

Desarrollo de un método de radioinmunoanálisis para cortisol, utilizando anticuerpos obtenidos y purificados de la yema de huevo de gallinas inmunizadas

Lucía Eliana Rangel Porta*

Gerardo Perera Marín*

Arantza Lassala Irueste*

Luis Alberto Zarco Quintero*

Abstract

Production of anti-cortisol antibodies was induced in laying hens. A conjugate of cortisol with bovine serum albumin (BSA) was mixed with Freund's complete adjuvant and physiological saline solution. One mg of the steroid was injected, followed by six more injections of 0.5 mg administered every two weeks. During egg collection, a serum titre average of 39.4% at a work dilution of 1:1000 was obtained. In order to develop a liquid phase radioimmunoassay (RIA), the anti-cortisol antibodies were recovered from the egg yolk, and then purified. Antibodies showed high specificity to cortisol, less than 0.1% cross-reaction with androstenedione, estradiol, 17-hydroxyprogesterone and testosterone with a sensitivity of 339 pg/ml. Accuracy of the RIA was appropriate (less than 15% interassay variation coefficient). The final yield was 594,552.63 mg of protein which can be used to process 95,000,000 tubes. It was concluded that the egg yolk of immunized hens is a good source of anti-cortisol antibodies, and that it can be used as an alternative to rabbit serum.

KEY WORDS: ANTIBODIES, EGG YOLK, CORTISOL, PURIFICATION.

Resumen

Se indujeron anticuerpos anticortisol en gallinas de postura, para lo cual se realizó una primera aplicación de 1 mg de cortisol conjugado con albúmina sérica bovina (BSA) y mezclada con adyuvante completo de Freund y solución salina fisiológica; posteriormente se realizaron seis aplicaciones más de 0.5 mg del mismo inmunógeno, los cuales se aplicaron a intervalos de 15 días. Se encontró en suero un título promedio, durante el periodo de colección del huevo, de 39.4% en una dilución de trabajo 1:1000. Los anticuerpos anticortisol se recuperaron y purificaron a partir de la yema de huevo y con ellos se desarrolló la prueba de radioinmunoanálisis (RIA) de fase líquida. Los anticuerpos de la yema mostraron alta especificidad para el cortisol respecto de otros esteroides (reacción cruzada menor a 0.1% con androstenediona, estradiol, 17-hidroxiprogesterona y testosterona), así como una sensibilidad de 339 pg/ml. La precisión del RIA fue adecuada (C.V. interensayo menor a 15%), al igual que la recuperación del sistema. El rendimiento fue de 594 552.63 mg de proteína, que sirven para procesar 95 000 000 tubos. Se concluye que la yema de huevo de gallinas inmunizadas es una efectiva fuente de anticuerpos anticortisol, la cual puede ser utilizada como una alternativa al suero de conejos.

PALABRAS CLAVE: ANTICUERPOS, YEMA DE HUEVO, CORTISOL, PURIFICACIÓN.

Recibido el 5 de noviembre de 1998 y aceptado el 22 de enero de 1999.

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

Introducción

La obtención de anticuerpos específicos y con alta afinidad para desarrollar métodos analíticos de cuantificación hormonal, como el radioinmunoanálisis (RIA), o el enzimoinmunoanálisis (ELISA), es un proceso costoso y complejo, por ello el interés de probar nuevas alternativas que permitan contar con una fuente práctica y económica de anticuerpos de alta calidad. 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.¹ Aunque casi siempre los anticuerpos utilizados para los ensayos inmunológicos 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.²⁻⁹

A partir de los años ochenta se han producido anticuerpos policlonales en la yema de huevo contra antígenos tales como virus, bacterias, parásitos y algunas proteínas y péptidos.⁷ Los anticuerpos de la yema del huevo (IgY) resultan adecuados para ensayos inmunológicos, ya que disminuyen la proporción de falsos positivos al no interactuar con las IgG de mamíferos,¹⁰ o con los receptores de fijación del complemento de los mamíferos.¹¹

El único trabajo que se ha publicado, hasta la fecha, sobre obtención y purificación de anticuerpos contra una hormona esteroide a partir de la yema de huevo de gallinas inmunizadas es el de Montes et al.,¹² en el cual obtuvieron un alto rendimiento de anticuerpos de buena calidad contra progesterona, con los cuales desarrollaron un método de RIA sensible y específico.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la producción y obtención de anticuerpos contra cortisol a partir de la yema de huevo de gallina, así como su utilización para el desarrollo y validación de un método de RIA.

Material y Métodos

La inmunización de las gallinas 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). La purificación de los anticuerpos y el desarrollo del RIA se llevó a cabo en el Laboratorio de Endocrinología del

Departamento de Reproducción de la FMVZ de la UNAM.

Inducción de anticuerpos

Se utilizaron 5 gallinas de postura de 6 meses de edad, de la raza Dalling, alojadas en jaulas independientes. Para la inmunización se utilizó un conjugado de cortisol con albúmina sérica bovina*, el cual se disolvió en 0.5 ml de solución salina fisiológica (SSF) y 0.5 ml de adyuvante completo de Freund**. La mezcla se realizó con agitación constante durante 4 min en frío. Los animales recibieron 1 mg del conjugado en la primera inmunización y 0.5 mg en las subsecuentes; en total, cada animal recibió siete inmunizaciones con intervalos de 15 días. La inmunización se realizó según las dosis y tiempos señalados por Montes et al.,¹² modificando los sitios de inoculación, al aplicar la mitad de la dosis en tres sitios del músculo pectoral y el resto en una aplicación subcutánea en el cuello.¹³

Para el seguimiento de la respuesta inmune de los animales, siete semanas después de la primera inmunización se comenzaron a obtener muestras sanguíneas cada semana; para ello se tomaron en cada ocasión 4 ml de sangre de la vena radial del ala. Las muestras de sangre se centrifugaron a 1500 g durante 15 min y los sueros obtenidos se congelaron a -4° C hasta su utilización. Para las pruebas de titulación se utilizó hormona marcada***, previamente purificada en una columna cromatográfica (0.75 x 28 cm), empacada con Sephadex-LH-20† y eluida con benceno-metanol (85:15), con un flujo de 30 ml/h. Se colocó una concentración constante (8 000 cpm) de la hormona marcada purificada con diferentes diluciones de suero (1:1 hasta 1:4000) incubándolos a 4°C durante 24 h¹⁴. La separación del complejo antígeno anticuerpo se llevó a cabo con carbón-dextrán y centrifugación a 1500 g. El sobrenadante se colocó en viales con líquido de centelleo‡, y se contó durante 1 min en el contador de centelleo‡.

La producción diaria de huevo se identificó y se almacenó a 4° C, con el propósito de utilizar posteriormente únicamente los huevos obtenidos una semana después de que los animales presentaron un nivel sérico de 30% de unión a la hormona marcada, y hasta una semana después de que dicho título disminuyera.^{3,15}

Purificación y caracterización fisicoquímica de anticuerpos

Las yemas de los huevos seleccionados fueron sometidas al proceso de deslipidización descrito por Montes et al.,¹² posteriormente se resuspendieron 10 g de los polvos libres de lípidos de cada gallina en 75 ml de amortiguador de fosfatos salino (PBS 0.05 M, pH 7.4), manteniéndose en agitación durante 2 h a 4° C, para posteriormente ser centrifugados a 10 000 g durante 15 min; el sobrenadante se conservó en refrigeración y el precipitado se resuspendió nuevamente en el mismo volumen, manteniéndose en agitación durante 18 h a

* Hidrocortisona 3-(0-carboximetil)oxima-BSA, Sigma, número de catálogo H-2384.

** Adyuvante completo de Freund, Sigma, número de catálogo F-5881.

*** [1,2,6,7-3H]cortisol, con actividad específica de 63.0 Ci/mmol. Amersham, número de catálogo TRK409.

† Sephadex-LH-20, Pharmacia Biotech, número de catálogo 17-0090-10.

‡ Ecolite, ICN Farmacia, S.A. de C.V., número de catálogo 882475.

§ TRI-CARB, 4000 series. Liquid Scintillation System.

4° C; al término de este tiempo se centrifugó a 10 000 g durante 15 min, volviéndose a separar el sobrenadante y juntándose con el del día anterior; el precipitado se descartó.

Las inmunoglobulinas de la yema (IgY) fueron aisladas a partir del sobrenadante, utilizando el procedimiento de precipitaciones fraccionadas con una solución saturada de sulfato de amonio hasta una concentración final de un tercio de saturación.¹⁶ La movilidad relativa de las proteínas obtenidas durante la precipitación fraccionada de sulfato de amonio se determinó en una electroforesis en tubo en geles de poliacrilamida al 7%, en condiciones nativas (TRIS-PAGE), de acuerdo a lo descrito por Nicoll y Licht.¹⁷ Los geles se tiñeron con azul brillante de Comassie al 0.5% y se destiñieron con una solución de ácido acético al 5% durante 24 horas.

Las inmunoglobulinas generadas contra albúmina sérica bovina (IgY anti-BSA), que pueden interferir en el pegado específico de los anticuerpos contra la hormona de interés, se eliminaron del precipitado final, obtenido a partir de la precipitación con sulfato de amonio, mediante la metodología descrita por Munro y Stabenfeldt,¹⁸ utilizando una solución al 0.02% de BSA. La determinación de proteínas totales en cada paso de purificación se realizó por triplicado, según el método de Bradford, utilizando como estándar a la gammaglobulina bovina****.

La especificidad de los anticuerpos se midió en un ensayo de radioinmunoanálisis utilizando las siguientes hormonas: androstenediona, es tradiol, 17-hidroxiprogesterona y testosterona. El ensayo se realizó por cuadruplicado para cada anticuerpo.

Una vez conocido el comportamiento de los anticuerpos purificados de cada gallina, y viendo que sus diferencias no eran relevantes, se procedió a la validación del sistema, utilizando una mezcla de 200 μg de proteína de cada uno de los anticuerpos generados.

Desarrollo del radioinmunoanálisis

La titulación de la mezcla de anticuerpos purificados se realizó por medio de una prueba de inmunorreactividad en fase líquida, con ese fin se colocaron diferentes concentraciones de anticuerpo purificado (desde 12.5 ng hasta 50 μg de proteína) en un volumen de 100 μl de PBS-G, con una concentración constante de hormona marcada (8000 cpm).¹⁴ Con lo anterior, se determinó la concentración de anticuerpo necesaria para obtener 50% de unión con respecto a la unión máxima (B/Bo); con dicha concentración de anticuerpos se elaboraron las curvas de desplazamiento ($n=5$), utilizando el estándar de cortisol***** de la Organización Mundial de la Salud y manejándolo según las recomendaciones de dicha

organización, utilizándolo en diluciones seriadas desde 16.9 hasta 2175 pg/100 μl. Los resultados se linealizaron para su análisis por la transformación logit-log.¹⁹ Se calculó la repetibilidad del sistema, para obtener los valores del coeficiente de variación intra e interensayo a las dosis de 20%, 50% y 80% de la curva estándar. Se determinó la cantidad mínima detectable del sistema en valores del 90% de la unión máxima, que corresponde a la sensibilidad del mismo.

Finalmente, con el propósito de conocer la precisión del sistema, se incluyeron en repetidas ocasiones muestras de suero a las que previamente se les añadieron concentraciones conocidas de cortisol, para determinar el porcentaje de recuperación de las mismas.

Resultados

Inducción de anticuerpos

De los animales inmunizados ($n=5$), solamente 60% respondieron al tratamiento con elevaciones de los títulos de anticuerpos en suero. De la gallina G, se colectaron 20 huevos entre los días 112 y 168; de la gallina H, 60 huevos entre los días 112 y 189; mientras que la gallina J produjo 60 huevos entre el día 112 y el 189. Los huevos se manejaron como lotes de acuerdo con el animal del que provenían y se nombraron según la denominación original de los animales (cortisol G, H o J).

Purificación de anticuerpos

De la deslipidización de las yemas de huevo se obtuvieron polvos libres de lípidos, cuyo rendimiento fue de 32.45 g, 175.76 g y 120.25 g para las gallinas G, H y J, respectivamente.

El proceso de purificación con precipitaciones fraccionadas del sulfato de amonio saturado permitió obtener tres fracciones de cada suero, las cuales correspondieron a: primer. sobrenadante, segundo sobrenadante y precipitado final o IgY.

Durante el proceso de adsorción de los anticuerpos anti-BSA, los resultados demostraron una disminución en la densidad óptica a 280 nm, lo que sugiere que este proceso elimina adecuadamente los anticuerpos generados contra la albúmina necesaria para la inducción de anticuerpos, coincidiendo con lo informado por Munro y Stabenfeldt.¹⁸

Para la determinación de las proteínas totales, los resultados de la curva de referencia por el micrométodo fueron los siguientes: coeficiente de correlación de 0.997, pendiente de 0.030 y ordenada en el origen de 0.032; por lo tanto, $y = 0.030x + 0.032$.

Una vez desarrollado el sistema de cuantificación de proteínas, se procedió a la determinación en las muestras problema, mostrándose en el Cuadro 1 el rendimiento obtenido en el primer sobrenadante, segundo sobrenadante y precipitado final de cada suero.

**** Gammaglobulina bovina, Standard-Y, BIO-RAD.

***** Cortisol estándar lote número K079510 (220nM/L), Organización Mundial de la Salud.

Cuadro 1

RENDIMIENTO OBTENIDO DURANTE LOS DIFERENTES PASOS DE PURIFICACIÓN DE LOS SUEROS DE CONEJO

Nombre del producto	Peso total del polvo (mg)	[prot]/mg polvo (mg)	[prot]/total (mg)
Primer sobrenadante anticortisol g		566	
Segundo sobrenadante anticortisol g		788	
Precipitado final anticortisol g	32 450	742	24 077.90
Primer sobrenadante anticortisol h		723	
Segundo sobrenadante anticortisol h		648	
Precipitado final anticortisol h	175 760	289	50 794.64
Primer sobrenadante anticortisol j		773	
Segundo sobrenadante anticortisol j		762	
Precipitado final anticortisol j	120 250	520	62 530.00

[]= concentración; prot = proteína.

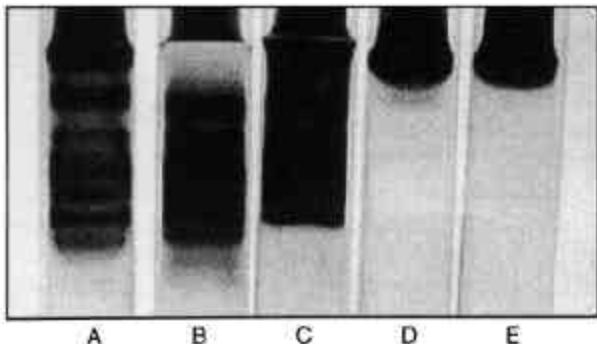


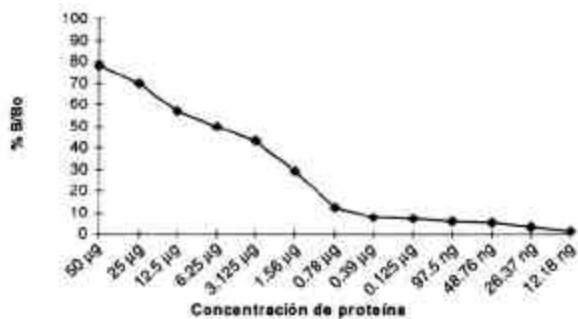
Figura 1. Patrón electroforético típico en condiciones nativas (TRIS-PAGE) de la yema de huevo anti-cortisol (IgY). La concentración de proteína total por tubo fue de 50 µg. A) corresponde a la yema de huevo antes de precipitar con S.S.A.; B) primer sobrenadante; C) segundo sobrenadante; D) precipitado final; E) IgG de referencia.

Las pruebas de especificidad realizadas a los anticuerpos mostraron porcentajes de unión contra las hormonas probadas en un rango de 0.0% a 2.8%, como puede observarse en el Cuadro 2.

Desarrollo del radioinmunoanálisis

La Figura 2 muestra los resultados de la inmunorreactividad de la mezcla de anticuerpos, donde 50% de unión con respecto al máximo se obtuvo cuando se añadieron 6.25 mg de proteína por tubo.

Los resultados de las curvas estándar se expresan en el Cuadro 3 y los coeficientes de variación intraensayo, así como los porcentajes de recuperación se muestran en el Cuadro 4.



Cuadro 2**REACCIÓN CRUZADA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-CORTISOL (IGY) CON OTRAS HORMONAS**

Anticuerpo	Androstenediona	Estradiol	17-hidroxi-progesterona	Testosterona
Cortisol G	0.3	2.0	0.7	0.1
Cortisol H	0.3	2.5	0.3	1.6
Cortisol J	0.8	0.4	0.4	2.8

Cuadro 3**RESULTADOS DE LAS CURVAS ESTANDAR DEL ANTICUERPO ANTI-CORTISOL, COLOCANDO EL ANTICUERPO A UNA CONCENTRACIÓN DE 6.25 ? 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
Coeficiente de correlación (r)	92.9	98.3	98.1	95.9	98.5	96.7	2.4	2.5
Dosis en pg/100m 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/100m 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%

Cuadro 4**COEFICIENTES DE VARIACIÓN INTRAENSAYO DE LAS CURVAS ESTÁNDAR DOSIS RESPUESTA Y PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE LOS ANTICUERPOS**

	Variación interensayo (%)						
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	Promedio	Recuperación
Estándar bajo (67.9 pg/500 m l)	7.0	2.9	3.0	0.4	0.4	2.7	122.2 %
Estándar medio (543.7 pg/500 m l)	7.5	1.5	2.6	2.6	5.9	4.0	72.31 %
Estándar alto (2175 pg/500 m l)	21.3	0.1	3.7	23.2	5.0	10.7	

bienestar del animal.^{20,21}

De las cinco gallinas utilizadas para producir anticuerpos anticortisol, solamente tres respondieron, obteniéndose títulos promedio de entre 33% y 44% en una dilución de trabajo de 1:1000. Montes et al.,¹² utilizando el mismo calendario de inmunización y el mismo número de

animales para producir anticuerpos antiprogesterona, también obtuvieron respuesta solamente en 3 animales. El bajo porcentaje de animales que respondieron al calendario de inmunización en ambos trabajos (60%), sugiere la necesidad de estudiar nuevos esquemas de inmunización para obtener mejores respuestas.

Los anticuerpos anticortisol obtenidos del suero de conejos inmunizados en otro trabajo realizado en este laboratorio,²² presentaron mayor avidez por su antígeno que los obtenidos a partir de la yema de huevo en el presente trabajo, lo que permitió trabajar con mayores diluciones (dilución de trabajo 1:4 000 vs 1:1 000, respectivamente). Estos resultados coinciden con lo informado por Svendsen et al.,⁹ quienes obtuvieron 1.5 a 2.0 veces más alto título en el suero de conejos que en la yema de huevo de gallinas, al inmunizar contra IgG humana. Otani et al.⁶ también encontraron en su estudio para producir anticuerpos anti-? s1-caseína, un mejor título en suero de conejos que en el suero de gallinas, o en la yema de huevo de éstos.

Otani et al.⁶ informaron en su estudio para producir anticuerpos anti-? 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 el presente 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 colectar los huevos fue mayor en nuestro caso, ya que Otani et al.⁶ utilizaron la producción de huevo durante solamente 5 días, mientras que en este estudio fue posible utilizar los huevos producidos durante un periodo de 2 meses. En este punto cabe aclarar que la postura de las gallinas fue inferior a la esperada, lo cual pudo deberse al estrés provocado durante el manejo de las tomas del suero para las titulaciones, o bien a que la inmunización con cortisol pudiera afectar de alguna manera la ovoposición.

La purificación de IgY a partir de las yemas de huevo, 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 (Cuadro 1). Los patrones electroforéticos en condiciones nativas (TRIS-PAGE) de cada suero o mezcla de yema y su correspondiente proceso de purificación muestran que la banda con menor movilidad electroforética, que corresponde a la IgY,²³ se incrementa en cada paso de purificación, al mismo tiempo que disminuyen el resto de las proteínas (Figura 1).

La purificación lograda en la mezcla de yema de huevo, como consecuencia del empleo de la precipitación con sulfato de amonio, fue buena y en la electroforesis no se observó la presencia de contaminantes como los mencionados por Montes et al.;¹² lo anterior puede explicarse debido a que las posibles levitinias encontradas por Montes et al.¹² se precipitan con sulfato de amonio a 50% de saturación,²¹ lo cual no ocurrió en el presente estudio ya que se trabajó solamente con un tercio de saturación de sulfato de amonio (35%).

Al comparar la especificidad de los anticuerpos anticortisol no se encontraron diferencias significativas

entre los provenientes de las distintas gallinas, ya que no se produjeron uniones importantes a hormonas como la androstenediona, el estradiol, la 17-hidroxiprogesterona o la testosterona [$H(3,N=40)=3.556; P=0.13136$].²⁴ Los valores de reacción cruzada obtenidos en el presente Trabajo son similares a los informados para la prueba de cortisol de CIS bio international*. 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.

Al comparar el rendimiento total de anticuerpos anticortisol con los resultados de Rangel,²² se observó que la yema de huevo fue más productiva que el suero de conejos (594 552.63 mg de proteína total vs 1 505.2 mg). Dichos resultados concuerdan con lo informado por Montes et al.,¹² quienes obtuvieron 2.5 veces mayor producción de anticuerpos antiprogesterona en la yema de huevo de gallinas que en el suero de conejos, pero contradice lo descrito por Otani et al.,⁶ quienes obtuvieron 10 veces menor producción de IgY's contra ? s1-caseína, cuando utilizaron como fuente el huevo de gallinas, que cuando usaron el suero de conejo. Estas variaciones entre trabajos están directamente relacionadas con el número de huevos puestos por las gallinas durante el periodo de máximos títulos en cada uno de los tres trabajos.

En el presente trabajo la cantidad total de anticuerpos obtenidos a partir de la yema tuvo una efectividad 192 veces mayor que la obtenida por Rangel,²² a partir del suero de conejos inmunizados en el mismo laboratorio. Estos resultados concuerdan con lo informado por Svendsen et al.,⁹ quienes registran de 5 a 10 veces mayor efectividad de los anticuerpos contra IgG humana en la yema de huevo que en el suero de conejo. Esto puede deberse a la lejanía filogenética de las aves con respecto a los mamíferos, por lo cual la IgG humana resulta mucho más antigénica para las gallinas que para los conejos.²⁵ 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 fue de 339 pg/ml. Esta sensibilidad es mayor a la indicada en la prueba de cortisol de DPC* (2 000 pg/ml) y a la de CIS bio international (20 000 pg/ml). Sin embargo, para fines prácticos no es necesaria tanta sensibilidad, ya que los niveles plasmáticos de cortisol en animales domésticos se encuentran en un rango de 3 000 a 8 300 pg/ml.²⁶

Al determinar la misma muestra en ocasiones repetidas, el coeficiente de variación interensayo se encontró dentro del rango aceptado;²⁷ sin embargo, el porcentaje de recuperación con el estándar bajo se encuentra por abajo de los límites recomendados para sistemas de radioinmunoanálisis.²⁷ 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.

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

** DPC Manual para la prueba de cortisol.

Con todo lo anterior, se puede concluir que la yema de huevo de gallinas inmunizadas es una efectiva fuente de anticuerpos anticortisol para el desarrollo de métodos de RIA con buena sensibilidad, especificidad y precisión. Esta fuente puede ser utilizada como una alternativa al suero de conejos inmunizados, con ventajas tales como la fácil obtención de los anticuerpos a partir de la recolección de huevos, en lugar del sangrado de los animales, así como la reducción en las lesiones ocasionadas por el adyuvante completo de Freund en las gallinas, en comparación con lo que ocurre en conejos.

Referencias

1. Zarow MX, Yochim JM, McCarthy JL. Experimental endocrinology. A sourcebook of basic techniques. New York: Academic Press, 1964.
2. Abraham G, Garza R. Radioimmunoassay of steroids. In: Abraham GE, editor. Handbook of radioimmunoassay. New York: Morton K. Schwartz, 1977.
3. Patterson R, Youngner JL, Weigle WO, Dixon FJ. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *J Immunol* 1962;89:272-278.
4. Bauwens R, Devos M, Kint J, 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* 1988;34:2153-2154.
5. Gassmann M, Thömmes P, Weiser T, Hübscher U. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB* 1990;4:2528-2532.
6. Otani H, Matsumoto K, Saeki A, Hosono A. Comparative studies on properties of hen egg yolk IgY and rabbit serum IgG antibodies. *Lebensm Wiss Technol* 1991;24:152-158.
7. Schade R, Pfister C, Halatsch R, Henklein P. Polyclonal IgY antibodies from chicken egg yolk: an alternative to the production of mammalian IgG type antibodies in rabbits. *ATLA* 1991;19:403-419.
8. Svendsen L, Crowley A, Ostergaard H, Stodulski G, Hau J. Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. *Lab Anim Sci* 1995;45:89-93.
9. Svendsen L, Crowley A, Stodulski G, 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* 1996;191:113-120.
10. Larsson A, Sjöquist J. Chicken antibodies: a tool to avoid false positive results by rheumatoid factor in the latex fixation tests. *J Immunol Methods* 1988;108:205-210.
11. Benson HN, Brumfield HP, Pomeroy BS. Requirement of avian C1 for fixation of Guinea pig complement by avian antibody-antigen complex. *J Immunol* 1961;87:63-68.
12. Montes P, Murcia M, 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* 1994;25:117-125.
13. Ermeling B, Steffen E, Fish R, Hook R. Evaluation of subcutaneous chambers as alternative to conventional methods of antibody production in chickens. *Lab Anim Sci* 1992;42:402-407.
14. IAEA. Laboratory training manual on radioimmunoassay in animal reproduction. Technical reports series No. 233. Vienna, Austria: FAO, International Atomic Energy Agency, 1984.
15. Patterson R, Youngner JL, Weigle WO, Dixon FJ. The metabolism of serum proteins in the hen and chick and secretion of serum proteins by the ovary of the hen. *J Gen Physiol* 1962b;45:501-513.
16. Garvey S, Cremer E, Sussdorf H. Methods in immunology 3rd ed. London: WA Benjamin, 1979.
17. Nicoll SC, Licht P. Evolutionary biology of prolactin and somatotropins. II. Electrophoretic comparison of tetrapod somatotropins. *Gen Comp Endocrinol* 1971;17:490-507.
18. Munro C, Stabenfeldt G. Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J Endocrinol* 1984;101:41-49.
19. Bedolla TN, Ulloa-Aguirre A, Landeros VJ, Pérez-Palacios G. Análisis de datos y control de calidad en el radioinmunoanálisis. I. Guía para la evaluación de resultados. *Rev Invest Clin* 1984;36:179-192.
20. Amyx HL. Control of animal pain and distress in antibody production and infectious disease studies. *J Am Vet Assoc* 1987;191:1287-1293.
21. Broderson JR. A retrospective review of lessons associated with the use of Freund's adjuvant. *Lab Anim Sci* 1989;39:400-405.
22. Rangel PL. Comparación de dos fuentes biológicas para producir anticuerpos destinados al desarrollo de métodos de radioinmunoanálisis para determinar los niveles plasmáticos de testosterona y cortisol (tesis de maestría). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1998.
23. Tizard I. Inmunología veterinaria. 3^a ed. México (DF): Interamericana, 1989.
24. Zar JH. Bioestatistical analysis. 3rd ed. Newark (NJ): Prentice Hall, New Jersey, 1996.
25. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. South Mimms (UK): London Methuen & Co. Ltd., 1992.
26. Hsu WH, Crump MH. Glándula adrenal. En: McDonald L, editor. Endocrinología veterinaria y reproducción. 4^a ed. México (DF): Interamericana, 1989.
27. Libertun C. Radioinmunoanálisis. Fundamentos y aplicaciones. Buenos Aires, Argentina: López Libreros Editores, 1980.