

PRODUCCION DE UN ANTISUERO ESPECIFICO CONTRA 17 β ESTRADIOL EN CONEJO^a

FERMIN JIMENEZ KRASSEL ^b

FRANCISCO J. PADILLA RAMIREZ ^b

VICENTE DIAZ SANCHEZ ^c

LOURDES BOECK QUIRASCO ^c

RESUMEN

Dentro de un programa de abastecimiento de reactivos primarios para el radioinmunoanálisis, se planteó la necesidad de producir antisueros específicos contra esteroides de importancia en reproducción animal. Por esta razón se inmunizaron seis conejos Nueva Zelanda de dos meses de edad y 1.3 kg de peso contra 17 β estradiol-6-(0-carboximetil)-oxima: BSA. Se aplicaron dosis únicas de 100, 300 y 600 μ g de una emulsión de 0.4 ml de *Bordetella pertussis* y 1.6 ml de adyuvante completo de Freund en 15-20 sitios en el dorso por vía intradérmica, además una inyección subcutánea de 0.4 ml de *B. pertussis* en un sitio diferente. El muestreo se inició en la tercera semana por punción de la arteria central de la oreja hasta determinar el título máximo por radioinmunoanálisis, tiempo en que fueron sacrificados por punción cardíaca. El título máximo inicial (1/15,000) se determinó a la décima semana en un conejo que recibió la dosis más baja. Los porcentajes de unión máxima, unión a dosis baja (23 fmol/tubo), dosis alta (750 fmol/tubo) y unión no específica fueron de 44, 34, 6 y 1% respectivamente para este título. El equilibrio de la reacción antígeno-anticuerpo se alcanzó a las ocho horas de incubación a 4 C. Los porcentajes de reacción cruzada contra estrona, estriol y etinilestradiol fueron 0.68, 0.11 y 0.10% respectivamente. La ecuación $Y = 108 + 0.85 X$ explicó la relación que existe con un antisuero de referencia proporcionado por la OMS ($r = 0.97$). Se obtuvo un antisuero con buena sensibilidad y especificidad contra 17 β estradiol para ser usado en radioinmunoanálisis.

a Recibido para su publicación el día 11 de junio de 1987.

b Depto. Reproducción Animal CENID-Microbiología. INIFAP-SARH. Km 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, C.P. 05110.

c Depto. Biología de la Reproducción. Instituto Nacional de la Nutrición. "Salvador Zubirán". Vázquez de Quiroga No. 15, Tlalpan, México, D.F.
Téc. Pec. Méx. Vol. 27 No.1 (1989)

INTRODUCCION

En los últimos años la comunidad biomédica ha adoptado y aplicado técnicas inmunológicas para el estudio de algunos problemas endócrinos. Este proceso ha generado nuevas áreas de investigación así como alternativas específicas para su aplicación. Aunque se ha avanzado en el conocimiento de la respuesta inmune, los procedimientos de inmunización se han realizado en forma empírica; por esta razón existen métodos que varían desde la dosis, frecuencia de inyección, especies, etc.⁸

El anticuerpo es uno de los componentes básicos de la reacción inmune en el inmunoanálisis en general y del radioinmunoanálisis (RIA) en particular. Por lo que el antisuero deberá cumplir con dos características principales: alta afinidad y especificidad bien definida^{7,2}. Para que un anticuerpo sea confiable, necesita llenar requisitos indispensables para su caracterización: pruebas de reacción cruzada, paralelismo avidéz, sensibilidad y precisión.

En México, la falta de anticuerpos específicos que permitan la determinación cuantitativa de las hormonas de importancia reproductiva en animales domésticos obliga a abastecerse de ellos a través de importaciones. Por lo que el objetivo de este experimento fue la inducción de un antisuero específico contra 17 β estradiol.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron conejos machos, sanos Nueva Zelanda de dos meses de edad y 1.3 ± 0.1 Kg de peso. El inmunógeno utilizado fue 17- β estradiol-6-(0-carboximetil)-oxima unido a albumina sérica bovina (20-30 moles de esteroide por mol de proteína (Sigma Chem.)). El procedimiento de inmunización realizado fue una modificación al esquema descrito por Vaitukaitis, y col.,¹⁰. Los conejos se distribuyeron en tres grupos y en cada grupo fueron inyectados con 100, 300 y 600 μ g del inmunógeno como dosis única por animal. El inmunógeno fue disuelto en 0.4 ml de solución salina que contenía 500,000 bacterias atenuadas y detoxificadas de *B. pertussis*. Esta solución se mezcló con 1.6 ml de adyuvante completo de Freund (Sigma Chem) y la emulsión (2.0 ml) se inyectó por vía intradérmica en 15 a 20 sitios de la región dorso lumbar. Simultáneamente se inyectó por vía subcutánea 0.4 ml adicionales de la solución con *B. pertussis* en una de las patas. A partir de la tercera semana post-inmunización se tomó una muestra de sangre (1 ml) de la arteria central de la oreja. Posteriormente a intervalos de siete días hasta que se detectaron los títulos máximos, momento en el cual los conejos se sangraron por punción cardíaca. El suero de cada animal se separó por centrifugación (1000 g) durante 30 min y se adicionó con 0.01% de azida de sodio y se almacenó a -20 C en frascos de 1 ml. La titulación semanal y final del antisuero se realizó por RIA, de acuerdo a la técnica descrita por Abraham¹. Posteriormente se liofilizó y se tituló nuevamente para verificar que no disminuyera la actividad inmunológica.

Para la caracterización de los antisueros (afinidad, especificidad y sensibilidad) se realizaron cuatro pruebas: 1) Curvas de dilución de antisuero; 2) Tiempo óptimo de incubación; 3)

Reacción cruzada y 4) Comparación con un antisuero de referencia (K-158310) proporcionado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Para preparar las curvas de dilución del antisuero, se descongeló 1 ml de suero completo y se diluyó con una solución salina amortiguadora de fosfatos (0.4 M, pH 7.2) conteniendo 1% de gelatina para obtener las siguientes diluciones iniciales: 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000, 1/16000 y 1/32000. Para esta prueba se consideró el comportamiento del antisuero con dos concentraciones conocidas de 17- β estradiol: 23 y 750 femtomoles/tubo. El título óptimo de la reacción se consideró cuando el anticuerpo une el 50% del antígeno y que será denominada como unión máxima (U_{max}). Además se calculó el tiempo mínimo requerido para llegar al equilibrio de la reacción antígeno-anticuerpo, usando un volumen de incubación de 0.7 ml y una temperatura constante de 4 C. El antisuero obtenido fue probado para determinar reacciones cruzadas con tres compuestos de estructura similar al estradiol: estrona, estriol y etinilestradiol. La comparación del antisuero obtenido con el de referencia fue probada por un comportamiento lineal con el anti-17 β estradiol K 158310 realizando tres análisis. Cada uno de los cuales consistió en análisis paralelos en los que se incluyeron 100 muestras de suero por duplicado, utilizando en cada caso el antisuero de la OMS y en el otro el que se obtuvo en el experimento. En ambos análisis se utilizaron trazadores y estándares proporcionados por la OMS.

RESULTADOS Y DISCUSION

En todos los animales se obtuvo una respuesta inmune. En el muestreo realizado tres semanas después de la inmunización se obtuvieron títulos de 1/1000. A la décima semana se

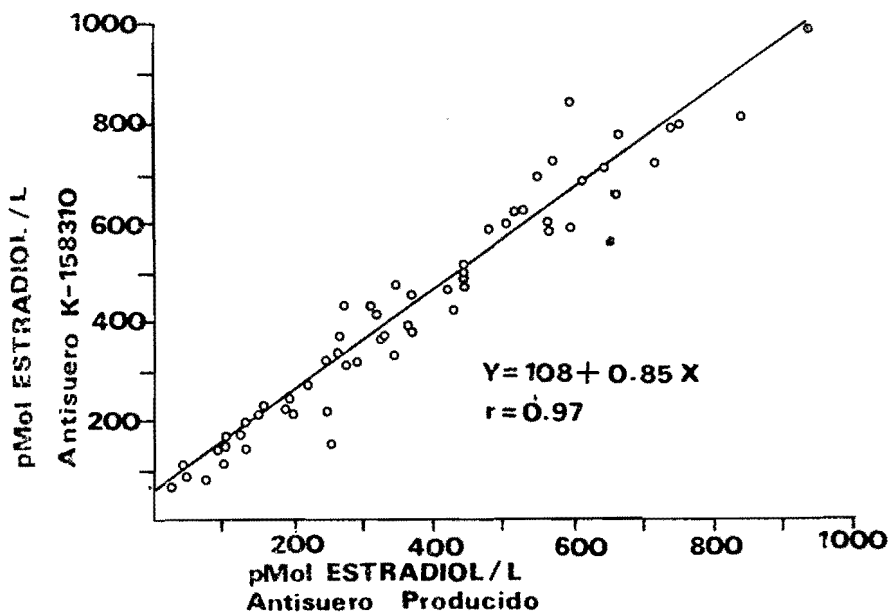


Figura 1. Curvas de dilución de un antisuero contra 17β estradiol preparado en conejo. Porcentajes de unión máxima (o—o) y con dos concentraciones conocidas de 17β estradiol (Δ — Δ 23 y \bullet — \bullet 750 fMol/tubo) en la prueba de radio inmunoanálisis.

determinó el título máximo de 1/20000 en uno de los conejos que recibió la dosis más baja (100 μ g), mientras que en los otros animales la respuesta fue de 1/4000. Esta respuesta fue similar a la obtenida por Vaitukaitis, y col.,¹⁰ en cuyo esquema de inmunización se basó este experimento. En los informes que mencionan haber usado otros esquemas de inmunización, los títulos máximos se presentan alrededor de la décima semana después de la inmunización contra esteroides y proteínas^{3,28}. La respuesta secundaria a una inyección de refuerzo se presenta más temprano en comparación con la respuesta primaria, además de que los títulos y avidéz son mayores⁶.

La caracterización se realizó únicamente en el antisuero que presentó el título máximo y se realizaron las pruebas de afinidad, especificidad, sensibilidad y la comparación con un antisuero de referencia.

Las curvas de U_{max} de las diferentes diluciones del antisuero con el antígeno marcado (2, 4, 6, 7-3H-estra-

dio) y con cantidades conocidas de 17β estradiol se presentan en la Figura 1. El título de un antisuero utilizado en RIA se ha definido como la dilución inicial en la que el antisuero une el 50% del esteroide tritulado¹. En cada una de las diluciones iniciales 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000, 1/16000 y 1/32000 se observaron los siguientes porcentajes de U_{max} : 88, 94, 85, 63 y 38%, respectivamente. Con base en estos resultados y en la definición, el mejor título del antisuero se encuentra entre 1/8000 y 1/16000. Una posterior titulación dentro de este rango mostró que la dilución 1/15000, presentó el mejor porcentaje de U_{max} (44%).

Asimismo, para la selección del título óptimo se consideró el comportamiento del antisuero en presencia de 17β estradiol sin marca radiactiva. El antisuero fue capaz de distinguir concentraciones de 23 y 750 fMol/tubo sin confundirse con la U_{max} (44%) ni con la unión no específica ($UNE = 1\%$), respectivamente. Para la dilución inicial de 1/15000, estos porcentajes

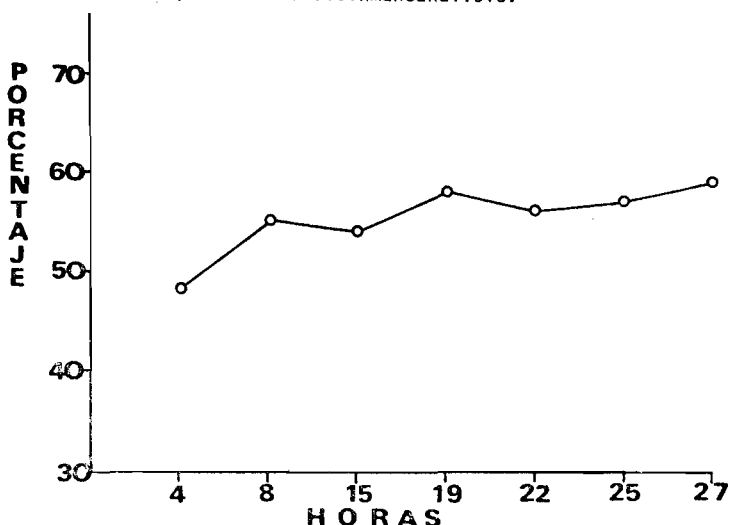
fueron de 34 y 6% para cada una de las concentraciones conocidas respectivamente.

Debido a que se busca un antisuero que se pueda optimizar en el RIA sin que se pierda la característica de sensibilidad, es decir distinguir dosis mínimas pero diferentes de cero (Skelley, y col.,⁹) se consideró que la dilución 1/15000 del antisuero cumple

con el requisito al detectar 23 fmol/tubo. Con este límite se pretende determinar concentraciones de dos a tres picogramos de estradiol por ml de suero presentes durante el período de anestro en ovejas¹⁰.

Los resultados del tiempo óptimo de incubación en que se obtiene el equilibrio de la reacción antígeno-anticuerpo se presentan en la Figura 2. La

Figura 2. Tiempo de incubación del anticuerpo contra 17- β estradiol preparado en conejo y en un volumen de 0.7 ml en la prueba de radioinmunoanálisis.



literatura menciona que el tiempo requerido para este equilibrio varía de pocas horas hasta días dependiendo de la especificidad del antisuero (Skelley, y col.,⁹). En este caso, el tiempo mínimo de incubación a 4 C y con la dilución 1/15000 fue de ocho horas.

Debido a la conveniencia en cuanto a la rutina de trabajo y a que no existen diferencias en los porcentajes de unión después de ocho horas, es posible utilizar hasta 20 h como el mejor tiempo de incubación. Sin embargo, deberá considerarse que si el período de incubación se prolonga por más de 48 h, el anticuerpo se daña y aumenta la UNE, provocando una cuantificación errónea⁴, Skelley, y col.,⁹.

Los porcentajes de reacción cruzada al 50% de unión máxima se presentan en el Cuadro 1. La especificidad del antisuero determinada por esta prueba es aceptable al compararla con otros antisueros y para los esteroides con los que presenta reacción cruzada.

Korenman, y col.⁵, encontraron porcentajes de reacción cruzada de 0.36 y 0.42% con estrona y estriol respectivamente, de un antisuero obtenido en oveja; asimismo, con un antisuero comercial (Micromedic Systems) inducido en conejos y con el mismo inmunógeno utilizado en el presente experimento, se mencionan porcentajes de 0.80 y 1.80% con los mismos estrógenos. Estos porcentajes

CUADRO 1. PORCENTAJES DE REACCION CRUZADA DE UN SUERO ANTI 17- β ESTRADIOL PREPARADO EN CONEJO, CON TRES ESTEROIDES DE ESTRUCTURA SIMILAR*

ESTEROIDE	PORCENTAJE DE UNION
17- β estradiol	100.00
Esterona	0.68
Estriol	0.11
Etinil estradiol	0.10

* Con una dilución inicial del 1/15 000 y el 50% de unión máxima en el radioinmunoanálisis.

de reacción cruzada son mayores que los encontrados en esta ocasión: 0.68 y 0.11% para estrona y estriol respectivamente, indicando que el antisuero tiene buena especificidad.

La comparación con el antisuero de referencia se realizó por medio de una regresión lineal simple de los valores obtenidos al analizar 100 muestras con ambos antisueros en la prueba de RIA (Figura 3). La ecuación que se ajustó a los datos fue: $Y = 108 + 0.852 X$, donde Y fueron las concentraciones de 17 β estradiol con el antisuero que se está titulando y X las proporcionadas por el antisuero de referencia ($r = 0.97$, $P < 0.05$). Estos resultados indican que el comportamiento del antisuero para determinar concentraciones de estradiol en suero o plasma fue similar al de referencia de la OMS, y que utiliza para observar el comportamiento de los laboratorios que realizan pruebas de RIA en el mundo. Aún cuando existe una sobrestimación de la concentración de 17 β estradiol (10%) en comparación con el antisuero de referencia, cabe señalar que esto no invalida la utilidad del antisuero producido, ya que existe la posibilidad de que el antisuero de referencia esté subestimando los valores blanco.

La obtención del antisuero contra 17 β estradiol cumple una parte de los objetivos del programa al lograr la producción de un antisuero con buen título de trabajo y una especificidad y sensibilidad aceptables para cuantificar 17 β estradiol en suero o plasma. Además proporciona apoyo a los proyectos de investigación en endocrinología de la reproducción en las principales especies de animales domésticos.

SUMMARY

The purpose of the present work was to produce a specific antiserum against estradiol-17 β . Six two-month-old new Zealand rabbit were immunized against estradiol 17 β -6 (O-carboxy-methyl)-oxime:BSA. One hundred, 300 AND 600 μ g of immunogen were homogenized with 0.4 ml of a *Bordetella pertussis* solution and 1.6 ml of complete Freund's adjuvant and the resulting emulsion was injected intradermally at 15-20 sites on the back of the animal. An extra 0.4 ml of *B. pertussis* solution was injected subcutaneously at a separate site. Starting on the third week after immunization, all animals were bled at 7-day intervals by central ear artery puncture for 10 weeks and then slaughtered by cardiac puncture when the maximum binding was detected. The initial maximum titre (1/15,000) was obtained in one rabbit which was injected with the power dose. The values for maximum binding, low dose binding (23 fmol / tube), high dose binding (750 fmol / tube) and non specific

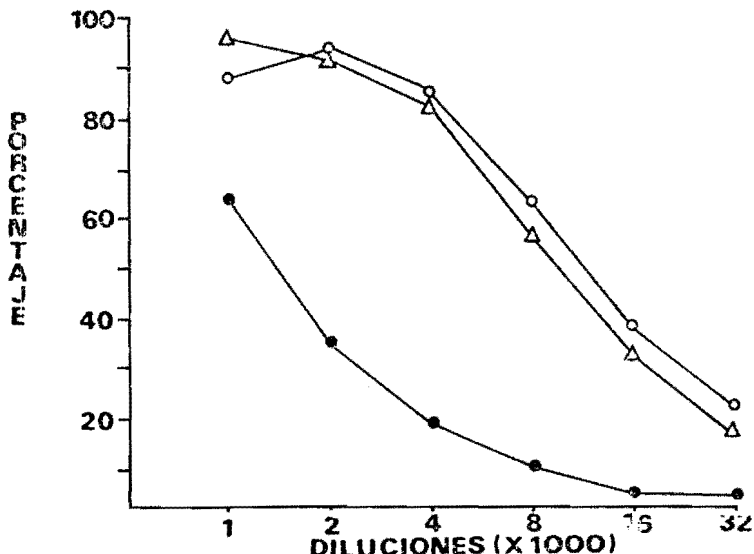


Figura 3. Correlación de los resultados obtenidos en la prueba de radioinmuno análisis usando dos antisueros contra 17- β estradiol.

binding were 44, 34, 6 and 1 % respectively. The antigen-antibody equilibrium was reached at eight hours and cross-reaction percentage against estrone, estriol and ethylestradiol were 0.68, 0.11 and 0.10% respectively. Regression equation $Y = 108 + 0.852x$ shows the relationship between the antiserum obtained and the WHO reference antiserum ($r = 0.97$). The anti-estradiol 17 β serum produced had good sensitivity and specificity for use in radioimmunoassay.

LITERATURA CITADA

1 ABRAHAM, G.E., 1974. Radioimmunoassay of steroids in biological materials. *Acta Endocr. Copen. Suppl.* 183:5.

2 FRANCHIMONT, P., HENDRICK, J.E. and REUTER, A.M., 1983. Antibody production for radioimmunoassay. In: Principles of competitive protein-binding assays. Odell, W.D. and Franchimont, P. (eds) John Wiley & Sons. New York. p. 33-53.

3 HURN, A.L. and LANDON, J., 1971. Antisera for radioimmunoassay. In: Radioimmunoassay Methods. Kirkham, K.D. and Hunter, W.M. (eds) Churchill Livingstone. Edinburgh. p. 121-142.

4 INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY., 1984. Laboratory training manual on radioimmunoassay in animal reproduction. *Technical Report Series* No. 233. Vienne. p. 85-106.

5 KORENMAN, S.G., STEVENS, K.H., CARPENTER, L.A. ROBB, M., NISWENDER, G.D. and SHERMAN, B.M., 1974. Estradiol radioimmunoassay without chromatography procedure, validation and normal values. *J. Clin Endocr. Metab.* 38:718.

6 LAND, R.B., FORDYCE, M., GAULD, I.K. MORRIS, B.A. and WEBB, R., 1983. Fertility of sheep given antisera to steroids during anoestrous. *J. Reprod. Fert.* 67:269.

7 MIDGLEY Jr. A.R., NISWENDER, G.D., GAY, V.L. and REINCHERT Jr. L.E., 1971. Use of antibodies for characterization of proteins and steroids. *Rec Progr. Horm. Res.* 27:235.

8 PARKER, C.W., 1976. *Radioimmunoassay of biologically active compounds* Prentice-Hall Inc. New Jersey . p. 24-67.

9 SKELLEY, D.S., BROWN, L.P., and BESCH, P.K., 1973. Radioimmunoassay. *Clin. Chemis.* 19(2):146.

10 VAITUKAITIS, J., ROBBINS, J.B., NIESCHLAG, E. and ROSS, R.T., 1971. A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J. Clin. Endocr.* 33:988.

11 YUTHASASTRAKOSOL, P., PALMER, W. M. and HOWLAND, B.E., 1975. Luteinizing hormone, oestrogen and progesterone levels in peripheral serum of anoestrous and cyclic ewes as determined by radioimmunoassay. *J. Reprod. Fert.* 43:57.