

COMPARACIÓN DEL USO DE RIA Y ELISA EN LA DETERMINACIÓN DE PROGESTERONA EN CABRAS DURANTE EL CICLO ESTRUAL

Comparison of using RIA and ELISA to determine progesterone in goats during the estrous cycle

Hugo Leyva-Ocariz*
Coralie Munro**

* Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA)
Decanato de Ciencias Veterinarias
Unidad de Investigación "Dr. H. Moussatche"
Laboratorio de Endocrinología. Apartado 846
Barquisimeto, Venezuela.

** University of California, Davis. School of Veterinary Medicine
Davis, CA. 95616, USA.

RESUMEN

En este trabajo se comparan los resultados del uso del análisis inmunoenzimático ELISA con el método tradicional de análisis inmunorradiactivo (RIA) para la determinación de progesterona en el suero sanguíneo de cabras triple mestizas del estado Lara, Venezuela. En ELISA se utiliza progesterona marcada con peroxidasa de rábano y un anticuerpo obtenido en conejos contra un inmunógeno de 11a-hemisuccinato de progesterona en albúmina sérica bovina. El coeficiente de correlación ($r=0.97$), la especificidad, precisión y sensibilidad de ELISA indican que el método es efectivo en la evaluación del cuerpo lúteo de la cabra y requiere tres horas solamente en su proceso.

Palabras clave: Progesterona, ELISA, RIA, cabra.

ABSTRACT

In this study results of using an enzyme-immunoassay ELISA and a traditional method of Radioimmunoassay (RIA) to measure serum progesterone in crossbred goats are compared. The study was conducted in the Lara state of Venezuela. In the ELISA method was used horseradish peroxidase labelling the progesterone and an antiserum raised in rabbits against progesterone 11a-hemisuccinyl-bovine serum albumin (BSA) immunogen. Correlation coefficient ($r=0.97$), specificity, precision and sensibility of the ELISA

indicated that this method is effective in evaluating the corpus luteum of the goat and the complete process needs only three hours.

Key words: Progesterone, ELISA, RIA, goat.

INTRODUCCIÓN

El radioinmunoanálisis (RIA) [2] ha sido la técnica analítica predominante usada en endocrinología durante los últimos treinta años. Sin embargo, desde la introducción del análisis inmunoenzimático ELISA, desarrollado por Engvall y Perlman [5], se ha ofrecido una alternativa al RIA para la detección de anticuerpos y antígenos en fluidos corporales.

La mayoría de los análisis inmunoenzimáticos para esteroides usan métodos de separación entre el conjugado y la fracción libre, que consumen considerable tiempo y reactivos, debido al requerimiento de varios pasos del lavado y centrifugación. Por estos problemas y los asociados con el manejo de material radioactivo, en el Laboratorio de Reproducción de la Universidad de California, Davis, Estados Unidos de Norteamérica, se desarrolló un sistema de ELISA para progesterona que reemplaza eficientemente al RIA [11].

El propósito del presente trabajo fue determinar la concentración de progesterona sérica durante el ciclo estrual de cabras mestizas de las zonas áridas de Venezuela, comparando el RIA y el ELISA mencionados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio se utilizaron 10 cabras triple mestizas (50% Alpina, 25% Nubian y 25% Criolla) que formaron parte de un estudio endocrinológico previamente reportado [9]. Las cabras fueron mantenidas en explotación semiextensiva en la Estación Experimental Lara del Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP) situada en El Cují, estado Lara, en el Hemisferio Norte a 69° 19' de longitud, a 10° 10' de latitud y altura de 600 m.s.n.m. La zona se caracteriza por presentar al menos dos períodos de lluvias anualmente con precipitación de 600 mm. Las cabras cuyas edad oscila entre 3 y 4 años, se encontraban en el período final de lactación, habiendo tenido al menos dos partos y mostraban un peso promedio de 34 Kgs. En la zona mencionada, las hembras entran en estro cuando se presenta el período de lluvias. La detección del celo se realizó utilizando un macho vasectomizado, dos veces por día (mañana y tarde) durante 1 hora y se verificó por el incremento en los niveles de 17 β -estradiol, medido mediante el método previamente descrito por Shille y col. [13], desde 15 pg/ml hasta 25-30 pg/ml de suero sanguíneo. Se tomó una muestra de sangre (3ml) diariamente entre 8 y 9 a.m., a partir de la observación de celo hasta la aparición del siguiente celo. El suero sanguíneo fue almacenado a -20°C hasta la determinación de progesterona por RIA y ELISA.

RIA

La progesterona sérica fue cuantificada por RIA siguiendo la técnica descrita previamente por Shille y Stabenfeldt [14]. El coeficiente de variación (CV) inter-ensayo fue de 16% y el CV intra-ensayo, de 12%.

ELISA

Se utilizó un análisis inmunoenzimático [11] el cual utiliza progesterona marcada con peroxidasa de rábano, como marcador, y un anticuerpo obtenido en conejos contra el hemisuccinato de progesterona. El suero sanguíneo (100 μ l) se ex-

trajo con 2 ml de éter de petróleo. Todas las muestras (50 μ l en cada hoyuelo de la placa) fueron corridas por duplicado en un ensayo. Se empleó una reacción competitiva con 2 horas de incubación. El esteroide libre fue separado del esteroide unido al anticuerpo, en un paso de lavado de la superficie del plato adherida al anticuerpo. Como substrato se utilizó 2,2' Azino-di (3-ácido sulfónico ethyl-benthiazolina) sal diamonium, permitiendo una reacción de una hora [11].

Análisis de datos

La curva estándar dosis respuesta, FIG. 1, fue construida comparando el porcentaje de unión del anticuerpo con el marcador (peroxidasa de rábano), contra la cantidad de progesterona agregada. El cálculo se realizó usando el programa de Davis y col. [4] diseñado para la calculadora T1-59.

En los puntos de la curva de progesterona, FIG. 2, se aplicó análisis de varianza y las medias fueron comparadas mediante la prueba t de Bonferroni [12].

RESULTADOS

Especificidad

Las reacciones cruzadas de varios esteroides, tanto en ELISA como en RIA usando el mismo anticuerpo contra 11 α -hemisuccinato BSA de progesterona, fueron calculadas mediante el método de Abraham [1] y se muestran en la TABLA I.

Precisión

La precisión del ELISA para progesterona fue analizada utilizando una mezcla de sueros sanguíneos de seis cabras en estudio. El coeficiente de variación intra-ensayo fue de 7,2% (coeficiente promedio de variación entre placas).

Sensibilidad

En ELISA fue calculada utilizando el promedio de la sensibilidad determinada en dos curvas estándar. La sensibilidad

TABLE I
REACCIÓN CRUZADA DEL ANTICUERPO ANTI-PROGESTERONA EN EL RIA Y ELISA

Esteroides	% Reacción Cruzada*	
	ELISA	RIA
11 α -hidroxiprogesterona	22.00	25.00
17 α -hidroxiprogesterona	0.30	0.70
20 α -hidroxiprogesterona	0.43	0.21
20 β -hidroxiprogesterona	1.45	0.46
5 α -pregnano-3,20 diona	25.00	16.00
17 β -estradiol	0.04	0.03

* 50% de inhibición en las respectivas curvas de dosis respuesta, expresado como (ng progesterona/ ng de esteroide) x 100% [1].

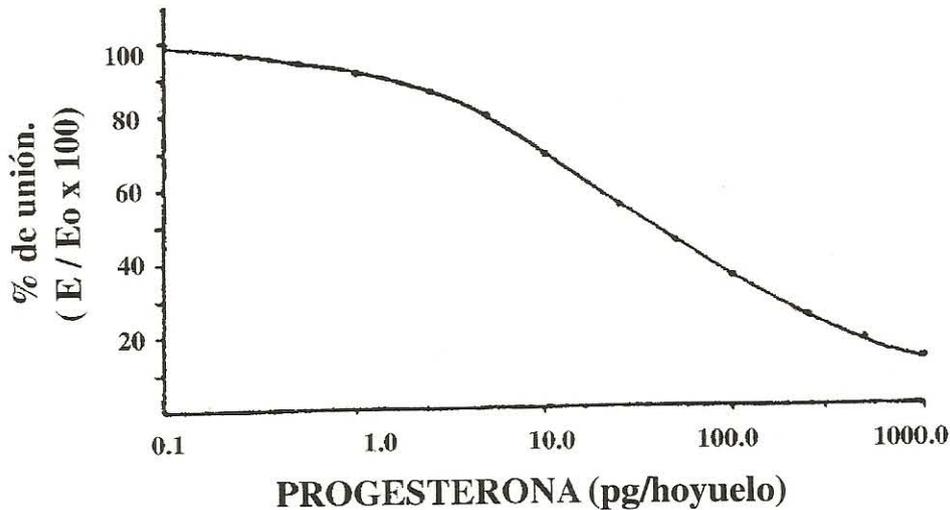


FIGURA 1. CURVA ESTÁNDAR DOSIS-RESPUESTA PARA ELISA DE PROGESTERONA. E: LECTURA DE ABSORBANCIA DE LA MUESTRA O ESTÁNDAR. Eo: LECTURA DE ABSORBANCIA DE LOS BLANCOS (CEROS). SENSIBILIDAD: 0.25 PG/HOYUELO. EN EL RIA FUE 2 PG/HOYUELO.

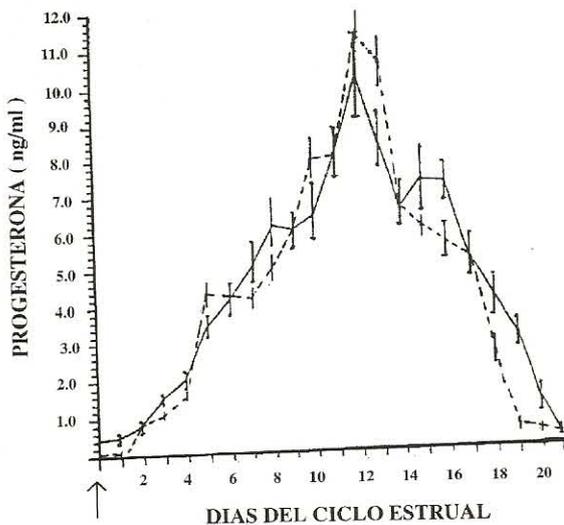


FIGURA 2. CONCENTRACIÓN DE PROGESTERONA SÉRICA ($\bar{X} \pm SEM$) EN 10 CABRAS TRIPLE MESTIZAS A TRAVÉS DEL CICLO ESTRUAL, DETERMINADA POR RIA (LÍNEA CONTINUA), ELISA (LÍNEA INTERRUMPIDA) ($r= 0.98$). LA FLECHA INDICA EL DÍA DE LA PRESENTACIÓN DEL ESTRO.

fue de 0.25 pg/hoyuelo de la placa, donde la sensibilidad es definida como la concentración de progesterona la cual es mayor que cero (lectura de absorbancia de los tubos blancos) + 2 desviaciones estándar [19]. Otros detalles de la curva estándar se observan en la FIG. 1. La sensibilidad del RIA fue de 2 pg/tubo.

Correlación con RIA

Coefficientes de correlación de progesterona en suero sanguíneo de cabras (10 animales, 225 muestras) entre dos

estros, determinados tanto por ELISA como por RIA se muestran a continuación, FIGS. 1 y 2:

r	Pendiente	Intercepción Y	n
0.97	0.98	-0.019	225

Curva de progesterona

Analizando la curva de progesterona, FIG. 2, por el método de ELISA podemos observar lo siguiente: La duración del ciclo estrual fue en promedio de 22 ± 1 días. Al tercer y cuarto día se observaron valores de progesterona entre 1 y 2 ng/ml. La diferencia entre las concentraciones del día 2 (0.6 ± 0.1 ng/ml) y del día 3 (1.3 ± 0.2 ng/ml) fue significativa ($P < 0.01$). Igualmente, la diferencia de concentraciones del día 17 (5.2 ± 0.4 ng/ml) y del día 18, inicio de la luteólisis, (2.5 ± 0.2 ng/ml) fue significativa ($P < 0.05$). El pico se observó alrededor del día doce (11 ± 0.7 ng/ml). Entre los días once y trece, la progesterona se mantuvo por encima de los 7.5 ng/ml. A partir del día 17 se observó la mayor actividad luteolítica, es decir, entre 4 y 5 días antes del estro. A este respecto, González-Stagnaro y col. [6] obtuvieron presentación del estro 55 horas después de la inyección de cloprostenol, un análogo de la prostaglandina $PGF2\alpha$, en cabras Alpinas.

En la FIG. 3 se pueden comparar las curvas de Progesterona de una cabra con ciclo de 21 días y de otra con ciclo de 22 días. En ambos casos el pico de progesterona se presentó a los doce días del ciclo, pero en el primer animal la concentración alcanzó los 11.5 ng/ml., declinando los días después a 6 ng/ml. En el animal con ciclo de 22 días la máxima concentración fue de 8 ng/ml, manteniéndose durante dos días para luego declinar a 6 ng/ml, entre el día quince y dieciséis.

DISCUSIÓN

Comparando las concentraciones de progesterona encontradas en este trabajo usando ELISA, con las reportadas por otros autores empleando RIA, se pueden resaltar los siguientes hechos:

Simplicio y col. [15] trabajando con cabras nativas brasileñas encontraron valores de progesterona de 0.2 ng/ml el día cero o día del estro, lo que es similar a los resultados reportados aquí; pero en este trabajo para el día once, se presentó el pico de producción de dicha hormona, siendo 10.4 ng/ml con ELISA y 10.0 ng/ml con RIA. Se reportaron 3.7 ng/ml 48 horas antes de la presentación de celo [15], mientras que en el presente trabajo se registró 1.0 ng/ml (RIA) y 0.5 ng/ml (ELISA), siendo significativa la diferencia al aplicar el método de Zarco y col. [19]. Estos autores no reportan datos para el cuarto día, en el cual, en este trabajo, fueron observados incrementos en la producción de progesterona oscilando entre 1 y 2 ng/ml, mientras que en el tercer día esta hormona estuvo alrededor de 0.6 ng/ml en los dos métodos. La anterior consideración indica que en las razas de cabras utilizadas para este estudio, efectuado en la Estación Experimental Lara del Cují, Venezuela, la detección de incrementos por encima de 1 ng/ml de progesterona el cuarto día del ciclo, pudiera indicar la presentación de ovulación.

La mayor cantidad de progesterona (11.8 ng/ml) durante el ciclo estival, fue registrada en el día 15, pero en cabras criollas ovidectomizadas, modelo que este laboratorio ha utilizado durante los últimos años para estudiar la actividad ovárica en cabras de las zonas áridas y semiáridas del estado Lara [8].

Los niveles de progesterona en el plasma sanguíneo de cabras de razas diferentes varió desde 0.2 ng/ml, en el día del estro, hasta aproximadamente 16 ng/ml durante la fase luteal del ciclo estival, y decreció rápidamente a niveles basales durante los últimos tres días del ciclo [3, 7, 10, 16, 17]. Estos datos incluyeron cabras Angora; sin embargo, Wentzel y col. [18], trabajando con esta raza, reportaron que el valor más alto de progesterona fue solamente de 6.7 ng/ml en el día 13 del ciclo. Es de hacer resaltar que ninguno de estos trabajos utilizó ELISA sino RIA para la determinación de progesterona.

CONCLUSIONES

ELISA es muy efectivo en la evaluación de la actividad funcional del cuerpo lúteo y requiere solamente tres horas en su proceso. El sistema presenta gran sensibilidad, pudiendo detectar cantidades del orden de 0.04 ng/ml el día del estro, FIG. 3, y registra muy buena especificidad. El ensayo es menos costoso que el RIA, ya que requiere equipo menos sofisticado y no necesita el uso de material radiactivo.

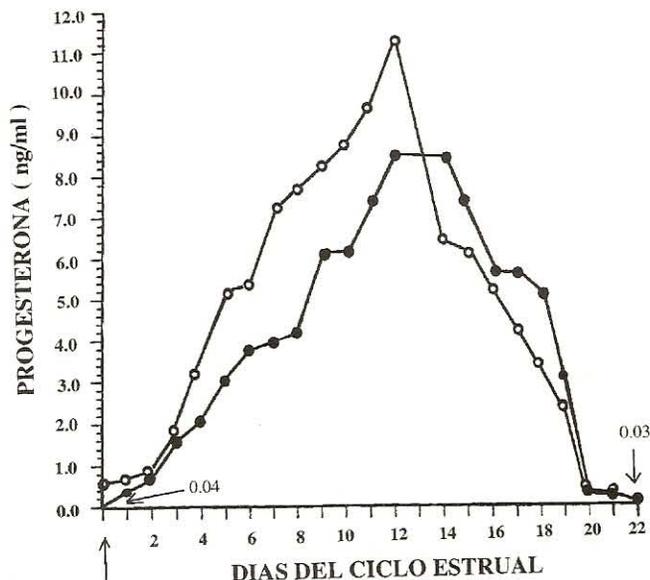


FIGURA 3. CONCENTRACIÓN DE PROGESTERONA SÉRICA (ng/ml) EN DOS CABRAS TRIPLE MESTIZAS A TRAVÉS DEL CICLO ESTIVAL, DETERMINADA POR ELISA. ● CABRA CON CICLO DE 22 DÍAS. ○ CABRA CON CICLO DE 21 DÍAS. LAS FLECHAS INDICAN EL DÍA DE LA PRESENTACIÓN DEL ESTRO.

RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados de este trabajo, se recomienda el método de ELISA descrito, para cuantificar progesterona en el suero sanguíneo de cabras. El método fue desarrollado en el Laboratorio de Endocrinología Reproductiva de la Universidad de California en Davis [11] y utilizado por primera vez en la determinación de progesterona en las cabras de Venezuela [9].

AGRADECIMIENTOS

A la Estación Experimental Lara del FONAIAP-Lara, al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico-Tecnológico (CDCHT) de la Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado (UCLA) de Barquisimeto, al Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de California, Davis, USA y, al Centro de Computación del CDCHT.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABRAHAM, G.E. Solid phase radioimmunoassay of oestradiol-17B. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 29:866-870. 1969.

- [2] ARIJE, C.R.; WILTBANK, J.N.; HOPWOOD, M.L. Hormone levels in pre and post partum beef cows. **J. Anim. Sci.** 39:338-347. 1974.
- [3] CHEMINEAU, P.; GAUTHIER, J.C.; POIRIER, J.C.; SAUMANDE, J. Plasma levels of LH, FSH, prolactin, oestradiol-17 β and progesterone during natural and induced oestrus in the dairy goat. **Theriogenology** 17(3): 313-323. 1982.
- [4] DAVIS, S.E.; MUNSON, P.J.; JEFFE, M.L.; RODBARD, D. Radioimmunoassay data processing with a small programable calculator. **Journal of Immunoassay** 1:15-25. 1980.
- [5] ENGVALL, E.; PERLMAN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry** 8: 871-874. 1971.
- [6] GONZÁLEZ-STAGNARO, C.; COGNIÉ, Y.; RAVAU, C.; PELLETIER, J.; FAGU, O.; ANDRÉ, B.; BARIL, G.; CORTEEL, J.M. Niveles hormonales y momento de ovulación en cabras tratadas con CB-154 durante el celo sincronizado con prostaglandinas análogas durante la estación sexual. **Proceedings 10th International Congress in Animal Reproduction and Artificial Insemination**, Urbana-Champaign, USA:9. 1984.
- [7] HEAP, R.B.; LINZELL, J.L. Arterial concentration, ovarian secretion and mammary uptake of progesterone in goats during the reproductive cycle. **J. Endocr.** 36(4): 389-399. 1966.
- [8] LEYVA-OCARIZ, H.; STABENFELDT, G.H.; MUNRO, C.; ARTEAGA, M.; ORDUZ, B.; DIAZ, M.; HERNÁNDEZ, I. Endocrinología de cabras criollas ovidectomizadas y mestizas en zonas semiáridas de Venezuela. **Revista Científica FCV-LUZ** III(2):157-164. 1993.
- [9] LEYVA-OCARIZ, H.; MUNRO, C.; STABENFELDT, G.H. Serum LH, FSH, estradiol-17 β and progesterone profiles of native and crossbred goats in a tropical semiarid zone of Venezuela during the estrous cycle. **Anim. Reprod. Sci.** 39:49-58. 1995.
- [10] MORI, Y.; KANO, Y. Changes in plasma concentrations of LH, progesterone and oestradiol in relation to the occurrence of luteolysis, oestrus and time of ovulation in the Shiba goat. **J. Reprod. Fert.** 72:223-230. 1984.
- [11] MUNRO, C.; STABENFELDT, G.H. Development of a microtitre plate enzyme immunoassay (EIA) for the determination of progesterone. **J. Endocrinol.**, 101:41-49. 1984.
- [12] NETER, J.; WASSERMAN, W. **Applied Linear Statistical Models**. Irwin-Dorsey, Homewood: 419-635. 1974.
- [13] SHILLE, V.M.; LUNSTROM, K.E.; STABENFELDT, G.H. Follicular function in the domestic cat as determined by estradiol-17B concentrations in plasma: relation to estrous behavior and cornification of exfoliate vaginal epithelium. **Biol. Reprod.** 21:953-963. 1979.
- [14] SHILLE, V.M.; STABENFELDT, G.H. Luteal function in the domestic cat during pseudopregnancy and after treatment with prostaglandin F. **Biol. Reprod.** 21:1217-1223. 1979.
- [15] SIMPLICIO, A.A.; RIERA, G.S.; NUNES, J.F. Estrous cycle and period evaluation in an undefined breed type (SRD) for goats in Northeast Brazil. **Proceedings 3rd International Conference on goat production and Disease**. Tucson, AZ, USA: 310. 1982.
- [16] THIBIER, M.D.; POTHELET, N.; JEANGUYET, G.; MONTIGNY, G. Estrous behavior progesterone in peripheral plasma and milk in dairy goats at onset of breeding season. **J. Dairy Sci.** 64(3): 515-519. 1981.
- [17] THORBURN, G.D.; SCHNEIDER, W. The progesterone concentration in the plasma of the goat during the estrous cycle and pregnancy. **J. Endocr.** 52(1):23-36. 1972.
- [18] WENTZEL, D.; BOTHA, L.J.; VILJOEN, K.S. Progesterone levels in the peripheral plasma of the cycling Angora goat doe. **Agroanimalia** 11(2):27-28. 1979.
- [19] ZARCO, L.; STABENFELDT, G.H.; KINDAHL, H.; QUIRKE, J.F.; GRANSTROM, E. Persistence of luteal activity in the non pregnant ewe. **Animal Reproduction Science** 7:245-267. 1984.