Universidad del Zulia
Vicerrectorado Académico
SERBILUZ
LUZ Repositorio Académico

Revista de Agronomía (LUZ):7: 255 - 263

DETERMINACION DIRECTA DE TESTOSTERONA EN SUERO SANGUINEO DE MACHOS BOVINOS [1]

DIRECT DETERMINATION OF TESTOSTERONE IN BLOOD SERUM OF MALE BOVINES.

RAMIREZ IGLESIA, L.N [2]

FACCIO, G[3]

RESUMEN

Con el objeto de validar su uso en los machos bovinos, se utilizó un radioinmunoanálisis comercial en fase líquida para la determinacion directa de la testosterona en suero humano (CIS-SBTESTO). Durante la realización de las pruebas, se utilizaron muestras de sangre extraídas por punción de la vena yugular a tres toros y tres becerros de 4- 6 meses castrados desde los 2 meses de edad. El uestreo se efectuó desde las 7 am a las 12 m cada hora. La sangre fue centrifugada a 3.000 rpm por 20 minutos, separado el suero y almacenado a -20 °C. Se realizaron pruebas de paralelismo (PP) de recuperación (PR) y de precisión. La PP fue satisfactoria, en la PR la regresión lineal de los valores de testosterona esperados sobre los observados, cuando se agregó a las muestras de suero los estandar 0 a 5 ng/ml dio un r=0.89 (y=0.51 + 0.84x), cuando se mezclaron distintas proporciones de la muestra y el estandar 10 ng/ml arrojó r= 0,9245 (y = 2, 05 + 0,53 x). El coeficiente de variación intraensayo e interensayo fue de 3,0 y 8,1 respectivamente. Los valores de la testosterona para dos toros arrojó una media de 7.76 ± 5,25 ng/ml; los becerros mostraron niveles de testosterona indetectable; coincidiendo estos resultados con aquellos reportados por la literatura. Las pruebas son satisfactorias y sugieren la factibilidad de su uso en la medicina veterinaria para determinar cambios en los niveles de testosterona circulantes en machos bovinos.

1) Postgrado en Producción Animal. LUZ. Maracaibo
2) Núcleo Universitario Rafael Rangel ULA. Trujillo
3) Laboratorio Clínico La Redoma. Maracaibo, Venezuela.

ABSTRACT

In order to perform the RIA, used for direct determination of testosterone in human blood serum (CIS-SBTESTO), blood samples extracted from the yugular vein of three bulls and three-five month old steers were takes. Sampling was done every hour from 7 to 12 am. Blood was centrifugated at 3000 rpm for 20 min. Blood serum was then isolated and stored at - 20 °C. Test of paralelism (PT), recovey (RT) and accuracy (AT) were performed. PT was satisfactory and linear regression for RT regarding the expected testosterone values over the observed ones after adding standard 0-5 ng/ml to serum samples showed a r = 89(y =.51 + .84 x) and after mixing different leves of the serum sample with standard 10 mg/ml should the following results r = .92 (y=2.05 + .53 x). Botch, within and between-assay variation coefficients were 3.0 and 8.1, respectively. Mean testosterone value for two bulls was 7.76 ± 5.25 ng/ml. Young steers did not show detectable levels of testosterone. These results suggest the possibility of using the RIA to determine changes on levels of blood serum testosterone in male bovines.

INTRODUCCION

La cuantificación de los niveles de testosterona en suero y/o plasmas sanguíneos de machos bovinos, posee gran importancia para el estudio de la pubertad, la actividad reproductiva y el comportamiento sexual de los toros (17). En esta región es necesario y conveniente conocer tanto a nivel de fincas como en los centros de inseminación artificial y de investigación, los perfiles hormonales periféricos del principal andrógeno del macho bovino.

Actualmente se encuentran disponibles en el mercado nacional kits de radioinmunoanálisis (RIA) para la determinación directa de la testosterona en la especie humana, pero su uso no debe ser confiable para otras especies, hasta tanto se realicen pruebas de validación que detecten cambios en la concentración de la testosterona en el suero, plasma u otros líquidos orgánicos de animales (13,2). Así se ha hecho para cuantificar de acuerdo a la técnica del RIA, la insulina en caninos, bovinos y equinos (13); la triyodotironina, la tiroxina y el cortisol en caninos, felinos y equinos (12); las hormonas tiroideas en los ovinos y en los caprinos (10); la progesterona y la testosterona en las cabras (5); la progestrona en la leche descremada y el suero de los bovinos (16;11); así como para determinar la progesterona en la crema de leche (9) la validación del Elisa para la progesterona en el plasma de los bovinos, para su uso en los equinos, ovinos y caninos (4). El objetivo del presente trabajo fue validar un RIA kits para cuantificar la testosterona en el suero sanguíneo de los machos bovinos.

MATERIALES Y METODOS

El ensayo se basa en la competencia por un limitado número de lugares de unión en la molécula del anticuerpo, entre la testosterona -I ^{125} y aquella contenida en los estandares y/o muestras analizadas. Después de un determinado período de incubación, la cantidad de testosterona -I ^{125} unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la cantidad de ellas presentes en la muestra. La separación de las fracciones unidas y libre se realiza mediante un segundo anticuerpo.

El kit* para radioinmunoanálisis en el suero o el plasma sanguíneo contiene, estandares preparados en suero humano con las siguientes concentraciones: 0; 0,25; 0,5;1; 2,5; 5 y 10 ng/ml. La sensibilidad fue determinada en 0,08 ng/ml (0,28 nmol/l). El anticuerpo altamente específico se obtuvo en conejos, las pruebas de reactividad cruzada demostraron los siguientes resultados: Testosterona 100%, 5-Dihidrotestosterona 7,2%, Androsteneidona 0,081%, Dehidroepiandrosterona 0,036%, 5-α - Androstan, 3-α, 17-β diol 0,03%, Glucoronato de Testosterona 0,025%, otros esteroides como Cortisol, Corticosterona, Deoxicorticosterona, 17-Epitestosterona, Sulfato de Testosterona, Androsteron, Progesteron, Estrona, Estradiol y Estriol exhibieron una reactividad cruzada inferior a 0,02%. La testosterona marcada con I ^{125} presenta una radioactividad de 30 KBq (0,8 μCi) al momento de la preparación. La habilidad de combinación del sistema (Bo/Tx100) fue mayor del 45%. La precisión del ensayo, expresado como coeficiente intra e inter ensayo fue 6,8% a 9,4% a 10% respectivamente.

Las muestras se tomaron cada hora desde las 7 am hasta las 12m, mediante punción de la vena yugular a tres toros mestizos adultos y tres becerros de 4-6 meses de edad, los cuales fueron castrados a los dos meses. Para obtener el suero, la sangre se centrifugó dentro de los 30 minutos de obtenida a 3.000 rpm durante 20 minutos, luego fue trasegado a viales, refrigerado inmediatamente y transportado al laboratorio, donde se conservó a -20 °C hasta su procesamiento.

Las pruebas se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante, sin modificaciones. Las muestras fueron procesadas por duplicado en tubos de polipropileno de 12 x 75 mm y fondo curvo; se usaron 50 μl de estandares y muestras a analizar, 200 ul de testosterona I^{125} y 200 μl de anti suero, el período de incubación fue de tres horas a 37 °C; luego del cual se le agregó 1.0 ml del inmunoprecipitante y se centrifugaron a 2.000 g por 15 minutos; el sobrenadante fue separado inmediatamente por aspiración. Para el conteo de la radioactividad remanente se utilizó un contador de centelleo gamma, manual, marca NML (Nuclear Medical Laboratories), modelo IN-V-TRON 2000. La cuantificación de testosterona en las muestras y los controles fue realizada por regresión lineal, utilizando la transformación logit-log (8).

*SB-TESTO International-CIS (Francia)

La especificidad, definida como el grado con el cual un ensayo detecta aquella sustancia para la cual ha sido elaborado (3), fue probada mediante la inhibición paralela de la curva estandar y las diluciones seriadas del suero sanguíneo de tres toros. Como diluente se utilizó PBSG (Buffer fosfato gelatina), preparado de acuerdo a la siguiente fórmula: 1,265g de NaH2P04.H20; 9,058g de NaHP04.7H20; 8,5g de NaCl; 1.0g de gelatina anhidra y 0,1g de Azida de sodio 1.000 ml de agua destilada, el pH fue ajustado a 7,2 con HCl 5N. Se hicieron determinaciones para cuantificar cambios en la concentración de testosterona en las muestras de suero provenientes de toros adultos y becerros castrados, desde las 7 am a las 12m, tomadas con intervalo de una hora.

La exactitud, definida como la concordancia entre la cantidad de la testosterona medida y la presente en la muestra (3), fue ensayada mediante la prueba de recuperación, agregando a las muestras de suero los estandares 0; 0,25; 1.0; 2,5 y 5.0 ng/ml en la proporción (V + V)/2 (50 µl + 50 µl) /2. También se ensayó esta prueba agregando la muestra de suero y el estandar de 10 ng/ml en las proporciones 100/0%; 75/25%; 50/50% y 25/75% respectivamente, para determinar la correspondencia entre los valores esperados (E) y los observados (0).

La precisión, como una medida de la variación observada entre repetidas determinaciones de una misma muestra (3), fue determinada con el control que trae el kit, calculando el coeficiente de variación intraensayo e interensayo de acuerdo al método de Cekan (2).

RESULTADOS Y DISCUSION

La prueba de paralelismo es ampliamente utilizada para ensayos de especificidad. La inhibición paralela o la superposición de las curvas de las diluciones seriadas de la muestra (leche, suero, plasma o semen) con respecto a los calibradores, sugiere que el mismo elemento el cual inhibe la combinación de las soluciones estandares está presente en la serie de diluciones de la muestra (8, 12). En la figura 1, observamos el paralelismo existente entre las diluciones 1:1; 1:2; 1:8; y 1:16 de tres muestras de suero sanguíneo provenientes de tres toros diferentes, lo cual señala que el mismo elemento presente en la muestra y en los estandares, inhibió la unión de la hormona marcada al anticuerpo, demostrando una única combinación del anticuerpo y antígeno (12). (Figura 1).

La prueba de exactitud del radioinmunoanálisis se muestra en las figuras 2 y 3. En la Figura 2, se observa la regresión de los valores de testosterona esperados sobre los observados, al agregar a las muestras del suero bovino los estandares 0 a 5 ng/ml, la curva de recuperación tiene un intercepto (a) de 0,51, la pendiente (b) de 0,84 y el coeficiente de correlación (r) de 0,8893; la recuperación para distintas proporciones de la muestra y el estandar 10 ng/ml dió un intercepto (a) de 2,05, la pendiente (b) de 0,53 y el coeficiente de correlación (r) fue de 0,9245 (Figura 2). (Figura 3).

Estos resultados son satisfactorios y demuestran para los radioinmunoanálisis

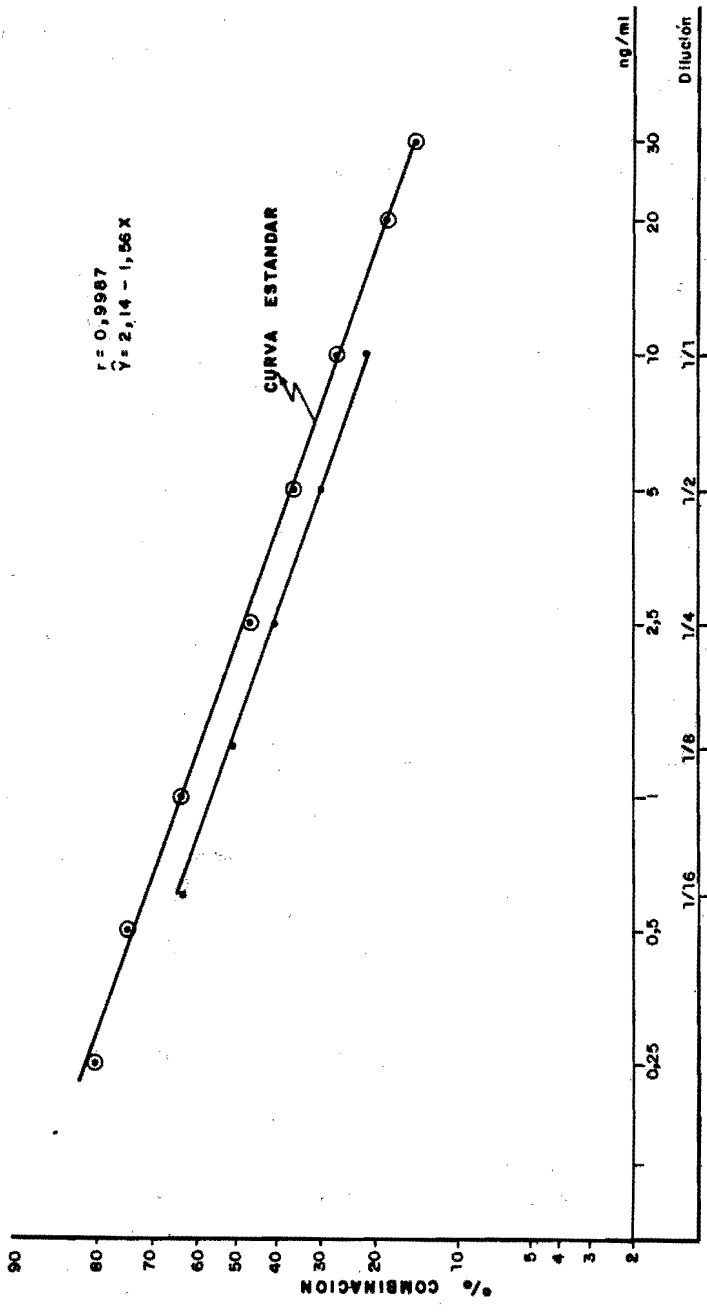

Figura 1. Inhibición de la curva (paralelismo) para las soluciones estandar y las diluciones seriada de sueros sanguíneos de tres toros en el radioinmunoanálisis para Testosterona.

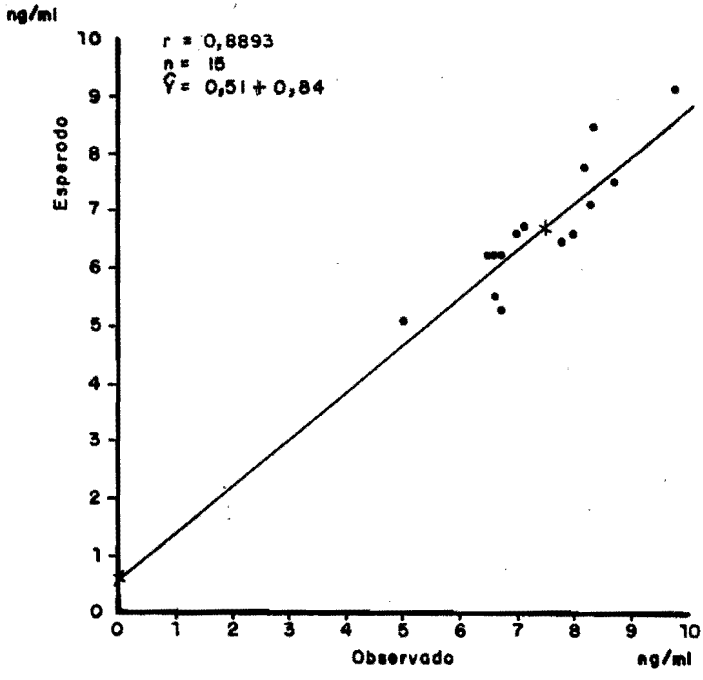

Figura 2. Prueba de Recuperación de Testosterona agregando a las muestras estandars (Oa 5ng/ml).

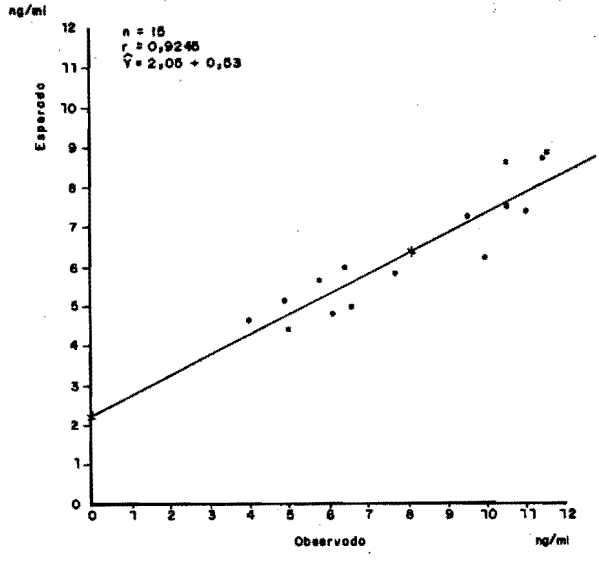

Figura 3. Prueba de Recuperación para Testosterona mezclando distintas proporciones de la muestra y estandar de 10 ng/ml.

en forma directa, la no existencia de sustancias en el suero bovino que puedan interferir la unión del antígeno con el anticuerpo, tal como ha sido reportado (2,12).

En la Figura 4a, se observaron los valores de testosterona determinado para dos toros, los cuales mostraron una media de 7,96 ± 5,25 ng/ml con un valor máximo de 14,6 ng/ml y un mínimo de 1,9 ng/ml; valores estos que se encuentran dentro de los reportado por la literatura (17); (6,14,15). (Figura 4)

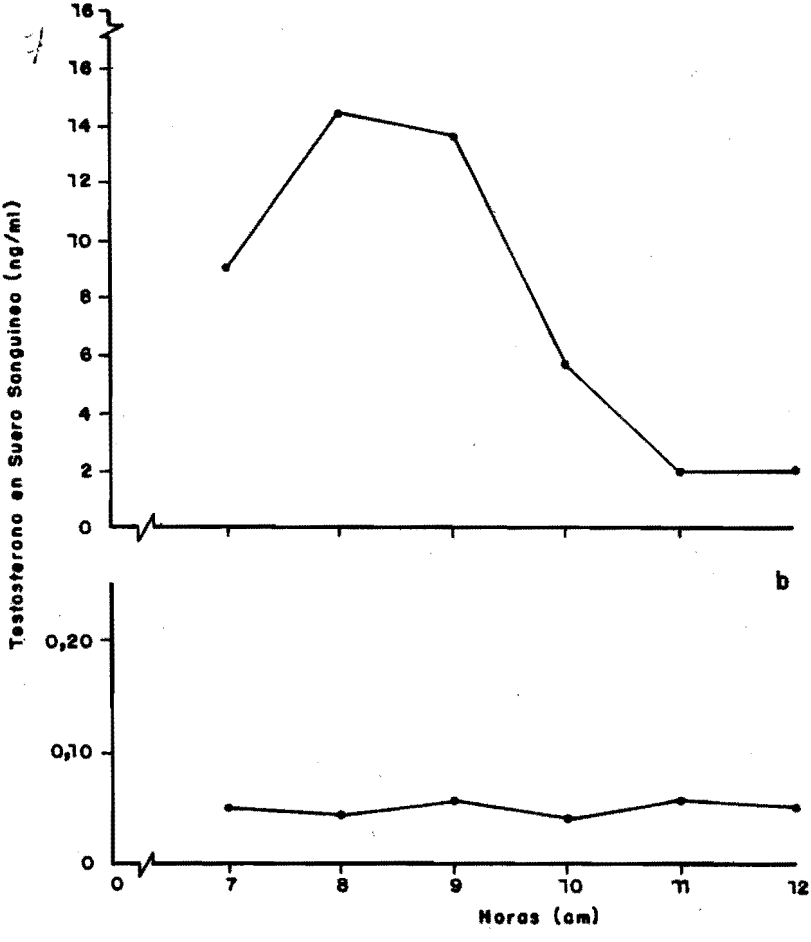

Figura 4. Niveles de Testosterona en suero sanguíneo a) Promedio de dos toros. b) Promedio de tres becerros de 6-8 meses de edad, castrados a los dos meses.

Los niveles de testosterona en becerros de 5-6 meses castrados a los 2 meses de edad, fueron inferiores a 0,1 ng/ml (indetectables) (Figura 4b), tal como era de esperarse de acuerdo a lo reportado (1,7). El coeficiente de variación de acuerdo al método de Cekan (2) fue de 3,0 el intraensayo y de 8,1 el interensayo.

Estos resultados demuestran la validación de un radioinmunoanálisis en fase líquida, ya que todas las pruebas fueron satisfactorias. El método es de fácil ejecución y puede ser usado para determinar cambios en los niveles de testosterona en el suero y/o el plasma de machos bovinos, siendo recomend ble su uso en la medicina veterinaria.

Agradecimiento

Los autores expresan su agradecimiento a Pfizer de Venezuela por el apoyo económico que hizo posible este trabajo.

REFERENCIAS

1.- *AMANN, R.P y O.A. WALKER. 1983. Changes in the pituitary gonadal axis associated with puberty in holstein bulls. J. of Anim. Sci. 57(2): 433-442.*

2.- *CEKAN, S.Z. 1976. Reliability of steroid radioinmunoassay. Doctoral thesis at Uppsala University.*

3.- *CHARD, T. 1982.* ***An Introduction to radioinmunoassay an related techniques.*** *Second Edition. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam pp284.*

4.- *EcKERSALL, P.D y M.J.A. HARVEY, M.J.A. 1987. The use of a bovine plasma progesterone ELISA kit to measure progesterone in equine, bovine and canine plasma. The Veterinary Record, 120: 5-8.*

5.- *FAHMI, A.A., N.S. WILLIAMSON, A. TIBARY and R.L. HEGSTED. 1985. The influence of some sampling handling factors on progesterone and testoterona analysis in goats. Theriogenology 24(2): 227-233.*

6.- *FOOTE, R.H., N. MUNKENBECK y W.A. GREENE. 1976. Testoterone and libido in Holstein bulls of various ages. J. of Dairy Sci. 59(11): 2.011-2.013.*

7.- *HEMEIDA, N.A., Y.R. EL-BAGHDADY y M.A. EL-FADALY. 1985. Serum profiles of andostenedione, testoterone and LH from birth throught puberty in buffalo bull calves. J. of Reproduction and Fertility. 74: 311-316.*

8.- *IAEA (International Atomic Energy Agency). 1985.* ***Laboratory Training Manual of Radioinmunoassay in Animal Reproduction.*** *Technical Reports Series No.233. IAEA. Viena.*

9.- *MATHER, E.C., P.M. CAMPER, F. VAHDAT, H.H. WHITMORE and B.G. GUSTAFFSON. 1978. Assesment of ovarian activity in the postpartum dairy cow by use of a milk progesterone assay. Theriogenology, 10 (2 y 3): 119-128.*

10.- *MILLAR K.R. and A.T. ALBYT. 1985. Evaluation of RIA kits for the measurement of thyroid hormones in sheep and cattle sera. New Zeland Veterinary J. 33: 116-117.*

11.- RAMIREZ IGLESIA, L.N. y G. FACCIO. 1987. El uso del Radioinmunoensayo (RIA) en fase líquida (CIS, SB-PROG) para la determinación directa de progesterona en la leche descremada y el suero sanguíneo de bovinos. 37o. Convención Anual de la Asociación Venezolana para el Avance de la Ciencia (ASOVAC) 22-27 de Noviembre, Maracaibo, Venezuela.

12.- REIMERS, T.J, R.G. COWAN, H.P. DAVIDSON y E.D. COLVY. 1981. Validation of radioinmunoassay for trinofothyronine, thyroxine, and hidrocortisone (cortisol) in canine, feline, and equine sera. American Journal Veterinay Reserch, 42(11): 2016-2021.

13.- REIMERS, T.J., R.G. COWAN, J.P. McCANN, M.W. ROSS. 1982. Validation of a rapid Soli-phase radioinmunoassay for canine, bovine and equine insulin. American Journal Veterinay Research, 43(7):1274-1278.

14.- SUNDBY, A. and R. TOLLMAN. 1978. Plasma Testoterone in bulls seasonal variation. Acta Veterinaria Scandinavia. 19:263-268.

15.- TAVEIRA B.R. 1987. Comportamiento sexual, biometrica testicular, aspectos do semen e niveis plasmaticos de testoterona em touros Canchim e velore. Universidades Federal de Minas Gerais. Coselho de Pos- Graduacao. Escola de Veterinaria. Belohorizonte Brasil. Tesis de Maestria.

16.- TAYLOR, R.T. and O. ROBERT. 1984. Milk progesterone levels in reproductive studies at four diary farms in Costa Rica. First Coordination Meeting "Regional Net Work for Improvent Management of Meat and Milk-Producing Livestock in Latin America, with the aid of Radioinmunoassay Technique" FAO/IAEA. 5-9 de Noviembre, Lima, Perú, Mimeo.

17.- THIBIER, M. 1976. Diurnal testosterone and 17 - hydroxyprogesterone in peripheral plasma of young post-puberty bulls. Acta Endocrinológica 81:623-634.