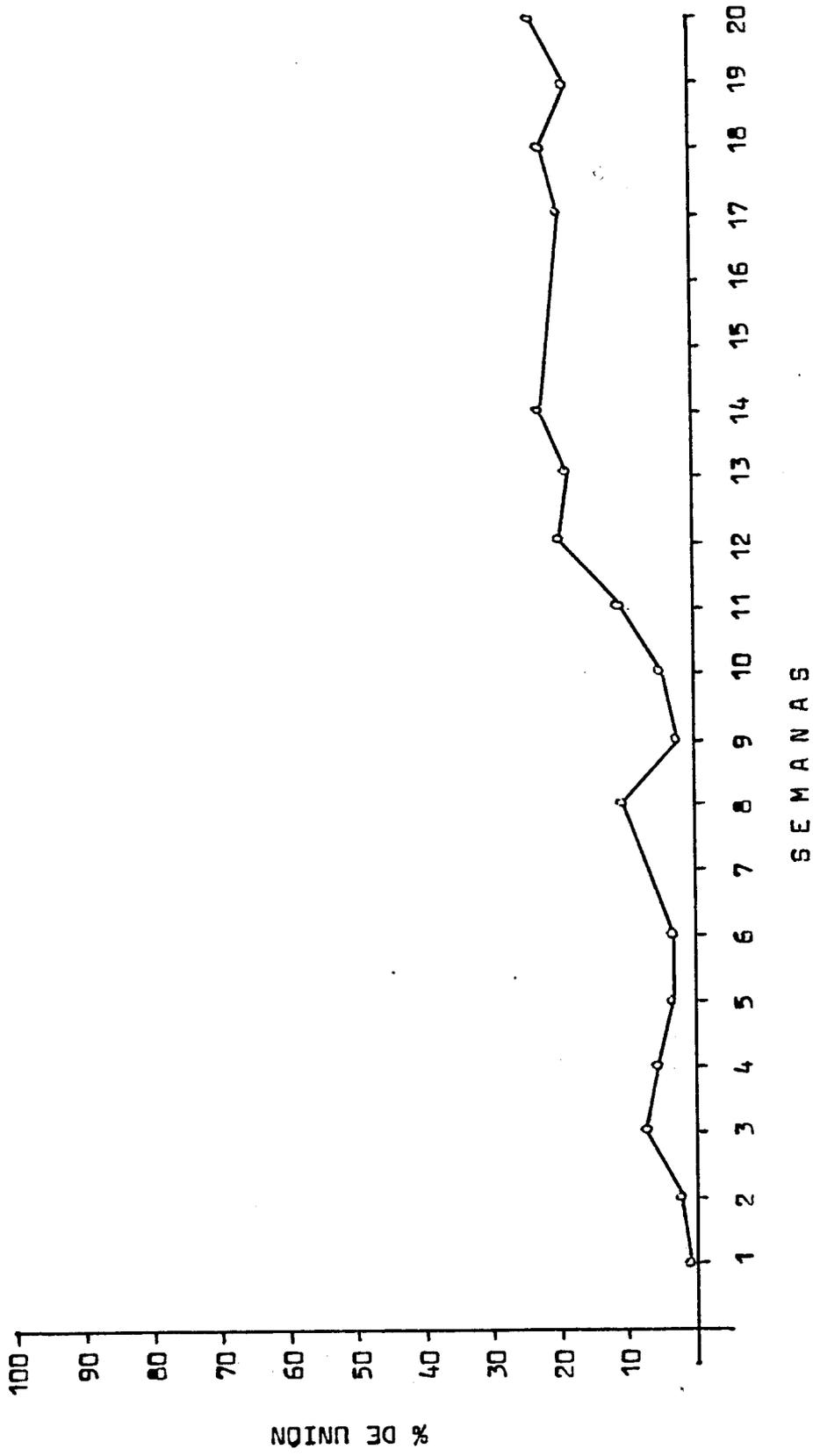


Gráfico # 15

CORTISOL-3-CMO-ASB

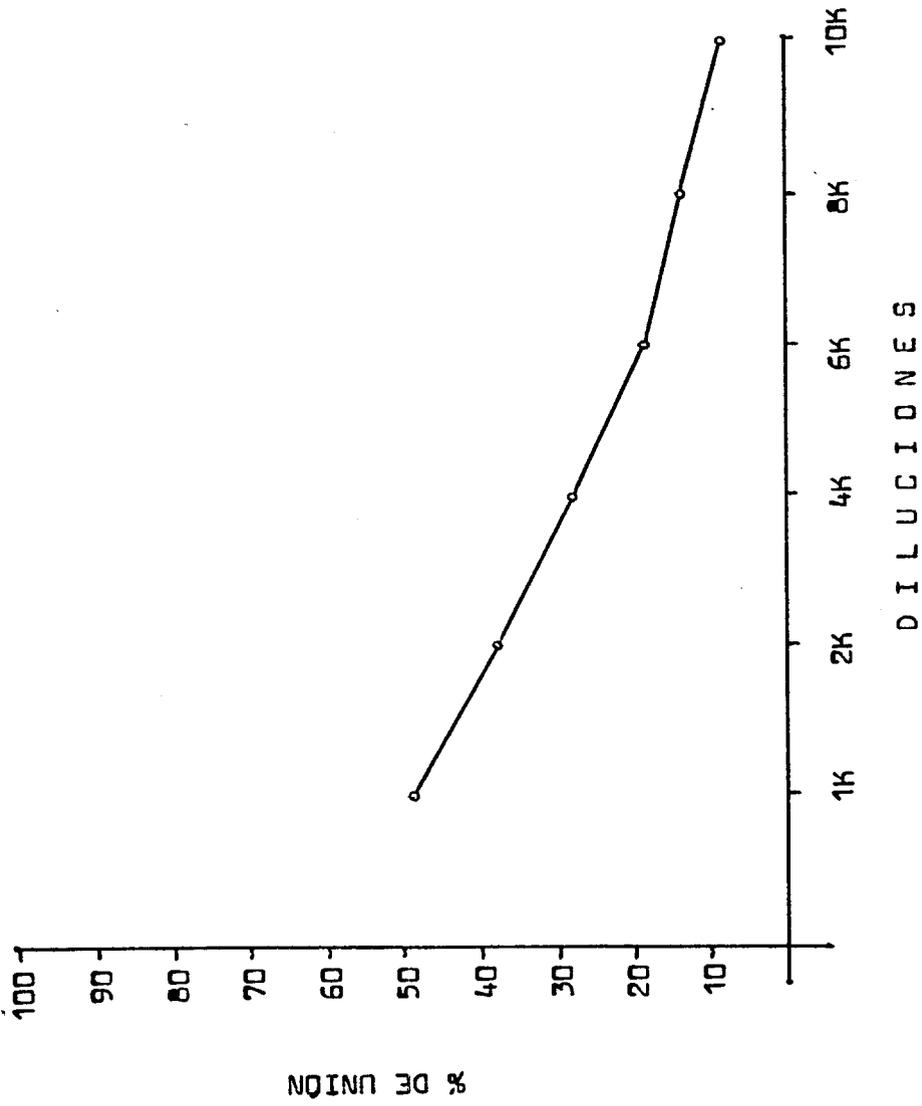
C III 1:4 000



Gráfica # 16

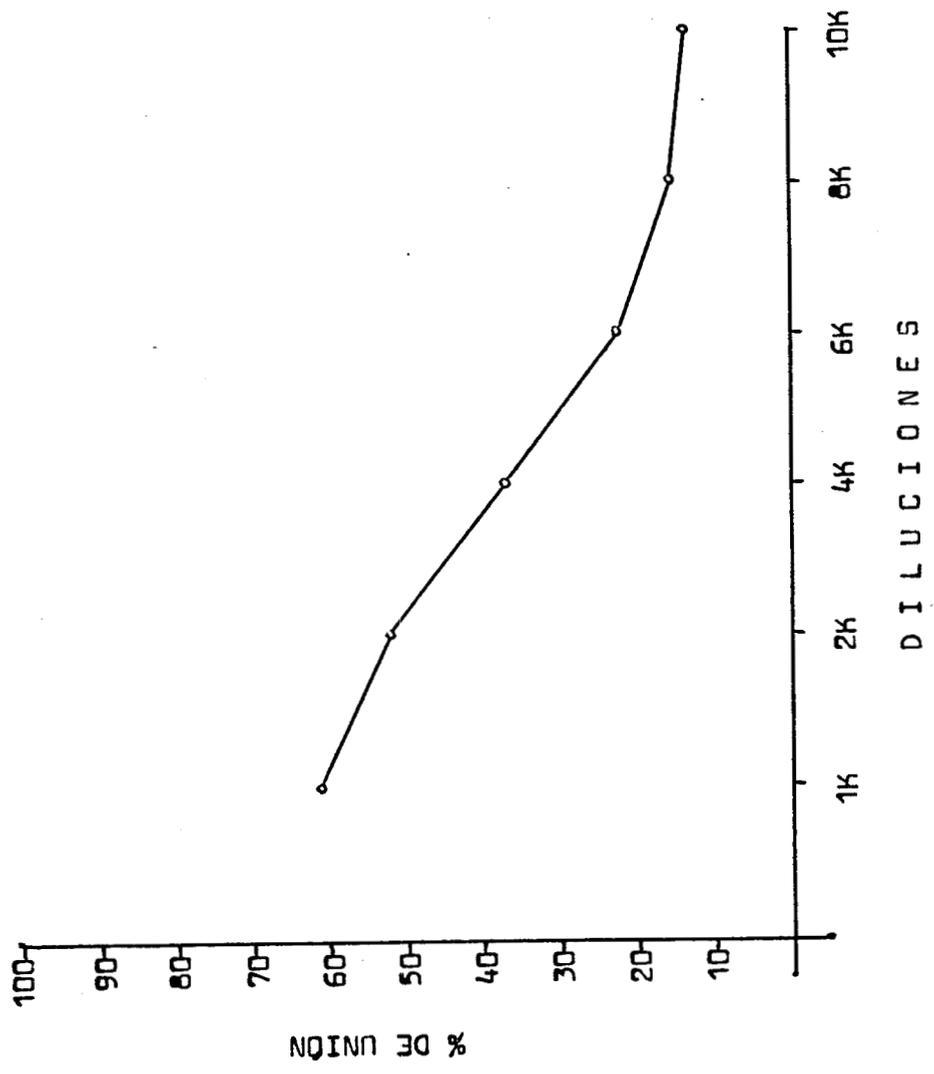
CORTISOL-3-CMO-ASB

C I SANGRADO FINAL



Gráfica # 17

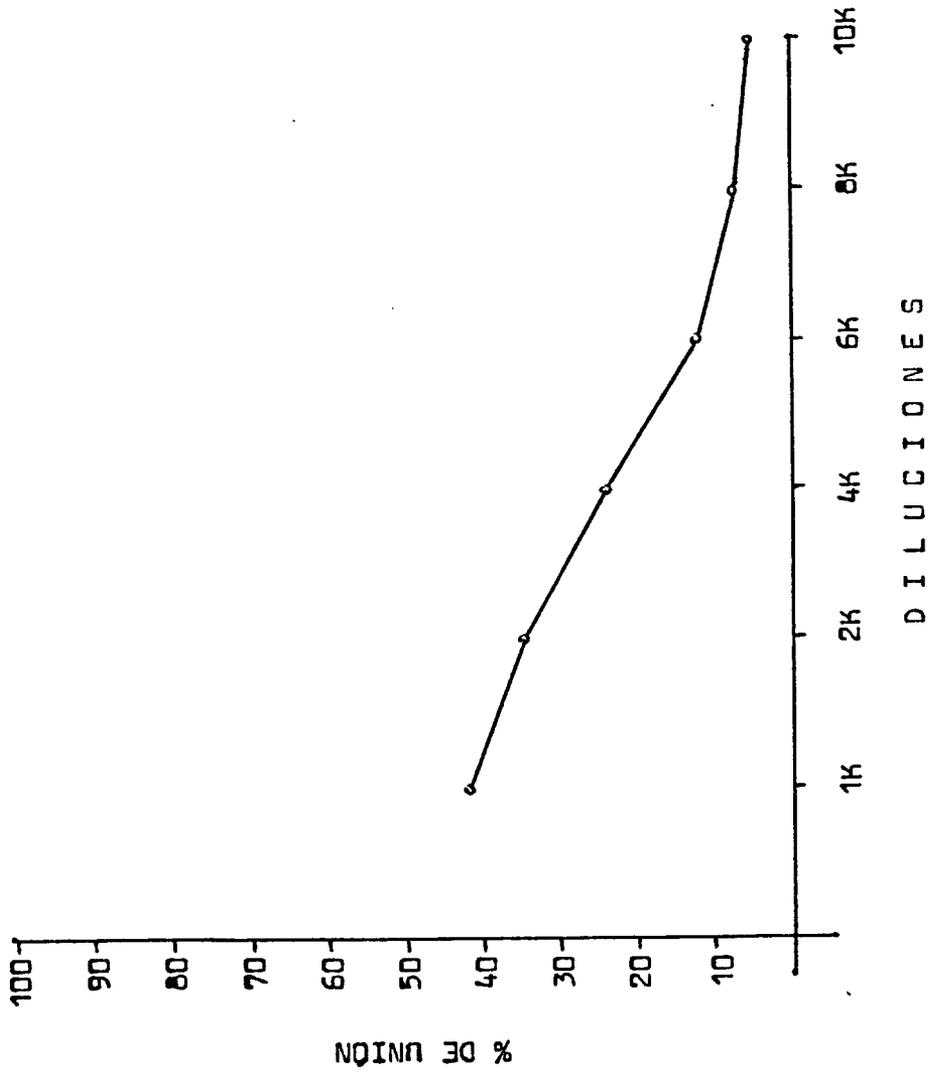
CORTISOL-3-CMO-ASB
C II SANGRADO FINAL



Gráfica # 18

CORTISOL-3-CMO-ASB

C III SANGRADO FINAL



Gráfica # 19

Inmunización: 17-VIII-87

TESTOSTERONA-3-CMO-ASB

Conejos		14-IX-87	21-IX-87	28-IX-87	6-X-87	12-X-87	19-X-87	4-XI-87
TI	Diluciones							
	1 K	4.76	5.85	8.72	8.47	12.27		46.31
	2 K	2.16	2.35	4.24	3.06	5.20		33.21
	4 K	1.28	1.47	2.58	1.31	2.44	R	25.84
	6 K			2.54	1.15	1.48		11.41
	8 K			1.27		1.16		6.11
10 K							3.84	
TII	1 K	7.29	5.26	6.17	8.75	9.15		51.61
	2 K	3.11	2.67	3.63	3.40	5.86		38.91
	4 K	1.81	1.01	2.47	1.60	3.97	R	28.41
	6 K			1.11		1.24		13.11
	8 K					1.14		7.81
	10 K							4.31
TIII	1 K	20.07	12.21	10.28	12.60	13.10		28.40
	2 K	10.39	6.89	7.20	7.90	10.30		22.30
	4 K	3.52	2.95	4.80	2.10	6.20	R	15.21
	6 K	3.16	2.23	3.21	1.28	3.18		11.30
	8 K	2.59	1.04	1.08		2.83		6.80
	10 K	2.14						3.28

bajadas, resalta, sin embargo la inferioridad - del conejo TIII en relación a los demas, pese a que mostraba niveles superiores de producción - en las diluciones 1:1000 y 1:2000, en la etapa anterior a la reinmunización.

En las tres semanas anteriores al sacrificio, el conejo TII observó una elevación constante semana a semana y por arriba de los niveles de producción del resto de los animales. El conejo -- TIII, también continuo superando constantemente su porcentaje de unión, pero siempre en niveles inferiores. En el caso del conejo TI, se observó una caída considerable en la segunda semana postreinmunización, afortunadamente se recupero en la tercera y cuarta semana, pero ya no alcanzo los niveles de la primera.

En la cuarta semana después de haber reinmunizado, el conejo TII nos indicaba ya el porcentaje de unión deseado en la dilución 1:4000, se decidió entonces sacrificarlos a todos los conejos en la semana siguiente (30-XI-87). Se consideró innecesario aplicar una segunda reinmunización a los conejos TI y TIII, pues se observó en el caso de anticortisol que una segunda reinmuniza

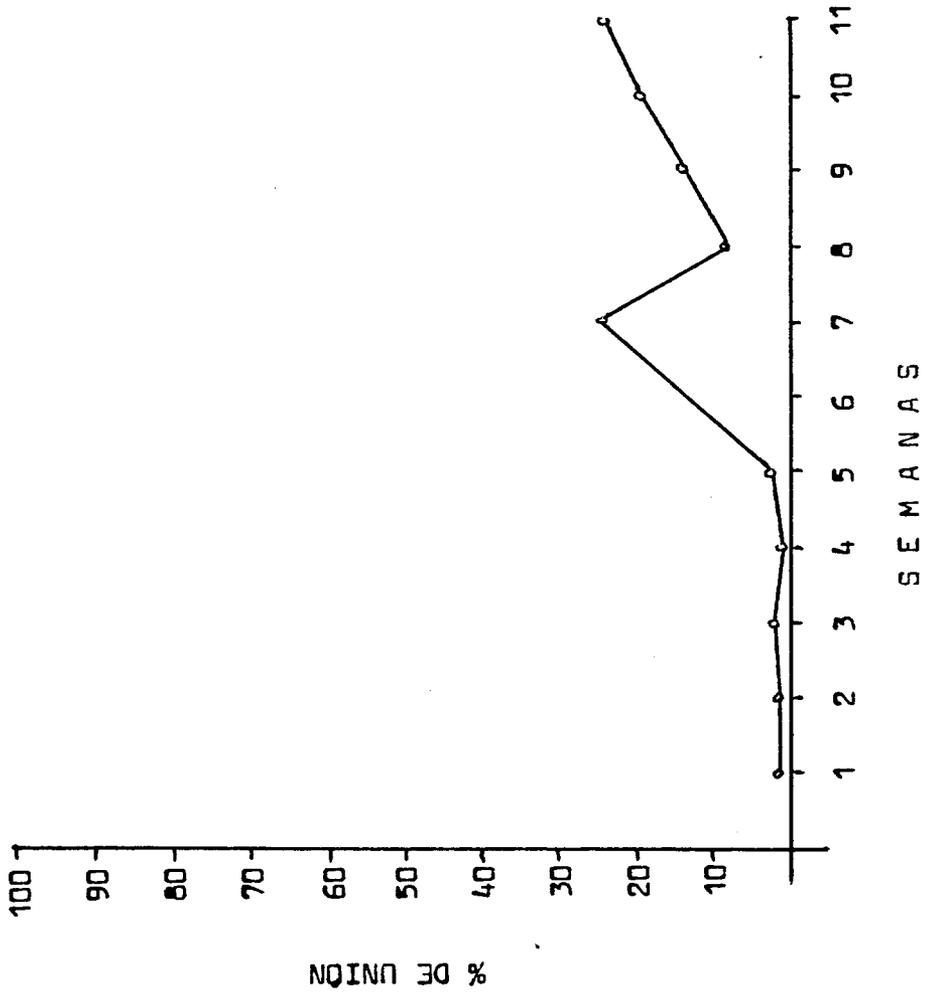
ción no provocaba efectos favorables que justificaran su uso. El análisis del suero de sangrado final del conejo TII, arrojó resultados favorables, pues en la dilución 1:4000 unió 39.72%, es decir, alcanzó a aumentar un poco más en relación a la penúltima semana, lo que no sucedió con el resto de los animales.

Las gráficas 20, 21 y 22 ilustran la producción que siguieron los conejos TI, TII y TIII. La gráfica # 21 corresponde al esquema de producción que siguió el conejo TII y nos muestra los niveles de producción tan bajos que obtuvo en las primeras cinco semanas y el efecto positivo que ejerció la reinmunización para elevar el porcentaje de unión al trazador.

Una vez más se logró alcanzar el porcentaje de unión para la dilución fijada en un principio. Este antisuero (TII), fué seleccionado para continuar con su caracterización, tomándose también las aliquotas correspondientes y guardando el resto del suero colectado, Los otros sueros fueron desechados para ser utilizados posteriormente e incluso no se continuó con su caracterización.

TESTOSTERONA-3-CMO-ASB

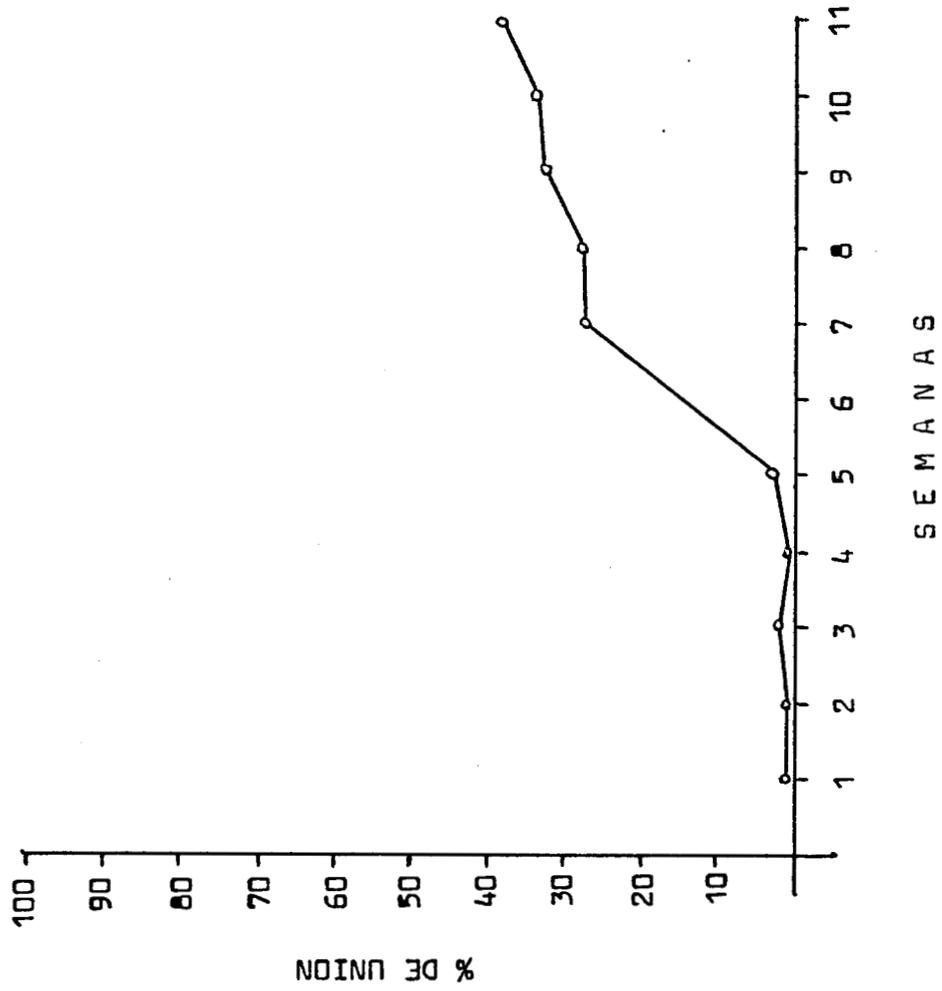
TI 1:4 000



Gráfica # 20

TESTOSTERONA-3-CMO-ASB

T II 1:4 000



Gráfica # 21

TESTOSTERONA-3-CMD-ASB

T III 1:4 000

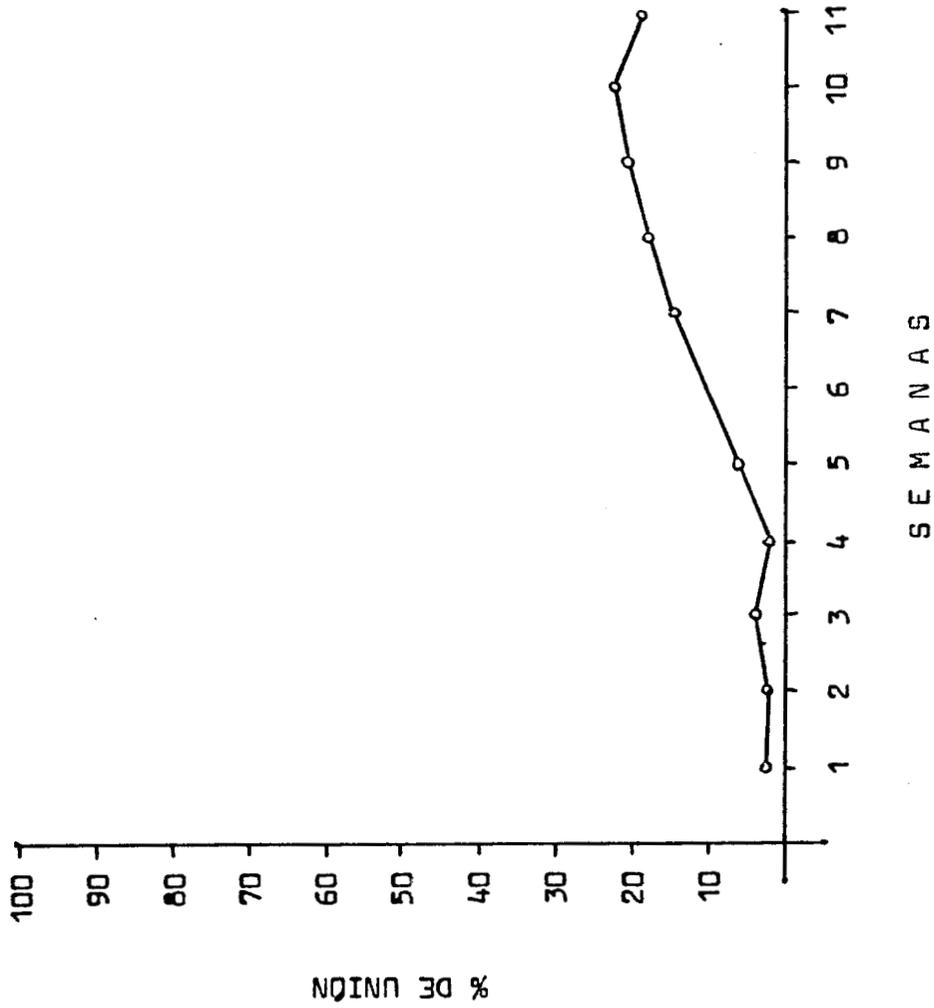


Gráfico # 22

Las gráficas 23, 24 y 25, muestran las curvas de dilución del sangrado final de cada conejo.

Con la obtención de los resultados del sangrado final de los conejos inmunizados contra Testosterona-3-CMO-ASB y teniendo ya los correspondientes a los demás inmunógenos concluye la primera etapa (Ensayos de Unión) de caracterización de los antisueros.

La gráfica # 26, muestra la curva estandar de cada una de las hormonas con que fué probado el antisuero contra 17β Estradiol y de la curva estandar del propio antígeno.

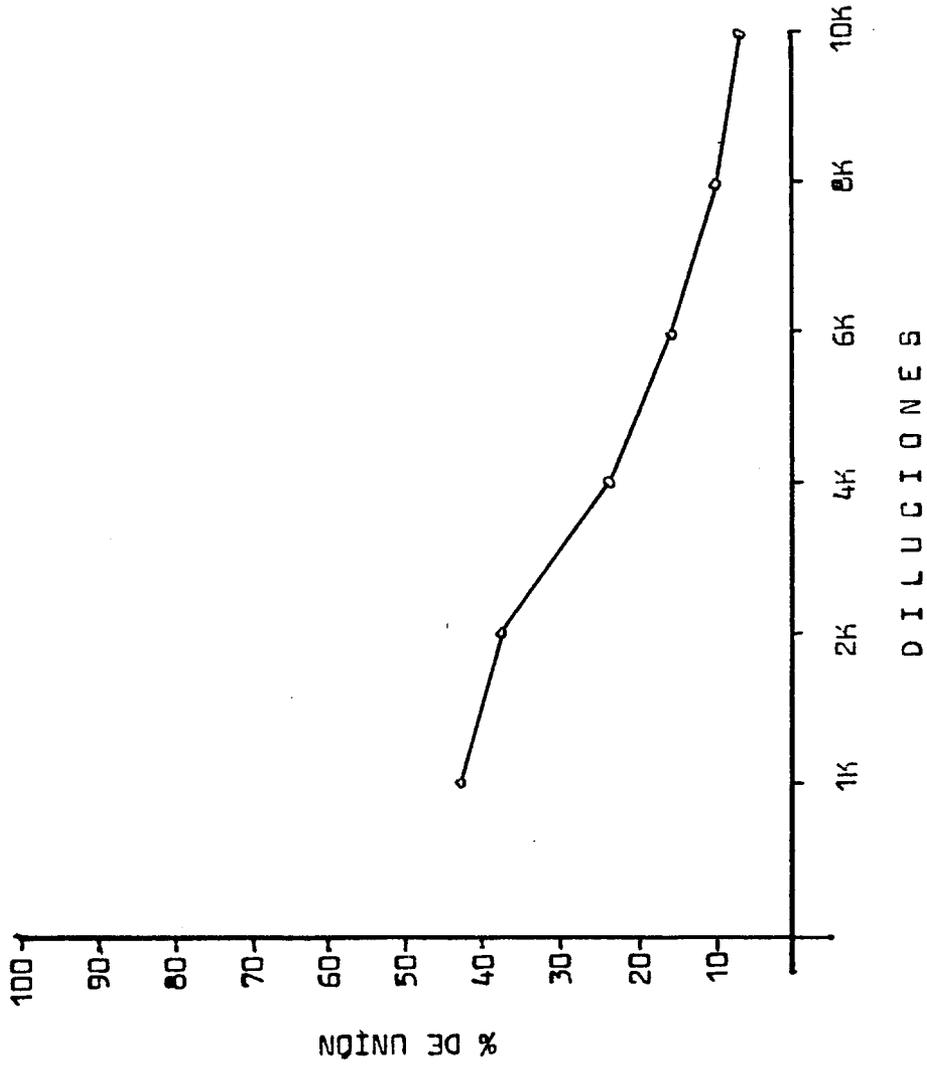
Se aprecia que el antisuero tiene un alto grado de especificidad pues sólo cruza 1.28% con Estrona; con Estriol prácticamente no cruza, pues su nivel de reacción cruzada es de 0.03%; con Etinil Estradiol sólo 0.005% y con Cortisol y 17α Estradiol definitivamente no cruza.

Cabe resaltar que este antisuero se trabajó en dilución de 1:16000 y la implicación directa que esto tiene con el número de pruebas en que puede ser utilizado.

La gráfica de reacción cruzada (fig. #27), en el caso del antisuero contra Cortisol nos muestra-

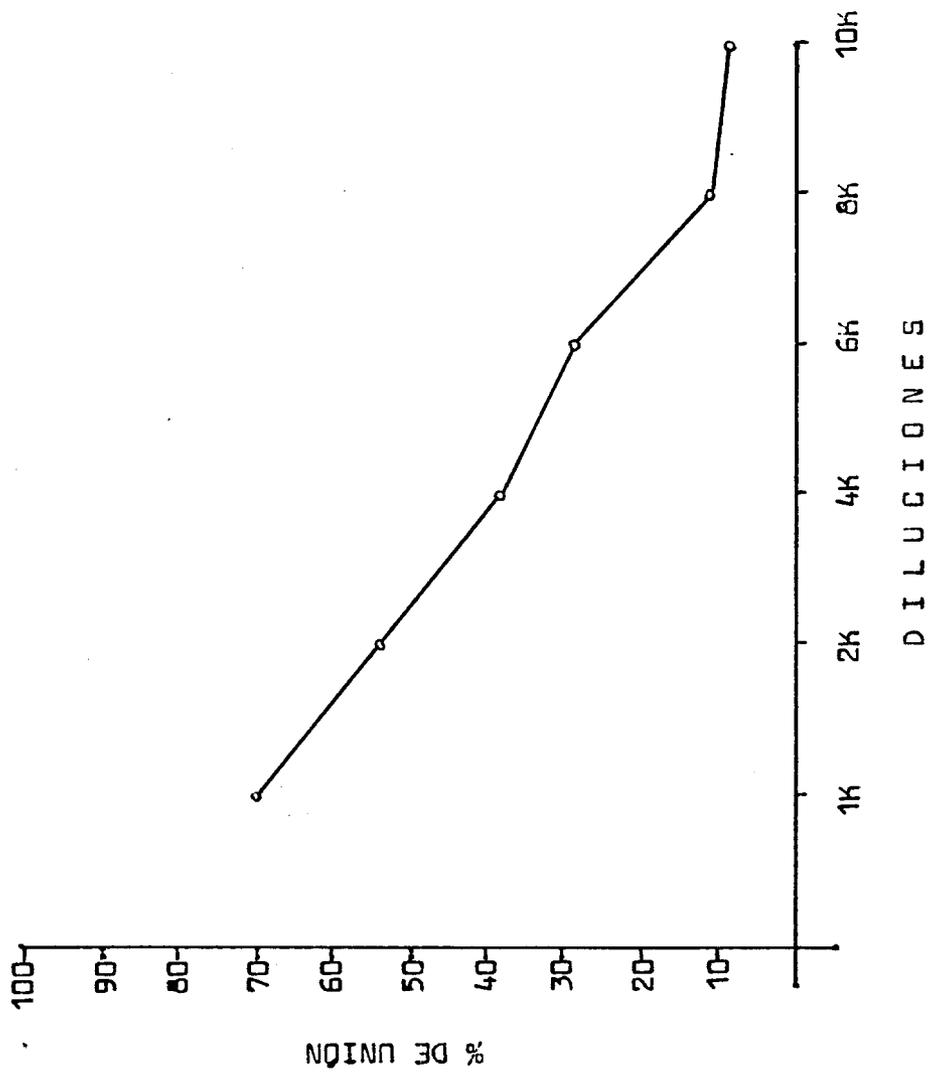
TESTOSTERONA-3-CMO-ASB

TI SANGRADO FINAL



TESTOSTERONA-3-CMO-ASB

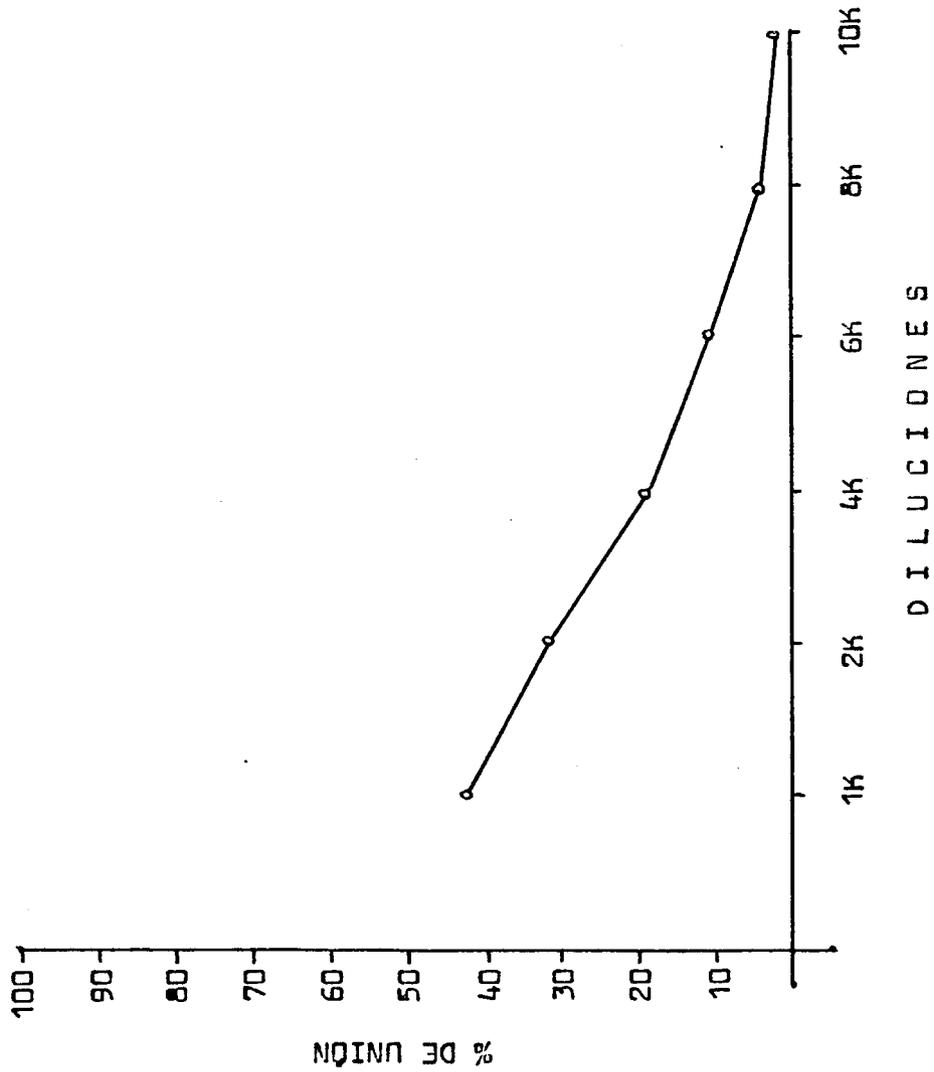
T II SANGRADO FINAL



Gráfica # 24

TESTOSTERONA-3-CMO-ASB

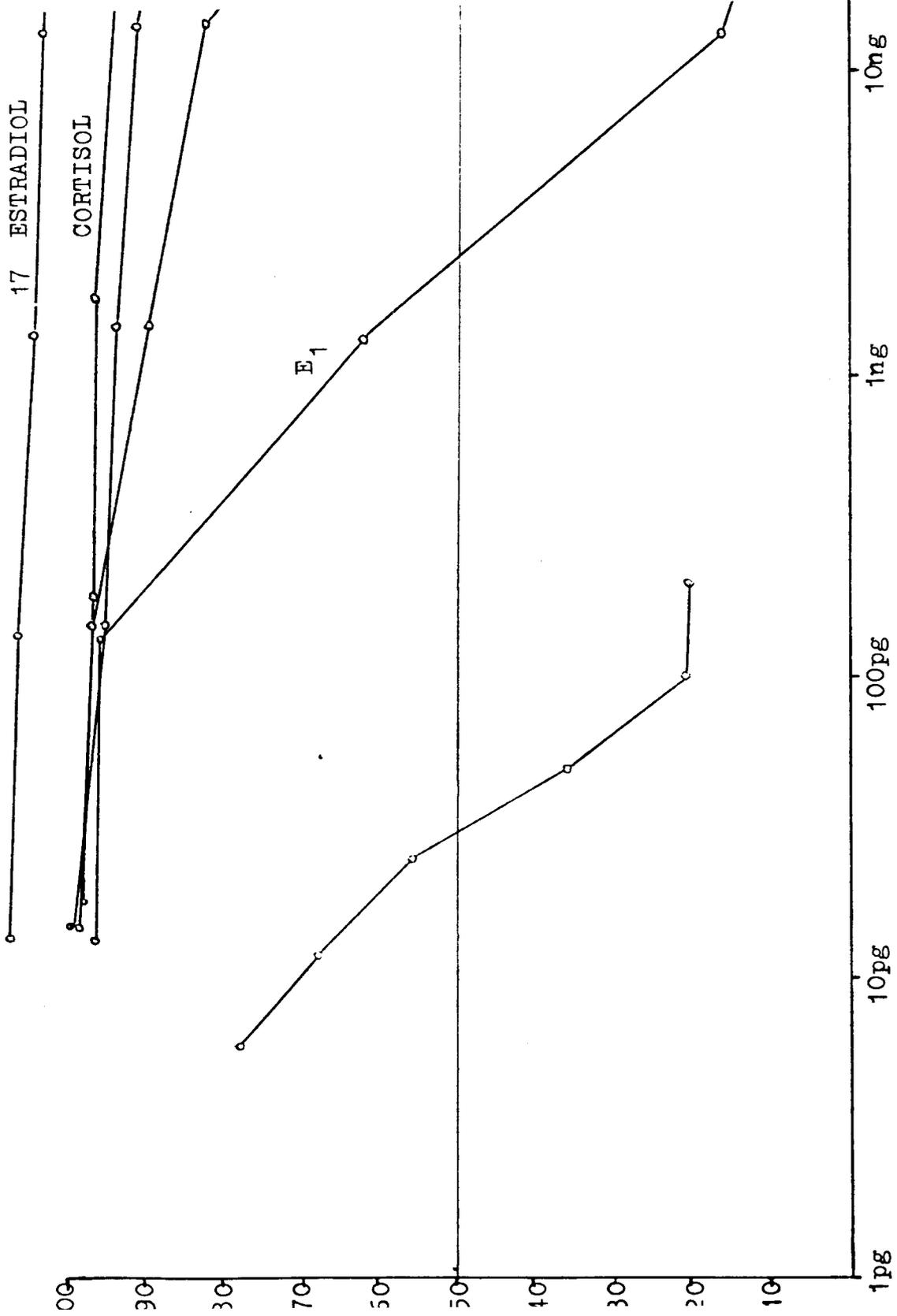
T III SANGRADO FINAL



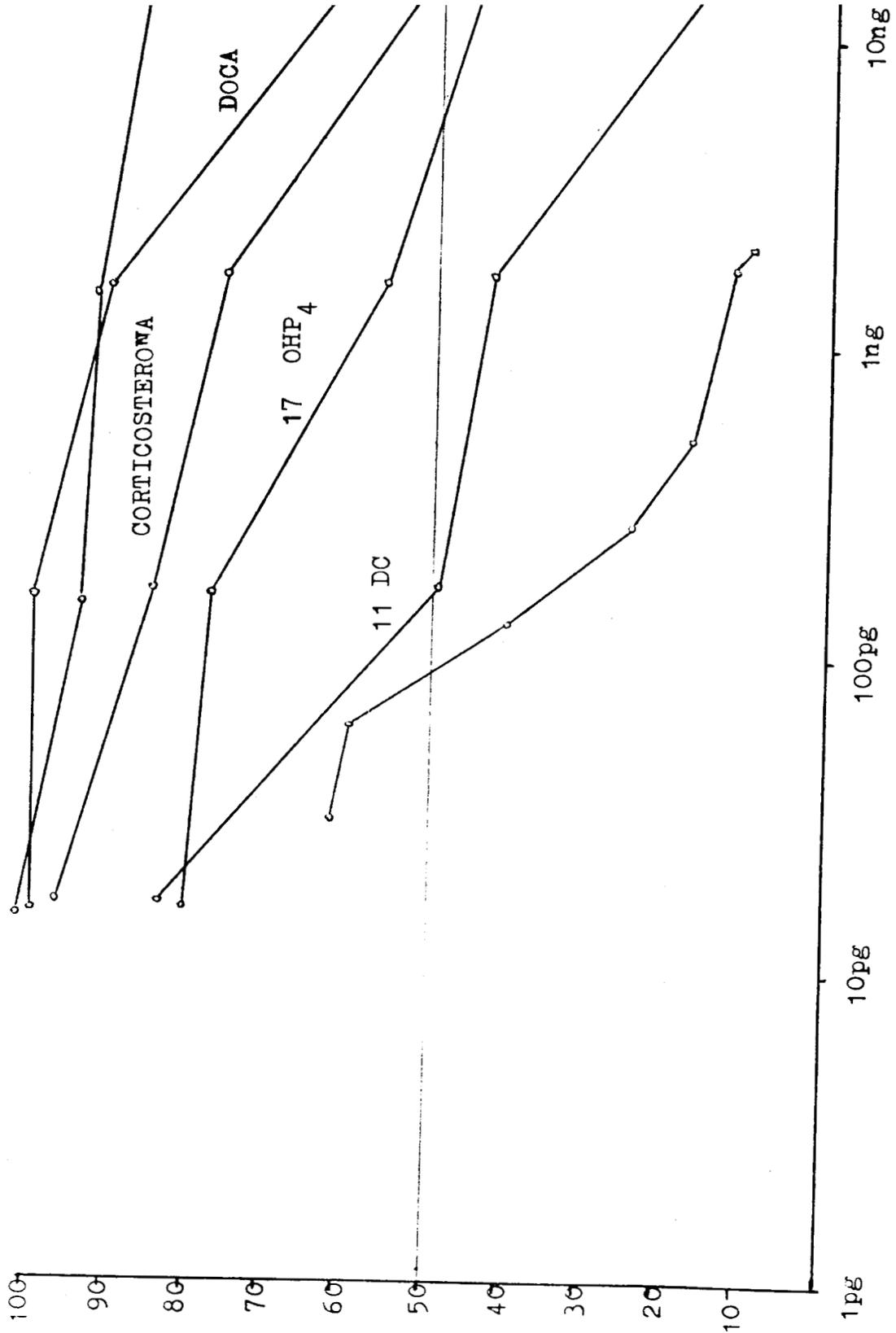
Gráfica # 25

As. 17 β ESTRADIOL-6-CMO-ASB

1:16 000



As. CORTISOL-3-CMO-ASB
1:3 000



un porcentaje de reacción cruzada muy elevado con 11-Desoxicortisol del orden de 52.22%; con 17α OHP₄ cruza 1.6%; con Corticosterona tan sólo 0.52%; con Desoxicorticosterona 0.16% y con Progesterona 0.03%.

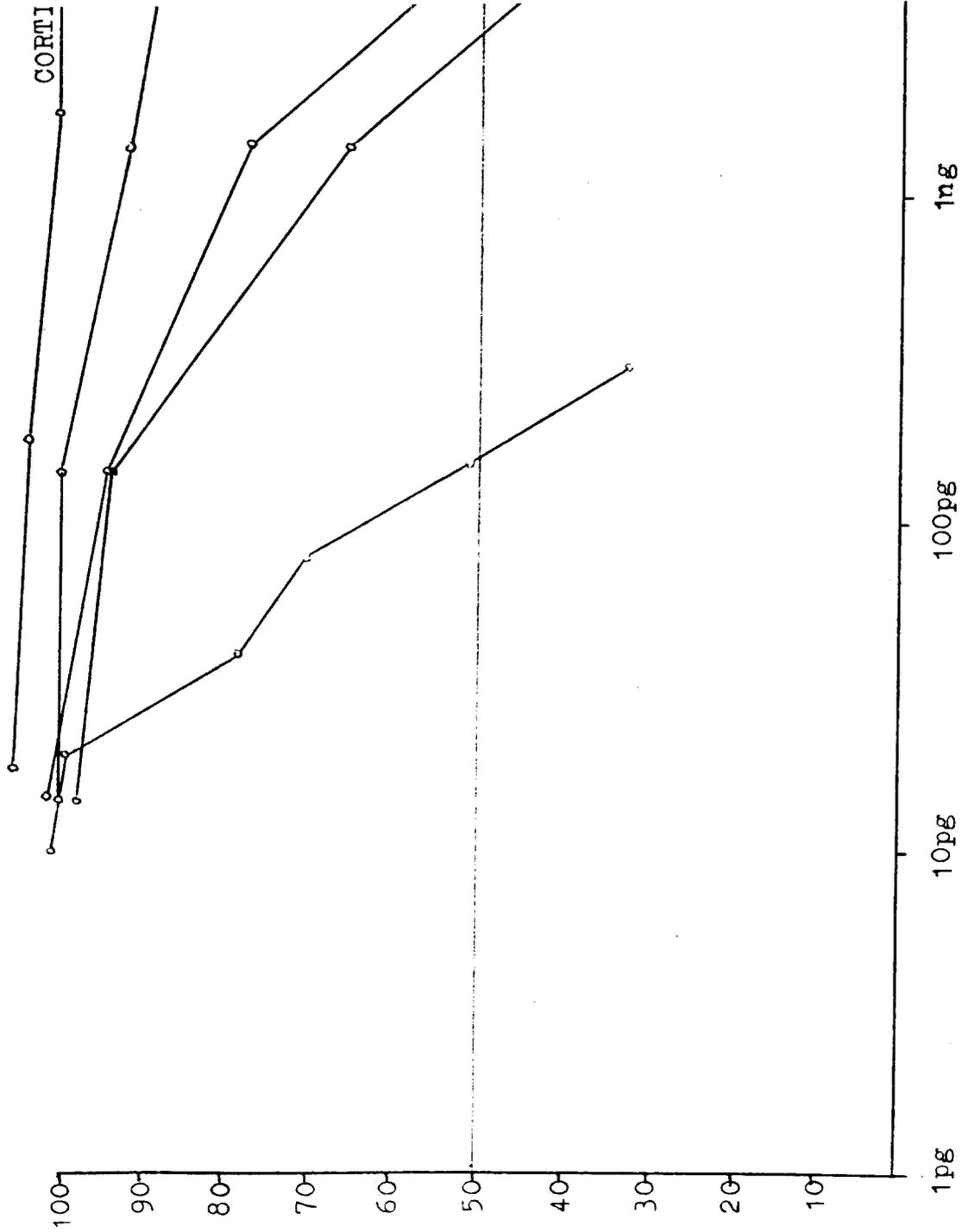
De manera general, podemos considerar que este antisuero cuenta con una buena especificidad, aún cuando tiene el inconveniente de cruzar más de la mitad de él con 11-Desoxicortisol. Sin embargo los demás reactantes con los cuales fué probado no confunden al antisuero más allá del 2%.

Cabe hacer notar que el antisuero fué trabajado en una dilución 1:3000 para tener un mayor porcentaje de unión al antisuero.

En el caso del antisuero contra Testosterona (gráfica # 28), su prueba de reacción cruzada nos indica los siguientes resultados: 5α -DHT cruza un 5%; Androstendiona 2.5% y androstandiol 0.05% y con Cortisol no cruza.

Podemos observar que este antisuero es también muy específico de su antígeno ya que su porcentaje de reacción cruzada más alto es de 5% con 5α -DHT y fué trabajado en una dilución 1:4000 que nos indica que puede ser utilizado en varios-

As. TESTOSTERONA-
1:4 000



Gráfica # 28

trabajos de Radioinmunoanálisis.

Una vez obtenidos los resultados de las pruebas de reacción cruzada de cada antisuero producido concluye la fase de evaluación de los antisueros y -- marca el cumplimiento parcial del primer objetivo -- impuesto al inicio de este trabajo. Desafortunadamente no fué posible producir anticuerpos contra Progesterona como estaba planteado al inicio de es te trabajo.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Se logró la producción de antisueros contra Estradiol, Cortisol y Testosterona.

En el caso de Estradiol, los resultados obtenidos fueron muy superiores a las exigencias mínimas de producción que se tenían establecidas. Se alcanzó en una dilución 1:16000 un porcentaje de unión -- del 52%, que nos indica la respuesta inmunológica tan positiva y por ende la producción de anticuerpos tan elevada que se obtuvo. Así mismo, el período de producción para obtener estos resultados fué el más corto de todos, no hubo necesidad de reinmunizar y se obtuvo una excelente respuesta general en los animales inoculados que sobrevivieron.

Cabe destacar, que todos los animales superaron grandemente los requerimientos de producción mínimos deseados.

Durante la fase de exposición al inmunógeno, los conejos consumieron alimento de manera normal y no se presentaron síntomas que nos indicaran algún trastorno patológico. En el caso del conejo -

E II, que falleció por desnucamiento, conviene apuntar que no se contaba aún con experiencia - en el manejo de los animales y colección de --- muestras sanguíneas.

La evaluación del antisuero elegido, indica un grado adecuado de especificidad para su antígeno ya que su porcentaje de reacción cruzada más elevado es menor al 2% y no representa de ninguna manera una limitante para uso. La sensibilidad de ensayos es adecuada por la curva estándar del antígeno. Así mismo, se obtuvo una buena cantidad de suero sanguíneo que al ser trabajado en la dilución señalada anteriormente permitirá realizar una gran cantidad de Radioinmunoanálisis.

Los resultados presentados indican que el inmunógeno utilizado fue lo suficientemente agresivo - en su estímulo y que la conjugación llevada a cabo es la adecuada para obtener antisueros específicos.

En el caso del antisuero contra Cortisol, no se observaron resultados tan satisfactorios en cuanto a la producción de anticuerpos, sin embargo, las curvas de dilución nos indican un porcentaje de unión superior al mínimo deseado en la dilución 1:4000.

Después de varias semanas de exposición al inmunógeno, en las que no se lograba el porcentaje de unión mínimo deseado en la dilución referida, se precisó reinmunizar a los conejos a fin de estimular más al sistema inmunológico. Afortunadamente, esta acción nos permitió satisfacer integralmente los requerimientos de producción de anticuerpos que se tenían marcados con anterioridad. Podemos considerar que este inmunógeno no fué tan agresivo como el de Estradiol ya que el tiempo de exposición de los animales fué mayor e incluso hubo necesidad de reinmunizar. Así mismo, sólo un conejo respondió satisfactoriamente, al respecto es necesario señalar que el número de animales utilizados fué muy pequeño, pues se recomienda utilizar un mínimo de diez animales por inmunógeno a aplicar y nosotros sólo trabajamos 4 animales como máximo, en el caso de Cortisol y Testosterona se utilizaron tan sólo 3 conejos. La causa fundamental de esta acción fué debida a la falta de espacio y de jaulas en el bioterio. La segunda reinmunización aplicada al conejo CIII, no tuvo el mismo efecto que la primera reinmunización ya que posterior a ello existieron fluctuaciones mínimas que no permitie

ron alcanzar las necesidades mínimas de producción, lo que nos indica la inutilidad de una tercera inmunización.

Los resultados obtenidos del análisis de este antisuero nos indican una buena especificidad para con su antígeno. El elevado porcentaje de reacción cruzada que muestra para con 11-Desoxicortisol, es un dato de gran importancia que permite ajustar resultados en pruebas de Radioinmunoanálisis que utilicen este antisuero.

La deficiencia de especificidad en este sentido no implica una limitante en su uso, sino más bien un factor de consideración en el análisis de las muestras desconocidas.

El resto de las hormonas usadas para confundir al antisuero muestran porcentajes demasiado bajos, que no llegan siquiera al 2% de reacción cruzada.

La curva estandar del antígeno empleado nos indica que la sensibilidad del ensayo es adecuada pues el antisuero utilizado reconoce la concentración más pequeña contenida en el estandar número siete.

El antisuero contra Testosterona también llevó implícita la necesidad de reinmunizar los conejos tras un período en el que se tenían porcentajes de unión demasiado bajos. Se mostró, una vez más, que la reinmunización tiene efectos positivos sobre el aumento en la producción de anticuerpos; ello está acorde con lo señalado en la literatura respecto a la respuesta dada a una primera reinmunización por la capacidad de memoria inmunológica con que cuenta el organismo. El porcentaje de unión del sangrado final fué superior al señalado como mínimo en la dilución 1:4000.

Aún cuando sólo un conejo respondió satisfactoriamente, es necesario resaltar el hecho de -- que sólo se trabajaron un total de tres, lo -- que nos limita los resultados finales que se -- pudieron haber obtenido si el número de animales hubiera sido mayor.

Desafortunadamente, los logros obtenidos con el inmunógeno contra Estradiol no pudieron ser igualados en cuanto a la respuesta manifestada por los animales, lo que nos hace reflexionar -

sobre una posible deficiencia en la calidad del inmunógeno o tal vez en un desacoplamiento del esteroide a la proteína, pues el proceso de inmunización fué el mismo, ningún conejo manifestó síntomas patológicos y recibieron el mismo manejo y alimentación que los otros.

En cuanto a la especificidad y reacción cruzada, podemos concluir una vez más, que la conjugación llevada a cabo fué la adecuada para obtener antisueros específicos a su antígeno, pues el mayor porcentaje de reacción cruzada alcanzado fué del 5%, lo que no representa un factor de rechazo para su uso en pruebas de Radioinmunoanálisis. Incluso se pudo constatar de manera práctica lo señalado en los antecedentes, en el sentido de que la posición 3 y el puente Carboximetiloxima, son condiciones necesarias que de terminan especificidad en los anticuerpos produ cidos. Así mismo, observa también una sensibili dad de ensayos adecuada que se desprende por la curva estandar que se realizó para el antígeno. Lamentablemente, en el caso del antisuero contra Progesterona no se logró su obtención y pos

terior caracterización, dado que el sangrado final arrojó resultados negativos. La curva de dilución de cada conejo no alcanzó los porcentajes de unión en la dilución fijada como mínima, pese a que en la semana anterior al sacrificio mostraban niveles de producción muy positivos. Sin embargo, se presentó un descenso en la producción de anticuerpos. Se manifestó también una buena respuesta a la reinmización que nos permitió una buena respuesta pero no prolongada como se esperaba.

El descenso tan pronunciado que se observó de una semana a otra obedece fundamentalmente a que los animales sufrieron una alteración en su estado de salud, pues en el transcurso de la última semana se observaron síntomas de disnea, anorexia y pérdida de peso, ello nos motivo a sacrificarlos para aprovechar los niveles de producción con que se contaba, lo que lamentablemente no sucedió. En el caso del conejo PII que murió en el transcurso del período de producción, no se práctico necropsia --- puesto que el animal había sido ya retirado del bioterio. Sin embargo, se cuenta con informa--

ción extraoficial proveniente del bioterio del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubiran, en el sentido de que los animales padecen una Neumonía que los conduce a la muerte.- Aún cuando este animal días antes de su fallecimiento también presentó síntomas de trastornos fisiológicos, donde se destacaban los de carácter respiratorio días antes de su fallecimiento, los niveles de producción no alcanzaban aún los señalados como mínimos, por lo que se decidió esperar una recuperación del mismo, lo que no sucedió. Es en estos casos, en donde se hace más patente el contar con un mayor número de animales a fin de ampliar las posibilidades de éxito.

Las curvas de desplazamiento que se obtuvieron con los antisueros obtenidos son idénticos a las producidas con el antisuero de referencia (Organización Mundial de la Salud), por lo tanto, se concluye que en forma líquida al menos, los anticuerpos son equivalentes. La segunda etapa de evaluación final de los anticuerpos será cuando éstos se produzcan en forma liofilizada, para este proceso se requiere el con -

curso de la industria farmaceutica, por lo que el proceso final de estandarización rebasa el planteamiento inicial de este trabajo de tesis.

R E F E R E N C I A S

- 1.- International Atomic Energy Agency.
Technical Reports Series # 233: 85-97 (1984).
- 2.- Marks, V., Lindup, W.E. and Baylis, E.M.
Adv. Clin. Chem. 16:47-68 (1973)
- 3.- V.H.T. James and S.L. Jeffcoate
British Med. Bull. Vol.30 # 1;50-54 (1974)
- 4.- V. Marks, B.A. Morris and J.D. Teale
B. Med. Bull. Vol.30 # 1:80-85 (1979)
- 5.- Belsey, R., De Luca, H.F. and. Potts, J.T., Jr.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 33:554-557 (1971)
- 6.- J.H.L. Playfair, B.A.L. Hurn and Dennis Schulster.
B. Med. Bull. Vol.30 #1:24-26 (1974)
- 7.- B. Lee Gordon
Lo Esencial de la Immunología
a) Capitulo 1
b) Capitulo 2

c) Capítulo 4

d) Capítulo 5

e) Capítulo 8

Ed. El Manual Moderno S.A. de C.V. (1975)

8.- Ian Tizard

Inmunología Veterinaria

a) Capítulo 1

b) Capítulo 3

c) Capítulo 4

Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. (1985)

9.- British Medical Journal.

Vol. 3: 66 (1971)

10.- Fadenberg, H. et al.

Pediatrics (Springfield) 47:927-935 (1971)

11.- Roitt, I.M., Greaves, M.F., Torrigiani, G., Bostoff, J.
and Playfair, J.H.L.

Lancet 2:367-371 (1969).

12.- J. Cosbie Ross.

British Medical Journal 4:663-665 (1970)

- 13.- Wang, A.C., Faulk, W.P., Stuckey, M.A. and Fudenberg, H.H.
Immunochemistry 7:703-708 (1970)
- 14.- Bevan, M.J., Parkhouse, R.M.E., Williamson, A.R. and
Askonas, B.A.
Prog. Biophys. Mol. Biol. 25:131 (1972)
- 15.- Schlossman, S.P. and Kabat, E.A.
J. Exp. Med. 116:535-552 (1962)
- 16.- Benacerraf, B. and McDevitt, H.O.
Science (N.Y) 175:273-279 (1972)
- 17.- Allison, A.C. and Davies, A.J.S.
Nature (London) 233:330-332 (1971)
- 18.- Bernard F. Erlanger, Felix Borek, Sam M. Beiser, and
Seymour Lieberman.
J. Biol. Chem. Vol.234 #5: 1090-1094 (1959)
- 19.- Midgley, A.R., Jr, Niswender, G.D., Gay, V.L. and
Reichert, L.E., Jr.
Recent Prog. Horm. Res. 27:235-246 (1971)

- 20.- Walker, C.S., Clark, S.J. and Wotiz, H.H.
Steroids 21:259-273 (1973)
- 21.- Bernd Renner, Rudolf Bochskaht and Ernst Gerstner.
J. Steroid Biochem. Vol. 20 # 6A:1247-1251 (1984)
- 22.- K. Hoffman., P. Samarajeewa, E.R. Smith and A.E. Kellie.
Journal of Steroid Biochemistry 6 /:91-94 (1975)
- 23.- Kantor, F.S., Ojeda, A. and Benacerraf, B.
J. Exp. Med. 117:55-69 (1963)
- 24.- Jeffcoate, S.L. :In: Kirkham, K.E. and Hunter, W.M.,
Ed. Radioimmunoassay Methods. Churchill Livingstone, Edin
burgh 151-155 (1971).
- 25.- B.D. Gilby and S.L. Jeffcoate
J. Endocrinol. 57:XLVII (Abstract) (1973)
- 26.- Abraham, G.E., Odell, W.D., Edwards, R. and Purdy, J.M.
Acta Endocrinol. (copenhagen) Duppl. 1 #147:332-343 (1970)
- 27.- Exley, D., Johnson, M.W. and Dean, PDG.
Steroids 18:605-620 (1971)

- 28.- Kuss, E. and Goebel, R.
Steroids 19:509-518 (1972)
- 29.- Gross, S.J., Grant, J.D., Bennet, R., Wong, S.L.R. and
Lomax, P.
Steroids 18:555-563 (1971)
- 30.- Morgan, C.A. and Cooke, I.D.
J. Endocrinol 54:445-456 (1976)
- 31.- Youssefnejadian, E., Florensa, E., Collins, W.P. and
Somerville, I.P.
J. Steroid Biochem 3:893-901 (1972).
- 32.- A.C. Allison, A.J.S. Davies
Nature 233:330-332 (1971)
- 33.- Green, I., Paul, E.E. and Benacorraff, B.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 64:1095-1102 (1969)
- 34.- J. Vaitukaitis, J.B. Robbins, E. Mieschlag and G.T. Ross.
J. Clin. Endocr. 33: 988-991 (1971).