

EL ENSAYO INMUNOFUOROMÉTRICO (FIA) EN LA MEDICIÓN DE TESTOSTERONA EN CAPRINOS

Use of Immunofluorometric Assay to Measure Testosterone Serum Concentration in Crossbred Male Goats

Héctor E. Soto C.¹, Bernardo H. González B.¹, Gustavo López M.², Ignacio Contreras³, Ángel C. Bello B.¹ y Víctor Merchán²

¹Departamento de Biología Experimental, Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios, Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez. Municipio Salías, Edo. Miranda, Venezuela.

²Fondo Nacional de investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental "El Cuji". Edo. Lara, Venezuela.

³Sección de ovinos y caprinos, Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela.

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la concentración de testosterona, a partir del estímulo con Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) en machos caprinos mestizos, explotados bajo condiciones tropicales, mediante el ensayo inmunofluorométrico estandarizado (sistema DELFIA®), a fin de determinar si por este tipo de ensayo se alcanzan valores similares a los obtenidos por otros sistemas de determinación hormonal. Para ello, fueron estimulados con una dosis alta de GnRH (1500 µg), cuatro caprinos adultos, sometidos a asistencia y control sanitario permanentes. Se tomaron muestras de sangre cada 20 min, antes y después de la estimulación. La sangre obtenida fue centrifugada y el suero sanguíneo fue utilizado para realizar el ensayo. Los resultados indicaron un valor medio de testosterona de $7,96 \pm 3,85$ ng/mL antes de la estimulación. Después de la estimulación la concentración promedio fue de $12,92 \pm 6,2$ ng/mL. Estos resultados se asemejan a los reportados por la literatura citada lo cual indica que los valores de concentración de testosterona obtenidos por inmunofluorimetría son similares a la de otros tipos de ensayos, garantizando datos confiables a la hora de establecer un patrón de valores de testosterona sérica para los caprinos de la ganadería nacional.

Palabras clave: Inmunofluorometría (FIA), testosterona, Radioinmunoensayo (RIA), cabras, GnRH.

ABSTRACT

Testosterone concentration in crossbred male goats grown in tropical conditions was evaluated by immunofluorometric stan-

dardized assay (DELFIA® system). The goats were maintained with permanent attendance and sanitary care. Four male goats were stimulated with a high dose (1500 µg), of Gonadotropin Release Hormone (GnRH), for the determination testosterone concentration in serum. Blood samples were obtained every twenty minutes, two times before and six times after the stimulation with GnRH. The blood samples were centrifuged, serum was separated and used to carry out the immunofluorometric assay. The results indicate an average of testosterone in serum of 7.96 ± 3.85 ng/mL before the stimulation. The average of testosterone concentration in serum after the stimulation was of 12.92 ± 6.2 ng/mL. These results are similar to those reported in the references, this indicates that the immunofluorometric method shows average of the concentration, comparable to other methods, and it can guarantee reliable data when establishing the pattern of testosterone values in serum for caprines national livestock.

Key words: Immunofluorometry (FIA), testosterone, Radioimmunoassay (RIA), goats, GnRH.

INTRODUCCIÓN

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) propuso en 1970, un consumo mínimo de proteínas de 60 g/persona/día, de los cuales, al menos 10 g deberían ser de origen animal. Los países en vías de desarrollo –Venezuela entre ellos– están muy por debajo de esa cifra, debido en parte a una producción animal deficiente. Venezuela presenta una superficie aproximada de 4 millones de hectáreas de zonas áridas y semiáridas poco rentables para la cría de ganado bovino o la agricultura que podrían rentabilizar-

se con ovinos y caprinos, como alternativas que permitan aprovechar dichas zonas [13, 14]. En Venezuela sin embargo estas explotaciones aún presentan poco nivel de desarrollo. Son pocos los trabajos de investigación relacionados con las características reproductivas y endocrinas de estas especies a pesar del significativo esfuerzo hecho al respecto por Leyva-Ocariz y col. [7, 8, 9] quienes fundamentalmente han estudiado las hembras de la especie en tales regiones, motivando a realizar estudios en machos con el objetivo de establecer los patrones reproductivos de los caprinos en Venezuela.

La testosterona es uno de los esteroides fundamentales asociados al proceso de reproducción. Asegura la diferenciación sexual y el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios macho semental y regula la secreción de gonadotropinas. Se encarga de la virilización externa durante la embriogénesis, la mayor parte de la maduración sexual y la vida sexual adulta, incluyendo la iniciación y mantenimiento de la espermatogénesis. De allí la importancia de determinar cuáles son los valores de testosterona sérica libre normales y cuál es el máximo una vez que es estimulada su producción con GnRH. El 98% de la testosterona circula unida a globulina transportadora y albúmina, siendo el 2% libre la fracción biológicamente activa y disponible [5]. Los valores de referencia de esta última en los hombres adultos masculinos son 1,2-6,3 ng/mL y en la mujer adulta 0,3 ng/mL. En machos cabríos explotados en condiciones tropicales, se han reportado valores desde 0,4 ng/mL hasta 17,5 ng/mL, donde además se determinó un comportamiento estacional importante [2]. En Australia los valores reportados para machos cabríos de las razas Merino y Booroola oscilaron entre 0,27V 7,12 ng/mL [10].

En décadas pasadas, desde que en 1959 fue utilizado por primera vez para medir la insulina, el Radioinmunoensayo (RIA) permitió estudiar la dinámica endocrina en la mayoría de las especies de mamíferos y significó por lo tanto un gran avance en el conocimiento de la fisiología de la reproducción. Recientemente –gracias al alto desarrollo de la inmunología– se han introducido técnicas para medir hormonas que prescindan del uso de material radiactivo altamente contaminante, como lo son ELISA (Enzima inmunoensayo) que se basa en lecturas de actividad enzimática y el Fluoroinmunoensayo (FIA), que se basa en la capacidad de fluorescencia generada por una reacción antígeno-anticuerpo. El fundamento en ambos inmunoensayos es la competencia entre una hormona marcada y la hormona presente en un suero problema. El FIA se basa en la competencia entre testosterona marcada con europio y la proveniente de la muestra problema, por un anticuerpo anti-testosterona, donde el lector detecta el europio libre que fluoresce al formar miscelas con agentes quelantes. Dicha fluorescencia es inversamente proporcional a la concentración de testosterona presente en las muestras

Aún cuando todavía en 1986 la testosterona fue medida en cabras, utilizando la técnica del RIA [9, 18], ya para 1987 Bertoff y col. [1], compararon RIA y FIA en la determinación de

testosterona sérica en un tipo de visón (*Mustela vison*), demostrando que FIA era un método reproducible de procedimientos más sencillos, con posibilidades de procesar un mayor número de muestras en menos tiempo y sin riesgos operativos importantes. Por otra parte en 1993 Menjívar y col. [12], compararon el FIA (sistema Delfia) con RIA para medir hormonas foliculo estimulante (FSH) y luteinizante (LH). Los resultados mostraron ventajas a favor del FIA en términos de sensibilidad, especificidad, volumen de muestras procesadas, larga vida de los reactivos así como la eliminación del uso de material radiactivo. En 1995 Elliott y col., [4], determinaron la concentración de las hormonas esteroides estradiol, progesterona y testosterona en suero bovino, utilizando el *kitt-Delfia-FIA* al cual compararon con ELISA y RIA. Los métodos tuvieron una correlación alta entre ellos (r osciló entre 0,91 y 0,97 respectivamente). Por otro lado, el FIA demostró ser un método fácil, con adecuada sensibilidad para medir hormonas esteroides en rumiantes [4]. Esta técnica ha sido empleada para la medición de esteroides en bovinos en Venezuela por el grupo de trabajo que realizó la presente investigación [3, 15, 16, 18] con resultados similares a los obtenidos en esta especie por otros autores utilizando RIA.

El objetivo de este trabajo fue determinar a través de la técnica inmunofluorométrica (FIA) DELFIA, los valores séricos normales en caprinos venezolanos y los valores máximos una vez que estos animales son estimulados con GnRH.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó durante el mes de Agosto de 1999, en época lluviosa, en las instalaciones del Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Lara (CIAE-LARA) del Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias ubicadas en la parroquia catedral del municipio autónomo Iribarren, estado Lara, Venezuela. Geográficamente se encuentra a 10°9' latitud norte, 69°18' longitud oeste, con una altura de 580 m.s.n.m. Posee una extensión de 99 ha de las cuales 84 están destinadas tanto para la explotación caprina como para la ovina. Sus suelos van de franco-arcillosos a franco-arcilloso-arenoso con un drenaje moderado, poco profundo y con una capa vegetal compuesto principalmente de pasto buffel (*Cenchrus ciliaris*) y pasto estrella (*Cynodon nemfluensis*). Se encuentra en una zona de vida denominada monte espinoso premontano con una precipitación anual promedio de 546,3 mm, temperatura media anual de 32,9°C, humedad relativa media anual de 29,2%, evaporación media anual de 1981,7 mm, radiación media anual de 511,7 Langley y una velocidad del viento de 9,7 Km/h.

Un grupo de 28 caprinos puros y mestizos en diverso grado de las razas Nubian, Alpino, Canario, Canario mediterráneo y Criollo, mantenidos como reproductores del rebaño de la estación, se les evaluó la condición física, clínica y parasitológica así como calidad espermática, previo al experimento. Del

lote se seleccionaron 4 caprinos (01 Nubian, 02 Alpinos y 01 mestizo: N1368, A839, A833 y H294) de edades comprendidas entre 16 y 20 meses, en buenas condiciones de salud. Se escogieron animales con excelente calidad espermática (80-90% de motilidad individual, +++ o ++++ de motilidad masal, y < de 25% de atipias espermáticas) indicador indirecto de producción apropiada de testosterona. Todos los animales seleccionados tenían buen estado comoral.

Evaluación física, clínica y parasitológica

Los parámetros evaluados antes de la estimulación con GnRH fueron: peso corporal, circunferencia escrotal, temperatura corporal, hematocrito y parasitemia mediante la técnica de Woo [19] y frotis directo. La evaluación parasitológica fue realizada para descartarla presencia de hemoparásitos.

Evaluación hormonal

Los 4 caprinos, después del seguimiento descrito fueron estimulados por vía intravenosa con una solución acuosa que contenía la hormona liberadora de gonadotropinas GnRH cuya dosis única fue 1500 µg. Procediéndose posteriormente a tomar muestras de sangre utilizando agujas Venoject, calibre 20, estériles con fundas protectoras y tubos venoject estériles, sin anticoagulantes de 10cc, cada 20 min durante 2 h consecutivas y luego se tomaron 3 muestras cada h, hasta completar 5 en total. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 10.000 g dentro de las 2 h posteriores a la toma de la muestra para obtener suero sanguíneo que se separó y trasvasó a tubos de almacenamiento debidamente identificados. Los sueros fueron almacenados congelados a -20°C hasta el momento de determinar la testosterona. La determinación de la concentración se realizó mediante un ensayo estandarizado Inmunofluorométrico. El método es un fluoroinmunoensayo en fase sólida, basado en la competición entre tesioesterona unida a europio y testosterona de las muestras por un anticuerpo policlonal anti-

testosterona obtenido de conejo. La testosterona de los standards, del control y las muestras inhiben selectivamente la unión de la testosterona marcada con europio con el anticuerpo, quedando libres para ser disociados. El europio libre forma miscelas que fluorescen en presencia de agentes quelantes aportados por el kit de reactivos, siendo la fluorescencia inversamente proporcional a la cantidad de testosterona contenida en las muestras, la cual es medida empleando un equipo comercial para diagnóstico "in vitro" DELFIA® de Wallace Oy, Nº A050-101.

Estadística

Se empleó el método denominado "T de Student alterno", apropiado para grupos de datos con desviaciones standard diferentes, con el objeto de comparar las concentraciones de la hormona antes v después de la estimulación con GnRH. Se utilizó el programa estadístico, denominado "GraphPad Instait 1990-1994 GraphPad software.v2.05a".

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación física y parasitológica

Los resultados del chequeo previo realizado antes de la estimulación con GnRH no mostraron valores distintos a los esperados en animales en buen estado de salud. Los valores de hematocnto fueron los esperados así como los de circunferencia escrotal. Por otro lado, no se detectó la presencia de hemoparásitos por la técnica de Woo o de frotis directo y coloreado.

Evaluación hormonal

Los datos obtenidos con respecto a la concentración de testosterona producida por los animales posterior al reto con GnRH se muestran en las FIGS. 1, 2, 3 y 4, para cada capriño evaluado, y en las TABLAS I y II para todo el grupo de animales.

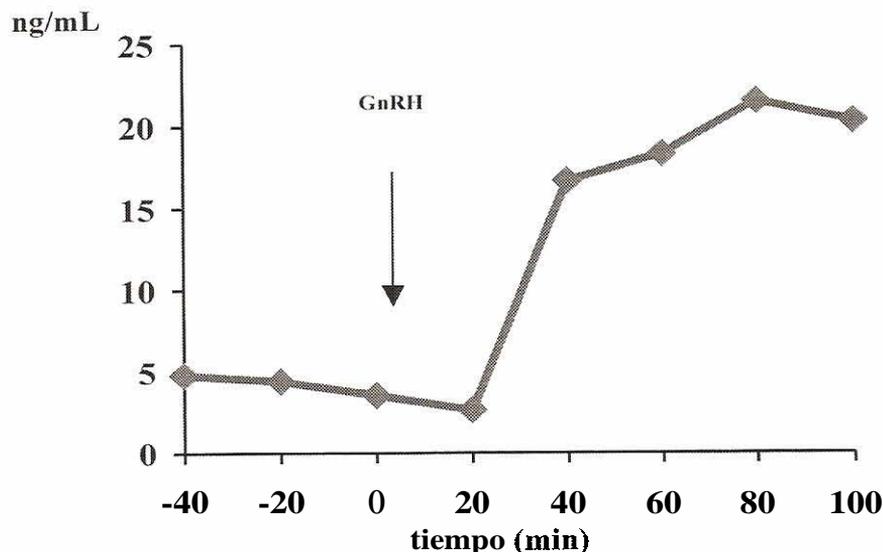


FIGURA 1. VALORES DE TESTOSTERONAPREVIO Y POSTERIOR AL RETO CON GnRH (ANIMAL N1368).

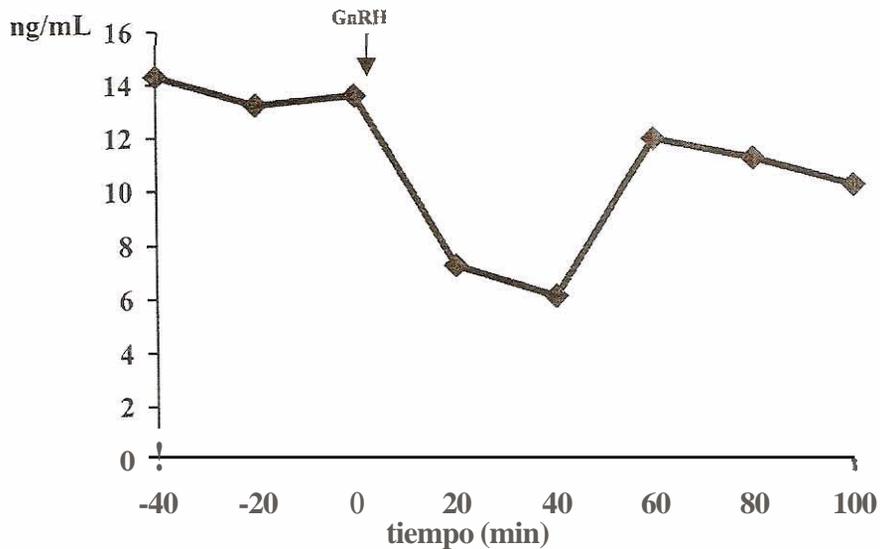


FIGURA 2. VALORES DE TESTOSTERONA PREVIO Y POSTERIOR AL RETO CON GNRH (ANIMAL A839).

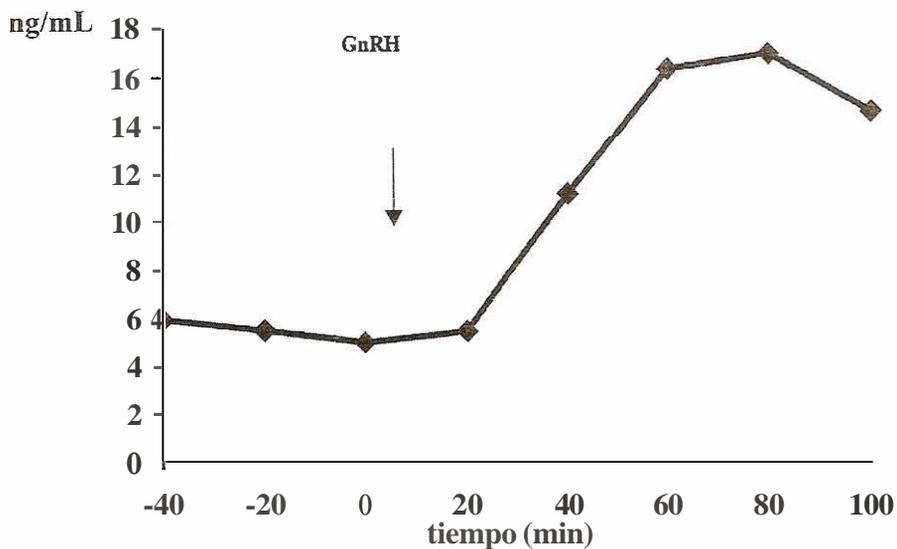


FIGURA 3. VALORES DE TESTOSTERONA PREVIO Y POSTERIOR AL RETO CON GNRH (ANIMAL H294).

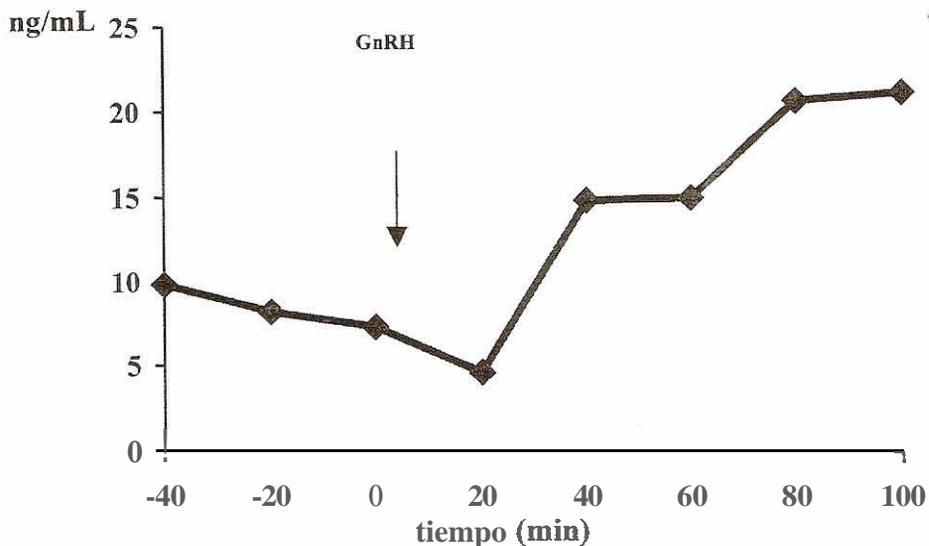


FIGURA 4. VALORES DE TESTOSTERONA PREVIO Y POSTERIOR AL RETO CON GNRH (ANIMAL A833).

TABLA I
VALORES PROMEDIO DE **CONCENTRACIÓN** DE TESTOSTERONA (**ng/mL**) OBTENIDOS PREVIO Y POSTERIOR AL RETO CON GNRH

Tiempo (min)	Animal N1368	Animal A839	Animal H294	Animal A833
-20	4,83	14,3	5,98	9,82
-40	4,41	13,22	5,5	8,18
0	3,55	13,57	5	7,31
20	2,61	7,17	5,44	4,56
40	16,64	6	4,1	14,82
60	18,27	11,82	16,29	14,94
80	21,48	11,08	16,9	20,54
100	20,27	10,03	14,53	21

En cursiva los valores pre-estimulación con GnRH coeficiente de variación intraensayo 4%).

TABLA II
RESUMEN Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS VALORES DE TESTOSTERONA (ng/mL) PREVIO Y POSTERIOR AL RETO CON GNRH

Preinyección de GnRH	Postinyección de GnRH
7,96 ± 3,85 ^a	12,92 ± 6,2 ^b
n = 12	n = 20

P = 0,0092.

Se presentaron diferencias altamente significativas (P = 0,0092) en la concentración de testosterona antes y después del estímulo con GnRH. El valor promedio de testosterona sérica fue de 12,92 ± 6,2 ng/mL dicho valor se alcanzó a un tiempo entre 60 y 80 min posterior al estímulo con GnRH. Estos resultados son similares a los valores promedio reportados por la literatura 2, 10, 11. Uno de los caprinos evaluados no presentó diferencias significativas entre los valores pre y pos estimulación (A839, FIG. 2). Los valores pre estimulación de este animal, presentaron una media de 13, 7 ng/mL, siendo este mucho más alto que el reportado por la literatura para niveles basales y para el valor basal promedio obtenido en este trabajo (7,96 ± 3,85 ng/mL). Es posible que esta alta concentración de testosterona se deba a alguna anomalía en la regulación de la adenohipófisis (alta liberación de ICSH por ejemplo), una alteración de las células de Leydig productoras de la hormona, o del funcionamiento de las adrenales. Se han documentado numerosas enfermedades que cursan con aumentos de la concentración de esta hormona, tales como: hiperplasia adrenal congénita, precocidad sexual idiopática, tumores adrenocorticales, tumores extragonadales productores de gonadotropinas, y aún el efecto de fármacos y drogas como: anticonvulsivantes, barbitúricos, clomifeno, estrógenos, gonadotropinas, bromocriptina, fenitoína entre otros [6]. De la misma manera se sabe que factores fisiológicos –no patológicos– cómo el crecimiento, la exposición al calor y el ejercicio o estrés previos a la toma de muestras pueden incrementar los resultados esperados. El alcance de esta investigación no permitió preci-

sar cual anomalía es responsable de la respuesta diferente presentada por el animal identificado con el A839.

Es importante destacar la necesidad de realizar investigaciones con un mayor número de animales, a fin de estandarizar los valores normales de Testosterona y utilizarlos como patrón para determinar si un animal bajo condiciones de explotación tropical produce o no niveles adecuados. Este trabajo permitió establecer que la inmunofluorometría (FIA) –sistema DELFIA– es apropiada como una técnica altamente confiable y segura para la determinación de los valores de testosterona en caprinos sugiriéndose la posibilidad de realizar determinaciones para otras hormonas con esta misma técnica, que ha sido comparada exitosamente con otras técnicas como el radioinmunoensayo y ELISA por otros autores [1, 4].

CONCLUSIÓN

Los valores de Testosterona en caprinos obtenidos por inmunofluorometría –sistema DELFIA– son similares a los reportados por la literatura a través del uso del RIA. En consecuencia el sistema es capaz de evaluar este esteroide, lo que resulta altamente beneficioso por la rapidez con que se obtienen los valores y por la seguridad que ofrece al operador.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BERTOFT, E.; MAENTAUSTA, O.; SUNDQVIST, C. y LUKOLA, A. Comparison between Radioimmunoassay and a new time-resolved Fluoroimmunoassay: determination of total serum Testosterone in male mink (*Mustela vison*). *Anirn. Rep. Sci.* 12: 291-295. 1987.
- [2] CHEMINEAU, P y DELGADILLO, J. Neuroendocrinología de la reproducción del caprino: Reproductive neuroendocrinology in goats. *Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia.* Vol III. 2.113-121. 1993.

- [3] DE STEFANO H., B. GONZÁLEZ, H. SOTO y S. GODOY. Efectos de *Jrypanosoma vivax* sobre la concentración de testosterona producida como respuesta a la inyección de GnRH, en un grupo de Toros Siboney. *Acta Científica Venezolana* (50): Supl. 2. 370pp. Abst. 1999
- [4] ELLIOT, C.; FRANCIS, K.; SHORTT, H y MCCAUGHEY, W. Determination of the concentrations of the steroids estradiol, progesterone and testosterone in bovine sera: comparison of commercial dissociation enhanced lanthanide fluorescence immunoassay kits with conventional radio and enzyme immunoassays. *Analyst*. 120(6):1827-30. 1995.
- [5] HAFEZ, E. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Interamericana McGraw Hill. 6ª ed. México. 543p.
- [6] HSU. W y CRUMP, M. Glándula adrenal. En: *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*. De: McDonald, L.E. y Pineda, M.H.. Interamericana McGraw-Hill. 4ta Edición. México, D.F. 195-222. 1991.
- [7] KATSILOMETES, G. y LEYVA-OCARIZ, H. 1998. Use of an enzyme immunoassay for the measurement of caprine serum LH. **Small Rum**. Res. 28: 177-182
- [8] Leyva-Ocariz, H. ; Munro, C.; Stabenfeldt, G. 1994. Serum LH, FSH, estradiol-17 and progesterone profiles of native and crossbred goats in a tropical semiarid zone of Venezuela during the estrous cycle. *Anim. Repr. Sci*. 39: 49-58
- [9] LEYVA-OCARIZ. H.; STABENFELDT, G.; MUNRO, C.; ARTEAGA, M.; ORDUZ, B. ;DIAZ, M.; y HERNÁNDEZ, I. 1993. *Endocrinología de cabras criollas ovidectomizadas y mestizas en zonas semiáridas de Venezuela*. *Revista Científica. FCV-LUZ*. Vol III (2) 157-164
- [10] MARTIN, G.; SUTHERLAND, S. y LINDSAY, D. Effects of nutritional supplements on testicular size and the secretion of LH and testosterone in Merino and Booroola rams. *Ani. Repr. Sci*. 12. 267-281. 1987.
- [11] MC DONALD y PINEDA, M.H. *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*. Interamericana McGraw-Hill. 4ta Edición. México, D.F. 466 pp. 1991.
- [12] MENJIVAR, M.; ORTIZ, G.; CÁRDENAS, M.; GARZA-FLORES, J. Comparison of the DELFIA and RIA methods for measuring luteinizing and follicle stimulating hormones in serum. **Rev. Invest. Clin. Nov-Dec**. 45(6):579-84. 1993.
- [13] REVERÓN, A. Tipos y razas de carneros. En: *Temas ovinos y caprinos*. De: Reverón, A.E. Espasandes S.R.L. Editores. 3ra edición. Maracay. Venezuela. 31-92. 1996.
- [14] REVERÓN, A. Perspectivas de la producción ovina en Venezuela. Curso sobre producción de ovinos y caprinos: Convenio FONAIIPA-CIARA. Octubre de 1998. edit por. Centro de Investigaciones Agropecuarias del estado Lara. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. 25-32. 1998.
- [15] SOTO, H.; GONZALEZ, B.; ROSSI, M.; GODOY, S. y BELLO, A. Evaluación de la actividad ovárica en bovinos mestizos explotados en condiciones tropicales. **ASOVAC. Certificado**. *Acta Científica Venezolana. ASOVAC*. Vol. 47. Supl, N° 1. (Abst). 1996.
- [16] SOTO, H.E; GONZÁLEZ, B.; ROSSI, M; GODOY, S. y BELLO, A.; Evaluación de la actividad *ovarica* en bovinos mestizos explotados en condiciones tropicales (*Bovine ovaric activity evaluation under tropical condition exploitation*). *Zoot. Trop.* .Volumen 17 (1). 1999.
- [17] SOTO, H.; GONZÁLEZ, B.; GODOY, S.; BELLO, A. y BRETaña, A. Palpación transrectal y cuantificación hormonal en la evaluación de la actividad ovárica de bovinos mestizos explotados en condiciones tropicales: (Transrectal palpation and hormonal quantification in the evaluation of the ovarian activity of crossbred cows under tropical conditions development). *Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia*. Vol X (1) 56-62. 2000.
- [18] WAINDI, E.; GOMBE. S.: ODUOR-OKELO, D. Plasma testosterone en tripanosoma congolense-infected Toggerburg gotas. **Arch. Androl.**; 17 (1):9-17. 1986.
- [19] WOO, P. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. *Can. J Zool.*, Vol. 47: 921-923. 1969.