

Producción de anticuerpos antiprogesterona a partir de la yema de huevo de gallinas y del suero sanguíneo de conejos, para ser utilizados en radioinmunoanálisis

Rubén C. Montes Pérez*, **
Clara Murcia Mejía*
Luis Zarco Quintero*

Resumen

Se indujo la producción de anticuerpos contra progesterona en gallinas Leghorn y conejos Nueva Zelanda, con el propósito de utilizarlos para establecer un Radioinmunoanálisis (RIA) para determinar progesterona. La extracción de anticuerpos de la yema del huevo de las gallinas inmunizadas se realizó con 2-propanol y acetona. Los anticuerpos del suero sanguíneo de conejo se extrajeron con solución de sulfato de amonio. Los anticuerpos de la yema del huevo mostraron elevada afinidad y especificidad hacia la progesterona. La sensibilidad del RIA establecido con estos anticuerpos fue de 0.27 ng/ml; los coeficientes de variabilidad intraensayo e interensayo fueron de 19.6 y 22.2%, respectivamente. Hubo una correlación de 0.94 entre los valores de progesterona determinados con un estuche comercial y los establecidos con los anticuerpos de la yema. Los anticuerpos obtenidos del suero de conejo también tuvieron elevada afinidad y especificidad hacia la progesterona. La sensibilidad de RIA que utilizó este anticuerpo fue de 0.23 ng/ml, el coeficiente de variabilidad intraensayo de 14.7% y el interensayo de 22.7%. Los valores de progesterona medidos con un estuche comercial y con el RIA establecido con los anticuerpos del conejo tuvieron una correlación de 0.96. Se concluye que la yema de huevo de gallinas inmunizadas es una fuente práctica de anticuerpos antiprogesterona de calidad comparable a la de los anticuerpos obtenidos a partir de suero sanguíneo de conejos. La producción de anticuerpos antiprogesterona extraídos de la yema del huevo de gallinas inmunizadas, fue 2.5 veces mayor que la obtenida del suero sanguíneo de conejos inmunizados contra el mismo antígeno.

Introducción

Actualmente, es usual el empleo de radioinmunoanálisis y del enzimo inmunoanálisis para cuantificar hormonas esteroides o peptídicas para seguir la actividad reproductiva de los animales domésticos.^{13, 27, 52}

Recibido para su publicación el 3 de noviembre de 1993

*Departamento de Reproducción. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. 04510, México, D.F.

**Departamento de Reproducción. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. Apdo. Postal 116-D, Mérida, Yuc.

Los componentes primarios de estas técnicas son tres: El anticuerpo, el trazador, y el antígeno no marcado o analito. Mediante la combinación de estos componentes, bajo condiciones fisicoquímicas controladas, se pueden cuantificar hormonas en muestras de suero, plasma sanguíneo, saliva o leche.¹

Para establecer la técnica es necesario disponer de los anticuerpos dirigidos contra la hormona que se pretende cuantificar, los cuales deben poseer alta afinidad, especificidad y disponibilidad.¹⁰ Hoy día, en México, la mayor parte de los anticuerpos utilizados para la medición hormonal se producen en cantidades limitadas en algunos institutos de investigación (por ejemplo, en el Instituto Nacional de Nutrición o el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM). Por otra parte, la adquisición de este biológico es limitada por el elevado costo que representa el adquirir estuches comerciales cuando hay que analizar cantidades relativamente grandes de muestras de animales, para observar por ejemplo la actividad ovárica.

Para la obtención de anticuerpos antiprogesterona generalmente se inmunizan conejos con diferentes dosis del inmunógeno, que van desde 15 µg por kg de peso corporal³ hasta 1 mg por animal.⁴⁷ Los anticuerpos así producidos se utilizan en forma cruda como antiseros. También pueden purificarse mediante técnicas de precipitación con sulfatos, separación por cromatografía de afinidad utilizando la proteína A, precipitación con polietilenglicol o rivanol, o las cromatografías de intercambio iónico.¹¹ También se han producido anticuerpos contra progesterona en borregos mediante la administración de progesterona 1 l alfa-hemisuccinato: albúmina sérica bovina.^{7, 27}

Una alternativa interesante para producir anticuerpos consiste en la inmunización de gallinas para aislar los anticuerpos a partir de la yema de huevo. Así, se han producido y aislado de la yema de huevo anticuerpos contra hormona luteinizante,⁴³ antígenos virales³⁶ y contra α -hemaglutinina humana.²¹ La ventaja de dicha técnica es que una vez inmunizada la gallina se cuenta con una fuente consistente de anticuerpos frescos durante todo el ciclo de postura del animal. Sin embargo, en la literatura no existen referencias sobre la producción de anticuerpos contra hormonas esteroides a partir de yema de huevo

Uno de los principales inconvenientes de las técnicas para extraer los anticuerpos de la yema del huevo es la abundante cantidad de lipoproteínas presentes en ésta.³⁸ Patterson *et al.*³⁴ y Malkinson,²⁶ informaron que el uso de éter-dicloruro de etileno hace posible extraer de manera eficiente las inmunoglobulinas de la yema. Posteriormente, Polson *et al.*³⁷ lograron extraer exitosamente las inmunoglobulinas con polietilenglicol y sulfato de amonio. Jensenius *et al.*²³ separaron gama globulinas de la yema de huevo con técnicas de precipitación con sulfato dextrán y baja fuerza iónica a pH neutro; recientemente, Bade y Stegemann⁵ informaron sobre la separación de gama globulinas a partir de yema mediante precipitación con isopropanol y acetona.

Es preciso contar con una fuente económica y práctica para la obtención de anticuerpos contra hormonas esteroides para su uso en radioinmunoanálisis. Luego, el presente trabajo tiene por objetivos: 1) Determinar las características inmunoquímicas de los anticuerpos contra progesterona, obtenidos a partir del suero de conejos inmunizados y los obtenidos a partir de la yema de huevo de gallinas inmunizadas, 2) Determinar la exactitud, precisión, especificidad y sensibilidad de los radioinmunoensayos establecidos con los anticuerpos correspondientes y 3) Determinar cuál de las fuentes probadas presenta mayor rendimiento de anticuerpos utilizables para el RIA.

Material y métodos

Se inició el calendario de inmunización en dos conejos Nueva Zelanda de seis semanas de edad mediante la aplicación subcutánea de 0.1 mg de progesterona conjugada con albúmina sérica bovina por medio de enlace 11- α hemisuccinato emulsificada con adyuvante incompleto de Freund durante las tres primeras aplicaciones, que se realizaron quincenalmente. En las aplicaciones mensuales posteriores, el adyuvante se sustituyó por completo de Freund. Para la producción de anticuerpos en yema de huevo se utilizaron cinco gallinas de estirpe Daling de 20 semanas de edad. En ellas se siguió el mismo calendario de inmunización usado con los conejos, utilizando el conjugado emulsificado en dosis de 0.5 mg, por vía intramuscular.

Para el seguimiento de la respuesta inmunológica se colectó una muestra sanguínea una semana después de cada refuerzo, para titular la aparición de anticuerpos en suero de acuerdo con la técnica empleada por la Agencia Internacional de Energía Atómica.²²

En cuanto a los conejos, en el momento en el que no se observó mayor aumento del título de anticuerpos, se procedió a obtener la mayor cantidad posible de sangre, de la cual fue separado el suero. La extracción de anticuerpos del suero sanguíneo de los conejos se realizó conforme a la técnica de Munro y Stabenfeldt.³⁰ El extracto de anticuerpos del conejo utilizados se envasó en tubos de ensayo y se almacenó a -25°C . Se midió la cantidad de proteínas presente en el extracto a través de la absorción a 280 nm.⁵⁰ En el caso de las

gallinas, a partir de que se obtuvieron los títulos máximos en suero sanguíneo, se colectaron los huevos durante 3 meses. Las yemas de todos los huevos se juntaron y se procedió a la extracción de los anticuerpos contenidos en la yema del huevo de las gallinas que presentaron el mayor título de anticuerpos séricos, para lo cual se utilizó la técnica de Bade y Stegemann,⁵ modificando la temperatura a 20°C en este trabajo. Se cuantificó la concentración proteínica en el extracto de anticuerpos mediante la técnica de absorción a 280 nm.¹¹ Tanto en los extractos de suero de conejo como en los de yema, se realizó una corrida electroforética en gel de poliacrilamida para detectar el grado de purificación de las inmunoglobulinas, según lo descrito por Gabriel.¹⁶

Ya preparados los extractos de anticuerpos, se procedió a establecer las condiciones de los radioinmunoensayos para cada uno de ellos, para lo cual se probaron simultáneamente diversas concentraciones de anticuerpos y trazador, para encontrar la combinación óptima en cuanto a sensibilidad y rendimiento.¹⁴ Para ello se usó como trazador progesterona conjugada con I-125. Una vez encontrada la combinación óptima se corrieron cinco curvas estándar, a partir de las cuales se calculó la media y el error estándar para cada una de las concentraciones del calibrador. Con dichos datos se construyó la curva estándar media con su envoltura de error. Se consideró la sensibilidad de los inmunoensayos como la dosis de progesterona obtenida a partir de una curva estándar media, cuando se sustraen dos errores estándar al porcentaje de unión de un calibrador que tienen 0.0 ng/ml de progesterona no radiactiva.²²

Para determinar la especificidad se realizaron pruebas de paralelismo y se calcularon las reacciones cruzadas con cortisol,¹⁷ α -hidroxiprogesterona,²⁰ α -hidroxiprogesterona,¹¹ desoxicortisol,¹¹ desoxicortisona y progesterona.²² Para la primera prueba se usó una muestra de suero bovino cuya concentración de progesterona era de 4.2 ng/ml, la cual fue sometida a diluciones dobles desde 1:2 hasta 1:16 estimándose las concentraciones de progesterona en cada dilución por medio de RIA que se estaba evaluando, las cuales se graficaron sobre la curva estándar. Las concentraciones de los esteroides utilizados para calcular las reacciones cruzadas fueron de 3.6×10^{-5} hasta 3.6 $\mu\text{g/ml}$. El porcentaje de reacción cruzada se estimó según el método descrito por la IAEA.²²

La precisión se calculó a partir de los coeficientes de variabilidad intraensayo e interensayo, utilizando una muestra de suero bovino cuya concentración de progesterona fue de 4.2 ng/ml, colocada por cuadruplicado en un mismo ensayo para determinar el primer coeficiente; para el segundo, se usaron las concentraciones de progesterona de la misma muestra analizada por duplicado en cuatro ensayos consecutivos.²²

Para determinar la exactitud de los inmunoensayos, se relacionaron las estimaciones de progesterona cuantificadas con un estuche comercial previamente validado⁴⁴ y las estimaciones hechas con los RIA instrumentados en este trabajo, mediante un análisis de regresión lineal simple.⁵¹

Una vez instrumentados los radioinmunoanálisis con los anticuerpos extraídos, se estimó la constante de afinidad de éstos, utilizando la gráfica de Scatchard.³¹ Los ensayos diseñados en este trabajo requieren la extracción de esteroides con éter de petróleo con bajo punto de ebullición.

Resultados

En la Figura 1 se muestran los porcentajes de unión del suero sanguíneo de los conejos a lo largo del tiempo

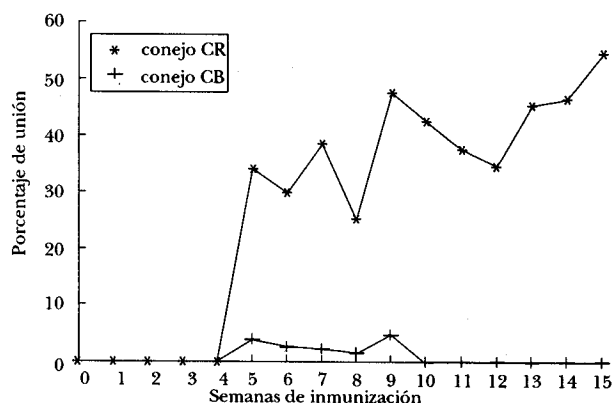


Figura 1. Título de anticuerpos contra progesterona en suero de conejos en diferentes momentos del calendario de inmunización

cuando se titularon contra progesterona radiactiva, usando una dilución fija de 1:500. Sólo el conejo CR produjo títulos adecuados, por lo que con el suero de este conejo se efectuó el resto del trabajo. El análisis electroforético del antisuero obtenido del conejo CR mostró una sola banda de proteínas (Figura 2). La cantidad de proteína cuantificada en el extracto fue de 2.95 mg/ml.

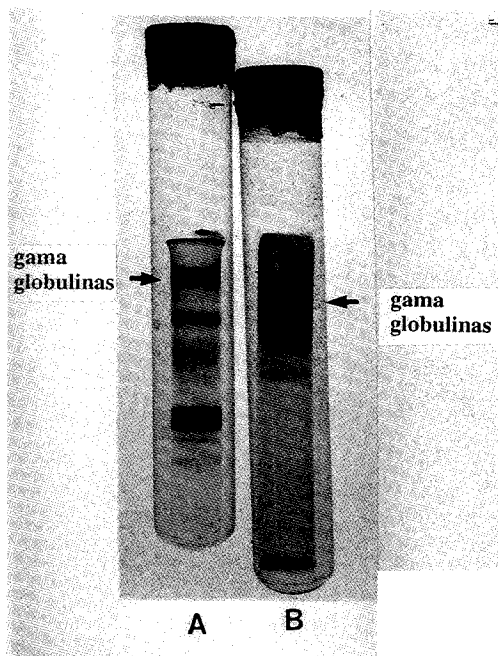


Figura 2. Fotografía de la electroforesis en gel de poliacrilámid del anticuerpo CR. La imagen A corresponde a la corrida electroforética de un suero normal de conejo y B a la del anticuerpo CR

En el Cuadro 1 se muestra la unión del anticuerpo CR al trazador en ausencia de progesterona, así como el desplazamiento del trazador por el estándar de progesterona al utilizar diversas combinaciones de dilución de anticuerpos CR y masa radiactiva. Se empleó la

Cuadro 1
UNION DEL TRAZADOR Y DESPLAZAMIENTO DE LA UNION POR UN ESTANDAR EMPLEANDO DOS NIVELES DE MASA RADIACTIVA Y DIFERENTES DILUCIONES DEL ANTICUERPO CR

Dilución del anticuerpo	Masa radiactiva	cpm EO	cpm E	%E/EO	Desplazamiento
1:1000	3500	2656	2700	—	—
	6500	4472	4270	95	5
1:2000	3500	2380	2161	90	10
	6500	4082	3151	77	23
1:4000	3500	2100	1575	75	25
	6500	3770	2525	67	33
1:8000	3500	1918	1208	63	37
	6500	3185	1560	68	32
1:15000	3500	1218	548	45	55

cpm EO: Cuentas por minuto contenidas en la fracción unida en ausencia de progesterona no marcada

cpm E: Cuentas por minuto contenidas en la fracción unida en presencia de un estándar que contiene 2.0 ng/ml de progesterona

%E/EO: Porcentaje de unión del trazador en presencia del estándar

Desplazamiento: Diferencia de unión entre el EO y el estándar

combinación de anticuerpo CR diluido 1:15,000 y 3,500 cuentas por minuto (cpm) de trazador para montar la curva de calibración, ya que fue la combinación en la que se produjo mayor desplazamiento (55%). En la Figura 3 se muestra la curva de calibración obtenida.

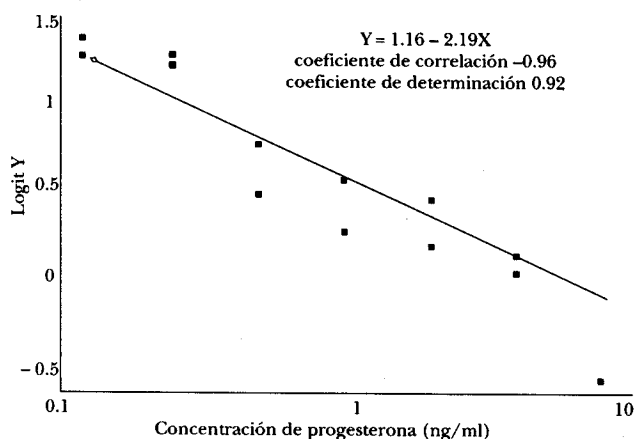


Figura 3. Curva de calibración utilizando el anticuerpo CR

La constante de afinidad estimada para el anticuerpo CR fue de $K = 1.06 \times 10^8$ l/Mol.

A partir de la curva de calibración con su envoltura de error se calculó la sensibilidad del RIA, de 0.23 ng/ml (Figura 4).

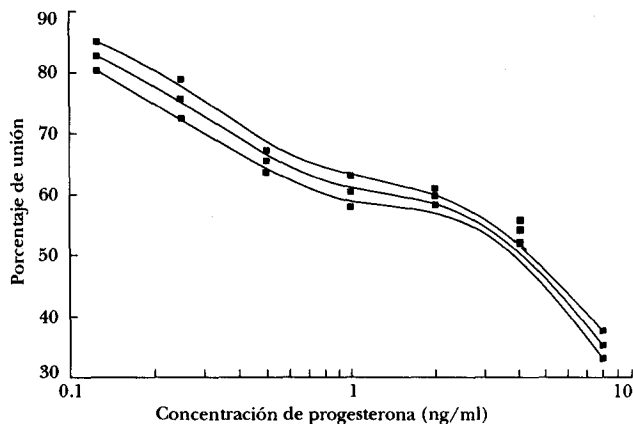


Figura 4. Curva estándar y envoltura de error del RIA que utiliza el anticuerpo del conejo CR

Los resultados de la 2 reacción cruzada del anticuerpo CR se observan en el Cuadro 2. En todos los casos la reacción cruzada fue menor que 2%.

El coeficiente de variación intraensayo fue de 14.7% y el coeficiente de variación interensayo de 22.7%. Los resultados obtenidos con el RIA establecido con los anticuerpos del conejo CR, tuvieron una correlación

Cuadro 2
REACCION CRUZADA DEL ANTICUERPO CR
CON DIVERSOS ESTEROIDES

Compuesto	% Reacción cruzada
17 α -hidroxiprogesterona	1.74
20 α -hidroxiprogesterona	0.14
Cortisol	0.02
11 Desoxicortisol	0.03
11 Desoxicorticosterona	1.67
Progesterona	100.00

significativa con los obtenidos al analizar las mismas muestras con un RIA comercial. La ecuación de regresión se representa en la Figura 5. El volumen total de anticuerpo colectado del conejo CR fue de 40 ml, por lo que si la dilución de trabajo del anticuerpo en el RIA es de 1:15,000, el volumen total del anticuerpo diluido será de 599,960 ml, aproximadamente 600 litros. En el

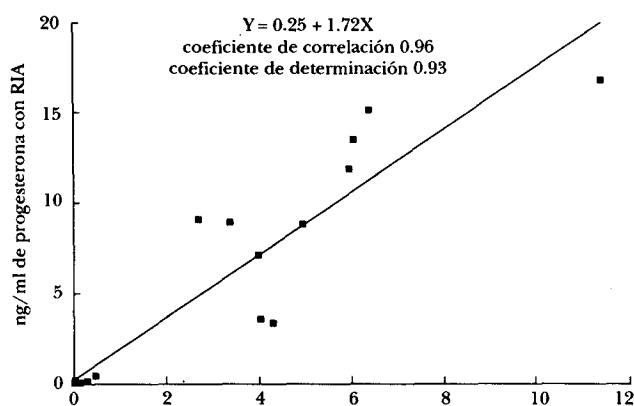


Figura 5. Ecuación de regresión entre estuche comercial y RIA con anticuerpo CR

RIA se utiliza 0.1 ml por tubo de la dilución de anticuerpo, por lo que los 600 l obtenidos alcanzarán para 6,000,000 de tubos.

La respuesta inmune en las gallinas apareció alrededor de un mes después de iniciada la inmunización (Figura 6). Se utilizaron los huevos de las gallinas 3, 4 y 5 para extraer los anticuerpos, y se mezclaron los extractos de las tres gallinas para obtener un extracto que se denominó IgY.

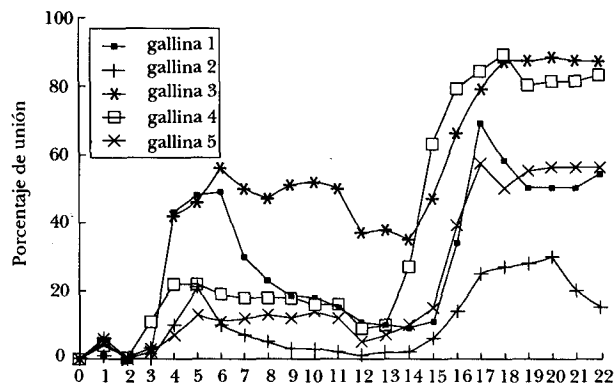


Figura 6. Título de anticuerpos contra progesterona en suero de gallinas en diferentes etapas del calendario de inmunización

El análisis electroforético en gel de poliacrilamida indicó la presencia de las mismas proteínas contaminantes encontradas en la yema completa, pero en menor proporción (Figura 7). El extracto en solución contenía 7.06 mg/ml de proteína. Los resultados de la inmunorreactividad del extracto IgY a diversas diluciones frente a diferentes masas radiactivas se observan en

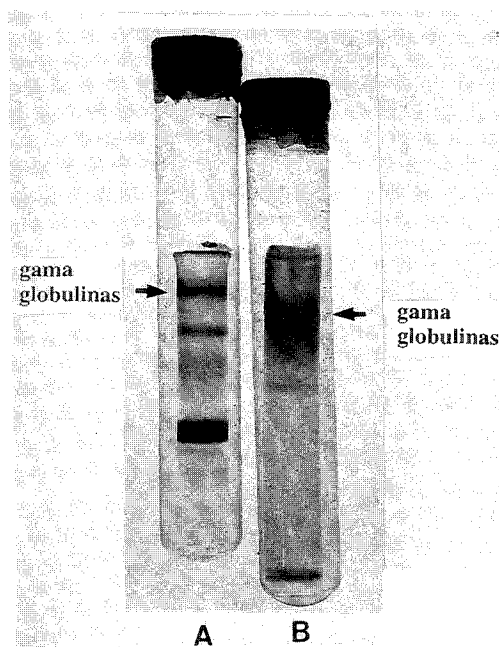


Figura 7. Fotografía de la electroforesis en gel de poliacrilamida del extracto de la yema de huevo (IgY). La imagen A corresponde a la corrida electroforética del anticuerpo IgY y B a la yema de huevo completa

el Cuadro 3. Se optó por la combinación de 4,500 cpm de masa radiactiva y anticuerpo en dilución 1:2,500. La curva de calibración tuvo un comportamiento lineal mediante transformación logit-log (Figura 8); el modelo de regresión es significativo ($P < 0.05$).

Cuadro 3

UNION DEL TRAZADOR Y DESPLAZAMIENTO DE LA UNION POR UN ESTANDAR EMPLEANDO DOS NIVELES DE MASA RADIATIVA Y DIFERENTES DILUCIONES DE IgY

Dilución del anticuerpo	Masa radiactiva	cpm EO	cpm E	%E/EO	
1:400	2500	1325	1166	88	12
	4500	1980	1881	95	5
1:700	2500	1150	1190	104	—
	4500	2025	1701	84	16
1:1000	2500	1000	800	80	20
	4500	2070	1656	80	20
1:2000	2500	900	774	86	14
	4500	1575	1244	79	21
1:4000	2500	750	755	—	—
	4500	1305	1265	97	3

cpm EO: Cuentas por minuto contenidas en la fracción unida en ausencia de progesterona no marcada

cpm E: Cuentas por minuto contenidas en la fracción unida en presencia de un estándar que contiene 2.0 ng/ml de progesterona no marcada

%E/EO: Porcentaje de unión del trazador en presencia del estándar
Desplazamiento: Diferencia del porcentaje de unión entre el EO y el estándar

La constante de afinidad estimada para el anticuerpo IgY fue de $K = 5.5 \times 10^8$ l/Mol.

Los porcentajes de reacción cruzada se muestran en el Cuadro 4; ninguno de los metabolitos probados tuvo una reacción cruzada con progesterona mayor a 7%. En la Figura 9 se muestra la prueba de paralelismo. El suero testigo diluido en serie doble demuestra un desplazamiento paralelo con respecto a la curva de calibración.

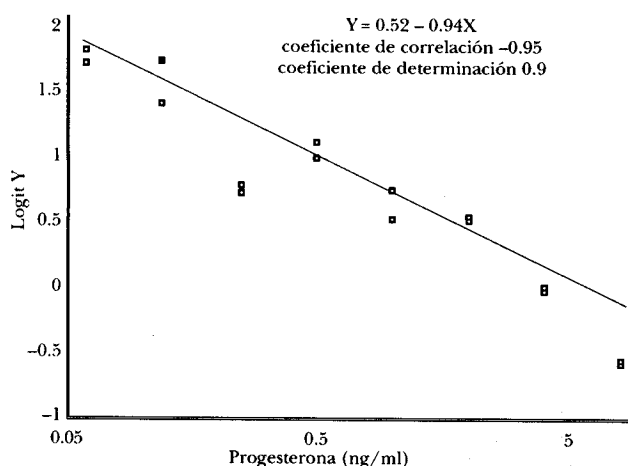


Figura 8. Desplazamiento de la curva estándar con IgY

Cuadro 4
REACCION CRUZADA DEL ANTICUERPO IgY CON DIVERSOS ESTEROIDES

Compuesto	% Reacción cruzada
17 α -hidroxiprogesterona	0.83
20 α -hidroxiprogesterona	0.65
Cortisol	menor que 0.01
11 Desoxicortisol	7.0
11 Desoxicorticosterona	6.0
Progesterona	100.0

La sensibilidad estimada del RIA con IgY a partir de una curva estándar con su envoltura de error fue de 0.27 ng/ml (Figura 10). Los coeficientes de variabilidad intraensayo e interensayo fueron de 19.6% y 22.2%, respectivamente. La comparación de niveles de progesterona entre un estuche comercial y el RIA

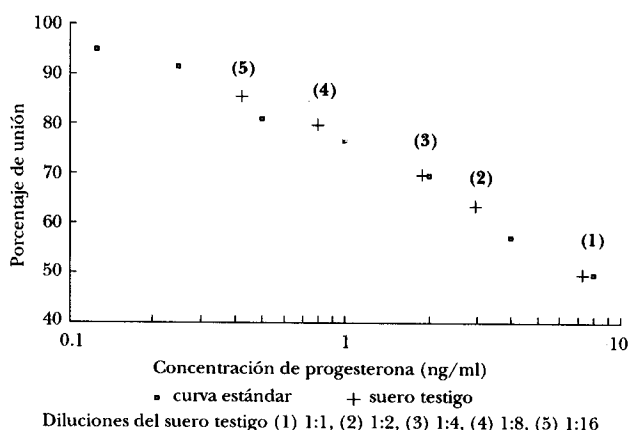


Figura 9. Prueba de paralelismo con el anticuerpo IgY.

instrumentado con el anticuerpo IgY muestra una relación lineal; los resultados y el modelo obtenido se muestran en la Figura 11. El volumen total del anticuerpo IgY resuspendido fue de 600 ml. La dilución de trabajo en el RIA fue de 1:2,500, por lo que el volumen total del anticuerpo diluido es de 1,500,000 ml, que corresponde a 1,500 litros, suficiente para procesar 15,000,000 de tubos.

Discusión

La respuesta inmune del conejo CR resultó igual a la registrada por otros autores.^{12,31} El anticuerpo obtenido presentó las características apropiadas para ser utilizado para el RIA: Elevada afinidad y especificidad, pero baja disponibilidad, ya que sólo se colectaron 40 ml.

La extracción de inmunoglobulinas del suero del conejo CR fue eficiente, pues sólo se observó una banda de proteínas en el gel de electroforesis, ubicada en la región de menor motilidad, correspondiente a las gama globulinas.⁴⁸

La estimación de la afinidad demostró que los anticuerpos poseen suficiente energía de enlace para

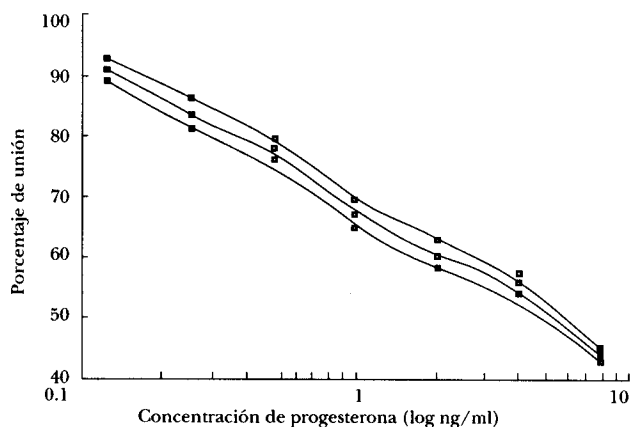


Figura 10. Curva estándar y envoltura de error del RIA que utiliza el anticuerpo IgY

conservar los complejos formados en la reacción inmunológica,¹⁵ a pesar de haberse utilizado un método de extracción que puede provocar interferencia debido a la presencia de otros componentes, como residuos del solvente de extracción.¹

La curva de calibración con el anticuerpo del conejo mostró que se ajusta estadísticamente a un modelo de regresión lineal, lo que permite la cuantificación de hormona en extractos lipídicos de muestras plasmáticas. Los valores de pendiente e intercepción determinados en este estudio son similares a los informados por la literatura.¹⁵ Los porcentajes de reacción cruzada que exhibió este anticuerpo están dentro de los valores registrados por otros autores como adecuados para emplearse en radioinmunoanálisis.^{3, 8, 25, 51} En todo caso, si hubiera hiperfunción adrenal, la cantidad de cortisol que debería alcanzarse para provocar sobreestimación de los valores de progesterona tendrían que ser 100 veces mayor al valor de los niveles fisiológicos normales.¹⁸

La sensibilidad obtenida en el RIA para progesterona con el anticuerpo CR sirve para medir progesterona plasmática en niveles fisiológicos normales, y es similar a la de la mayoría de los inmunoensayos para progesterona registrados en la literatura,^{20, 24, 40} aunque existen algunos cuya sensibilidad es mucho mejor,

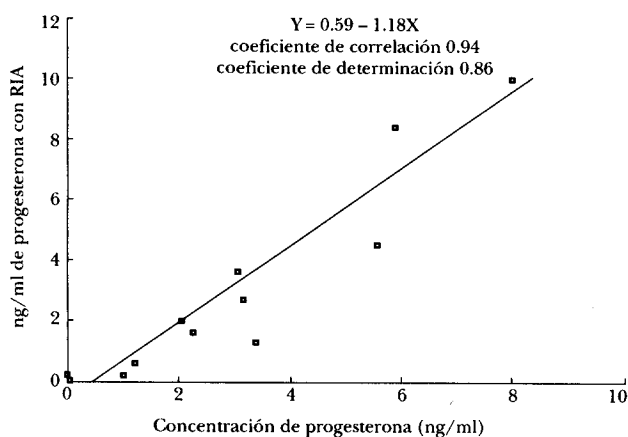


Figura 11. Ecuación de regresión entre estuche comercial y RIA con anticuerpo IgY

desde 1.2 picogramos por ml,²⁸ 30 picogramos por ml,^{2, 4} hasta valores relativamente elevados, como 400 picogramos por ml.⁸

La afinidad y precisión del inmunoensayo determina la sensibilidad del mismo. La sensibilidad obtenida en el presente trabajo se vio más afectada por los coeficientes de variación relativamente elevados que presentó este inmunoensayo, que por la afinidad de los anticuerpos. Se ha informado que al aumentar la dilución de la solución de anticuerpos aumenta la sensibilidad, debido a que los anticuerpos con mayor afinidad serán los que enlacen el antígeno.¹⁹ En este trabajo se exploraron altas diluciones, tanto como 1:8000 y 1:15,000, con las cuales se obtuvieron mayores diferencias en el desplazamiento, lo cual indica que estas diluciones son las apropiadas para establecer el RIA de progesterona.

En la literatura se registran coeficientes de variación intraensayo entre 3.8 y 19.1%, siendo menores para los sueros con valores arriba de 5.0 ng/ml. de progesterona, y mayores para valores iguales o cercanos a 1.0 ng/ml.^{9, 28, 45, 46} En cuanto a la variabilidad entre análisis, la literatura también registra un amplio rango, que va desde 4.2 hasta 23.0%, según la cantidad de progesterona presente en las muestras.^{17, 39} Los coeficientes de variación registrados en el presente trabajo son relativamente elevados. Sin embargo, están por debajo de los de algunos inmunoensayos comerciales utilizados para medir progesterona que también emplean extracción de esteroides, los cuales presentan variabilidad intraensayo de 33% y coeficientes de variabilidad interensayo de alrededor de 32%, aun cuando emplean sueros testigo con 5.99 y 6.53 ng/ml de progesterona.³⁵ Esto indica que el proceso de extracción de los esteroides a partir del plasma produce aumento en los coeficientes de variabilidad, debido a los efectos del blanco producidos por residuos de solventes orgánicos en los tubos de extracción en los que se concentran los esteroides para ser sometidos al RIA.²

Se encontró una elevada correlación entre las concentraciones estimadas con el RIA instrumentado con anticuerpos de conejo en el presente trabajo y las determinadas con un estuche comercial. Aunque variaron las cantidades absolutas de progesterona cuando se compararon las estimaciones obtenidas con uno y otro métodos, fueron sin embargo proporcionalmente iguales. En la literatura se indica que ensayos bastante exactos y precisos no muestran relación de identidad con otros métodos analíticos sumamente sensibles, exactos y precisos, como la cromatografía líquida de alta presión, o con otros inmunoensayos igualmente precisos y exactos.^{42, 51}

El comportamiento inmunológico de las gallinas fue más uniforme que el de los conejos, ya que mostraron niveles relativamente elevados de anticuerpos desde la respuesta primaria. En especial, las gallinas 1, 3 y 4 conservaron títulos elevados semanas después del último refuerzo. Esta permanencia de títulos elevados en gallinas ha sido registrada por otros investigadores para el caso de inmunógenos peptídicos.^{23, 37} Es probable

que la relativa lejanía filogenética que presentan las aves en relación con los mamíferos, facilite la rápida y efectiva producción de anticuerpos contra moléculas proteínicas pertenecientes a estos últimos, como es el caso de la albúmina sérica bovina contenida en el inmunógeno.⁶

Se ha informado que la producción de anticuerpos en gallinas puede ser provocada por la inoculación de dosis relativamente elevadas de inmunógeno,⁶ ya que la inducción de tolerancia inmunológica es tardía y se necesitan dosis que sobrepasan 5 g por kg de peso corporal.²⁹ Las dosis utilizadas en este trabajo están por debajo de aquellas que pudieran producir tolerancia, pero estimularían la inducción de anticuerpos de elevada afinidad.

Se ha informado que la cantidad de inmunoglobulinas presentes en la yema del huevo es igual o superior a la encontrada en el suero materno.²⁶ En este trabajo se encontró que la cantidad de proteínas presentes en la yema es elevada, superior a la cantidad de proteínas contenidas en el suero sanguíneo de rumiantes.⁴⁸ Esto fue confirmado en el análisis electroforético, el cual mostró la presencia de varias bandas de proteínas que no corresponden a las gamaglobulinas; probablemente sean fosfotilinas y lipovitelininas, las cuales forman parte de la yema completa,³⁸ dando como resultado el aumento en la cantidad proteínica en el extracto. Sin embargo, a pesar de haber contaminación con proteínas diferentes a las inmunoglobulinas en el extracto de la yema, éste fue capaz de unir progesterona con suficiente afinidad como para permitir la estabilidad de los complejos formados.

Es probable que la purificación adicional del anticuerpo extraído de la yema del huevo, utilizando métodos como la precipitación con sulfato de amonio o de sodio, polietilenglicol o rivanol, mejore el comportamiento inmunoquímico de los anticuerpos. De esta manera se eliminaría gran cantidad de proteínas que pueden afectar la formación y estabilidad de los complejos. Dicha situación se daría cuando las moléculas involucradas contienen grupos hidrofóbicos que interactúan con los sitios de unión del anticuerpo y los determinantes antigénicos a través de fuerzas de Van der Waals, hidrofóbicas, y enlaces de hidrógeno, que dirigen gran parte de la formación de los complejos.^{32, 33}

La curva estándar establecida con IgY mostró un bajo porcentaje de unión no específica; el modelo de regresión fue significativo, con un elevado valor de correlación también significativo.

El anticuerpo IgY presentó bajo nivel de reacción cruzada con metabolitos de esteroides, incluso menor a los registrados por otros autores cuando producen anticuerpos a partir de conejo.^{27, 41, 42, 49, 51} La prueba de paralelismo realizada con un suero testigo mostró un desplazamiento paralelo a la curva estándar; se confirma así que el extracto de anticuerpos es específico hacia la progesterona.

El RIA establecido con el anticuerpo IgY se encuentra dentro del rango esperado de sensibilidad, el cual

permite detectar valores fisiológicos, a pesar de haberse empleado un proceso inespecífico de separación de fracciones que por ser altamente dependiente del tiempo de la exposición al carbón, así como de la concentración del mismo, puede alterar significativamente la precisión y la sensibilidad.

Los coeficientes de variación de los ensayos instrumentados en este trabajo resultaron mayores a lo esperado. Sin embargo, es posible utilizarlos para la determinación semicuantitativa de progesterona, sobre todo en estados fisiológicos donde las concentraciones de esta hormona son elevadas, como por ejemplo para la detección de cuerpo lúteo funcional en rumiantes y porcinos. La aplicación de esta técnica para determinar niveles elevados de progesterona del día 21 al 23 postservicio en bovinos permitiría diagnosticar gestación temprana utilizando muestras de plasma o leche.^{42, 52}

El rendimiento de los anticuerpos extraídos de la yema del huevo fue dos veces mayor que el obtenido con anticuerpos de conejo, sin considerar la cantidad de yema que se perdió por descomposición durante el periodo de almacenamiento. Por otra parte, los valores de afinidad de ambos anticuerpos no difieren de modo notorio, ya que ambos se encuentran dentro del rango sugerido para ser usados en el RIA.³² Los valores de especificidad muestran que son cualitativamente iguales. Todo ello indica que los anticuerpos extraídos de la yema ofrecen una mejor alternativa de disponibilidad.

Abstract

Leghorn hens and New Zealand rabbits were immunized against progesterone, in order to produce antibodies to be used in radioimmunoassay (RIA). Acetone and 2-propanol were used to extract antibodies from the yolk of eggs of immunized hens. Antibody extraction from rabbit blood serum was done by precipitation with ammonium sulfate. Antibodies from egg yolk had high affinity and specificity for progesterone. Sensitivity of the RIA established with these antibodies, was 0.27 ng/ml, with intra- and interassay coefficients of variation of 19.6 and 22.2%, respectively. There was a significant correlation (0.94) between the progesterone concentrations determined with egg-yolk antibodies and those found using a commercial kit. Antibodies from rabbit serum had also high affinity and specificity for progesterone. RIA, established with these antibodies, had a sensitivity of 0.23 ng/ml, with intra- and interassay coefficients of variation of 14.7 and 22.7%, respectively. The correlation between progesterone values determined with rabbit antiserum and those obtained with a commercial kit was 0.96. The yield of antibodies from egg yolk was 2.5 times higher than that of rabbit serum. It is concluded, that egg yolk of immunized hens is a practical source of antiprogesterone antibodies with similar quality to that of antibodies extracted from the blood serum of immunized rabbits.

Literatura citada

1. Abraham, G.E.: Radioimmunoassay of steroids in biological materials. *Acta endocrinol.* 183 (Suppl.): 1-42 (1974).
2. Abraham, G.E.: Reliability criteria for steroid radioimmunoassay. In: Radioimmunoassay of Steroid Hormones. 2nd ed. Edited by: Gupta, D., 9-17. *Verlag Chemie*, Weinheim, Germany, 1980.
3. Abraham, G.E., Manlinos, F.S. and Garza, R.: Radioimmunoassay of steroids. In: Handbook of Radioimmunoassay. Edited by: Abraham, G.E., 591-656. *Marcel Dekker*, New York, 1977.
4. Arnstadt, K.I. and Cleere, W.F.: Enzyme-immunoassay for determination of progesterone in milk from cows. *J. Reprod. Fert.*, 62: 173-180 (1981).
5. Bade, H. and Stegemann, H.: Rapid method of extraction of antibodies from hen egg yolk. *J. Immunol. Methods*, 72: 421-426 (1984).
6. Benedict, A.A. and Yamaga, K.: Immunoglobulins and antibody production in avian species. In: Comparative Immunology. Edited by: Marchalonis, J.J., 335-375. *Blackwell Scientific Publications*, Oxford, U.K., 1976.
7. Bosu, W.T.K., Edqvist, L.E., Lindberg, P., Martinsson, K. and Johansson, E.D.B.: The effect of various dosages of lymestrenol on the plasma levels of oestrogens and progesterone during the menstrual cycle in the Rhesus monkey. *Contraception*, 13: 677-684 (1976).
8. Breuel, K.F., Spitzer, J.C., Gimenez, T., Henricks, D.M. and Gray, S.L.: Effect of holding time and temperature of bovine whole blood on concentrations of progesterone, estradiol-17 β and estrone in plasma and serum samples. *Theriogenology*, 30: 613-627 (1988).
9. Capparelli, R., Iannelli, D. and Bordin, A.: Use of monoclonal antibodies for radioimmunoassay of Water Buffalo milk progesterone. *J. Dairy Res.*, 54: 471-477 (1987).
10. Chard, T.: An introduction to radioimmunoassay and related techniques. In: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 6, Part II. 4th ed. Edited by: Burdon, R.H., Knippenberg van, P.H., 1-247. *Elsevier*, Amsterdam, 1990.
11. Cooper, T.G.: The Tools of Biochemistry. *John Wiley and Sons*, New York, 1977.
12. Dawson, E.C., Denissen, E.H.C. and Weemen van, B.K.: A simple and efficient method for raising steroid antibodies in rabbits. *Steroids*, 31: 357-366 (1978).
13. Diez, T., Manzo, M., Troconiz, J., Benacchio, N. and Verde, O.: Plasma progesterone levels during the estrous cycle of Holstein and Brahman cows. Carora type and cross-bred heifers. *Theriogenology*, 26: 419-431 (1986).
14. Dobson, H.: A Radioimmunoassay Laboratory Handbook: With Special Reference to Hormones of Reproduction. *Liverpool University Press*, Liverpool, U.K., 1983.
15. Feldman, H. and Rodbard, D.: Mathematical theory of radioimmunoassay. In: Principles of Competitive Protein-Binding Assays. Edited by: Odell, W.D., Daughadey, W.H., 158-203. *J.B. Lippincott*, Philadelphia, 1971.
16. Gabriel, O.: Analytical disc gel electrophoresis. In: Methods in Enzymology. Vol. 22. Edited by: Jakoby, W.B., 565-577. *Academic Press*, New York, 1971.
17. Grage, H., Narag, R., Damodaran, K., Anaokar, S. and Savjani, G.: Rapid solid-phase assay for progesterone. *Clin. Chem.*, 32: 1153 (1986).
18. Grant, J.K. and Reastall, G.H.: Clinical Biochemistry of Steroid Hormones. *Elsevier*, New York, 1983.
19. Griswold, W.R. and Nelson, D.P.: A rapid method for the determination of antibody affinity. *Immunol. Lett.*, 7: 229-232 (1984).
20. Hillbrand, F.W. and Elsaesser, F.: Concentrations of progesterone in the backfat of pigs during the oestrus and after ovariectomy. *J. Reprod. Fert.*, 69: 73-80 (1983).
21. Hiepe, F., Schwarz, G. and Hiepe, T.: Obtaining antibodies from the yolk of eggs of immunized hens. *Monatsch. Vet.*, 43: 19-20 (1988).
22. IAEA: Laboratory Training Manual of Radioimmunoassay in Animal Reproduction. Technical Reports Series No. 233. *International Atomic Energy Agency*, Vienna, Austria, 1984.
23. Jensenius, J.C., Andersen, I., Hau, J., Crone, M. and Koch, C.: Eggs: Conveniently packaged antibodies, methods for purification of yolk IgG. *J. Immunol. Methods*, 46: 63-68 (1981).
24. King, G.J., Walton, J.S. and Bellissimo, D.J.: Anestrus in pigs: Confirmation by a solid-phase RIA for progesterone and subsequent response to treatment. *Can. vet. J.*, 26: 2-6 (1985).
25. MacDonnel, H.F., Mullins, S. and Gordon, A.C.: Radioimmunoassay and enzymeimmunoassay of plasma progesterone as monitors of progesterone sponge treatment in ewes. *Theriogenology*, 30: 303-321 (1988).
26. Malkinson, M.: The transmission of passive immunity to *Escherichia coli* from mother in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Immunology*, 9: 311-317 (1965).
27. Marcus, G.J. and Hackett, A.J.: Use of enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of bovine serum and milk progesterone without extraction. *J. Dairy Sci.*, 69: 818-824 (1986).
28. Meisterling, E.M. and Dailey, R.A.: Use of concentration of progesterone and estradiol-17 β in milk in monitoring postpartum ovarian function in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 70: 2154-2161 (1987).
29. Mueller, A.P. and Wolfe, H.R.: Precipitin production following massive injection of BSA in adult chickens. *Int. Arch. Allergy*, 19: 321-325 (1961).
30. Munro, C. and Stabenfeldt, G.: Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J. Endocrinol.*, 101: 41-49 (1984).
31. Naegele, W. and Drahovsky, M.: Production of steroid antisera. In: Radioimmunoassay of Steroid Hormones. 2nd ed. Edited by: Gupta, D., 55-72. *Verlag Chemie*, Weinheim, Germany, 1980.
32. Nisonoff, A.: Introduction to Molecular Immunology. *Sinauer Associates*, Sunderland, Massachusetts, 1984.
33. Parker, W.C.H.: Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds. *Prentice-Hall*, Englewood Cliffs, New Jersey, 1976.
34. Patterson, R., Youngner, J.S., Weigle, W.O. and Dixon, F.J.: Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *J. Immunol.*, 89: 272-278 (1962).
35. Pilo, A., Zucchelli, G.C., Chiesa, M.R., Franceschetti, F. and Albertini, A.: Improvement in the quality of estradiol, progesterone and testosterone RIAs-evaluation of the between kit and within kit contributes to the overall variability. *Clin. Chem.*, 32: 1183 (1986).
36. Polson, A., Wechmar van, B.M. and Regenmortel van, H.V.: Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol. Commun.*, 9: 475-494 (1980).
37. Polson, A., Wechmar van, B.M. and Fazakerley, G.: Antibodies to proteins from yolk of immunized hens. *Immunol. Commun.*, 9: 495-514 (1980).
38. Powrie, W.D.: Chemistry of egg and egg products. In: Egg Science and Technology. 2nd ed. Edited by: Stadelman, W.J., Cotterill, O.J., 65-91. *AVI*, Westport, Connecticut, 1977.
39. Reimers, T.J., McCann, J.P. and Cowan, R.G.: Effects of storage times and temperature on T3, T4, LH, prolactin, insulin, cortisol and progesterone concentrations in blood samples from cows. *J. Anim. Sci.*, 57: 683-691 (1983).
40. Runnebaum, B.: Quantitative determination of progesterone by radioimmunoassay. In: Radioimmunoassay of Steroid Hormones. 2nd ed. Edited by: Gupta, D., 143-151. *Verlag Chemie*, Weinheim, Germany, 1980.
41. Sauer, M.J., Foulkes, J.A. and O'Neill, P.M.: Use of microtitre plate EIA for direct determination of progesterone in whole milk: Application of heterologous systems for improved sensitivity. *Br. vet. J.*, 138: 522-532 (1982).
42. Sauer, M.J., Foulkes, J.A., Worsfold, A. and Morris, B.A.: Use of progesterone 11-glucuronide-alkaline phosphatase conjugate in a sensitive microtitre-plate enzymeimmunoassay of progesterone in milk and its application to pregnancy testing in dairy cattle. *J. Reprod. Fert.*, 76: 375-391 (1986).
43. Spearow, J.L. and Trost, B.A.: Development of a sensitive enzyme linked immunosorbent assay for cattle, sheep, rat and mouse luteinizing hormone. *Biol. Reprod.*, 37: 595-605 (1987).
44. Srikandakumar, A., Ingraham, R.H., Ellsworth, M., Archbald, L.F., Liao, A. and Godke, R.A.: A comparison of a solid phase, no-extraction radioimmunoassay for progesterone with an extraction assay for monitoring luteal function in the mare, bitch and cow. *Theriogenology*, 26: 779-793 (1986).

45. Staigmiller, R.B., Short, R.E., Bellows, R.A. and Carr, J.B.: Effect of nutrition on response to exogenous FSH in beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 48: 1182-1190 (1979).
46. Tho, P.T., Scholer, J., Phung van, B., Harp, R.J. and McDonough, P.J.: Radioimmunoassay of progesterone in saliva: A simplified technique using 125 I-radioligand. *Fert. Steril.*, 43: 410-416 (1985).
47. Thorneycroft, I.H. and Stone, C.S.: Radioimmunoassay of serum progesterone in women receiving oral contraceptive steroids. *Contraception*, 5: 129-146 (1972).
48. Tizard, I.: Inmunología Veterinaria. 3a ed. *Interamericana*, México, D.F., 1989.
49. Wang, H.X., Stott, R.A., Thorpe, G.H.G., Kricka, L.J., Holder, G. and Rudd, B.T.: An enhanced chemiluminescence immunoassay for serum progesterone. *Steroids*, 44: 3294-3303 (1984).
50. Warburg, O. und Christian, W.: Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochemische*, 310: 384-421 (1941).
51. Wiel van de, D.F.M. and Koops, W.: Development and validation of an enzyme immunoassay for progesterone in bovine milk blood plasma. *Anim. Reprod. Sci.*, 10: 201-213 (1986).
52. Wimpy, T.H., Chang, C.F., Estergreen, V.L. and Hillers, J.K.: Milk progesterone enzyme immunoassay: Modifications and a field trial for pregnancy detection in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 69: 1115-1121 (1985).