

07669



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

4/29

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMPARACION DE DOS FUENTES BIOLÓGICAS PARA
PRODUCIR ANTICUERPOS DESTINADOS AL DESARROLLO
DE METODOS DE RADIOINMUNOANÁLISIS PARA
DETERMINAR LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE
TESTOSTERONA Y CORTISOL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN PRODUCCION ANIMAL:
REPRODUCCION

P R E S E N T A:

MVZ LUCIA ELIANA RANGEL PORTA

ASESORES: MVZ PhD LUIS ALBERTO ZARCO QUINTERO
BIOL. M. en C. GERARDO PERERA MARIN



MEXICO, D.F.

1998

262874

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DECLARACION

La realización de este trabajo fue posible gracias al apoyo económico de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se autoriza a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi esposo y a mi hijo,
con todo cariño y agradecimiento por su apoyo
y amor.

A mi familia, gracias por estar siempre
conmigo.

A la memoria de mi papá y de mi abuelita.

A mis suegros, con mucho cariño.

A mis asesores: Doctores Luis Zarco y Gerardo Perera
Por su confianza y apoyo, así como por compartir conmigo sus
conocimientos y orientarme siempre del modo que lo han hecho.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a Arantza, por tu paciencia y muy grata compañía durante todo el tiempo que implicó la realización de este trabajo.

Al Doctor Arturo Olguin, porque sin tu apoyo y confianza este trabajo no hubiera sido posible.

Al Doctor Jaime Navarro, por el tiempo que me dedicaste incondicionalmente y sin mayor interés que nuestra amistad.

A las Doctoras Susana y Clara, que siempre me han orientado y ayudado con infinita paciencia.

A la Doctora Coralie Munro, por todos sus consejos y palabras de apoyo.

Al Doctor Vicente Díaz del Instituto de Nutrición y particularmente al Doctor Roberto Chavira, quien siempre tuvo tiempo para ayudarme y explicarme todo cuanto le pedí.

A Memo, gracias por tu disposición para ayudarme.

Al Dr. Ernesto Avila, Director de la granja de aves, quien nos apoyó sin restricciones para el trabajo de campo, al personal de la granja y muy especialmente a la Dra. Marisela y al Dr. Ulises.

A Miguel Cuevas, por todo el tiempo y la ayuda que me diste.

Al personal de los departamentos de Nutrición y Microbiología e Inmunología, que de uno u otro modo ayudaron para la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado revisor de tesis Doctores:
Carlos Galina, Joel Hernández, Alfredo Sahagún, Rubén Montes y Luis Zarco, por sus valiosas opiniones, gracias.

LISTA DE CONTENIDOS:

I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISION DE LITERATURA.....	4
Testosterona.....	4
Cortisol.....	6
Obtención de anticuerpos a partir de la yema del huevo.....	8
Procedimiento para la inmunización de gallinas.....	11
Extracción y purificación de anticuerpos.....	12
Validación de anticuerpos.....	12
Estandarización de la técnica de RIA.....	13
III. MATERIAL Y METODOS.....	15
Producción de anticuerpos del suero de conejos.....	15
a) <u>Inducción de anticuerpos</u>	15
a.1 <i>Preparación del inmunógeno</i>	
a.2 <i>Esquema de inmunización</i>	
a.3 <i>Titulación de los anticuerpos</i>	
b) <u>Purificación de anticuerpos</u>	19
c) <u>Adsorción de anticuerpos anti albúmina sérica bovina (anti-BSA)</u>	20
d) <u>Caracterización fisicoquímica</u>	22
d.1 <i>Determinación de proteínas totales</i>	
d.1 <i>Electroforesis en TRIS-PAGE</i>	
e) <u>Caracterización inmunológica</u>	24
e.1 <i>Titulación del primer anticuerpo</i>	
e.2 <i>Desarrollo de la curva estándar</i>	
e.3 <i>Especificidad de los anticuerpos</i>	
f) <u>Validación del sistema</u>	26
f.1 <i>Pool de anticuerpos</i>	
f.2 <i>Titulación de los anticuerpos</i>	
f.3 <i>Desarrollo de la curva estándar</i>	
f.4 <i>Sensibilidad</i>	
f.5 <i>Determinación de la precisión del sistema</i>	
Producción de anticuerpos de la yema del huevo de gallinas.....	28
a) <u>Inducción de anticuerpos</u>	28

a.1 <i>Preparación del inmunógeno</i>	
a.2 <i>Esquema de inmunización</i>	
a.3 <i>Titulación de los anticuerpos</i>	
b) <u>Purificación de anticuerpos a partir de la yema de huevo</u>	30
b.1 <i>Deslipidización</i>	
b.2 <i>Resuspensión de la yema de huevo</i>	
b.3 <i>Precipitación con sulfato de amonio</i>	
c) <u>Adsorción de los anticuerpos anti-BSA</u>	32
IV. RESULTADOS	33
Resultados en suero de conejos	33
Resultados en la yema de huevo	49
Rendimiento de los anticuerpos	60
Análisis estadístico	61
V. DISCUSION	64
Anticuerpos anti-testosterona	64
Anticuerpos anti-cortisol	70
Discusión general	76
I. LITERATURA CITADA	79
II. APENDICE DE SOLUCIONES	87
III. LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	92

RESUMEN:

RANGEL PORTA LUCIA ELIANA. Comparación de dos fuentes biológicas para producir anticuerpos destinados al desarrollo de métodos de radioinmunoanálisis para determinar los niveles plasmáticos de testosterona y cortisol. Asesores: PhD Luis Alberto Zarco Quintero y M. en C. Gerardo Perera Marín.

En el presente trabajo se comparó el suero de conejos inmunizados contra la yema de huevo de gallinas inmunizadas como fuentes para la obtención de anticuerpos destinados a la determinación de testosterona y cortisol por medio de radioinmunoanálisis (RIA) de fase líquida. Los anticuerpos contra testosterona obtenidos del suero de conejos mostraron especificidad, siendo la reacción cruzada del 12.7% con dihidrotestosterona y 1.05% con androstenediona, estradiol y 17-hidroxiprogesterona. La sensibilidad al 90% de unión fue de 39.6pg/ml. El rendimiento final del anticuerpo fue de 1260.83mg de proteína, que sirven para analizar 1.6×10^6 tubos.

Por otra parte, se encontró que la yema de huevo de gallinas inmunizadas no es una adecuada fuente de anticuerpos anti-testosterona, ya que dichos anticuerpos no pueden pasar a la yema, posiblemente al ser atraídos por la testosterona presente en los folículos ováricos, además de que al inmunizar contra testosterona se inhibe la postura de las gallinas.

En segundo lugar se obtuvieron y purificaron anticuerpos anti-cortisol en el suero de conejos y en la yema del huevo, con los cuales se desarrolló la prueba de RIA de fase líquida, encontrándose que los conejos alcanzaron un título superior al de las gallinas (37.6% en promedio en una dilución de trabajo de 1:4000 vs 39.4% en promedio durante el periodo de colección del huevo en una dilución de trabajo de 1:1000). En ambos casos los anticuerpos mostraron tener alta especificidad para el cortisol respecto a otros esteroides (reacciones cruzadas menores al 0.1% con androstenediona, estradiol, 17-hidroxiprogesterona y testosterona) y una sensibilidad de 339pg/ml.

En cuanto al rendimiento final del RIA de cortisol, éste resultó mayor en los anticuerpos producidos en conejo que en los de la yema del huevo (1501.2mg que sirven para procesar 4.8×10^5 tubos vs 1578.2mg para 2.5×10^5 tubos). La precisión del RIA desarrollado con los anticuerpos de la yema del huevo se encontró dentro de los parámetros establecidos (C.V. interensayo máximo de 15%), no así la del RIA desarrollado con los anticuerpos del suero de conejo. Los anticuerpos generados en el suero mostraron tener mayor avidéz por el antígeno que los producidos en la yema de huevo, ya que detectan menores cantidades que estos últimos. El porcentaje de recuperación fue mayor en el caso de los anticuerpos de la yema del huevo que con los anticuerpos del suero de conejos (122.2% vs 92.6% con un estándar bajo).

Se concluye que la yema de huevo es una efectiva fuente de anticuerpos anti-cortisol y que puede ser utilizada como una alternativa al suero de conejos. lo cual no es valido en el caso de la testosterona.

COMPARACION DE DOS FUENTES BIOLÓGICAS PARA PRODUCIR ANTICUERPOS DESTINADOS AL DESARROLLO DE MÉTODOS DE RADIOINMUNOANÁLISIS PARA DETERMINAR LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA Y CORTISOL

I. INTRODUCCION:

Hoy en día el estudio de la actividad reproductiva de los animales domésticos es de gran importancia; para conseguir ésto se han desarrollado diversas técnicas analíticas con la finalidad de medir los niveles hormonales en diferentes condiciones fisiológicas. Uno de los métodos comúnmente utilizado es el radioinmunoanálisis (RIA).

El radioinmunoanálisis es una metodología utilizada para cuantificar sustancias de importancia biológica. La técnica se basa en el principio del reconocimiento de una sustancia de interés por su correspondiente anticuerpo altamente específico y fue inicialmente desarrollada por Yalow y Berson en 1960 para la cuantificación de la insulina humana. La metodología del RIA presenta una serie de ventajas, como la alta sensibilidad, reproducibilidad y precisión en la determinación inmunológica, lo que le ha permitido ser universalmente reconocida como un sistema cuantitativo en fluidos biológicos.

Los requisitos indispensables para el desarrollo del RIA son: a) contar con una sustancia a medir (muestra problema), b) tener anticuerpos específicos con alta afinidad para la hormona en estudio, c) tener moléculas altamente purificadas que se utilizarán como sustancia de referencia (hormona fría o

estándar) y d) contar con la misma sustancia a medir marcada radiactivamente (trazador u hormona marcada) (Libertun, 1980).

Para el desarrollo del radioinmunoanálisis es fundamental la obtención de anticuerpos específicos y con alta afinidad por la hormona a analizar. Estos anticuerpos pueden ser producidos a partir de la inmunización de una diversidad de especies (rata, cobayo, borrego, cabra, caballo, conejo, entre otros), siendo el modelo del conejo el más utilizado (Abraham y Garza, 1977).

Aunque casi siempre los anticuerpos utilizados para el RIA provienen del suero de animales inmunizados, existen algunos trabajos en donde se ha utilizado la yema de huevo de gallinas inmunizadas como fuente para la obtención de anticuerpos, siendo el trabajo de Patterson *et al.* en 1962 el pionero en esta área.

La yema de huevo ha demostrado ser una fuente de anticuerpos práctica, económica y con alto rendimiento (Montes *et al.*, 1994; Svendsen *et al.*, 1996). El Comité de Procedimientos en Animales de Inglaterra idió en 1991 que la cantidad de anticuerpo purificado de la yema de huevo de una gallina ponedora puede ser diez veces mayor que la obtenida del suero de un conejo en un periodo similar (Svendsen *et al.*, 1995). Por otro lado la Dirección de la Comunidad Europea, en su comunicado 86/609, artículo 7, indicó que las aves tienen un estatus filogenético inferior al de los mamíferos y es por ello que es preferible usar aves en lugar de mamíferos para la producción de anticuerpos destinados al análisis de muestras de mamíferos (Russel, 1992 citado por Svendsen *et al.*, 1995).

Schade *et al.* en 1991, realizaron una revisión sobre la producción de anticuerpos policlonales en la yema de huevo, en donde se observa que a partir de los años ochentas se ha retomado este modelo para la obtención de anticuerpos contra antígenos tales como virus, bacterias, parásitos y algunas proteínas y péptidos. También se ha utilizado para producir anticuerpos contra prostaglandinas (Fertel *et al.*, 1981).

Montes *et al.* (1994) desarrollaron un radioinmunoanálisis para progesterona con anticuerpos obtenidos y purificados a partir de la yema de huevo de gallinas inmunizadas; siendo este el único trabajo hasta la fecha en el que se han producido anticuerpos contra alguna hormona esteroide a partir de la yema de huevo. En dicho trabajo se demostró que la yema de huevo es una fuente de alto rendimiento para la producción de anticuerpos de buena calidad destinados al desarrollo de métodos de radioinmunoanálisis de hormonas esteroides.

Sin embargo, existen otras hormonas esteroides de interés para las cuales nunca se ha intentado producir anticuerpos a partir de la yema de huevo. Dos de estas hormonas son la testosterona y el cortisol.

El objetivo del presente trabajo es evaluar la producción y obtención de anticuerpos contra testosterona y cortisol a partir de yema de huevo de gallina, comparando su eficiencia contra la del método tradicional de obtención a partir del suero de conejos. Además, se desarrollaron métodos de RIA con cada uno de los anticuerpos obtenidos, comparándose la sensibilidad, especificidad, precisión y exactitud de los métodos, así como el rendimiento de los anticuerpos obtenidos a partir de cada modelo animal.

II. REVISION DE LITERATURA:

Testosterona:

La testosterona es una hormona esteroide del grupo de los andrógenos u hormonas masculinas. Es el más importante andrógeno testicular, siendo su principal sitio de producción las células intersticiales o de Leydig, aunque hay una pequeña producción en la corteza suprarrenal y en los equinos se ha encontrado cierta producción en el conducto del epidídimo (Morrow, 1986; Hafez, 1987).

La testosterona estimula las últimas etapas de la espermatogénesis, prolonga la vida del espermatozoide en el epidídimo, promueve el crecimiento, desarrollo y actividad secretora de los órganos sexuales accesorios (próstata, vesículas seminales, glándulas bulbouretrales, conducto deferente), así como la diferenciación y desarrollo de los genitales externos (pene y escroto); también es requerida para el mantenimiento de las características sexuales secundarias y del comportamiento sexual (Zarrow *et al.*, 1964; Hafez, 1987).

Se ha demostrado que la testosterona posee gran actividad anabólica de proteínas y que interviene indirectamente en la síntesis enzimática gracias a que provoca la retención de nitrógeno (Zarrow *et al.*, 1964).

La producción de testosterona es autorregulada; cuando hay gran cantidad de la hormona se ejerce la retroalimentación negativa sobre la secreción de gonadotropinas a nivel hipotálamo-hipófisis, aumentando la secreción de gonadotropinas cuando hay poca producción de testosterona (Bolander, 1989).

Los machos de las especies domésticas estacionales, como la ovina y la caprina, son capaces de producir espermatozoides durante todo el año; sin embargo, la calidad del semen es menor durante la época de anestro (cuando la cantidad de horas luz es mayor), lo cual coincide con una baja producción de testosterona. Es por ello que medir los niveles circulantes de testosterona ayuda a determinar el mejor momento para obtener semen y con ello asegurar una mayor fertilidad en los rebaños (Lincoln y Short, 1980).

Por otro lado, las determinaciones de testosterona también son útiles para detectar el inicio de la pubertad en los machos y para el diagnóstico de algunos problemas asociados a la reproducción, como la baja libido (Hafez, 1987).

En las hembras se produce cierta cantidad de testosterona a partir de las células de la teca interna del folículo. Posteriormente, en las células de la granulosa la testosterona es convertida a estradiol. La testosterona también tiene funciones en la hembra, ya que se encuentra presente en el líquido folicular y su relación con los estrógenos proporciona una referencia de la integridad fisiológica y la viabilidad del folículo. Su concentración es mayor que la de estradiol en folículos atrésicos, así como en los folículos pequeños de las ovejas (Hafez, 1987).

En diversas especies se han medido los niveles de testosterona con diferentes propósitos, usando el radioinmunoanálisis como método diagnóstico, con sensibilidades que van desde 25pg/ml (Holycak *et al.*, 1994) hasta 0.1ng/ml (Ronayne *et al.*, 1993; McDonnell y Watson, 1993; Thompson *et al.*, 1994;

Monder *et al.*, 1994; Stumpf *et al.*, 1993; Pérez y Mateos, 1994). En todos los casos la fuente de anticuerpos fue el suero de conejos inmunizados.

En el cuadro 1 se muestran las concentraciones promedio de testosterona comúnmente encontradas en machos de diferentes especies.

Cuadro 1: Niveles de testosterona (ng/ml) en sangre sistémica.

ESPECIE	Testosterona (media \pm error estándar)
VERRACO	4.0 \pm 0.5
TORO	6.7 \pm 0.2
GARAÑÓN	2.1 \pm 0.1
CARNERO	5.2 \pm 0.6
MACHO CABRIO	6.2 \pm 0.7
PERRO	2.2 \pm 0.7
GATO	6.3 \pm 0.3

Tomado de: Pineda, M.H.: Reproducción del Macho. En McDonald 1989.

Cortisol:

El cortisol es una hormona esteroide perteneciente al grupo de los glucocorticosteroides, es secretada en la corteza adrenal por la estimulación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) e interviene en el catabolismo de las grasas y proteínas, así como en la gluconeogénesis, aumentando la deposición de glucógeno hepático (Zarrow *et al.*, 1964). En el sistema inmune ocasiona linfopenia y eosinopenia (Pineda, 1989). Esta hormona es muy importante para lograr la adaptación del organismo al medio ambiente, ya que interviene en los procesos metabólicos básicos (Zarrow *et al.*, 1964).

La síntesis de cortisol está autorregulada, es decir que la misma hormona ejerce un control negativo para su producción, además, su secreción está fuertemente influenciada por los ritmos circadianos, lográndose su mayor producción durante los periodos de sueño (Bolander, 1989).

Desde el punto de vista reproductivo la importancia del cortisol radica en su liberación por parte del feto para desencadenar el parto, induciendo la actividad de las enzimas placentarias responsables de la transformación de progesterona en estrógenos, lo que provoca una caída en los niveles de progesterona y un incremento en los de estrógenos, ocasionando con ello la liberación de prostaglandinas para iniciar la labor de parto. Por otro lado, la producción excesiva de cortisol interviene en el aborto por estrés de los caprinos, el cual se debe a una hipersecreción adrenal, problema que se reporta como la causa de hasta un 5% de los abortos en cabras (Morrow, 1986).

También se produce cortisol durante el amamantamiento, el ordeño y en situaciones de estrés (Hafez, 1987), se piensa que el cortisol puede tener efectos inhibitorios de la reproducción en animales lactantes y/o estresados (Echternkamp, 1984; Wan *et al.*, 1994).

En la gran mayoría de los estudios en los que se han determinado las concentraciones plasmáticas de cortisol en animales domésticos (Moberg, 1975, 1991; Echternkamp, 1984; Wan *et al.*, 1994; Méndez, 1995) se ha empleado la técnica de radioinmunoanálisis y los anticuerpos utilizados han provenido del suero de conejos inmunizados.

En el cuadro 2 se muestran las concentraciones de cortisol comúnmente encontradas en diferentes especies y estados fisiológicos.

Cuadro 2: Concentraciones plasmáticas de cortisol (ng/ml)

ESPECIE	RANGO	PROMEDIO
PERRO	<3.0-77.5	19.4
GATO	<3.0-82.8	17.0
OVEJA		
GESTANTE		6.0
NO GESTANTE		7.0
CABRA	8.0-19.0	12.0
VACAS		
AMAMANTANDO		9.4
NO LACTANDO		4.5
GESTANTE		26.0
YEGUA		13.7
CERDO		8.1

Tomado de: Hsu, W.H. y Crump, M.H.: Glándula Adrenal. En McDonald 1989.

Obtención de anticuerpos a partir de la yema de huevo:

Los anticuerpos obtenidos de la yema del huevo son proteínas de bajo peso molecular (aproximadamente 64,000 daltons) y se han denominado como anticuerpos IgY (Leslie y Clem, 1969). Las IgY's son diferentes a las inmunoglobulinas descritas en mamíferos, ya que presentan diferencias fisicoquímicas y estructurales en la cadena H de la proteína (Leslie y Clem, 1969). Por otro lado, Ambrosius y Hadge (1987), encontraron cierta reacción cruzada con las IgA's de mamíferos y concluyeron que la IgY de las aves es un homólogo de las IgA de mamíferos, siendo ambos anticuerpos de tipo secretor.

La yema de huevo concentra una gran cantidad de anticuerpos mediante los cuales la madre transfiere inmunidad al embrión. Las IgY constituyen el único tipo de inmunoglobulina presente en cantidades significativas en la yema

del huevo (Rose *et al.*, 1974). Así, se ha informado que la concentración de IgY en la yema va desde 7.9mg/ml (Kowalczyk *et al.*, 1985) hasta 25mg/ml (Rose *et al.*, 1974).

La transferencia de las IgY del suero materno al ovocito ocurre a través del epitelio folicular del ovario. Durante la maduración del ovocito dicho epitelio prolifera y se adelgaza, lo que permite que el transporte de inmunoglobulinas se acelere (Romanoff y Romanoff, 1949; Patterson *et al.*, 1962b; Rose y Orlans, 1981). Patterson *et al.* (1962) describieron que el máximo transporte de inmunoglobulinas ocurre en óvulos pequeños, ya que cuando el óvulo alcanza su última fase de crecimiento se forma la membrana vitelina, con lo que disminuye el transporte de inmunoglobulinas al óvulo (Romanoff y Romanoff, 1949).

La presencia de títulos de anticuerpos específicos en la yema del huevo se observa en los huevos que son puestos 5 a 7 días después de elevarse los títulos en el suero. Esto se debe a que la transferencia de los anticuerpos ocurre en el ovario cuando el ovocito aún tiene un tamaño menor a 0.6cm, momento en el que aún le faltan 5 a 7 días para ovular (Patterson *et al.*, 1962, Patterson *et al.*, 1962b).

Es difícil obtener anticuerpos altamente específicos contra proteínas altamente conservadas de un mamífero a partir de otro mamífero; por lo tanto y gracias a la lejanía filogenética de las aves, estas resultan ser una buena opción (Gassmann *et al.*, 1990). Además, la cantidad de antígeno necesaria para obtener una respuesta inmune es mucho menor que la requerida en conejos y el trabajar con pollos resulta barato y fácil.

Los anticuerpos IgY resultan adecuados para ensayos inmunológicos, ya que disminuyen la proporción de falsos positivos al no interactuar con las IgG de mamíferos y con el factor reumatoide (Larsson y Sjöquist, 1988), o con los receptores de fijación del complemento de los mamíferos (Benson *et al.*, 1961).

Por otra parte, la respuesta inmune en las aves resulta más homogénea debido a que los pollitos se obtienen de cruza entre líneas, lo cual no sucede cuando la producción de anticuerpos se realiza en conejos (Harboe e Inguild, 1973).

Otra ventaja es que la colección del huevo no representa un procedimiento agresivo como el sangrado de los mamíferos para obtener los anticuerpos. En este punto se ha comprobado que la técnica de sangrado para obtener los anticuerpos en especies pequeñas produce un severo dolor crónico y estrés (Amyx, 1987; Broderson, 1989). Por último, los anticuerpos de gallinas son resistentes al ácido y al calor, por lo que pueden ser administrados en forma oral (Gassmann *et al.*, 1990).

Las técnicas de purificación de anticuerpos rutinarias en IgG de conejo, utilizando la proteína A del *Staphylococcus aureus* y la proteína G del *Streptococcus spp.* (Akerström *et al.*, 1985) no son útiles para la purificación de la IgY, debido a que ésta no interactúa con dichas proteínas. Sin embargo, la purificación de anticuerpos IgY es simple y rápida y se obtiene una pureza del 90% con la precipitación con polietilenglicol (PEG).

Procedimiento para la inmunización de gallinas:

Durante la revisión bibliográfica no se encontró ninguna referencia donde se utilizara la yema de huevo como fuente biológica para obtener anticuerpos contra testosterona y cortisol.

Debido a que el peso molecular de los esteroides es demasiado pequeño, entre 300 y 400 daltons (Grant y Reastall, 1983), es necesario conjugarlos con una proteína de mayor tamaño con el propósito de que el sistema inmunológico lo reconozca (Naegele y Drahovsky, 1980). Una vez conjugada la molécula pequeña con la proteína acarreadora se le denomina hapteno-acarreador o inmunógeno (Tizard, 1989). El inmunógeno puede prepararse mediante la conjugación del esteroide de interés con albúmina sérica bovina (BSA), a través de un enlace hemisuccinato (James, 1980).

Se han utilizado una gran variedad de adyuvantes para inducir la respuesta inmune en varias especies animales, siendo el adyuvante completo de Freund el que mejores resultados ha producido al inmunizar gallinas (Svendsen *et al.*, 1996). Inmediatamente antes de ser inyectado el conjugado se emulsifica con el adyuvante completo de Freund, para favorecer su liberación paulatina en el organismo (Vanselow, 1987).

En las gallinas el adyuvante completo de Freund tiene la ventaja de que su inoculación es tolerada y no produce reacción inflamatoria local, como se observa en conejos (Gassmann *et al.*, 1990). Esta observación fue confirmado por el estudio realizado por Ermeling *et al.* en 1992.

El uso del adyuvante completo de Freund produce títulos de anticuerpos muy altos y duraderos en la yema del huevo, los que se evalúan a partir de los 16 días después de la primera inoculación (Gassmann *et al.*, 1990).

Extracción y purificación de anticuerpos:

Existe una gran variedad de métodos de purificación de anticuerpos; entre los que se encuentran las precipitaciones con sulfato de amonio (Garvey *et al.*, 1977), precipitación con polietilenglicol (Ermeling *et al.*, 1992; Svendsen *et al.*, 1995); precipitación con ácido caprílico (Svendsen *et al.*, 1995), 2-propanol-acetona (Schade *et al.*, 1991) y como paso final de purificación se utilizan intercambiadores aniónicos como la Dietiletilamino etilcelulosa (DEAE-celulosa), (Gassmann *et al.*, 1990) o el DEAE-Sephacel (Otani *et al.*, 1991).

Los pasos de extracción y purificación de las gammaglobulinas de diferentes especies son monitoreados rutinariamente por una electroforesis en tubo de geles de poliacrilamida al 7% en condiciones no desnaturizantes (TRIS-PAGE) (Cooper, 1977, Schade *et al.*, 1991), sin embargo otros reportes informan la utilización de la electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) en geles al 12% (Svendsen *et al.*, 1995).

Validación de anticuerpos:

Los anticuerpos purificados se pueden someter a una gran variedad de pruebas para conocer la concentración adecuada para la utilización en sistemas de radioinmunoanálisis y/o ELISA. Por ejemplo, la utilización de inmunotransferencia o inmunoelectroforesis utilizando geles de poliacrilamida

al 12.5% (Akerström *et al.*, 1985; Gassmann *et al.*, 1990, Svendsen *et al.*, 1995), inmunodifusión radial (Schade *et al.*, 1991) y la titulación del anticuerpo utilizando diferentes concentraciones de anticuerpo con antígeno constante (Montes *et al.*, 1994; Svendsen *et al.*, 1996). La concentración de proteína total presente en la muestra final de anticuerpo se determina por diversas técnicas, por ejemplo el método de Bradford (Gassmann, *et al.*, 1990), espectrofotometría a 280nm (Schade *et al.*, 1991), el método de Lowry (Munro y Stabenfeldt, 1984; Otani *et al.*, 1991) y el método de BCA (ácido bisicónico) (Ermeling *et al.*, 1992) entre otros.

Estandarización de la técnica de RIA:

Una vez conocidas las concentraciones óptimas de anticuerpo y de trazador, para cada fuente de anticuerpos se desarrolla la curva estándar, evaluando los siguientes parámetros: sensibilidad, especificidad, exactitud y precisión.

La sensibilidad se define como la cantidad mínima detectada en el sistema al 90% de la unión máxima (B_0), extrapolada por la pendiente de la curva estándar. Se expresa como la concentración en ng/ml, pg/ml, fmol/ml, etc. Este parámetro se encuentra en función de la afinidad del anticuerpo (es decir a menor afinidad menor sensibilidad), la masa del trazador, el volumen de incubación, así como la actividad específica del trazador (a menor actividad específica menor sensibilidad) (Bosch *et al.*, 1980).

La especificidad es el grado en que un ensayo responde a sustancias para las que no fue diseñado, pero químicamente similares a las sustancias de interés y se expresa como porcentaje de reacción cruzada en el sistema.

La exactitud es definida como la mayor proximidad con la que un método analítico se aproxima al verdadero valor de la muestra cuantificada y se determina a través de medir la concentración antes y después de añadir concentraciones conocidas de la sustancia a investigar, los valores son expresados en porcentaje de recuperación (Libertun, 1980).

La precisión es la característica que determina la variabilidad de la estimación de las concentraciones de la muestra problema. Para evaluarla se determinan los coeficientes de variación interensayo e intraensayo, en valores conocidos de la curva estándar (20%, 50% y 80%); idealmente debe medirse en controles de calidad bajos, medios y altos de una muestra conocida (Bosch *et al.*, 1980).

En la gran mayoría de los trabajos revisados donde se compara el uso de anticuerpos producidos en la yema del huevo con los del suero de conejo, la prueba diagnóstica utilizada fue la de ELISA, sin embargo Bauwens *et al.* en 1988 y Montes *et al.* en 1994 tuvieron éxito al compararlos en la prueba de radioinmunoanálisis.

III. MATERIAL Y METODOS:

El trabajo de campo se realizó en el Bioterio del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), localizado en la Calle Díaz Mirón sin número, Colonia Zapotitlán, Delegación Tláhuac, en México, D.F. El CEIEPA se ubica geográficamente a 19°18' Latitud Norte y 99°2'3" Longitud Oeste del Meridiano de Greenwich, con una altura sobre el nivel del mar de 2242m y una presión de 558mm de Hg. La temperatura promedio anual es de 15°C, siendo el clima de tipo templado subhúmedo con lluvias en verano, C(w2)(w)b(i') (García, 1981).

El trabajo de laboratorio se desarrolló en el Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Reproducción de la FMVZ de la UNAM, en Ciudad Universitaria.

Producción de anticuerpos del suero de conejo:

a) Inducción de anticuerpos: En este trabajo se utilizó para la inmunización de los conejos el método recomendado por Vaitukaitis *et al.* en 1971 y modificado por Munro y Stabenfeldt en 1984.

Con el propósito de inducir anticuerpos anti-testosterona y anti-cortisol, se inmunizaron para cada hormona 5 conejos hembras de 8 semanas de edad de la raza Nueva Zelanda, con un peso promedio de 1.5Kg. Los animales utilizados para testosterona se identificaron con números del 1 al 5 y los utilizados para

cortisol se identificaron con letras de la A a la E; colocando a cada animal en jaulas independientes.

a.1 Preparación del inmunógeno: Los esteroides utilizados para la inducción de los anticuerpos fueron testosterona 3-(0-carboximetil) oxima-BSA, e hidrocortisona 3-(0-carboximetil) oxima-BSA, ambos de Sigma-Chemical. Durante el proceso de inmunización se utilizó el adyuvante completo de Freund (Sigma). Cada esteroide (1mg) se disolvió en 0.5ml de solución salina fisiológica (SSF) y 0.5ml del adyuvante completo, la mezcla se realizó con agitación constante durante 4 minutos en frío. La inoculación se realizó por vía subcutánea, distribuida en cinco puntos (0.2ml por sitio) de la región dorsal, aplicando en total 1 mg del esteroide por animal en cada inmunización.

a.2 Esquema de Inmunización: El calendario de inmunización se muestra en el cuadro 3. En todos los conejos se siguió el mismo calendario. El sangrado en blanco se realizó en el momento que cada animal presentó títulos máximos de anticuerpos.

Cuadro 3: Esquema de inmunización de los conejos.

Día	Fecha	Actividades
1	17/02/97	1ª. Inoculación y sangrado para titulación de anticuerpos.
14	3/03/97	2ª. Inoculación.
28	17/03/97	3ª. Inoculación.
56	14/04/97	Sangrado para titulación de anticuerpos.
63	21/04/97	4ª. Inoculación y sangrado para titulación de anticuerpos.
70	28/04/97	5ª. Inoculación y sangrado para titulación de anticuerpos.
77	5/05/97	Sangrado para titulación de anticuerpos.
84	12/05/97	Sangrado para titulación de anticuerpos.
91	19/05/97	Sangrado para titulación de anticuerpos.
98	26/05/97	6ª. Inoculación y sangrado para titulación de anticuerpos.
105	2/06/97	Sangrado para titulación de anticuerpos.
109	6/06/97	Sangrado en blanco (conejas 1, 2, 4 y E).
112	9/06/97	7ª. Inoculación y sangrado para titulación de anticuerpos.
119	16/06/97	Sangrado para titulación de anticuerpos.
123	20/06/97	Sangrado en blanco (conejas 3, 5, A, C y D).

NOTA: El suero obtenido de los conejos A, C y D se mezcló en un pool que se denominó Cortisol, el resto de los sueros se denominaron según la identificación original de los animales a los que correspondían (1, 2, 3, 4, 5 y E).

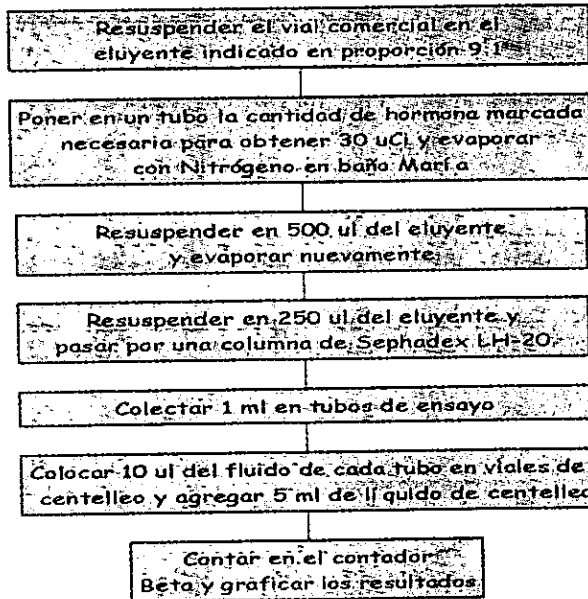
a.3 Titulación de los anticuerpos: Con la finalidad de cuantificar los niveles plasmáticos de los anticuerpos anti-testosterona y anti-cortisol generados en cada animal, cada semana se tomaron 4ml de sangre de la vena marginal de la oreja. Las muestras colectadas se centrifugaron a 3000rpm durante 15min y los sueros obtenidos de cada muestra se congelaron a -4°C hasta su titulación por el método de RIA de fase líquida, de acuerdo a lo recomendado por la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA, 1984).

Para la titulación se utilizaron las hormonas [1,2,6,7- ^3H] testosterona y [1,2,6,7- ^3H] cortisol (Amersham) con una actividad específica de 101.0Ci/mmol y de 63.0Ci/mmol respectivamente, las que se purificaron independientemente en una columna de vidrio (0.75 x 28cms), empacada previamente con LH-20 con un flujo de 30ml/hr. Las columnas se eluyeron con 100ml de tolueno:metanol

(85:15) en el caso de testosterona y para cortisol se utilizó como eluyente el benceno:metanol (85:15).

Una vez equilibrada la columna se procedió a realizar la metodología del esquema 1.

Esquema 1: Metodología para la purificación de la hormona tritiadaa.



Una vez purificada la hormona se desarrolló la prueba de inmunorreactividad, es decir el reconocimiento de la hormona tritiada por su correspondiente anticuerpo, utilizando un procedimiento en fase líquida, con un tiempo de incubación de 24hrs a 4°C. Para ello, se diluyó el suero a evaluar en PBS-G 0.05M, a un pH de 7.4, obteniéndose diluciones seriadas desde 1:1 hasta 1:500. Cuando se obtuvieron uniones máximas del 30% o mayores en la dilución 1:500 se procedió a realizar más diluciones, desde 1:500 hasta 1:4000.

En el siguiente esquema se muestra el procedimiento seguido en cada caso.

Cuadro 4: Metodología para la titulación de los anticuerpos.

No. de tubo	Identificación	PBS-G μ l	Anticuerpo μ l*	Hormona Tritiada μ l		Carbón-dextran μ l	Incubar a 4°C durante 30 min
1-2	C.T.	800	-----	100	Agitar 5	-----	min
3-4	UNE	600	-----	100	segundos	200	y centrifugar
5-6	1:1	500	100	100	en vortex	200	a 4°C, a 1500
7-8	1:10	500	100	100	e incubar	200	xg
9-10	1:100	500	100	100	a 4°C	200	durante 15
11-12	1:250	500	100	100	durante	200	min.
13-14	1:500	500	100	100	24	200	Decantar en
15-16	1:1000	500	100	100	horas	200	viales con 5 ml
17-18	1:2000	500	100	100		200	de líquido de
19-20	1:4000	500	100	100		200	centelleo

C.T.= cuentas totales; UNE= unión no específica; 1:1-1:4000 dilución del suero: xg= gravedades.

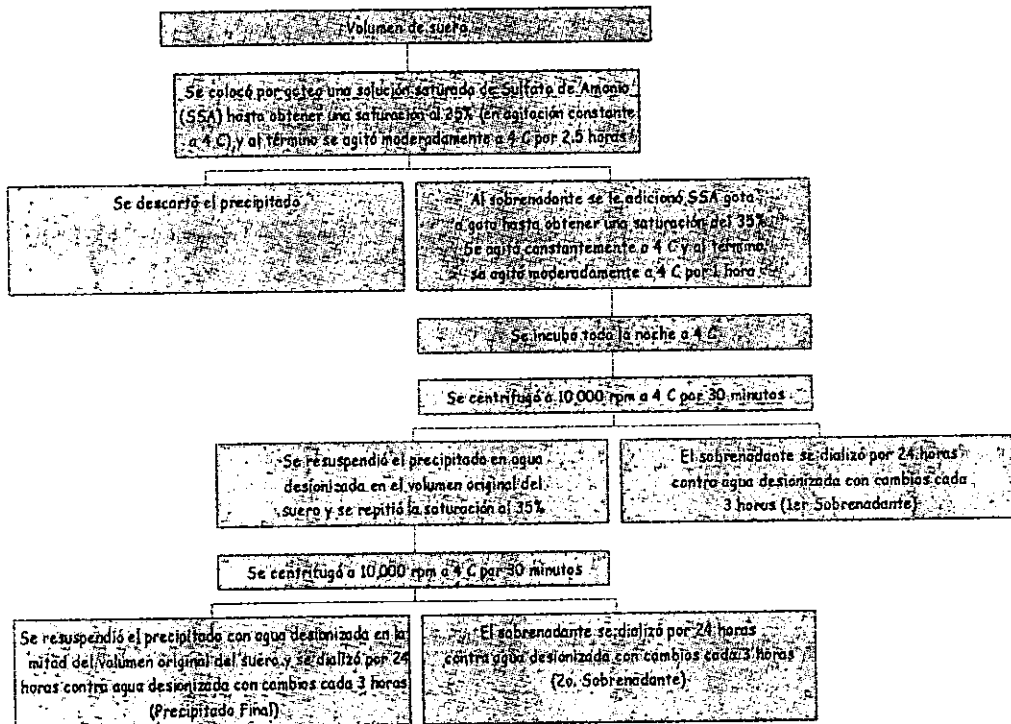
* Representa el volumen de solución añadido y diluido a la concentración correspondiente en cada caso.

Cuando la titulación de los anticuerpos mostró una unión igual o mayor al 30% en la dilución 1:4000, los animales se sangraron en blanco, para lo cual se tranquilizaron con una inyección intramuscular de 50mg de ketamina. La obtención total de sangre se realizó por punción cardiaca y el suero se separó por centrifugación bajo las condiciones descritas en las muestras para titulación. Al suero total se le agregaron 10 μ l de azida de sodio al 1% como conservador. Finalmente se almacenó en refrigeración hasta su purificación.

b) Purificación de anticuerpos: Las gammaglobulinas (IgG) de suero fueron aisladas de cada conejo, utilizando el procedimiento de precipitaciones fraccionadas con una solución saturada de sulfato de amonio (100%) hasta

obtener una concentración final de un tercio de saturación (Garvey *et al.*, 1977). El siguiente esquema describe dicho procedimiento:

Esquema 2: Metodología para la purificación de los anticuerpos por precipitación con Sulfato de Amonio a un tercio de saturación.



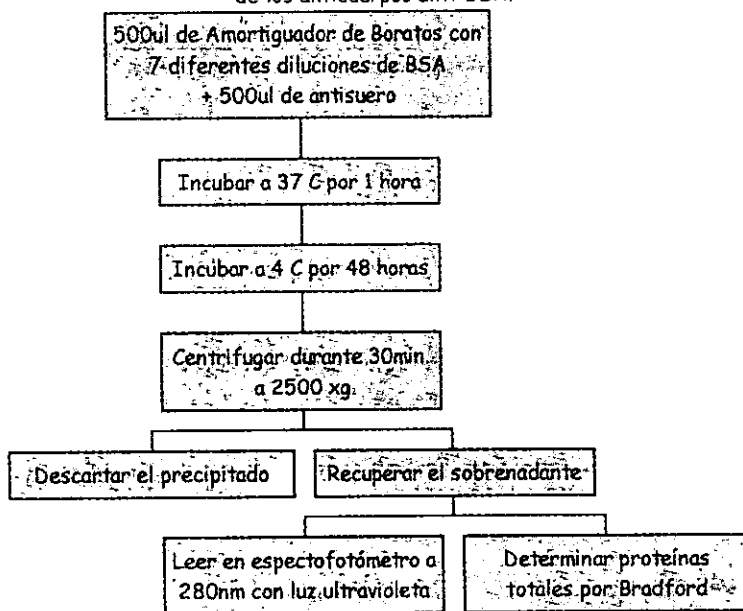
Nota: El precipitado final es la fracción que contiene las inmunoglobulinas de interés en mayor concentración y pureza, mientras que el 1er. y 2o. sobrenadante se conservaron únicamente como controles para realizar la electroforesis y la tabla de rendimientos. 10,000 rpm equivalen a 5,000 xg.

c) Adsorción de anticuerpos anti-albúmina sérica bovina (anti-BSA): Con el propósito de eliminar las inmunoglobulinas generadas contra albúmina sérica bovina (IgG anti-BSA) que interfieren en el pegado específico de los anticuerpos contra la hormona de interés, se procedió a determinar la

concentración adecuada de albúmina sérica bovina (BSA) que pudiera eliminar dicha contaminación (Munro y Stabenfeldt, 1984). Para lograr ésto, se trabajó con el lote experimental obtenido del conejo 1 inmunizado contra testosterona (testo 1), realizándose dos experimentos:

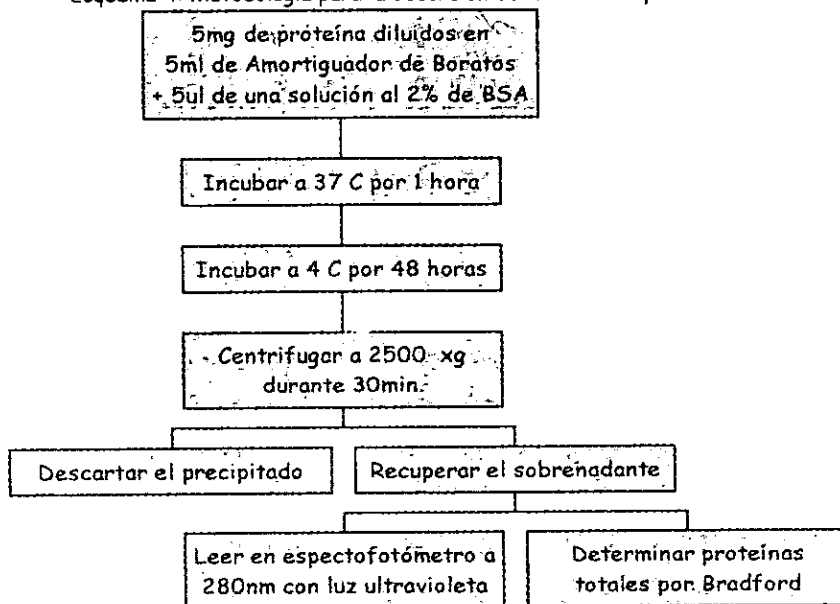
1. - La albúmina sérica bovina se resuspendió en amortiguador de boratos (ver apéndice) para obtener las siguientes concentraciones: 0.05, 0.1, 0.2, 1.0, 2.0, 10.0 y 20.0mg de BSA/ml. Posteriormente, de cada concentración de BSA se tomaron 500 μ l y se agregaron 500 μ g de proteína correspondientes a IgG de testo 1 en 500 μ l. Una vez hecho lo anterior se utilizó la siguiente metodología:

Esquema 3: Metodología para determinar la concentración adecuada de BSA para la adsorción de los anticuerpos anti-BSA.



2.- Ya conocida la concentración adecuada de BSA que eliminó las proteínas anti-BSA, se procedió de manera rutinaria a realizar el siguiente esquema de trabajo:

Esquema 4: Metodología para la adsorción de los anticuerpos anti-BSA.



d) Caracterización fisicoquímica:

d.1 *Determinación de proteínas totales:* La cuantificación de proteínas totales en cada paso de purificación, así como en el precipitado final (IgG) se realizó por el método de Bradford, utilizando como estándar a la gamma globulina bovina (Standard I, BIO-RAD). Para ello se desarrolló el micrométodo de acuerdo a las especificaciones del producto, utilizando concentraciones de proteína de 2 hasta 20µg, por triplicado. Para el análisis de cada muestra obtenida durante la purificación, se pesó 1 mg de polvo, el cual fue

resuspendido en 1ml de agua desionizada, para obtener una concentración de 1µg de polvo/µl de solución. De esta manera, la cuantificación de proteínas totales para cada muestra se realizó en 10µl por triplicado.

d.2 Electroforesis en TRIS-PAGE: Con la finalidad de conocer la movilidad relativa de las proteínas obtenidas durante la precipitación fraccionada de sulfato de amonio, se procedió a desarrollar la electroforesis en tubo en geles de poliacrilamida al 7% en condiciones nativas (TRIS-PAGE), de acuerdo a lo descrito por Nicoll y Licht (1971). La electroforesis se desarrolló utilizando 50µg de proteína de cada fracción por tubo de gel, los tubos se corrieron a un voltaje constante de 1.5mV en el gel concentrador y 3mV en el gel resolvidor por tubo durante 3 horas. Los geles se tiñeron con Azul brillante de Comassie al 0.5% y se destiñeron con una solución de ácido acético al 5% durante aproximadamente 24 horas.

e) Caracterización Inmunológica:

e.1 Titulación del primer anticuerpo: Para la titulación del primer anticuerpo (IgG) se procedió a montar un radioinmunoanálisis de fase líquida donde se colocaron diferentes concentraciones de anticuerpo purificado que oscilaron desde 12.5ng hasta 50µg de proteína en un volumen de 100µl de PBS-G.

Cuadro 5: Metodología para la titulación del primer anticuerpo.

Identificación	PBS-G µl	Anticuerpo µl	Hormona Tritiada µl		Carbón- dextran µl	Incubar
Cuentas Totales	800	0	100		0	a 4°C
Unión no específica	600	0	100	Agitar	200	durante
100 µg anticuerpo	500	100	100	5	200	30 minutos
50 µg anticuerpo	500	100	100	segundos	200	y centrifugar
25 µg anticuerpo	500	100	100	en	200	a 4°C,
12.5 µg anticuerpo	500	100	100	vortex	200	a 1500 xg
6.25 µg anticuerpo	500	100	100	e	200	durante
3.125 µg anticuerpo	500	100	100	incubar	200	15 minutos.
1.56 µg anticuerpo	500	100	100	a	200	Decantar
0.78 µg anticuerpo	500	100	100	4°C	200	a viales
0.39 µg anticuerpo	500	100	100	durante	200	individuales
0.195 µg anticuerpo	500	100	100	24	200	con 5 ml
97.5 ng anticuerpo	500	100	100	horas	200	de líquido
48.76 ng anticuerpo	500	100	100		200	de centelleo
26.37 ng anticuerpo	500	100	100		200	y contar
12.18 ng anticuerpo	500	100	100		200	durante 1 min.

e.2 Desarrollo de la curva estándar: Para elaborar la curva de desplazamiento de testosterona y cortisol se utilizaron estándares de la Organización Mundial de la Salud, correspondientes a Testosterone standard lote N° K079810 (6 μ M/L) y Cortisol standard lote N° K079510 (220nM/L). Cada estándar se dividió en 5 alícuotas de 100 μ l con una concentración de 0.6 μ M para testosterona y 0.22nM para cortisol y se conservaron a 4°C hasta su utilización. A continuación, 100 μ l de cada estándar se evaporaron con nitrógeno a sequedad, se resuspendieron en 10ml de PBS-G y se incubaron por 30 minutos a 37°C. A partir de esta dilución (vial1), se realizaron diluciones seriadas, es decir 5ml del vial 1+ 5ml de PBS-G, constituyendo el vial 2; éste se agitó en un vórtex durante 1 minuto, repitiéndose este procedimiento hasta obtener la última concentración utilizada en la curva. El cuadro siguiente muestra las concentraciones de estándar utilizadas en el sistema.

Cuadro 6: Concentraciones de estándar utilizadas para el desarrollo de las curvas estándar.

N° DE ESTÁNDAR	TESTOSTERONA (pg/ 500 μ l)	CORTISOL (pg/ 100 μ l)
1.	316.8	2175.0
2.	158.4	1087.5
3.	79.2	543.7
4.	39.6	271.8
5.	19.8	135.9
6.	9.9	67.9
7.		33.9

Para el desarrollo de la curva estándar se utilizó la concentración de anticuerpo que presentó una unión máxima del 40-50% en los ensayos de

inmunorreactividad anteriores, de tal forma que se tomó la cantidad adecuada de proteína necesaria para el sistema, diluyéndolos en PBS-G, considerando para el cálculo que se coloca un volumen de 100 μ l por tubo.

Los resultados se linealizaron para su análisis por la transformación logit-log (Bedolla *et al.* 1984).

e.3 Especificidad de los anticuerpos: Para determinar la especificidad de los anticuerpos anti-testosterona se realizó un ensayo de radioinmunoanálisis utilizando las siguientes hormonas: Androstenediona, Estradiol, 17-hidroxiprogesterona y dihidrotestosterona; mientras que para los anticuerpos anti-cortisol se utilizaron las tres primeras, además de la testosterona (todas las hormonas tritiadas fueron de la marca Amersham y los antisueros de Sigma). El ensayo se realizó por cuadruplicado para cada anticuerpo y se probaron los anticuerpos libres de anti-BSA, así como los anticuerpos totales (con anti-BSA). La siguiente metodología, describe el procedimiento utilizado:

Cuadro 7: Metodología para determinar la especificidad de los anticuerpos.

Identificación	PBS-G μ l	Anticuerpo problema μ l	Anticuerpo estándar μ l	Hormona Tritiada μ l	Agitar 5 segundos e incubar a 4°C durante 24 horas	Carbón- dextran μ l	Incubar a 4°C por 20 minutos y centrifugar a 1500 xg durante 15 minutos a 4°C, decantar y contar
Cuentas Totales	600	0	0	100		0	
Unión no específica anticuerpo a probar	600	0	0	100		200	
	400	100	100	100		200	

f) Validación del sistema: Una vez conocida la inmunorreactividad y especificidad de cada anticuerpo, así como el desarrollo de la curva estándar y viendo que las diferencias entre los diferentes anticuerpos obtenidos no era

relevante, se procedió al desarrollo de la validación del sistema, utilizando un pool de anticuerpo generado en el laboratorio. Para ello se realizaron los siguientes pasos:

f.1 Pool de anticuerpos: Se mezclaron los anticuerpos anti-Testosterona (1 al 5), en concentraciones de 100 μ g de proteína de cada uno, de igual forma se procedió con anti-Cortisol, en concentraciones de 300 μ g cada uno.

f.2 Titulación de los anticuerpos: Una vez realizada la mezcla de anticuerpos, se determinó la inmunoreactividad de cada pool en condiciones idénticas a lo descrito en el punto e.1

f.3 Desarrollo de la curva estándar: Finalmente, con la determinación de la cantidad de anticuerpo necesaria para el desarrollo de la curva estándar, se montó la curva en concentraciones ya descritas (e.2). Se realizaron tres curvas estándar independientes. Con los datos obtenidos se calculó la repetibilidad del sistema, obteniendo los valores del coeficiente de variación intra e interensayo a las dosis de 20, 50 y 80% de la curva estándar.

f.4. Sensibilidad: Corresponde a la cantidad mínima detectable del sistema en valores del 90% de la unión máxima de la curva dosis-respuesta.

f.5 Determinación de la precisión del sistema: Con el propósito de conocer la precisión del sistema, se incluyeron en repetidas ocasiones muestras de suero, para determinar la concentración de testosterona o cortisol, según el caso, a las que previamente se les colocaron concentraciones conocidas de testosterona y/o cortisol, para determinar la recuperación de las mismas.

Con el propósito de concentrar las muestras, en el caso de la testosterona, fue necesario realizar la siguiente metodología al suero: Se

colocaron 500µl de suero en tubos de vidrio de 10ml, se les adicionaron 5ml de éter etílico previamente enfriado a 4°C y se agitaron en vortex durante 1min. Se dejaron reposar 10min. y se congelaron en hielo seco-acetona; inmediatamente se decantó la fase superior (éter) a otro tubo de 10ml y se dejó evaporar a sequedad en la campana de extracción con Nitrógeno. El extracto se resuspendió en 500µl de PBS-G y se agitó en vortex durante 1min.

Producción de anticuerpos de la yema del huevo de gallina:

a) Inducción de anticuerpos: Al igual que para los conejos, se procedió a inmunizar 5 gallinas de postura de 6 meses de edad, de la raza Dalling, para cada hormona. Las gallinas se identificaron con números del 6 al 10 para testosterona y con letras de la F a la J para cortisol. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales.

a.1 *Preparación del inmunógeno*: Se utilizaron los mismos productos que para los conejos y la mezcla por animal se realizó colocando 1mg ó 0.5mg de esteroide-BSA en 0.5ml de SSF y 0.5ml del adyuvante completo de Freund frío.

a.2 *Esquema de inmunización*: La inmunización se realizó según las dosis y tiempos utilizados por Montes *et al.*, en 1994, pero inoculando la mitad de la cantidad en tres sitios del músculo pectoral y el resto en una aplicación subcutánea en el cuello, lo anterior de acuerdo al estudio realizado por Ermeling *et al.* en 1992.

Se aplicó 1mg del esteroide por animal en la primera inmunización y 0.5mg en las subsecuentes, desinfectando con alcohol antes de inocular,

distribuyendo la mitad del total de la mezcla en una aplicación subcutánea en el cuello y el resto en tres puntos intramusculares en el músculo pectoral.

Para el monitoreo de la respuesta inmune de las gallinas se tomaron 4ml de sangre de la vena radial de acuerdo al siguiente calendario.

Cuadro 8: Esquema de inmunización de las gallinas.

Día	Fecha	Actividades
1	17/02/97	1ª. Inoculación y sangrado para titulación de anticuerpos.
14	3/03/97	2ª. Inoculación.
28	17/03/97	3ª. Inoculación
42	31/03/97	4ª. Inoculación
49	7/04/97	Sangrado para titulación de anticuerpos.
56	14/04/97	5ª. Inoculación y sangrado para titulación de anticuerpos.
63	21/04/97	Sangrado para titulación de anticuerpos.
70	28/04/97	Sangrado para titulación de anticuerpos.
77	5/05/97	Sangrado para titulación de anticuerpos.
84	12/05/97	6ª. Inoculación y sangrado para titulación de anticuerpos.
91	19/05/97	Sangrado para titulación de anticuerpos.
98	26/05/97	7ª. Inoculación y sangrado para titulación de anticuerpos.
105 a 189	2/06/97 a 25/08/97	Sangrado semanal para titulación de anticuerpos.

Los huevos se colectaron diariamente y se almacenaron a 4°C hasta su posterior tratamiento.

De los 5 animales inmunizados contra testosterona solo uno (gallina 10) produjo títulos suficientes (30% de unión en una dilución de trabajo de 1:1000), por lo cual fue la única que se usó, colectando su producción de huevos entre el día 84 y el 126 (3 huevos en total). Para el caso de cortisol, solamente 3 animales respondieron (gallinas G, H y J). De la gallina G se colectaron los huevos entre los días 112 y 168 durante los cuales puso 30 huevos, de la gallina H se colectó la producción de huevos entre los días 112 y 189, recuperándose

30 huevos en total, mientras que la gallina J produjo 60 huevos entre el día 112 y el 189.

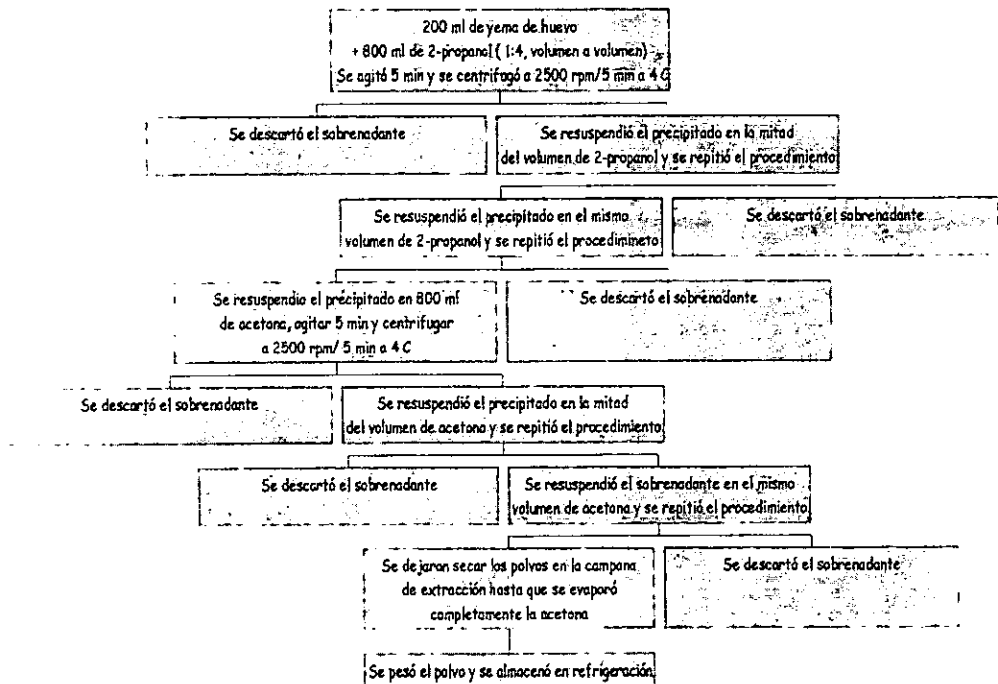
a.3 Titulación de los anticuerpos en suero de gallinas: Se realizó del mismo modo que para el suero de conejo.

b) Purificación de anticuerpos a partir de la yema de huevo: Se agruparon lotes de huevos por animal para cada una de las hormonas, tanto para testosterona como para cortisol.

Se realizó el método propuesto por Montes *et al.* (1994), además de la precipitación con sulfato de amonio, ya que Svendsen *et al.* en 1995 encontraron que es el método con el que se recupera la más alta tasa de anticuerpos, además del mayor grado de purificación de los mismos.

b.1 **Deslipidización:** Como primer paso para la purificación de los anticuerpos se eliminaron las grasas de la yema del huevo con precipitación de 2-propanol y acetona; para ello se realizó el siguiente protocolo de trabajo:

Esquema 5: Metodología para la deslipidización de la yema de huevo.



Nota: 2500 rpm equivalen a 1250 xg.

b.2 **Resuspensión de la yema de huevo:** Una vez obtenidos los polvos libres de lípidos, se pesaron únicamente 10g de cada uno de ellos, a excepción de la gallina 10 de testosterona, de la cual únicamente se tenían 8.73g. Posteriormente cada polvo fue resuspendido en 75ml de amortiguador de fosfatos salino (PBS 0.05M), mantenidos en agitación a 4°C durante 2 horas y centrifugados posteriormente a 10,000rpm durante 15min; el sobrenadante se

conservó en refrigeración y el precipitado se resuspendió nuevamente en el mismo volumen manteniéndose en agitación durante 18hrs a 4°C; al término de este tiempo se centrifugó a 10,000rpm por 15min y el sobrenadante se mezcló con el del día anterior.

b.3 *Precipitación con sulfato de amonio:* La precipitación con sulfato de amonio se realizó como fue descrita para los conejos.

c) Adsorción de los anticuerpos anti BSA: De aquí en adelante se repitió la metodología descrita para los anticuerpos obtenidos del suero de los conejos.

Al momento de elaborar el pool de los anticuerpos anti-cortisol huevo se colocaron 200µg de proteína de cada uno de los anticuerpos anti-cortisol (IgY) libres de anticuerpos anti-BSA.

IV. RESULTADOS:

Resultados en suero de conejos:

a) Inducción de anticuerpos: Los animales utilizados para la inducción de anticuerpos anti-testosterona y anti-cortisol fueron sangrados a blanco entre el día 109 y el 123 del esquema de inmunización, cuando presentaron un porcentaje de unión mayor al 30% a una dilución 1:4000 (cuadro 9 y 10).

Cuadro 9: Porcentaje de unión de los anticuerpos anti-testosterona en conejas.

Día del sangrado	% unión (Bo)				
	Coneja 1	Coneja 2	Coneja 3	Coneja 4	Coneja 5
77	26.7	14.5	N.D.	4.2	19.8
84	23.3	12.8	N.D.	45.7	2.9
91	19.9	12.1	N.D.	42.6	3.4
98	19.2	11.8	N.D.	47.8	12.7
105	64.5	64.0	13.0	75.5	42.2
112	-----	-----	27.0	-----	45.7
119	-----	-----	30.6	-----	54.7

N.D.= No detectable.

Cuadro 10: Porcentaje de unión de los anticuerpos anti-cortisol en conejas

Día del sangrado	% unión (Bo)			
	Coneja A	Coneja C	Coneja D	Coneja E
77	13.2	18.3	18.3	30.7
84	15.9	17.9	20.9	33.5
91	48.0	16.2	29.2	31.0
98	13.2	13.9	24.1	18.3
105	27.8	21.7	26.6	48.3
112	42.3	38.7	23.3	-----
119	38.7	33.5	30.0	-----

b) **Purificación de la hormona marcada:** El comportamiento cromatográfico de las hormonas purificadas se presenta en las figuras 1 y 2.

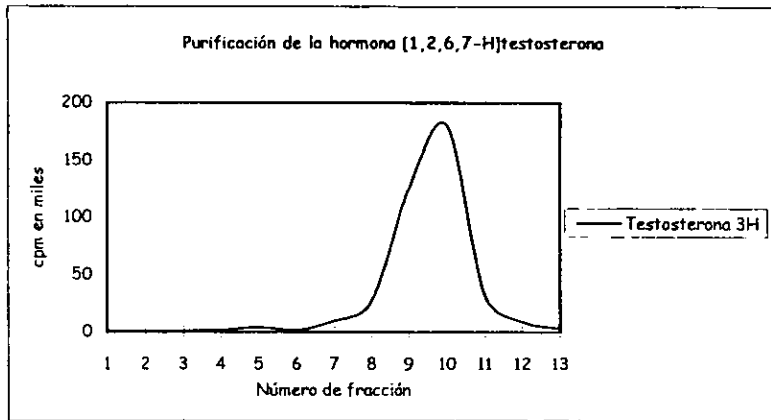


Figura 1: Cuentas por minuto obtenidas durante la purificación de la testosterona tritiada. Se utilizaron las fracciones 9 y 10.

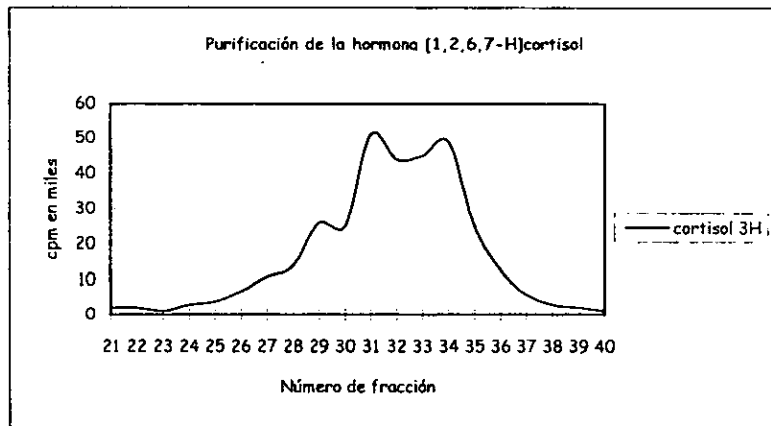


Figura 2: Cuentas por minuto obtenidas durante la purificación del cortisol tritiado. Se utilizaron las fracciones 29 a 34.

c) **Purificación de anticuerpos:** El proceso de purificación con precipitaciones fraccionadas del sulfato de amonio saturado (100%), permitió obtener tres

fracciones de cada suero, las cuales correspondieron a: 1er. sobrenadante, 2o. sobrenadante y precipitado final o IgG y cuya caracterización fisicoquímica fue la siguiente:

c.1 Determinación de proteínas totales: La curva de referencia de proteínas, utilizando el micrométodo presentó un coeficiente de correlación (r) de 0.997; una ordenada en el origen de 0.082 y una pendiente de 0.0266, como se aprecia en la figura 3.

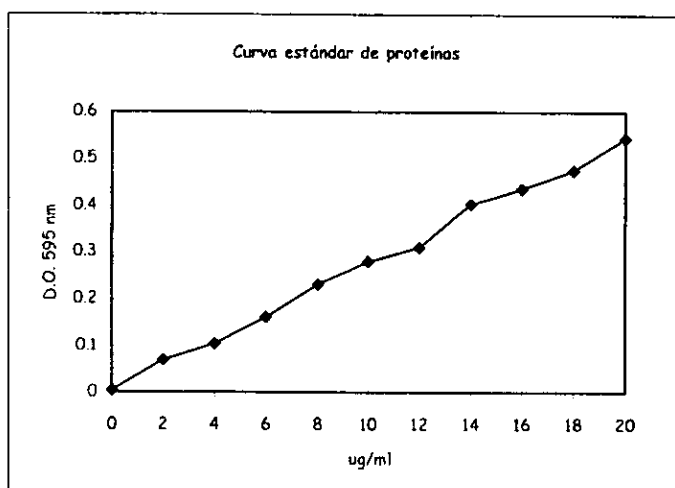


Figura 3: Curva estándar del microensayo de proteínas totales, utilizando el patrón de referencia gammaglobulinas (IgG) de origen bovino (BIO-RAD). El patrón se utilizó a las dosis de 0 a 20 μ g/ml. Las dosis se trabajaron por triplicado.

Una vez desarrollado el sistema de cuantificación de proteínas, se procedió a la determinación en las muestras problema. El rendimiento obtenido en el primer sobrenadante, segundo sobrenadante y precipitado final de cada suero se muestra en el cuadro 11:

Cuadro 11: Rendimiento obtenido durante los diferentes pasos de purificación de los sueros de conejo.

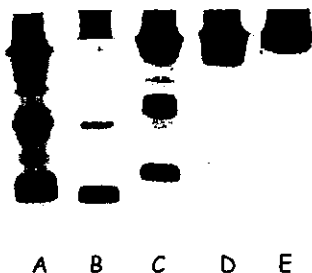
Nombre del producto	[prot]/10 μ l (μ g)	[prot]/mg polvo (μ g)	Peso del producto (mg)	[prot]/total (mg)
1er. Sob. Testost. 1	9.42	942	1130	1064.46
2º. Sob. Testost. 1	16.36	1636	130	212.68
Ppo. Final Testost. 1	5.53	553	250	138.25
1er. Sob. Testost. 2	31.74	3174	1260	3996.72
2º. Sob. Testost. 2	8.02	802	140	112.28
Ppo. Final Testost. 2	5.95	595	440	261.80
1er. Sob. Testost. 3	22.97	2297	990	2274.03
2º. Sob. Testost. 3	26.78	2678	170	455.26
Ppo. Final Testost. 3	8.63	863	400	345.2
1er. Sob. Testost. 4	18.25	1825	680	1241.00
2º. Sob. Testost. 4	9.83	983	90	88.47
Ppo. Final Testost. 4	2.82	282	120	33.84
1er. Sob. Testost. 5	24.18	2418	1310	3167.58
2º. Sob. Testost. 5	19.61	1961	310	607.91
Ppo. Final Testost. 5	14.17	1417	340	481.78
1er. Sob. Cortisol	30.48	3048	3140	9570.72
2º. Sob. Cortisol	19.84	1984	230	456.32
Ppo. Final Cortisol	11.68	1168	660	770.88
1er. Sob. Cortisol E	27.46	2746	990	2748.24
2º. Sob. Cortisol E	17.91	1791	160	286.56
Ppo. Final Cortisol E	14.32	1432	510	730.32

[] = concentración; prot = proteína.

c.2 *Electroforesis en TRIS-PAGE*: Las fotografías 1 y 2 presentan el patrón típico de corrida de sueros anti-testosterona y anti-cortisol respectivamente. Se puede observar que el precipitado final esta constituido casi exclusivamente por inmunoglobulinas, mientras que tanto el primer sobrenadante como el segundo presentan considerable contaminación con otro tipo de proteínas.



Fotografía 1: Patrón electroforético típico en condiciones nativas (TRIS-PAGE) de suero anti-testosterona. La concentración de proteína total por tubo fue de 50 μ g. A) corresponde a suero crudo; b) 1er sobrenadante; c) 2º sobrenadante; d) precipitado final; e) IgG de referencia.



Fotografía 2: Patrón electroforético típico en condiciones nativas (TRIS-PAGE) de suero anti-cortisol. A) corresponde a suero crudo; b) 1er sobrenadante; c) 2º sobrenadante; d) precipitado final; e) IgG de referencia.

d) Adsorción de anticuerpos-anti albúmina sérica bovina: Como paso inicial, en el experimento 1 se colocaron 500 μ g de anticuerpo anti-testosterona 1 (IgG) en 500 μ l de solución en presencia de diferentes concentraciones de BSA (0.05 hasta 20mg) en un volumen de 500 μ l, y la cuantificación de proteína se

(0.05 hasta 20mg) en un volumen de 500 μ l, y la cuantificación de proteína se realizó a 280nm. Debido a que la concentración de proteína fue muy elevada cuando se agregaron 10 y 20mg de BSA no se pudo obtener una lectura real a esta longitud de onda, por lo cual dichos resultados se eliminaron, el resto de los resultados se muestran en el cuadro siguiente:

Cuadro 12: Cuantificación de proteínas por D.O.280nm, del anticuerpo anti-testosterona 1 (IgG) (500 μ g) y diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina (BSA) en 1ml de solución

Concentración de Albúmina añadida	Densidad óptica a 280nm		
	De la solución de BSA	De la solución de BSA + Anticuerpo	De la solución purificada de Anticuerpo *
0.05mg	0.023	1.315	1.057
0.10mg	0.057	1.343	1.102
0.20mg	0.091	1.358	1.116
1.0mg	0.476	1.541	1.300
2.0mg	0.857	1.734	1.505

* Corresponde a la solución libre de BSA y de anticuerpos anti-BSA, obtenida después de la metodología descrita en el experimento 1 del punto c.

Posteriormente a las fracciones finales libres de anti-BSA, se les determinó proteínas totales por el método de Bradford con los siguientes resultados:

Cuadro 13: Concentración de proteína total por Bradford, en 1ml de solución del anticuerpo anti-testosterona 1 (IgG) libre de los anticuerpos anti-BSA

Concentración de Albúmina *	μ g de proteína total por ml
0.05mg	910
0.10mg	794
0.20mg	778
1.0mg	1742
2.0mg	2370

* Corresponde a la concentración de BSA utilizada para remover los anticuerpos anti-BSA.

Como se observa la concentración menor de proteína total correspondió a la solución con 0.20mg de BSA, sugiriendo que esta concentración de albúmina es la que elimina la mayor cantidad de anticuerpos contra esta BSA y cuyos resultados se corroboraron posteriormente a través de un radioinmunoanálisis donde la concentración de 0.2mg de BSA obtuvo la mayor unión. Los resultados se muestran en el cuadro 14.

Cuadro 14: Porcentaje de unión de BSA vs anti-testosterona (IgG) libre de anti-BSA.

Concentración de Albúmina utilizada para remover los ac. anti-BSA	% de unión
	Anticuerpo anti-testosterona libre de BSA
0.05mg	87.3
0.1mg	84.3
0.2mg	89.0
1.0mg	84.9
2.0mg	85.6

En base a estos resultados, con el anticuerpo anti-testosterona 1 (IgG) libre de anticuerpos anti-BSA, obtenido con una solución al 2% de BSA, se montó un radioinmunoanálisis para cuantificar la inmunoreactividad del antisuero, utilizando para ello concentraciones desde 12.18ng hasta 25 μ g de proteína total. Los resultados mostraron que la unión al 50%, correspondió a la concentración de 0.39 μ g de proteína total y se ejemplifican en la siguiente figura.

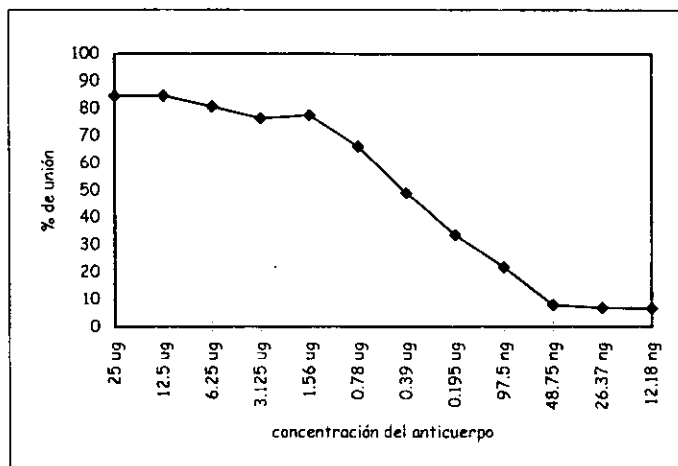


Figura 4: Inmunoreactividad del anticuerpo anti-testosterona 1 (IgG) libre de anticuerpos anti-BSA. La UNE fue de 5.9%. El anticuerpo denominado "Cortisol" es un pool de los anticuerpos obtenidos de las gallinas G, H y J.

Una vez concluido los experimentos anteriores, se realizó el experimento 2 (ver material y métodos), que en resumen consistió en eliminar los anticuerpos anti-BSA y desarrollar la inmunoreactividad, para cada uno de los anticuerpos. Los resultados mostraron una variabilidad en la dosis al 50% de

unión máxima, como se aprecia en el cuadro siguiente:

Cuadro 15: Concentración (proteína total) de anticuerpo anti-Testosterona (IgG), que mostró el 50% de Unión máxima (Bo) para cada antisuero.

Anticuerpo	Concentración de proteína
Testo 1	0.78 μ g
Testo 2	0.195 μ g
Testo 3	1.56 μ g
Testo 4	0.048 μ g
Testo 5	1.56 μ g

e) Caracterización inmunológica: La figura resume el comportamiento de la inmunoreactividad de cada anticuerpo anti-testosterona en el sistema de radioinmunoanálisis.

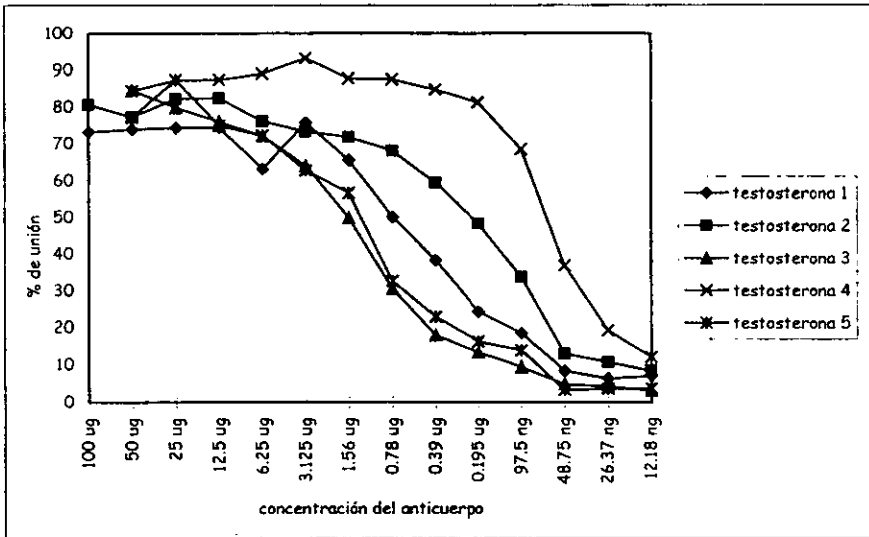


Figura 5: Inmunoreactividad de los anticuerpos anti-testosterona (IgG) libres de anticuerpos anti-BSA. La UNE fue de 4.0%.

Los resultados de los anticuerpos anti-cortisol (IgG) mostraron la unión máxima al 50% con una concentración del anticuerpo de 1.56 μ g.

En la siguiente figura se muestra el comportamiento de los dos anticuerpos durante la inmunorreactividad.

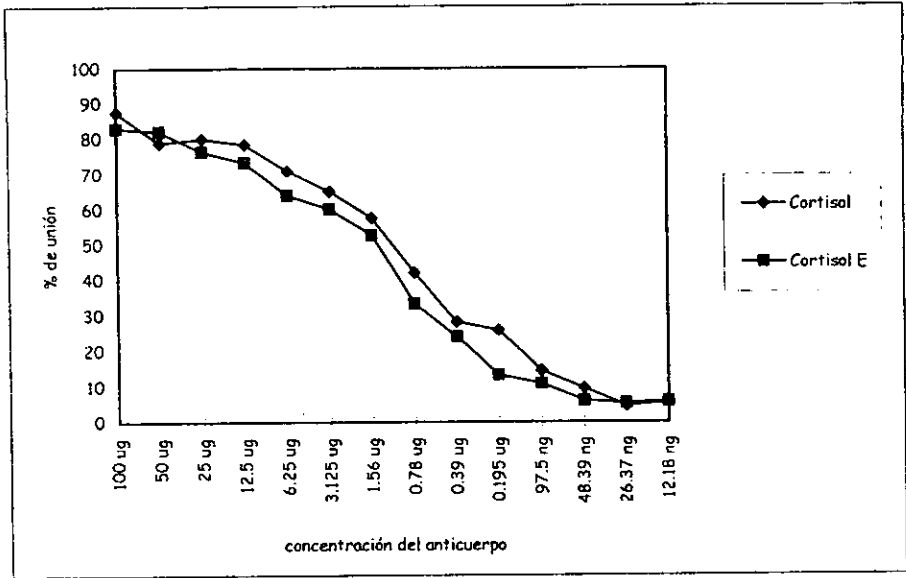


Figura 6: Inmunorreactividad de los anticuerpos anti-cortisol (IgG), libres de anticuerpos anti-BSA. La UNE fue de 4.7%.

f) Desarrollo de la curva estándar: Una vez conocida la concentración de anticuerpo necesaria para la obtención de la unión máxima cercana al 30%, se desarrollo la curva estándar utilizando concentraciones seriadas de hormona fría desde el rango de 4.8pg/500µl hasta 316.8pg/500µl. El comportamiento para los anticuerpos anti-testosterona (IgG) se muestra en el cuadro 16 y en la figura 7.

Cuadro 16: Resultados de las curvas estándar para los anticuerpos anti-testosterona (IgG)

	Testosterona 1	Testosterona 2	Testosterona 3	Testosterona 4	Testosterona 5
[Ac/tubo]	0.780 μ g	0.195 μ g	0.78 μ g	48.39ng	1.56 μ g
% B ₀	38.5	25.3	17	38.2	38.5
Pendiente (m)	- 1.346	- 0.947	- 0.807	- 0.892	- 0.821
Ordenada al origen (b)	3.223	1.594	1.505	1.589	1.767
Coefficiente de correlación (r)	- 0.988	- 0.999	- 0.990	- 0.987	- 0.970

Promedio de UNE = 1.5 %

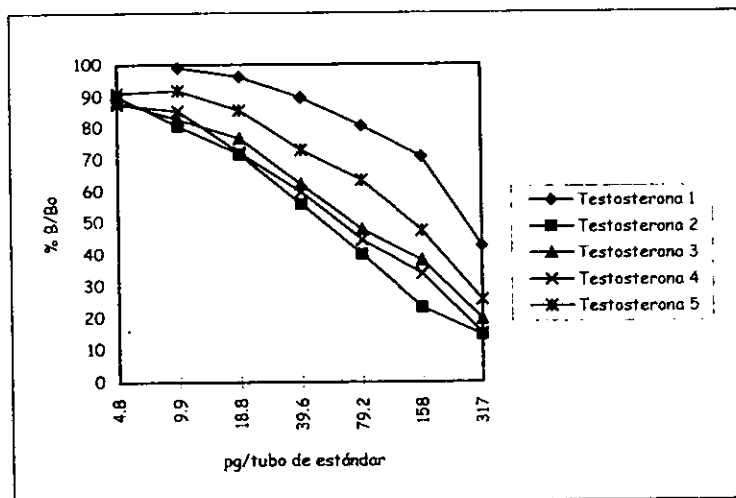


Figura 7: Curvas estándar de los anticuerpos anti-testosterona (IgG)

Los resultados para los anticuerpos anti-cortisol (IgG) se muestran en el cuadro 17 y en la figura 8.

Cuadro 17: Resultados de las curvas estándar para los anticuerpos anti-cortisol (IgG)

	Cortisol	Cortisol E
[Ac/tubo]	1.56µg	1.56µg
% Bo	47.9	47.7
Pendiente (m)	- 0.871	- 0.999
Ordenada al origen (b)	2.185	2.430
Coefficiente de correlación (r)	0.992	0.995

Promedio de UNE = 4.3 %

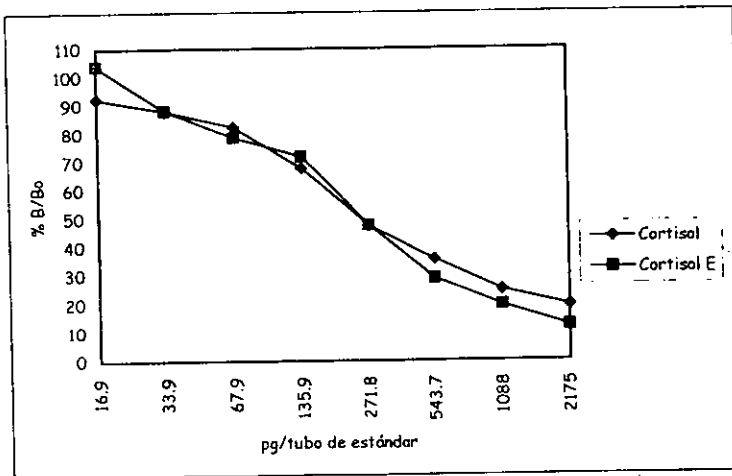


Figura 8: Curvas estándar de los anticuerpos anti-cortisol (IgG)

g) **Especificidad:** Las pruebas de especificidad para los anticuerpos anti-testosterona (IgG) mostraron porcentajes de unión contra androstenediona, estradiol y 17-hidroxiprogesterona con un rango de 0.1 a 4.4%, siendo mayor la unión contra dihidrotestosterona, donde se obtuvo un rango entre 5.9 y 33.3%. Es interesante señalar que el reconocimiento de dihidrotestosterona y androstenediona por parte del anticuerpo en estudio se incremento

notablemente en ausencia de anticuerpos anti-BSA, como se aprecia en el cuadro 18.

Cuadro 18: Porcentaje de unión de los anticuerpos anti-testosterona (IgG) en presencia de otras hormonas diferentes a la testosterona.

Anticuerpo	Androstenediona		Estradiol		17-hidroxi-progesterona		dihidro-testosterona	
	sin anti-BSA	con anti-BSA	sin anti-BSA	con anti-BSA	sin anti-BSA	con anti-BSA	sin anti-BSA	con anti-BSA
Testosterona 1	3.1	0.2	0.2	0.3	1.7	0.3	33.3	6.8
Testosterona 2	0.5	0.3	0.7	2.7	1.2	0.3	30.9	4.6
Testosterona 3	4.4	0.8	0.5	0.1	0.5	0.2	5.9	0.5
Testosterona 4	0.3	0.2	1.0	0.5	0.6	0.8	12.0	7.5
Testosterona 5	2.3	0.1	0.7	0.04	3.2	3.9	15.5	9.8

Los porcentajes de unión de las pruebas de especificidad para los anticuerpos anti-cortisol (IgG) mostraron que los anticuerpos son muy específicos contra dicha hormona, ya que el rango de unión encontrado con otras hormonas fue de 0 a 3.5%.

Cuadro 19: Porcentaje de unión de los anticuerpos anti-cortisol (IgG) en presencia de otras hormonas diferentes a la testosterona.

Anticuerpo	Androstenediona		Estradiol		17-hidroxi-progesterona		Testosterona	
	sin anti-BSA	con anti-BSA	sin anti-BSA	con anti-BSA	sin anti-BSA	con anti-BSA	sin anti-BSA	con anti-BSA
Cortisol	0.4	0.0	1.6	0.6	0.1	0.3	3.5	0.8
Cortisol E	2.5	0.5	1.8	0.2	0.0	0.7	0.0	0.2

h) Validación del sistema:

h.1 Titulación del anticuerpo: Con el pool de anticuerpos anti-testosterona y anti-cortisol se realizó la inmunorreactividad, con el objeto de determinar la concentración adecuada de anticuerpo para el desarrollo de la curva estándar. Los resultados se muestran en la figura 9.

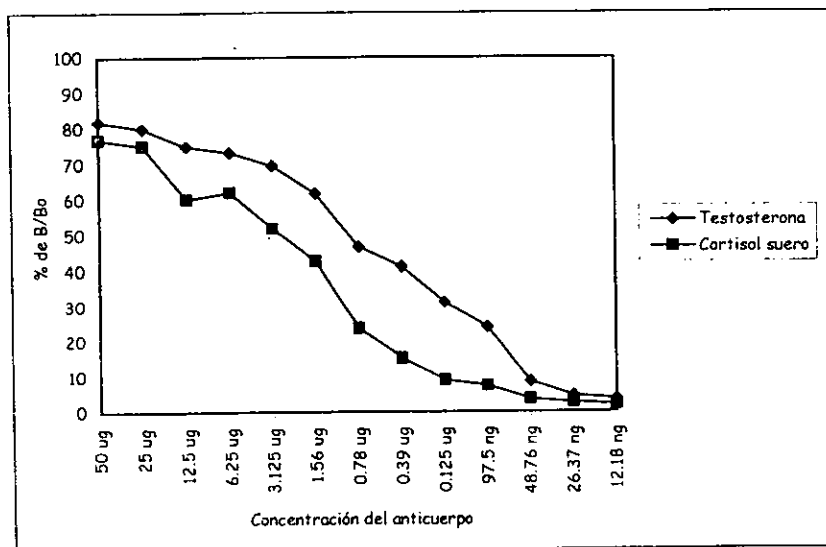


Figura 9: Inmunorreactividad de los anticuerpos anti-Testosterona y anti-Cortisol libres de anticuerpos anti-BSA. La UNE promedio fue de 4.2%.

Los resultados mostraron que la unión máxima al 50% se obtuvo en el caso de Testosterona con una concentración del anticuerpo de 0.78µg, mientras que para Cortisol se obtuvo con 3.125µg del anticuerpo.

h.2 Desarrollo de la curva estándar: Utilizando la concentración de anticuerpo en la que se obtuvo el 50% de unión se realizaron tres curvas estándar para los anticuerpos anti-testosterona y cinco para los anticuerpos

anti-cortisol suero, con diferencia de una semana entre sí, obteniéndose los siguientes resultados:

Cuadro 20: Resultados de las curvas estándar del anticuerpo anti-testosterona, colocando el anticuerpo a una concentración de $0.78\mu\text{g}/\text{tubo}$

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio	Desv. est.	C.V. interensayo
intercepto	6.715	6.002	4.914	5.877	0.9	15.4
% Bo	50.6	43.1	50.7	48.1	4.4	9.1
Pendiente (m)	-1.343	-1.131	-1.064	-1.200	0.1	12.3
Coefficiente de correlación (r)	98.9	92.8	97.9	96.5	3.3	3.4
Dosis en $\text{pg}/500\mu\text{l}$ al 80% B/Bo	52.9	59.1	27.5	46.5	16.8	36.0
Dosis en $\text{pg}/500\mu\text{l}$ al 50% B/Bo	148.5	201.4	101.2	150.4	50.1	33.3

X UNE = 5.8%

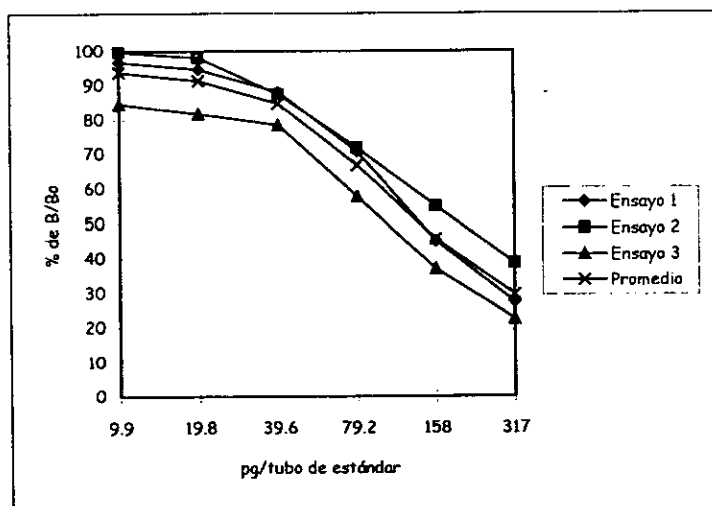


Figura 10: Curvas estándar del anticuerpo anti-testosterona.

Cuadro 21: Resultados de las curvas estándar del anticuerpo anti-cortisol suero, colocando el anticuerpo a una concentración de 3.125µg/tubo

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	Promedio	Desv. est.	C.V. interensayo
intercepto	5.881	7.102	5.855	6.057	7.151	6.409	0.6	10.3
% Bo	54.7	52.7	54.6	56.6	54.9	54.7	1.4	2.5
Pendiente (m)	-0.989	-1.125	-0.990	-0.990	-1.108	-1.000	0.1	10
Coefficiente de correlación (r)	96.4	98.3	97.5	97.8	97.7	97.5	0.7	0.7
Dosis en pg/100µl al 80% B/Bo	94.1	160.5	91.2	111.9	181.7	128	40.9	31.9
Dosis en pg/100µl al 50% B/Bo	382.2	550.2	369.8	453.7	635.1	478	113.3	23.7

X UNE = 4.3%

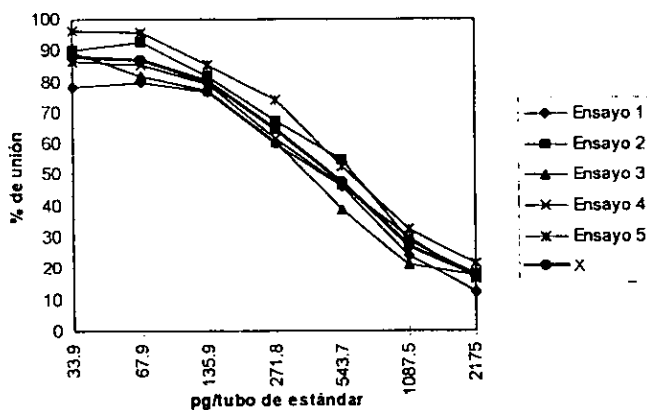


Figura 11: Curvas estándar del anticuerpo anti-cortisol del suero.

Con las curvas anteriores se calcularon los coeficientes de variación intraensayo y los porcentajes de recuperación.

Cuadro 22: Coeficientes de variación intraensayo de las curvas estándar dosis respuesta y porcentaje de recuperación de los anticuerpos anti-testosterona y anti-cortisol suero

	Testosterona	Ensayo			Recuperación		
		1	2	3			
Variación intraensayo	estándar bajo (9.9pg)	5.5	1.2	1.8	95.8%		
	estándar medio (39.6pg)	0.1	3.2	0.8	90.5%		
	estándar alto (316.8pg)	0.9	10.7	5.2			
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	Recuperación
Variación intraensayo	Cortisol suero estándar bajo (67.9pg)	0.2	3.3	0.5	0.8	1.6	92.6%
	estándar medio (543.7pg)	2.0	10.2	3.6	7.0	9.4	59.5%
	estándar alto (2175pg)	5.4	0.3	3.7	13.9	14.5	

Por otro lado se calculó la precisión de cada sistema, determinando mediciones repetidas de muestras de suero y calculando el coeficiente de variación interensayo para cada caso. El promedio de las mediciones para testosterona fue de 344.6pg/ml con una desviación estándar de 41.5pg/ml y su coeficiente de variación correspondió a 12.05% y para cortisol suero fue de 2480.4pg/ml con una desviación estándar de 430.8pg/ml con un coeficiente de variación de 17.37%.

Resultados en la yema del huevo:

a) Inducción de anticuerpos: De los cinco animales inmunizados contra testosterona solo uno tuvo un porcentaje de unión mayor al 30% en una dilución

de suero de 1 en 1000, por lo tanto únicamente se utilizaron los huevos de dicho animal.

Cuadro 23: Porcentaje de unión de los anticuerpos anti-testosterona en suero de gallinas, con una dilución de 1:1000

Día de sangrado	% de unión (Bo)	
	gallina 10	
77	41.4	
84	38.4	
91	22.2	
98	40.2	
105	49.3	
112	53.1	
119	56.8	
126	20.6	
133	28.3	

De los cinco animales inmunizados contra cortisol solamente tres presentaron porcentos de unión mayores al 30% en una dilución del suero de 1 en 1000, por lo cual solamente se utilizaron los huevos de dichos animales.

Cuadro 24: Porcentaje de unión de los anticuerpos anti-cortisol en suero de gallinas con una dilución de 1:1000

Día de sangrado	% de unión (Bo)		
	gallina G	gallina H	gallina J
105	73.6	48.9	76.1
112	58.7	49.3	32.9
119	43.9	49.7	36.0
126	36.1	38.3	50.9
133	41.1	28.1	36.3
140	34.2	30.0	45.3
147	34.5	25.7	37.7
154	36.6	24.9	38.8
161	36.5	26.4	28.6
168	24.9	22.0	30.9
175	17.4	23.1	36.6
182	19.3	29.1	45.6
189		29.1	34.6

b) Purificación de los anticuerpos:

b.1 *Deslipidización:* Del primer paso para la purificación de los anticuerpos, se obtuvo un polvo libre de grasas de las yemas de huevo, con el siguiente rendimiento:

Cuadro 25: Rendimiento en gramos de la yema de huevo después de la deslipidización.

Identificación	Peso en gramos (g)
Testosterona 10	8.79
Cortisol G	32.45
Cortisol H	175.76
Cortisol J	120.25

b.2 *Precipitación con sulfato de amonio:* Para poder trabajar en forma más homogénea se tomaron únicamente 10g de cada lote de polvos, excepto para testosterona 10, del cual se tomó la totalidad del polvo disponible. De cada lote se obtuvo un volumen final de 150ml de solución. Del mismo modo que para el suero de conejos, se obtuvieron tres fracciones de cada paso de purificación.

c) Caracterización fisicoquímica:

c.1 *Determinación de proteínas totales:* Para la curva de referencia de proteínas totales según la ecuación de la recta $Y=mx+b$, los resultados del coeficiente de correlación correspondieron a 0.997, la pendiente de 0.030 y la ordenada en el origen fue de 0.032, por lo tanto $y=0.030x+0.032$.

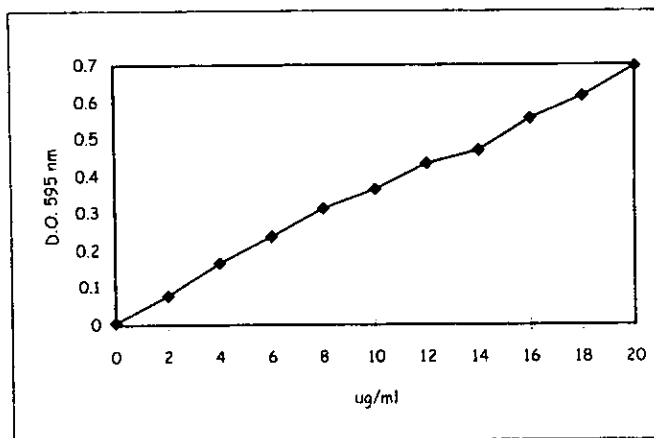


Figura 12: Curva estándar del microensayo de proteínas totales, utilizando el patrón de referencia gammaglobulinas (IgG) de origen bovino (BIO-RAD). El patrón se utilizó a las dosis de 0 a 20µg/ml. Las dosis se trabajaron por triplicado.

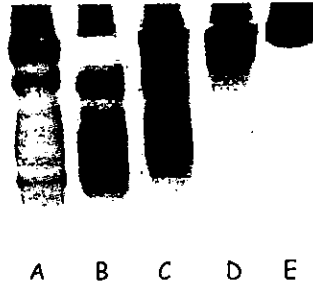
Con lo anterior se obtuvo el siguiente cuadro de rendimientos finales:

Cuadro 26: Rendimiento obtenido durante los pasos de purificación de la yema de huevo de gallina.

Nombre del producto	[prot]/10 µl (µg)	[prot]/mg de polvo (µg)	Peso del producto (mg)	[prot]/total (mg) en 10 g	Peso total del polvo (mg)	[prot]/total del polvo (mg)
1er. Ste. Testa. 10	12.47	1247	720	897.84		
Ppo. Final Testa. 10	13.07	1307	170	222.79		
1er. Ste. Cortisol G	5.66	566	980	554.68		
2º. Ste. Cortisol G	7.88	788	130	102.44		
Ppo. Final Cortisol G	17.42	1742	170	296.14	32450	960.84
1er. Ste. Cortisol H	6.64	664	820	570.48		
2º. Ste. Cortisol H	6.48	648	70	45.36		
Ppo. Final Cortisol H	2.89	289	60	17.34	175760	304.76
1er. Ste. Cortisol J	10.01	1001	970	1082.69		
2º. Ste. Cortisol J	11.43	1143	60	68.58		
Ppo. Final Cortisol J	5.20	520	50	26.00	120250	312.65

[] = concentración; prot = proteína.

c.2 *Electroforesis en TRI-PAGE*: A continuación se muestran los patrones electroforéticos típicos recuperados en la electroforesis de las diferentes fracciones obtenidas durante los pasos de purificación.



Fotografía 3: Patrón electroforético en condiciones nativas (TRIS-PAGE) de la yema de huevo anti-testosterona de la gallina 10. La concentración de proteína total por tubo fue de 50µg. A) corresponde a la yema de huevo antes de precipitar con S.S.A.; b) 1er sobrenadante; c) 2° sobrenadante; d) precipitado final; e) IgG de referencia.



Fotografía 4: Patrón electroforético típico en condiciones nativas (TRIS-PAGE) de la yema de huevo anti-cortisol (IgY). Donde la concentración de proteína total por tubo fue de 50µg. A) corresponde a la yema de huevo antes de precipitar con S.S.A.; b) 1er sobrenadante; c) 2° sobrenadante; d) precipitado final; e) IgG de referencia.

d) Caracterización inmunológica: Como puede observarse en la figura 13 el anticuerpo anti-testosterona obtenido de la yema de los huevos de la gallina 10 no reconoció la hormona marcada, por lo cual se concluyó que no funcionó dicho anticuerpo.

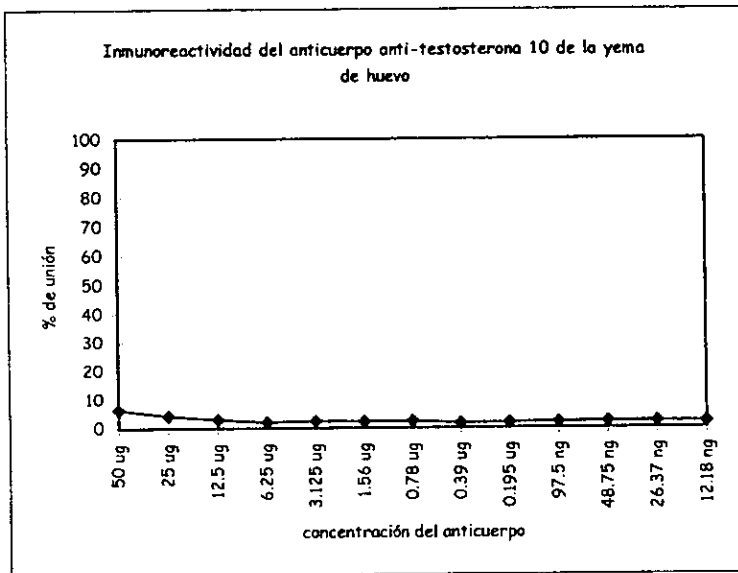


Figura 13: Inmunorreactividad de los anticuerpos anti-testosterona (IgY), libre de los anticuerpos anti-BSA. La Une fue de 2.4%.

Los resultados de los anticuerpos anti-cortisol (IgY) se presentan en la figura 14.

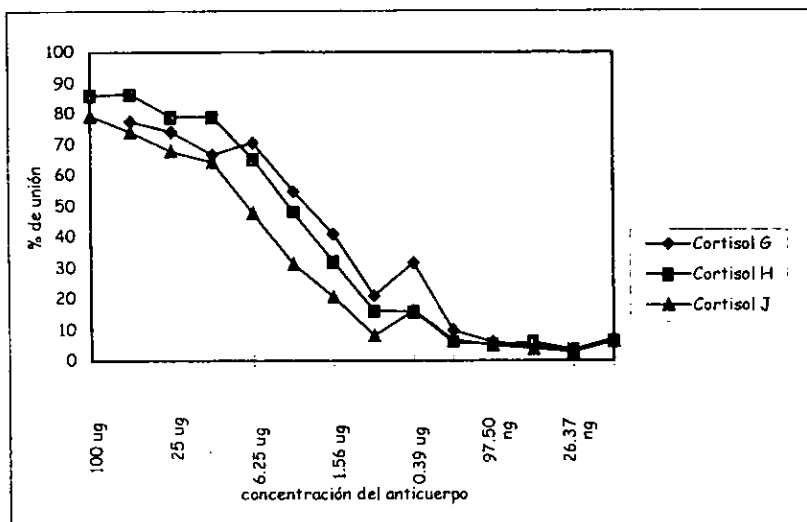


Figura 14: Inmunoreactividad de los anticuerpos anti-cortisol (IgY), libres de anticuerpos anti-BSA. El promedio de la UNE fue de 3%.

Los resultados mostraron una variabilidad en el 50% de unión máxima, como se aprecia en el cuadro siguiente:

Cuadro 27: Concentración de proteína que proporciona la unión del 50% con los anticuerpos anti-cortisol (IgY)

Anticuerpo	Concentración de proteína
Cortisol G	1.56 µg
Cortisol H	3.125 µg
Cortisol J	6.25 µg

e) **Desarrollo de la curva estándar:** Teniendo la concentración necesaria de anticuerpo para obtener la unión cercana al 30%, se realizaron curvas estándar utilizando concentraciones seriadas de trazador en un rango de 16.9 a 2175/100 µl.

Los resultados se muestran en el cuadro 28 y en la figura 15.

Cuadro 28: Resultados de las curvas estándar de los anticuerpos anti-cortisol (IgY)

	Cortisol G	Cortisol H	Cortisol J
[Ac/tubo]	1.56 μ g	3.185 μ g	6.25 μ g
% Bo	37	33	43.2
Pendiente (m)	- 1.65	- 1.326	- 1.17
Ordenada al origen (b)	4.890	3.312	3.035
Coefficiente de correlación (r)	- 0.978	- 0.939	- 0.997

X UNE = 3.3.%

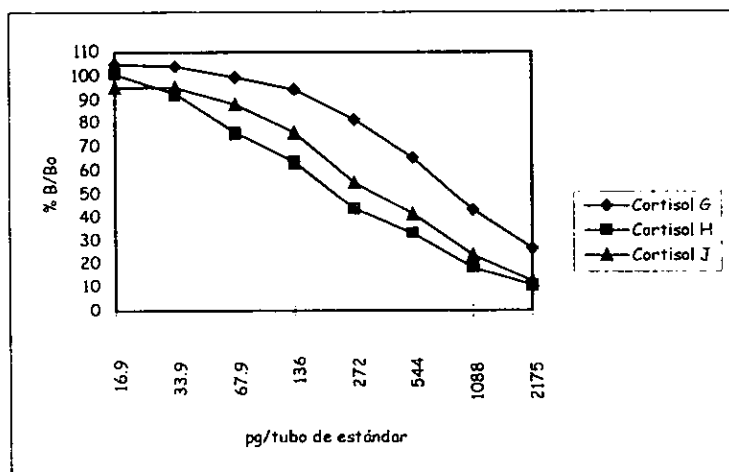


Figura 15: Curvas estándar de los anticuerpos anti-cortisol (IgY)

f) **Especificidad:** Las pruebas de especificidad realizadas a los anticuerpos anti-cortisol (IgY) mostraron porcentajes de unión contra las hormonas probadas en un rango de 0.0 a 2.8, como puede observarse en el cuadro 29.

Cuadro 29: Porcentaje de unión de los anticuerpos anti-cortisol (IgY) contra otras hormonas diferentes al cortisol.

Anticuerpo	Androstenediona		Estradiol		17 hidroxiprogestero		Testosterona	
	sin anti-BSA	con anti-BSA	sin anti-BSA	con anti-BSA	sin anti-BSA	con anti-BSA	sin anti-BSA	con anti-BSA
Cortisol G	0.3	0.7	2.0	0.4	0.7	0.2	0.1	0.7
Cortisol H	0.3	0.9	2.5	0.2	0.3	0.4	1.6	0.5
Cortisol J	0.8	1.0	0.4	0.0	0.4	0.2	2.8	0.3

g) **Validación del sistema:**

g.1 **Titulación del anticuerpo:** Una vez hecha la unión de los anticuerpos anti-cortisol (IgY) se realizó una prueba de inmunorreactividad para determinar la concentración a la que se usaría el anticuerpo Cortisol huevo para el sistema, resultando lo siguiente:

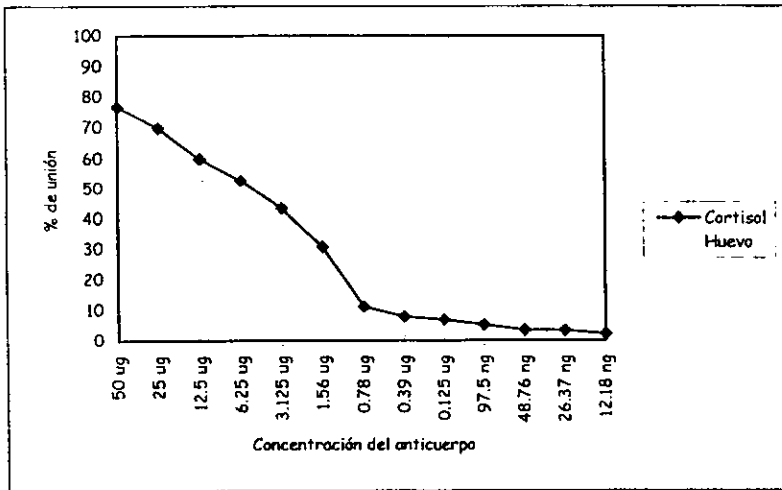


Figura 16: Inmunorreactividad del anticuerpo Cortisol huevo, libre de anticuerpos anti-BSA. La UNE fue de 4.7%.

Los resultados mostraron la unión B/Bo al 50% con una concentración de anticuerpo de 6.25 μ g.

g.2 Desarrollo de la curva estándar: Utilizando la concentración de anticuerpo de 6.25 μ g se realizaron cuatro curvas estándar con diferencia de una semana entre sí, obteniéndose los siguientes resultados:

Cuadro 30: Resultados de las curvas estándar del anticuerpo anti-cortisol huevo, colocando el anticuerpo a una concentración de 6.25 μ g/tubo

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	Promedio	Desv. est.	C.V. interensayo
intercepto	6.808	7.888	7.368	6.339	6.783	7.0	0.6	8.5
% Bo	43.7	44.3	44.0	49.7	46.6	45.7	2.5	5.5
Pendiente (m)	-0.978	-1.138	-1.073	-0.929	-0.975	-1.000	0.1	10
Coefficiente de correlación (r)	92.9	98.3	98.1	95.9	98.5	96.7	2.4	2.5
Dosis en pg/100 μ l al 80% de B/Bo	255.2	302.4	263.3	207.3	252.8	256.2	33.9	13.2
Dosis en pg/100 μ l al 50% de B/Bo	1052.9	1022.2	958.12	922.7	1047.1	1000.6	57.5	5.7

X UNE = 4.0%

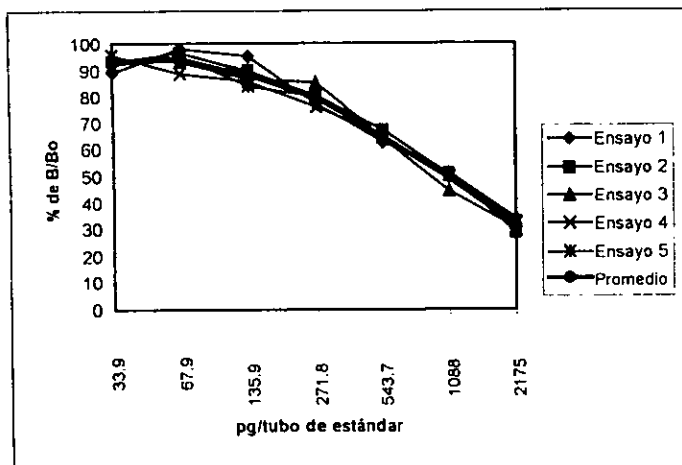


Figura 17: Curvas estándar del anticuerpo anti-cortisol huevo.

Con las curvas anteriores se calcularon los coeficientes de variación intraensayo y los porcentajes de recuperación.

Cuadro 31: Coeficientes de variación intraensayo de las curvas estándar dosis-respuesta y porcentaje de recuperación del anticuerpo anti-cortisol huevo

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	Recuperación
Estándar bajo (67.9pg)	7.0	2.9	3.0	0.4	0.4	122.2 %
Variación intraensayo Estándar medio (543.7pg)	7.5	1.5	2.6	2.6	5.9	72.31 %
Estándar alto (2175pg)	21.3	0.1	3.7	23.2	5.0	

Finalmente se determinó la repetibilidad del sistema de RIA desarrollado con los siguientes resultados: 2657.2pg/ml con una desviación estándar de 343.6pg/ml con un coeficiente de variación interensayo de 12.93%.

En resumen durante la validación de los sistemas de radioinmunoanálisis se obtuvieron los valores de los coeficientes de variación intraensayo que se

midieron en tres estándares alto (316.8 y 2175pg para testosterona y cortisol respectivamente), medio (39.6 y 543.7pg) y bajo (9.9 y 67.9pg). El resumen de los resultados se muestra en el cuadro 32.

Cuadro 32: Resumen de los resultados de los coeficientes de variación intraensayo para los anticuerpos anti-testosterona, anti-cortisol suero y anti-cortisol huevo

Estándar	Testosterona		Cortisol suero		Cortisol huevo	
	C.V.	Promedio	C.V.	Promedio	C.V.	Promedio
alto	0.9 a 10.7%	5.6%	0.3 a 14.5%	7.6%	0.1 a 23.2%	10.7%
medio	0.1 a 3.2%	1.4%	2.0 a 10.2%	6.4%	1.5 a 7.5%	4.0%
bajo	1.2 a 5.5%	2.8%	0.2 a 3.3%	1.3%	0.4 a 7.0%	2.7%

Rendimiento final de los anticuerpos:

El rendimiento de los anticuerpos manejándolos en forma de pools correspondió a 1260.83mg de proteína total para anti-testosterona en el suero de conejo, 1501.2mg para anti-cortisol en suero y 1578.2 mg para anti-cortisol en huevo.

De los anticuerpos anti-testosterona se requieren $0.78\mu\text{g}/500\mu\text{l}$ para obtener el 50% de unión a su correspondiente antigénico, mientras que para los anticuerpos anti-cortisol suero y anti-cortisol huevo se necesitan $3.125\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ y $6.25\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ respectivamente. Por lo tanto los anticuerpos obtenidos durante el presente trabajo sirven para trabajar 1.6×10^6 tubos de testosterona y 7.3×10^5 tubos de cortisol, de los cuales 4.8×10^5 se pueden trabajar con los anticuerpos anti-cortisol del suero y 2.5×10^5 con anti-cortisol del huevo.

Análisis estadístico:

Al analizar los resultados obtenidos en el presente trabajo se realizaron una serie de pruebas estadísticas y se utilizó como guía el libro *Bioestatistical Analysis* (Zar, 1996).

Para comparar los resultados obtenidos de la inmunorreactividad de los anticuerpos anti-cortisol obtenidos de ambas fuentes biológicas se comprobaron las dos suposiciones básicas: homoscedasticidad por prueba de F ($F=1.001$, $P=0.49$) y normalidad por la gráfica de papel probabilístico normal, donde se rechazó esta última. Por lo anterior se optó por realizar una prueba no paramétrica para comparar las inmunorreactividades, utilizándose la U de Mann-Whitney, en la que se comprobó que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de unión de las muestras de los anticuerpos anti-cortisol obtenidos de suero y de huevo ($U=465$, $Z=-1.33$, $P=0.183$).

Para determinar la especificidad de los anticuerpos obtenidos tanto contra testosterona como contra cortisol se compararon los resultados obtenidos entre los anticuerpos libres de anticuerpos anti-BSA y los anticuerpos con anticuerpos anti-BSA; los resultados entre las diferentes hormonas a las que se sometieron los anticuerpos y el efecto de la fuente biológica en el caso de los anticuerpos anti-cortisol, a continuación se muestran los resultados:

- En el caso de los anticuerpos anti-testosterona una vez comprobado que no existe normalidad (prueba de Shapiro & Wilk $P=0.000$) ni homoscedasticidad (prueba de Levene), se decidió realizar una prueba de análisis de varianza de Kruskal-Wallis para la mediana, comparando el efecto de la hormona contra

la que se sometieron los anticuerpos, encontrando que el promedio del porcentaje de unión de los anticuerpos anti-testosterona con la dihidrotestosterona es significativamente mayor que con el resto de las hormonas ($H(3, N=40)=18.556; P=0.0003$).

Finalmente se realizó la prueba de U de Mann-Whitney para determinar el efecto de la presencia o ausencia de los anticuerpos anti-BSA, encontrándose que la ausencia de anticuerpos anti-BSA resulta en un promedio del porcentaje de unión de los anticuerpos anti-testosterona con otras hormonas diferentes a la testosterona significativamente mayor que el de aquellos anticuerpos anti-testosterona con anticuerpos anti-BSA ($U=119.5(Z=-2.177); P=0.029$).

- Al comparar los anticuerpos anti-cortisol obtenidos de ambas fuentes biológicas se determinó la ausencia de normalidad (Prueba de Shapiro) así como la falta de homoscedasticidad (prueba de Levene). Con base en lo anterior se realizaron los siguientes análisis:
 - * En primer lugar se determinó el efecto de la hormona contra la que se sometieron los anticuerpos anti-cortisol utilizando la prueba de Kruskal-Wallis y se encontró que no existe evidencia estadísticamente significativa para asegurar que alguna de las hormonas se uniera en mayor proporción que las otras ($H(3, N=40)=3.556; P=0.3136$).
 - * En segundo lugar se analizó el efecto de la fuente biológica de la que provenían los anticuerpos por la prueba de Mann-Whitney, encontrándose que no existió evidencia suficiente para afirmar que los anticuerpos anti-cortisol suero se unieran en mayor proporción a las hormonas a las que

fueron sometidos que los anticuerpos anti-cortisol huevo ($U=176.5$ ($Z=-0.428$); $P=0.6687$).

- * Finalmente se realizó una prueba de Mann-Whitney para determinar el efecto de la presencia o ausencia de los anticuerpos anti-BSA, concluyéndose que no existe diferencia estadísticamente significativa entre la unión con otras hormonas de los anticuerpos anti-cortisol en presencia de anticuerpos anti-BSA y los anticuerpos sin anticuerpos anti-BSA ($U=147$ ($Z=-1.43$); $P=0.1517$).

V. DISCUSION:

El presente trabajo describe la obtención de anticuerpos anti-testosterona y anti-cortisol a partir de dos fuentes biológicas (suero de conejo y yema de huevo), su purificación y caracterización fisicoquímica e inmunológica, para el desarrollo del radioinmunoanálisis como método analítico de cuantificación hormonal.

Anticuerpos anti-testosterona:

El esquema de inmunización utilizado en conejos permitió la obtención adecuada de anticuerpos anti-testosterona; los resultados mostraron que los cinco animales utilizados presentaron títulos superiores al 30% de unión (entre el día 105 y el 119 de inoculación) a una dilución de trabajo de 1:4,000, correspondiente a una dilución final de 1:40,000. Tal como ha sido informado por otros autores (Vaitukaitis *et al.*, 1971; Montes *et al.*, 1994), existió variación individual en la respuesta a esquemas de inmunización, por lo que tres animales (números 1, 2 y 4) desarrollaron títulos más elevados y con mayor rapidez que los otros dos conejos (3 y 5).

Utilizando el mismo calendario de inmunización en conejos, Munro y Stabenfeldt (1984) reportaron haber obtenido un título de anticuerpos anti-progesterona en conejos del 30% de unión, el día 90 de inmunización, a una dilución de trabajo de 1:2500. La respuesta obtenida por ellos ocurrió entre quince y treinta días antes que lo obtenido en este trabajo, sin embargo, el título máximo obtenido por ellos fue inferior a lo informado en este trabajo,

tanto para testosterona como para cortisol. Montes *et al.* (1994) obtuvieron anticuerpos anti-progesterona de conejos en el día 105 de inmunización, con una unión aproximada del 55% en una dilución de trabajo de 1:500, que es mucho menor a la obtenida en este estudio. Tomando en cuenta lo anterior, se puede decir que el esquema de inmunización utilizado en conejos fue altamente exitoso, ya que permitió obtener altos títulos de anticuerpos en casi todos los animales (90%).

En el caso de la yema de huevo la situación fue diferente. Aunque esta substancia se ha utilizado exitosamente para la obtención de anticuerpos contra numerosos antígenos (Patterson *et al.*, 1962; Bauwens *et al.*, 1988; Gassmann *et al.*, 1990; Otani *et al.*, 1991; Schade *et al.*, 1991; Svendsen *et al.*, 1995, 1996), en el caso de la testosterona el uso de gallinas ponedoras como fuente biológica para la obtención de anticuerpos no fue efectiva, ya que cuatro de los cinco animales inmunizados no mostraron la presencia de anticuerpos en suero, aunque su producción de huevos fue constante. En contraste, la gallina 10 presentó un título en suero de 43% entre los días 77 y 119, a una dilución de trabajo de 1:1000. Sin embargo, la producción de huevos en este animal se interrumpió casi inmediatamente después de elevarse los títulos, por lo que solamente fue posible obtener tres huevos.

En las aves se ha descrito un pico preovulatorio de testosterona en plasma, el cual precede claramente al pico de LH, sugiriéndose que la testosterona es la responsable de iniciar el pico preovulatorio de LH y la ovulación (Sturkie, 1986). Además, se ha comprobado que los niveles plasmáticos de estrógenos en gallinas son mantenidos por la aromatización de

la testosterona en los pequeños folículos amarillos (<1 cm de diámetro) y en el estroma ovárico (Armstrong, 1984; Porter *et al.*, 1989). De esta manera, es muy probable que la exitosa inmunización contra testosterona haya sido la responsable de que se suspendiera la ovoposición, al neutralizarse la testosterona circulante responsable de generar el pico preovulatorio de LH, y al interferir con la fisiología normal del folículo.

Además de lo anterior, la prueba de inmunorreactividad de las IgY purificadas a partir de los tres huevos que fue posible obtener no mostró la presencia de anticuerpos anti-testosterona, aunque en ese momento el suero de la gallina mostraba títulos elevados de anticuerpos. Esto puede deberse a que los anticuerpos anti-testosterona pudieron haber quedado secuestrados en el folículo al unirse a la gran cantidad de testosterona presente en el tejido folicular. Las dos fracciones de tejido ovárico más ricas en testosterona son las que reciben el 50% del fluido sanguíneo que entra al ovario (Scanes *et al.*, 1982) y por lo tanto la mayor parte de los anticuerpos que intenten pasar a la yema del huevo deben pasar a través de ellas. Los tres huevos que se lograron obtener correspondieron a la segunda semana después de haberse logrado un título adecuado de anticuerpos en suero; estos folículos probablemente alcanzaron a ovular aún cuando los anticuerpos anti-testosterona se unieran a la testosterona presente y no pasaran a la yema dado que se ha comprobado que en los folículos yemosos mayores (folículos próximos a ovular) la producción de estrógenos no es dependiente de la disponibilidad de testosterona (Armstrong, 1984). Es decir, estos tres folículos ya tenían el desarrollo suficiente cuando se alcanzaron los títulos altos de anticuerpos, por lo que ya

no se bloqueó su maduración final. En cambio los folículos que en ese momento estaban menos desarrollados no pudieron seguir creciendo, por lo que se interrumpió la postura.

Para poder comprobar si en verdad sucedió el secuestro de los anticuerpos anti-testosterona en los folículos en crecimiento podría estudiarse la composición del líquido folicular de los mismos, una opción sería introducir testosterona marcada al líquido folicular de gallinas inmunizadas contra testosterona y determinar si hay formación del complejo antígeno-anticuerpo, otra opción sería realizar una prueba de wernern blot donde se sometiera líquido folicular de los folículos pequeños a anticuerpos anti-testosterona para ver si se forma la unión antígeno-anticuerpo.

La inmunorreactividad o titulación de cada uno de los anticuerpos anti-testosterona de conejo (IgG) libres de anti-albúmina, en presencia de su antígeno mostró una variabilidad en su respuesta al 50% unión, en valores que oscilaron entre 0.048 μ g y 1.56 μ g de proteína total. En el caso de la yema de huevo no fue posible la titulación de anticuerpos anti-testosterona de ninguna de las gallinas inmunizadas.

Las curvas estándar desarrolladas para cada uno de los anticuerpos anti-testosterona de conejo mostraron un comportamiento muy similar entre sí, con todas ellas se encontraron valores adecuados para la pendiente (-0.867), el coeficiente de correlación (98.6%) y el porcentaje de unión máxima del anticuerpo (%Bo) (31.5%).

Los anticuerpos anti-testosterona mostraron una reacción cruzada del 12.7% con la dihidrotestosterona, siendo ésta menor que lo informado por Prat

et al. (1986) y que lo indicado en el kit comercial de testosterona de doble anticuerpo de Diagnostic Products Corporation (DPC)¹, quienes informan un 40.7 y 34.0% respectivamente; sin embargo, los kits de RIA para testosterona de doble anticuerpo de ICN Biomedicals² y de testosterona total de DPC³ mostraron menor reacción cruzada (3.4 y 3.1% respectivamente). Es normal que la reactividad de anticuerpos contra testosterona sea alta con la dihidrotestosterona, ya que ambas moléculas son idénticas a excepción de un hidrógeno en el carbón 5 de esta última. Sin embargo, esta reactividad cruzada no debe de interferir con la medición de los niveles plasmáticos de testosterona, ya que la dihidrotestosterona se concentra en el citoplasma celular y en muy raras ocasiones se encuentra en cantidades significativas en el plasma (Fletcher, 1987).

Por otro lado, el promedio del porciento de unión de los anticuerpos anti-testosterona con androstenediona, estradiol y 17-hidroxiprogesterona fue de 1.05%, valores muy semejantes a lo reportado por los kits antes mencionados.

En cuanto a la presencia o ausencia de los anticuerpos anti-BSA se encontró que la ausencia de dichos anticuerpos resulta en un promedio del porcentaje de unión de los anticuerpos anti-testosterona con otras hormonas diferentes a la testosterona, significativamente mayor que el de aquellos anticuerpos anti-testosterona con anticuerpos anti-BSA ($U=119.5(Z=-2.177)$; $P=0.029$). Este punto debiera ser estudiado con mayor detenimiento y tal vez una explicación sería que al retirar los anticuerpos anti-BSA incluidos en la

¹ DPC Manual para la prueba de testosterona de doble anticuerpo.

² ICN Biomedicals, Inc. Manual para la prueba de testosterona de doble anticuerpo con ¹²⁵I.

³ DPC Manual para la prueba de testosterona total.

concentración total (μg de proteína) de anticuerpo que se agrega al sistema, se incrementa la cantidad real de anticuerpos anti-testosterona y por lo tanto el porcentaje de unión de los mismos se incrementa, lo cual no ocurre en el caso de los anticuerpos anti-cortisol porque de cualquier modo las hormonas contra las que fueron sometidos no debieran producir mayores uniones.

Con todo lo anterior se puede concluir que los anticuerpos anti-testosterona obtenidos del suero de conejos en este estudio son específicos para la testosterona.

La sensibilidad del sistema utilizando el pool de los anticuerpos anti-testosterona purificados a partir del suero de conejo fue de 39.6pg/ml , con un 90% de unión con respecto a la unión máxima. Dicha sensibilidad es idéntica a la del kit de testosterona total de DPC, menor que la del kit de testosterona de doble anticuerpo de DPC (24pg/ml) y mayor que la del kit de ICN (100pg/ml).

Las dosis al 50 y 80% en las curvas estándar para testosterona fueron 300.8pg/ml y 93pg/ml respectivamente, con coeficientes de variación interensayo de: 36 y 33.3%.

Cabe aclarar que los niveles sanguíneos de testosterona en diversas especies animales oscilan entre 2100 y 6700pg/ml (ver cuadro 1), por lo cual la sensibilidad del sistema con los anticuerpos generados en este trabajo es más que suficiente para medir los niveles plasmáticos de testosterona en diferentes especies animales.

La precisión encontrada con el RIA de testosterona desarrollado en el trabajo (C.V. interensayo del 12.05%) se encuentra por debajo del coeficiente

de variación máximo aceptado por la literatura (C.V. interensayo máximo del 15%, Libertun, 1980).

Los porcentajes de recuperación (90.5% y 95.8), correspondientes a la exactitud del sistema se encuentran dentro de los valores recomendados para sistemas de radioinmunoanálisis (Libertun, 1980).

En base a todo lo anterior, se concluye que con los anticuerpos anti-testosterona de conejo producidos en este trabajo fue posible desarrollar un sistema de radioinmunoanálisis específico, sensible y exacto para cuantificar muestras sanguíneas de testosterona en diversas especies animales, en este aspecto Montes *et al.* (1994), aunque trabajando con progesterona, también obtuvieron resultados favorables y produjeron anticuerpos de elevada afinidad, especificidad y buena sensibilidad pero con coeficientes de variación intra e interensayo un poco por arriba de los límites adecuados. En cambio, en el caso de la testosterona no fue posible utilizar la yema del huevo de gallinas inmunizadas como fuente de anticuerpos.

Anticuerpos anti-cortisol:

Solo cuatro de los cinco conejos utilizados para la obtención de anticuerpos anti-cortisol respondieron a la inmunización, a pesar de que en todos se siguió el mismo esquema de inmunización y titulación. El mayor título, a una dilución de trabajo de 1:4000, lo presentó el conejo E, con 48.3% (día 105), dos semanas antes que el resto de los animales. Estos resultados son mejores que los reportados por Munro y Stabenfeldt (1984) y Montes, *et al.* (1994) (diluciones de trabajo 1:2500 y 1:500 respectivamente).

De las cinco gallinas utilizadas para producir anticuerpos anti-cortisol, solamente tres respondieron, obteniéndose títulos promedio de entre 33 y 44% en una dilución de trabajo de 1:1000. Montes *et al.* (1994) utilizando el mismo calendario de inmunización y el mismo número de animales para producir anticuerpos anti-progesterona, también obtuvieron respuesta solamente en 3 animales. Al ver que el porcentaje de animales que respondieron al calendario de inmunización en ambos trabajos fue bajo podrían estudiarse nuevos esquemas de inmunización para obtener mejores respuestas.

Otani *et al.* (1991) reportaron en su estudio para producir anticuerpos anti- α s1-caseína a partir de la yema de huevo, que recuperaron los anticuerpos entre el día 65 y 70 de inmunización, siguiendo un calendario diferente al empleado en este estudio. La respuesta en nuestro estudio fue más lenta y requirió 45 días más para observar un título adecuado de anticuerpos. Sin embargo, el periodo durante el cual se pudieron coleccionar los huevos fue mayor en nuestro caso, ya que ellos utilizaron la producción de huevo durante solamente 5 días, mientras que en este estudio fue posible utilizar los huevos producidos en un periodo de 2 meses. En este punto cabe aclarar que la postura de las gallinas fue inferior a la esperada, no sabemos si esto pudo deberse a que los animales se estresaran durante el manejo de las tomas del suero para las titulaciones, o a que la inmunización con cortisol pudiera afectar de alguna manera la ovoposición. En este estudio no se realizaron inmunizaciones subsecuentes pero en futuros trabajos la producción de anticuerpos en el huevo puede optimizarse al someterse a los animales a refuerzos periódicos

para no disminuir el título de anticuerpos y a los manejos de pelechado rutinarios para mantenerlas en un segundo periodo de postura.

Durante la caracterización inmunológica de cada uno de los anticuerpos anti-cortisol generados en suero hubo gran uniformidad y en ambos casos se requirieron 1.56 μ g de proteína total para obtener el 50% de unión, mientras que los anticuerpos anti-cortisol obtenidos del huevo oscilaron entre 1.56 μ g y 6.25 μ g para obtener el mismo porcentaje de unión. Al comparar los resultados de los anticuerpos obtenidos de ambas fuentes biológicas, por la prueba de U de Mann-Whitney no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el porciento de unión de las muestras de los anticuerpos anti-cortisol obtenidos de suero y de huevo (U=468, Z=-1.33, P=0.183), por lo que puede decirse que los anticuerpos de ambas fuentes biológicas se comportaron de la misma forma.

Las curvas estándar obtenidas con los anticuerpos anti-cortisol producidos a partir del suero de diferentes animales presentaron un comportamiento muy similar, lo cual se observó en su pendiente (-0.935), coeficiente de correlación (99.4%) y porciento de unión máxima del anticuerpo (47.8%). En el caso de los anticuerpos obtenidos de la yema de huevo también hubo un comportamiento similar en las curvas obtenidas con anticuerpos de diferentes animales, con una pendiente promedio de -1.38, un coeficiente de correlación de 97.1% y un promedio del porcentaje de unión máxima de 37.7%.

Al comparar la especificidad de los anticuerpos anti-cortisol provenientes de ambas fuentes biológicas no se encontraron diferencias significativas, ya que como era de esperarse con ninguna de las dos fuentes se

produjeron uniones importantes a hormonas como la androstenediona, el estradiol, la 17-hidroxiprogesterona o la testosterona ($H(3,N=40)=3.556$; $P=0.13136$). Los valores de reacción cruzada obtenidos en el presente trabajo son similares a los reportados para el kit de cortisol de CIS bio international⁴. En este aspecto es importante señalar que las hormonas contra las que se probó la especificidad no son estructuralmente las más parecidas al cortisol y valdría la pena comparar dichos anticuerpos contra hormonas como el dihidrocortisol, la prednisolona y el 11-deoxicortisol entre otros.

Tampoco se encontró diferencia entre la fuente biológica de los anticuerpos anti-cortisol ($U=176.5(Z=-0.428)$; $P=0.6687$) ni en anticuerpos con la presencia o ausencia de los anticuerpos anti-BSA ($U=147(Z=-1.43)$; $P=0.1517$).

En cuanto al rendimiento total de anticuerpos anti-cortisol se observó que la yema de huevo fue un 5% más productiva que el suero de conejos (1578.2mg de proteína total vs. 1505.2mg). Los resultados de rendimiento de anticuerpos del presente trabajo, aunque en menor proporción, concuerdan con lo reportado por Montes *et al.* (1994) quienes obtuvieron 2.5 veces mayor producción de anticuerpos anti-progesterona en la yema de huevo de gallinas que en el suero de conejos, pero contradice lo descrito por Otani *et al.* (1991) quienes obtuvieron 10 veces menor producción de IgY's contra $\alpha s1$ -caseína cuando utilizaron como fuente el huevo de gallinas que cuando usaron el suero de conejo.

⁴ CIS bio international Manual para la prueba de cortisol "CORT-CT2 *in vitro* test".

Aunque en el presente trabajo la cantidad total de anticuerpos obtenidos a partir de la yema fue mayor a la obtenida a partir del suero, esta última fuente produjo anticuerpos para casi el doble de ensayos, lo que se debió a que se requiere usar menor cantidad de anticuerpos por tubo. De esta manera, los anticuerpos de suero de conejo son suficientes para 480,000 tubos, mientras que los de la yema del huevo alcanzan para 250,000 tubos. Estos resultados no concuerdan con lo reportado por Svendsen *et al.* (1996), quienes reportaron 5 a 10 veces mayor efectividad de anticuerpos contra IgG humana en la yema de huevo que en el suero de conejo. Una probable explicación a lo anterior puede deberse a la lejanía filogenética de las aves con los mamíferos, por lo cual la IgG humana resulta más antigénica para las gallinas que para los conejos (Russel, 1992 citado por Svendsen *et al.*, 1995). Este efecto no se observaría al inmunizar contra cortisol, ya que esta hormona es conservada en todas las especies.

La sensibilidad al 90% de unión en las curvas estándar para los pools de los anticuerpos anti-cortisol fue de 339pg/ml. Esta sensibilidad es mayor a la indicada en el kit de Cortisol de DPC⁵ (2000pg/ml) y a la del kit de CIS bio international (20000pg/ml). Sin embargo, para fines prácticos no es necesaria tanta sensibilidad, ya que los niveles plasmáticos de cortisol en las especies animales se encuentran en un rango de 3000 a 82800pg/ml (ver cuadro 2).

Las dosis al 50 y 80% en las curvas estándar fueron las siguientes: 4780pg/ml y 1280pg/ml respectivamente para cortisol suero y 10006pg/ml y 2562pg/ml para cortisol huevo; con lo cual se demuestra que los anticuerpos

⁵ DPC Manual para la prueba de cortisol.

generados en la yema del huevo tienen menor avidéz por su correspondiente antígeno que los del suero de conejos, ya que estos últimos detectan cantidades menores de cortisol (Libertun, 1980). Es interesante señalar que al determinar la misma muestra en ambos sistemas la variación fue poca (2480.4pg/ml con anticuerpos del suero contra 2657.2pg/ml con anticuerpos del huevo) con un coeficiente de variación interensayo dentro del rango aceptado para cortisol huevo y ligeramente por arriba en el caso de cortisol suero (Libertun, 1980). De esta manera, el RIA desarrollado con los anticuerpos de yema de huevo, aunque menos ávido, es más preciso que el de anticuerpos de suero de conejo. Esta mayor precisión es una gran ventaja, ya que como se mencionó anteriormente, la sensibilidad de los dos métodos es muy superior a la requerida.

Los porcentajes de recuperación calculados con un estándar medio y uno bajo fueron 59.5 y 92.6% para cortisol suero y 72.3 y 122.2% para cortisol huevo. En este caso fue mejor la recuperación con los anticuerpos anti-cortisol huevo, sin embargo en ambos casos el porcentaje de recuperación con el estándar bajo se encuentra por abajo de los límites recomendados para sistemas de radioinmunoanálisis (Libertun, 1980). La exactitud del sistema puede corregirse buscando modificar los tiempos de incubación de la prueba y finalmente al definirse el tiempo óptimo puede establecerse un factor de corrección para el cálculo de las concentraciones de la hormona en las muestras.

Por lo anterior se puede concluir que la yema de huevo es una buena alternativa para producir anticuerpos anti-cortisol destinados al desarrollo de

métodos de radioinmunoanálisis de cortisol con buena sensibilidad, especificidad y precisión.

Discusión general:

Al analizar en su conjunto los resultados obtenidos en el presente trabajo es posible encontrar tanto ventajas como desventajas en la utilización de anticuerpos purificados a partir de la yema de huevo de gallinas inmunizadas en lugar de utilizar los producidos tradicionalmente a partir del suero de conejos.

Durante el proceso de inmunización en ambas especies, utilizando el adyuvante completo de Freund, se vió que las lesiones macroscópicas ocasionadas en conejos no son observadas en las gallinas, resultados que concuerdan con lo reportado por Ermeling *et al.* (1992). Esto representa una ventaja desde el punto de vista ético y de bienestar del animal.

En el caso de las gallinas, pueden estudiarse otros esquemas de inmunización, ya que con el utilizado se obtuvieron títulos en suero considerablemente menores a los de los conejos y el porcentaje de animales que respondieron fue menor (60% para cortisol y 20% para testosterona).

Los anticuerpos obtenidos del suero de conejos inmunizados presentaron mayor avidéz por su antígeno que los obtenidos a partir de la yema de huevo, lo que permitió trabajar con mayores diluciones (dilución de trabajo 1:4,000 vs 1:1,000 respectivamente). Estos resultados coinciden con lo reportado por Svendsen *et al.* (1996), quienes obtuvieron 1.5 a 2.0 veces más alto título en suero de conejos que en gallinas al inmunizar contra IgG humana. Otani *et al.*

(1991) también reportaron en su estudio para producir anticuerpos anti- α s1-caseína mejor título en suero de conejos que en suero de gallinas y en la yema de huevo de las mismas.

Es interesante señalar que aún cuando se siguió el mismo esquema de inmunización en todos los animales, la respuesta entre ellos es variable en cuanto a porcentaje de unión (Bo) así como el tiempo de respuesta del animal, datos que confirman la observación de que los resultados obtenidos con la utilización de modelos biológicos, depende en mucho del propio individuo y no del experimentador (Garvey *et al.*, 1977).

La purificación de inmunoglobulinas IgG o IgY de cada antisuero o pool de yemas, mostró claramente que entre más se avanza en el proceso de purificación se obtiene un mayor grado de pureza, pero con un menor rendimiento de proteínas totales (cuadros 11 y 26). Los patrones electroforéticos en condiciones nativas (TRIS-PAGE) de cada suero o pool de yema y su correspondiente proceso de purificación muestran que la banda con menor movilidad electroforética, que corresponde a la IgG (Tizard, 1989) se incrementa en cada paso de purificación, al mismo tiempo que disminuyen el resto de las proteínas (fotografías 1 a 4).

La purificación lograda en el pool de yema de huevo gracias al empleo de la precipitación con sulfato de amonio fue buena y en la electroforesis no se observó la presencia de contaminantes como los reportados por Montes *et al.* (1994); lo anterior puede explicarse debido a que las posibles levitinas encontradas por Montes *et al.* se precipitan con sulfato de amonio a un 50% de saturación (Warner, 1954, citado por Patterson *et al.*, 1962), lo cual no ocurrió

en el presente estudio, ya que se trabajó solamente con un tercio de saturación de sulfato de amonio (35%).

Durante el proceso de adsorción de los anticuerpos anti-BSA, los resultados demostraron una disminución en la concentración de proteínas totales una vez concluido el procedimiento, lo que sugiere que este proceso elimina adecuadamente los anticuerpos generados contra la albúmina necesaria para la inducción de anticuerpos, coincidiendo con lo reportado por Munro y Stabenfeldt (1984).

Con todo lo anterior puede decirse que la yema de huevo es una efectiva fuente de anticuerpos anti-cortisol para el desarrollo de métodos de radioinmunoanálisis, la cual puede ser utilizada como una alternativa al suero de conejos inmunizados, con ventajas como la fácil colección de los anticuerpos a partir del huevo, en lugar del sangrado de los animales, disminuyendo el sufrimiento de los mismos, así como la reducción en las lesiones ocasionadas por el adyuvante completo de Freund. En cambio, la yema de huevo no es una alternativa útil para la producción de anticuerpos contra testosterona, ya que la inmunización contra esta hormona puede interferir en el proceso de ovoposición, por lo que no es posible obtener huevos con anticuerpos anti-testosterona.

VI. LITERATURA CITADA:

Abraham, G. and Garza, R. Radioimmunoassay of Steroids. In: Handbook of Radioimmunoassay. Edited by Guy E. Abraham. Ed. Morton K. Schwartz. 1977

Ambrosius, H. and Hodge, D.: Chicken Immunoglobulins. Vet. Immunol. Immunopathol. 17: 57-67, 1987

Akerström, B.; Brodin, T.; Reis, K. and Björck, L.: Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. J. of Immunol. 135: 2589-2592, 1985

Amyx, H.L.: Control of animal pain and distress in antibody production and infectious disease studies. J. Am. Vet. Assoc. 191: 1287-1293, 1987

Armstrong, D.G.: Ovarian aromatase activity in the domestic fowl (*gallus domesticus*). J. Endocr. 100: 81-86, 1984

Bauwens, R.; Devos, M.; Kint, J. and De Leenher, A.: Chicken egg yolk and rabbit serum compared as sources of antibody for radioimmunoassay of 1,25-Dihydroxyvitamin D in serum plasma. Clin. Chem. 34: 2153-2154, 1988

Bedolla, T.N.; Ulloa-Aguirre, A.; Landeros, V.J. y Pérez-Palacios, G.: Análisis de datos y control de calidad en el radioinmunoanálisis. I. Guía para la evaluación de resultados. Rev. Invest. Clin. 36: 179-192, 1984

Benson, H.N.; Brumfield, H.P. and Pomeroy, B.S.: Requirement of avian C1 for fixation of guinea pig complement by avian antibody-antigen complex. J. Immunol. 87: 63-68, 1961

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- Bolander, F.F.: Molecular Endocrinology. Academic Press Inc., USA, 1989
- Broderson, J.R.: A retrospective review of lessons associated with the use of Freund's adjuvant. Lab. Animal Sci. 39: 400-405, 1989
- Bosch, A.; Vantlen, H.; Brands, J. Schours, A. and VanWeemen, B.: Enzyme-immunoassay for hormones: preparation of tracer; comparison with Radioimmunoassay. In Immunoenzymatic Assay Techniques. Martinus Nijhoff Publishers. Londres. 1980
- Cooper, T.: The Tools of Biochemistry. John Wiley and Sons. New York, 1977
- Echternkamp, E.: Relationship between LH and cortisol in acutely stressed beef cows. Theriogenology. 22: 305-311, 1984
- Ermeling, B.; Steffen, E.; Fish, R. and Hook, R.: Evaluation of subcutaneous chambers as alternative to conventional methods of antibody production in chickens. Lab. Anim. Sci. 42: 402-407, 1992
- Fertel, R.; Yetiv, J.Z.; Coleman, M.A.; Schwarz, R.D.; Greenwald, J.E. and Bianchine, J.R.: Formation of antibodies to prostaglandins in the yolk chicken eggs. Biochemical and Biophysical Research Communications. 102: 1028-1033, 1981
- Fletcher, R.F.: Lecture Notes on Endocrinology, 4a. ed. Blackwell Scientific Publications. Gran Bretaña. 1987
- Garvey, J.; Cremer, N. and Sussdorf, D.: Ammonium sulfate precipitation. in Methods in Immunology. 3a. ed. Ed. W.A. Benjamin, Inc. 1977
- García, E.: Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. 3ª. ed. Offset Larios. México. 1981

Gassmann, M.; Thömmes, P.; Weiser, T. and Hübscher, U.: Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. FASEB Journal. 4: 2528-2532, 1990

Grant, J.K. and Reastall, G.H.: Clinical Biochemistry of Steroid Hormones. Ed. Elsevier. USA. 1983

Hafez, E.S.E.: Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 5a. ed. Ed. Interamericana. México. 1987

Harboe, N. and Inguld, A.: Immunization, isolation of immunoglobulins, estimation of antibody titre. Scand. J. Immunol. 2: (Suppl. 1) 161-164, 1973

Holycak, G.; Little, T.; Vernon, M.; McCollum, W. and Timoney, P.: Correlation between ultrasonographic findings and serum testosterone concentration in prepubertal and peripubertal colts. Med. Vet. Zootec. 46: 65-70, 1994

Hsu, W.H. y Crump, M.H.: Glándula Adrenal. En Endocrinología Veterinaria y Reproducción. Editado por McDonald, L. 4ª. ed. Ed. Interamericana. México. 1989

IAEA: Laboratory training manual on radioimmunoassay in animal reproduction. Technical reports series No. 233. International Atomic Energy Agency. Vienna, Austria. 1984

James, V.: Basic concepts of steroid radioimmunoassay. In: Gupta, D. Radioimmunoassay of Steroid Hormones. 2a.ed. Verlag Chemie. 1980

Kowalczyk, K.; Daiss, J.; Halpern, J. and Roth, T.: Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken. Immunology. 54: 755-762, 1985

Larsson, A. and Sjöquist, J.: Chicken antibodies: a tool to avoid false positive results by rheumatoid factor in the latex fixation tests. J. Immunol. Methods. 108: 205-210, 1988

Leslie, G.A. and Clem, L.W.: Pylogeny of immunoglobulin structure and function. III Immunoglobulins of the chicken. J. Exp. Med. 130: 1337-1352, 1969

Libertun, C.: Radioinmunoanálisis. Fundamentos y Aplicaciones. López Libreros Editores. Buenos Aires, Argentina. 1980

Lincoln, G. and Short, R.: Seasonal breeding: natures contraceptive. Recent Prog. Horm. Res. 36: 1-52, 1980

McDonnell, A. and Watson, E.: Three full sister mares with a stallion-like behavior and a high blood testosterone concentration. J. Equine Vet. Sci. 13: 220-222, 1993

Méndez, M.: Factores que afectan la presentación del estro inducido con un análogo de la prostaglandina F₂α en vacas Holstein. Tesis de Maestría. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, UNAM. México, 1995

Moberg, P.: Effects of enviroment and management stress on reproduction in the dairy cow. J. Dairy Sci. 59: 1618-1624, 1975

Moberg, P.: How behavioral stress disrupts the endocrine control of reproduction in domestic animals. J. Dairy Sci. 74: 304-311, 1991

Monder, C.; Sakai, R.; Miroff, Y.; Blanchard, D. and Blanchard, R.: Reciprocal changes in plasma corticosterone and testosterone in stressed male rats maintained in a visible burrow system: evidence for a mediating role of testicular 11β -hydroxysteroid dehydrogenase. Endocrinology. 134: 1193-1197, 1994

Montes, P.; Murcia, M. y Zarco, Q.: Producción de anticuerpos antiprogesterona a partir de yema de huevo de gallinas y del suero sanguíneo de conejos, para ser utilizados en radioinmunoanálisis. Vet. Méx. 25: 117-125, 1994

Morrow, D.: Current Therapy in Theriogenology. Saunders Co. Philadelphia, USA. 1986

Munro, C. and Stabenfeldt, G.: Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. J. Endocr. 101: 41-49, 1984

Naegele, W. and Drahovsky, M.: Production of steroid antisera in radioimmunoassay of steroid hormones. 2a. ed. Edited by Derek Gupta. Verlag Chemie. 1980

Nicoll, S.C. and Licht, P.: Evolutionary biology of prolactin and somatotropins. II. Electrophoretic comparison of tetrapod somatotropins. Gen. Comp. Endocrinol. 17: 490-507, 1971

Otani, H.; Matsumoto, K.; Saeki, A. and Hosono, A.: Comparative studies on properties of hen egg yolk IgY and rabbit serum IgG antibodies. Lebensm. Wiss. u. Technol. 24: 152-158, 1991

Patterson, R.; Youngner, J.L.; Weigle, W.O. and Dixon, F.J.: Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. J. Immunol. 89: 272- 278, 1962

Patterson, R.; Youngner, J.L.; Weigle, W.O. and Dixon, F.J.: The metabolism of serum proteins in the hen and chick and secretion of serum proteins by the ovary of the hen. The Journal of General Physiology. 45: 501-513, 1962b

Pérez, B. and Mateos, E.: Influence of photoperiod on the secretion of testosterone as a response to sexual stimulus in male goats. Theriogenology. 42: 127-135, 1994

Pineda, M.H.: Reproducción del Macho. En Endocrinología Veterinaria y Reproducción. Editado por McDonald, L. 4ª. ed. Ed. Interamericana. México. 1989

Porter, T.E.; Hargis, B.M.; Silsby, J.L. and El Halawani, M.E.: Diferential steroid production between theca interna and teca externa cells: a three-cell model for follicular steroidogenesis in avian species. Endocrinology. 125: 109-116, 1989

Prat, F.; Carrillo, M. y Mones, A.: R.I.A. de esteroides plasmáticos. Invest. Pesq. Barc. 50: 279-295. 1986.

Romanoff, A.L. and Romanoff, A.J.: The Avian Egg. John Wiley and Sons, Inc. New York, USA. 1949

Ronayne, E.; Enright, W. and Roche, J.: Effects of continuous administration of GnRH or a potent GnRH analogue on blood luteinizing hormone and testosterone concentrations in prepubertal bulls. Domestic Anim. Endocr. 10: 179-89, 1993

Rose, M.E.; Orlans, E. and Butteress, N.: Immunoglobuline classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. Eur. J. Immunol. 4: 521-526, 1974

Rose, M.E. and Orlans, E.: Immunoglobulins in the egg, embryo and young chick. Dev. Comp. Immunol. 5: 15-20, 1981

Scanes, C.G.; Mazelic, E.; Kavanagh, E.; Merrill, G. and Rabbi, J.: Distribution of blood flow in the ovary of the domestic fowl (*Gallus domesticus*) and changes after prostaglandin F₂ α treatment. J. Reprod. Fertil. 64: 227-231, 1982

Schade, R.; Pfister, C.; Halatsch, R. and Henklein, P.: Polyclonal IgY antibodies from chicken egg yolk: an alternative to the production of mammalian IgG type antibodies in rabbits. ATLA 19: 403-419, 1991

Sturkie, P.D.: Avian Physiology. 4th ed. Ed. Springer-Verlag, USA. 1986

Svendsen, L.; Crowley, A.; Ostergaard, H.; Stodulski, G. and Hau, J.: Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. Lab. Anim. Sci. 45: 89-93, 1995

Svendsen, L.; Crowley, A.; Stodulski, G. and Hau, J.: Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG. A comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. J. Immunol. Methods 191: 113-120, 1996

Stumpf, T.; Wolfe, M.; Robertson, M.; Kittok, R. and Kinder, J.: Season of the year influences concentration and pattern of gonadotropins and testosterone in circulation of the bovine male. Biol. of Reprod. 49: 1089-1095, 1993

Thompson, J.; Forrest, D.; Blanchard, T.; Bronson, A. and Lowes, N.: Ratio of serum concentration of testosterone and progesterone from yearling bulls with small testes. Theriogenology. 41: 1045-1052, 1994

Tizard, I.: Inmunología Veterinaria. Ed. Interamericana. 3ª. de México. 1989.

Vaitukaitis, J.; Robbins, B.; Nieschlag, E. and Ross, G.: A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. J. Clin. Endocr. 33: 988-991, 1971

Vanselow, B.A.: The application of adjuvants to veterinary medicine. Veterinary Bulletin. 57: 881-896, 1987

Wan, S.; Hennessy, D. and Cranwell, P.: Seasonal infertility, stress and adrenocortical responsiveness in pigs. Anim. Reprod. Sci. 34: 265-279, 1994

Yalow, R. and Berson, S.: Immunoassay of endogenous plasma insulin man. J. Clin. Invest. 39: 1157-1175, 1960

Zar, J.H.: Bioestatistical Analysis. 3ª. ed. Prentice Hall. New Jersey, U.S.A. 1996

Zarrow, M.X.; Yochim, J.M. and McCarty, J.L.: Experimental Endocrinology. Academic Press. USA, 1964

VII. APENDICE DE SOLUCIONES:

1. Amortiguador de Fosfatos salino 0.05 M (PBS):

NaH ₂ PO ₄	2.35g
Na ₂ HPO ₄	11.60g
NaCl.....	8.80g
Thimerosal.....	0.10g
H ₂ O desionizada.....	1000ml

Mezclar todo y ajustar pH a 7.2-7.4 con hidróxido de sodio (5.0 M). almacenar a 4°C hasta su utilización.

2. Hidróxido de Sodio 5.0 M (NaOH):

NaOH (PM 40).....	200g
H ₂ O desionizada.....	1000ml

Mezclar perfectamente y almacenar a temperatura ambiente.

3. Amortiguador de Fosfatos 0.05 M-Gelatina al 1% (PBS-G):

PBS.....	1000ml
Gelatina.....	1.0g

Mezclar perfectamente y almacenar a 4°C.

4. Carbón - Dextrán:

PBS-G.....	100ml
Dextrán.....	0.0625g
Carbón.....	0.625g

Disolver primero el Dextrán y al final el carbón. Guardar a 4°C.

5. Hormona tritiada:

a. Una vez purificada la hormona tritiada, se toma la cantidad necesaria para el desarrollo del sistema y se coloca en un vial de centelleo e inmediatamente después es evaporado el solvente con nitrógeno y la hormona es resuspendida en amortiguador de fosfatos (PBS-0.05M, pH 7.2-7.4) e incubada durante 20min en baño María a 37°C.

b. Para conocer la masa radioactiva aplicada en cada tubo de ensayo, colocar 100µl por vial (n=2) con 5ml de líquido de centelleo, agitar un minuto, limpiar el vial con alcohol y contar 1 minuto en contador Beta.

6..Líquido de Centelleo:

Etanol al 2%.....21ml
Liquifluor al 4.2%.....42ml
Tolueno al 93.7% (c.b.p.).....1000ml

7. Azida de Sodio al 0.1%:

Azida de Sodio.....0.1g
H2O desionizada.....100ml

8. Solución Saturada de Sulfato de Amonio al 100%:

(NH4)2SO4.....72g
H2O desionizada.....100ml

En la mitad del volumen final de H2O desionizada ir agregando poco a poco la sal del sulfato de amonio, agitar constantemente y agregar poco a poco el resto del agua.

9. Soluciones para Electroforesis TRIS-PAGE (Guardar a 4°C):

Acido Clorhídrico 1N (HCL-1N)

HCl.....8.25ml
H2O desionizada (c.b.p.).....100ml

Gel resolvedor:

• Solución A1:

HCl 1N.....24ml
TRIS.....18.5g
TEMED.....115µl
H2O desionizada (c.b.p.).....100ml
Ajustar a pH 9.4 con NaOH 5.0 M

• Solución A2 (7%):

Acrilamida.....28g
Bisacrilamida.....0.735g
H2O desionizada (c.b.p.).....100ml
Filtrar en papel Whatman no. 42

- Solución C:
 Persulfato de amonio.....140mg
 H2O desionizada.....100ml
 Cubrir el frasco con papel aluminio

Gel concentrador:

- Solución B:
 HCl 1N.....48.0ml
 TRIS.....6.0g
 TEMED.....460µl
 H2O desionizada (c.b.p.).....100ml
 Ajustar a pH 7.2 con NaOH 5.0 M

- Solución E:
 Riboflavina.....40mg
 H2O desionizada.....100ml
 Cubrir el frasco con papel aluminio

- Solución D:
 Acrilamida.....10.0g
 Bisacrilamida.....2.5g
 H2O desionizada (c.b.p.).....100ml
 Filtrar en papel Whatman no. 42

Amortiguador de Corrida:

- 1 x
 TRIS.....3.0g
 Glicina.....14.0g
 H2O desionizada.....100ml
 Ajustar a pH 8.3 con NaOH 5.0 M

Amortiguador de Muestra:

TRIS.....15mg
Glicina.....72.5mg
Azul de Bromofenol.....2.5mg
Glicerol.....500µl
H2O desionizada.....4.5ml
Cubrir el frasco con papel aluminio

Solución para teñir:

H2O desionizada.....45ml
Metanol.....45ml
Acido acético.....10ml
Azul de Comassie.....1g

Agregar el azul de Comassie al metanol y agitar, agregar el resto de las componentes y filtrar con filtro Watman no. 45. Conservar a temperatura ambiente.

Solución para desteñir (ácido acético al 5%):

Acido acético.....25ml
H2O desionizada (c.b.p.).....500ml

<u>Procedimiento</u>		
<u>GEL RESOLVEDOR</u>	<u>Proporción</u>	<u>Volumen</u>
Solución A1	1 parte	9ml
Solución A2	1 parte	9ml
Solución C	2 partes	18ml
<u>GEL CONCENTRADOR</u>		
Solución B	1 parte	1.5ml
Solución D	2 partes	3.0ml
Solución E	1 parte	1.5ml

10. Amortiguador de Boratos (BB):

Acido Bórico.....	150mg
Bórax.....	250mg
NaCl.....	4.5g
H2O desionizada.....	500ml

Mezclar perfectamente y almacenar a temperatura ambiente.

11. Solución de Albúmina Sérica Bovina (BSA) al 2 %:

BSA.....	40mg
H2O desionizada.....	2ml

Mezclar perfectamente y almacenar a temperatura ambiente.

VIII. LISTA DE CUADROS Y FIGURAS:

Cuadros:

1. Niveles de testosterona (ng/ml) en sangre sistémica.....	6
2. Concentraciones plasmáticas de Cortisol (ng/ml).....	8
3. Esquema de inmunización de los conejos.....	17
4. Metodología para la titulación de los anticuerpos.....	19
5. Metodología para la titulación del primer anticuerpo.....	24
6. Concentraciones de estándar utilizadas para las curvas estándar.....	25
7. Metodología para determinar la especificidad de los anticuerpos.....	26
8. Esquema de inmunización de las gallinas.....	29
9. Porciento de unión de los anticuerpos anti-testosterona en conejas.....	33
10. Porciento de unión de los anticuerpos anti-cortisol en conejas.....	33
11. Rendimiento obtenido durante los diferentes pasos de purificación de los sueros de conejo.....	36
12. Cuantificación de proteínas por D.O. 280nm, del anticuerpo anti-testosterona 1 (IgG) y diferentes concentraciones de BSA.....	38
13. Concentración de proteína total por Bradford, en 1ml de solución del anticuerpo anti-testosterona 1 (IgG) libre de los anticuerpos anti-BSA.....	38
14. Porciento de unión de BSA vs anti-testosterona (IgG) libre de anti-BSA.....	39
15. Concentración (proteína total) de anticuerpo anti-testosterona (IgG), que mostró el 50% de unión máxima (Bo) para cada antisuero.....	41
16. Resultados de las curvas estándar para los anticuerpos anti-testosterona (IgG).....	43
17. Resultados de las curvas estándar para los anticuerpos anti-cortisol (IgG).....	44
18. Porcentaje de unión de los anticuerpos anti-testosterona (IgG) en presencia de otras hormonas diferentes a la testosterona.....	45
19. Porcentaje de unión de los anticuerpos anti-cortisol (IgG) en presencia de otras hormonas diferentes al cortisol.....	45
20. Resultados de las curvas estándar del anticuerpo anti-testosterona.....	47
21. Resultados de las curvas estándar del anticuerpo anti-cortisol.....	48
22. Coeficiente de variación intraensayo de las curvas estándar dosis-respuesta y porciento de recuperación, de los anticuerpos anti-testosterona y anti-cortisol suero.....	49
23. Porciento de unión de los anticuerpos anti-testosterona en suero de gallinas, con una dilución de 1:1000.....	50

24. Porcentaje de unión de los anticuerpos anti-cortisol en suero de gallinas, con una dilución de 1:1000.....	50
25. Rendimiento en gramos de la yema de huevo después de la deslipidización.....	51
26. Rendimiento obtenido durante los pasos de purificación de la yema de huevo de gallina.....	52
27. Concentración de proteína que proporciona la unión del 50% con los anticuerpos anti-cortisol (IgY)	55
28. Resultados de las curvas estándar de los anticuerpos anti-cortisol (IgY).....	56
29. Porcentaje de unión de los anticuerpos anti-cortisol (IgY) contra otras hormonas diferentes al cortisol.....	57
30. Resultados de las curvas estándar del anticuerpo anti-cortisol huevo.....	58
31. Coeficiente de variación intraensayo de las curvas dosis-respuesta y porcentaje de recuperación del anticuerpo anti-cortisol huevo.....	59
32. Resumen de los resultados de los coeficientes de variación intraensayo para los anticuerpos anti-testosterona, anti-cortisol suero y anti-cortisol huevo.....	60

Figuras:

1. Cuentas por minuto obtenidas durante la purificación de la testosterona tritiada.....	34
2. Cuentas por minuto obtenidas durante la purificación del cortisol tritiado.....	34
3. Curva estándar del microensayo de proteínas totales, utilizando el patrón de referencia gammaglobulinas (IgG) de origen bovino (BIO-RAD).....	35
4. Inmunorreactividad del anticuerpo anti-testosterona 1 (IgG), libre de los anticuerpos anti-BSA.....	40
5. Inmunorreactividad de los anticuerpos anti-testosterona (IgG), libres de los anticuerpos anti-BSA.....	41
6. Inmunorreactividad de los anticuerpos anti-cortisol (IgG), libres de los anticuerpos anti-BSA.....	42
7. Curvas estándar de los anticuerpos anti-testosterona (IgG).....	43
8. Curvas estándar de los anticuerpos anti-cortisol (IgG).....	44
9. Inmunorreactividad de los anticuerpos Testosterona y Cortisol suero, libres de anticuerpos anti-BSA.....	46
10. Curvas estándar del anticuerpo anti-Testosterona.....	47
11. Curvas estándar del anticuerpo anti-Cortisol suero.....	48
12. Curva estándar del microensayo de proteínas totales, utilizando el patrón de referencia gammaglobulinas (IgG) de origen bovino (BIO-RAD).....	52

13. Inmunorreactividad de los anticuerpos anti-testosterona (IgY), libres de los anticuerpos anti-BSA.....	54
14. Inmunorreactividad de los anticuerpos anti-cortisol (IgY), libres de los anticuerpos anti-BSA.....	55
15. Curvas estándar de los anticuerpos anti-cortisol (IgY).....	56
16. Inmunorreactividad del anticuerpo anti-cortisol huevo, libre de los anticuerpos anti-BSA.....	57
17. Curvas estándar del anticuerpo anti-cortisol huevo.....	59

Fotografías:

1. Patrón electroforetico típico en condiciones nativas (TRIS-PAGE) de suero anti-testosterona.....	37
2. Patrón electroforético típico en condiciones nativas (TRIS-PAGE) de suero anti-cortisol.....	37
3. Patrón electroforético típico en condiciones nativas (TRIS-PAGE) de la yema de huevo anti-testosterona de la gallina 10.....	53
4. Patrón electroforético típico en condiciones nativas (TRIS-PAGE) de la yema de huevo anti-cortisol.....	53

Esquemas:

1. Metodología para la purificación de la hormona tritiada.....	18
2. Metodología para la purificación de los anticuerpos por precipitación con Sulfato de Amonio.....	20
3. Metodología para determinar la concentración adecuada de BSA para la adsorción de los anticuerpos anti-BSA.....	21
4. Metodología para la adsorción de los anticuerpos anti-BSA.....	22
5. Metodología para la deslipidización de la yema de huevo.....	31