

Comparación de dos fuentes biológicas para producir anticuerpos destinados al desarrollo de métodos de radioinmunoanálisis para determinar los niveles plasmáticos de testosterona

Lucía Eliana Rangel Porta*
Gerardo Perera Marín*
Arantzatzu Lassala Irueste*
Luis Zarco*

Abstract

The present work compared egg yolk and rabbit serum as biological sources of antibodies for the development of a radioimmunoassay (RIA) against testosterone. It was found that after testosterone immunization, laying-hens stopped producing eggs apparently because immunization affected either the follicular development or the ovulation process. In contrast, antibodies against testosterone were obtained in the rabbit serum, and a liquid phase RIA was developed. Rabbit antibodies showed high specificity, 5.84% cross-reacting with dihydrotestosterone and 0.72% with androstenedione, estradiol and 17-hydroxiprogesterone. Sensitivity at 90% binding was 39.6 pg/ml. The total antibody production was 126.083 mg, which can be used to process 1.6×10^5 samples. In conclusion, the production of antibodies against testosterone in egg yolk is not recommended as an alternative to rabbit serum, which is contrary to what has been found for other steroid hormones.

Key words: ANTIBODIES, TESTOSTERONE, EGG YOLK, RABBIT SERUM, RADIOIMMUNOASSAY.

Resumen

En el presente trabajo se compararon el suero de conejo y la yema de huevo como fuentes biológicas de anticuerpos antitestosterona para su uso en métodos de radioinmunoanálisis (RIA). Los resultados indican que la yema de huevo de gallinas inmunizadas no es una fuente adecuada de anticuerpos antitestosterona, ya que aparentemente dichos anticuerpos intervienen en el proceso del desarrollo folicular u ovulación, inhibiendo la postura e impidiéndose su recuperación. Asimismo, en el caso del suero de conejos, fue posible obtener y purificar anticuerpos antitestosterona con los cuales se desarrolló un RIA de fase líquida para medir los niveles plasmáticos de testosterona en diferentes especies animales. Los anticuerpos mostraron alta especificidad, y presentaron una reacción cruzada de 5.84% con dihidrotestosterona y 0.72% con androstenediona, estradiol y 17-hidroxiprogesterona. La sensibilidad al 90% de unión fue de 39.6 pg/ml. La recuperación del sistema fue de 90.5% con el estándar medio y 95.8% con el bajo. El rendimiento final del anticuerpo correspondió a 126.083 mg, que sirven para analizar 1.6×10^5 muestras. Se concluye que la yema de huevo no puede ser utilizada como una alternativa al suero de conejos para la producción de anticuerpos antitestosterona, a diferencia de lo que ocurre con otras hormonas esteroideas.

Palabras clave: ANTICUERPOS, TESTOSTERONA, YEMA DE HUEVO, SUERO DE CONEJO, RADIOINMUNOANÁLISIS.

Recibido el 29 de mayo de 2000 y aceptado el 2 de octubre de 2000.

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

Introducción

Uno de los requisitos indispensables para el desarrollo del RIA es tener anticuerpos específicos con alta afinidad y avidez para la hormona en estudio, éstos pueden ser producidos a partir de la inmunización de una diversidad de especies; el modelo del conejo es el más utilizado.¹

Existen algunos trabajos en los que se ha utilizado la yema de huevo de gallinas inmunizadas como fuente de anticuerpos.² Estos anticuerpos son conocidos como IgY,³ son homólogos de las IgA de mamíferos⁴ y resultan una alternativa práctica, económica y con alto rendimiento.⁵⁻⁷ Además, al tener las aves un estatus filogenético inferior al de los mamíferos, es preferible usarlas en lugar de estos últimos para la producción de anticuerpos destinados al análisis de muestras de mamíferos.⁸ 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,⁹ o con los receptores de fijación del complemento de los mamíferos.¹⁰ De igual manera, la obtención de anticuerpos a partir de la yema de huevo no representa un procedimiento invasivo, como el sangrado de los mamíferos, lo que evita el estrés y sufrimiento.^{11,12}

Cabe mencionar que en el laboratorio de endocrinología se ha logrado producir anticuerpos IgY contra progesterona⁵ y cortisol,⁷ con rendimiento y calidad adecuados para ser utilizados en radioinmunoanálisis.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la producción y purificación de anticuerpos contra testosterona a partir de yema de huevo de gallinas inmunizadas, evaluando el comportamiento de los anticuerpos así obtenidos, en pruebas de radioinmunoanálisis para la determinación de testosterona. Asimismo, estos anticuerpos fueron comparados con anticuerpos obtenidos por el método tradicional a partir del suero de conejos inmunizados.

Material y métodos

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); el trabajo de laboratorio se desarrolló en el Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Reproducción de la FMVZ - UNAM.

Para producir los anticuerpos antitestosterona de la yema de huevo se utilizaron cinco gallinas de postura

de seis meses de edad, de la raza Dalling, que fueron inmunizadas según las dosis y tiempos utilizados por Rangel *et al.*⁷ Asimismo, para producir los anticuerpos de suero de conejos se inmunizaron cinco conejos hembras de ocho semanas de edad, de la raza Nueva Zelanda, con peso promedio de 1.5 kg, mediante el método recomendado por Vaitukaitis *et al.*¹³ y modificado por Munro y Stabenfeldt.¹⁴ El inmunógeno se administró por vía subcutánea, distribuido en cinco puntos (0.2 ml por sitio) de la región dorsal. En ambos casos, los animales se alojaron en jaulas individuales y las inmunizaciones se realizaron con intervalos de cuatro semanas; cada animal recibió en total siete inmunizaciones.

Como inmunógeno se utilizó testosterona 3-(0-carboximetil) oxima-BSA, que se administró en dosis de 0.5 mg por inmunización en las gallinas, y 1 mg en los conejos. En ambos casos el inmunógeno se disolvió en 0.5 ml de solución salina fisiológica (SSF) y se emulsificó en 0.5 ml de adyuvante completo de Freund.*

Con la finalidad de cuantificar la presencia de anticuerpos generados en cada especie, se realizaron titulaciones semanales por el método de radioinmunoanálisis de fase líquida, de acuerdo con lo recomendado por la Agencia Internacional de Energía Atómica,¹⁵ utilizando [1,2,6,7-³H] testosterona** como hormona marcada, con una actividad específica de 101.0 Ci/mmol. Para ello se utilizó un tiempo de incubación de 24 h a 4°C, y las muestras de suero se diluyeron en amortiguador de fosfato salino (PBS 0.05 M, pH 7.4), para obtener diluciones seriadas desde 1:1 hasta 1:4000.

En el caso de las gallinas se utilizaron los huevos colectados una semana después de que los animales presentaron un nivel sérico igual o mayor a 30% de unión, en una dilución de trabajo de 1:1000.

Una vez obtenidos los resultados de titulación con unión igual o mayor al 30% en la dilución 1:4000, se procedió a sangrar a blanco a los conejos. La obtención total de sangre se realizó por punción cardiaca y el suero se separó mediante centrifugación. Al suero total se le adicionaron 10 ml de una solución al 1% de azida de sodio como conservador y se mantuvo a 4°C hasta su purificación.

La purificación de los anticuerpos a partir de la yema de huevo consistió en la eliminación de las grasas por medio de una precipitación con 2-propanol y acetona; para ello, se utilizó el método propuesto por Montes *et al.*⁵ Para la resuspensión del polvo obtenido libre de grasas (8.73 g) se utilizó la metodología descrita por Rangel *et al.*⁷

La purificación de las gammaglobulinas (IgG o IgY) obtenidas a partir del suero de conejos, o de la solución obtenida de la yema de huevo, consistió en un procedimiento de precipitaciones fraccionadas con una solución saturada de sulfato de amonio (100%), hasta obtener una concentración final de un tercio de saturación.^{16,17}

* Sigma

** Amersham

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 la gammaglobulina bovina (Standard I, BIO-RAD).

La movilidad relativa de las proteínas obtenidas durante la precipitación fraccionada de sulfato de amonio se determinó con electroforesis en tubo, en geles de poliacrilamida al 7% en condiciones nativas (TRIS-PAGE), de acuerdo con lo descrito por Nicoll y Licht,¹⁸ bajo las condiciones mencionadas por Rangel *et al.*⁷

La titulación del primer anticuerpo (IgG) se realizó mediante un radioinmunoanálisis de fase líquida, donde se colocaron diferentes concentraciones de anticuerpo purificado que oscilaron entre 0.0125 y 50 mg de proteína total, en un volumen de 100 ml de PBS-G.

Para el desarrollo de la curva estándar se utilizó el estándar de la Organización Mundial de la Salud (lote Nº K079810, 6 mM/L), con un rango de 4.8 hasta 316.8 pg/500 ml, y la concentración de anticuerpo que presentó una unión máxima del 40%-50% en los ensayos de inmunorreactividad anteriores. Para el análisis de los resultados la curva se transformó en una línea recta por logit-log.¹⁹

Para determinar la especificidad, los anticuerpos obtenidos en este estudio se incluyeron en ensayos específicos para las siguientes hormonas: androstenediona, estradiol, 17-hidroxiprogesterona y dihidrotestosterona.* Se obtuvieron el porcentaje de actividad cruzada por diferencia entre la unión máxima de dichos ensayos y la lectura tomada de los tubos que contenían el anticuerpo en estudio.

Una vez conocida la inmunorreactividad y especificidad de los anticuerpos de cada conejo, y viendo que las diferencias entre los diferentes anticuerpos obtenidos no era relevante, se mezclaron los anticuerpos de todos los conejos (100 mg de proteína de cada uno); posteriormente se procedió al desarrollo y validación del sistema de radioinmunoanálisis.

En el caso de la IgY, no se obtuvo inmunorreactividad en ninguna de las gallinas inmunizadas, por lo que los siguientes pasos sólo se realizaron con los anticuerpos de conejo.

Una vez determinada la cantidad de anticuerpo necesaria para el desarrollo de la curva estándar, se realizaron tres curvas estándar independientes, para calcular la repetibilidad del sistema, con lo cual se obtuvieron los valores del coeficiente de variación intra e interensayo a las dosis de 20%, 50% y 80% de la curva estándar. La sensibilidad correspondió a la concentración mínima detectable en valores del 90% de la unión máxima de la curva dosis-respuesta.

Con el propósito de conocer la precisión del sistema, se incluyeron en repetidas ocasiones muestras de suero, a las que previamente se les colocaron concentraciones conocidas de testosterona, para determinar su recuperación.

Las muestras de suero en las que se determinó la concentración de testosterona con el RIA desarrollado, fueron sometidas a un proceso de extracción, para lo cual se colocaron 500 ml de suero en tubos de vidrio de 10 ml, se les adicionaron 5 ml de éter etílico previamente enfriado a 4°C y se agitaron en vórtex durante 1 min. Se dejaron reposar 10 min y se congelaron en hielo seco-acetona; inmediatamente se descartó la fase superior (éter) a otro tubo de 10 ml y se dejó evaporar a sequedad en la campana de extracción con nitrógeno. El extracto se resuspendió en 500 ml de PBS-G y se agitó en vortex durante 1 min.

Resultados

La mayoría de las gallinas no mostraron respuesta inmune y sólo en el suero de una de ellas se obtuvo una unión mayor al 30% en una dilución de suero de 1 en 1 000; la producción de huevos se colectó entre los días 84 y 126. Sin embargo, durante ese periodo solamente puso tres huevos, por lo que la fuente de anticuerpos fue muy reducida (Cuadro 1).

Asimismo, en el Cuadro 2 se muestran los porcentajes máximos de unión (Bo) a la testosterona tritiada, obtenidos con el suero de cada conejo (dilución 1:4000) durante los diferentes días del protocolo de inmunización. Los conejos fueron sangrados a blanco entre los días 109 y 123, al alcanzar un mínimo de 50% de unión, excepto la coneja cuatro, que nunca pasó del 30% de unión.

El proceso de purificación con precipitaciones fraccionadas del sulfato de amonio saturado permitió obte-

Cuadro 1
PORCENTAJE DE UNIÓN MÁXIMA OBTENIDA EN DIFERENTES DÍAS CON EL SUERO DE CADA GALLINA

Día de sangrado	% de unión (Bo)				
	Gallina 6	Gallina 7	Gallina 8	Gallina 9	Gallina 10
77	1.8	0.0	2.5	0.2	41.4
84	1.8	0.1	8.8	1.1	38.4
91	0.2	1.1	3.2	2.4	22.2
98	1.7	3.8	2.0	5.2	40.2
105	1.3	5.3	8.0	3.7	49.3
112	6.2	7.4	5.3	2.1	53.1
119	7.4	7.1	9.6	0.6	56.8
126	0.2	4.0	1.7	2.6	20.6
133	1.1	2.9	8.2	4.3	28.3

* Todas las hormonas tritiadas fueron de la marca Amersham y los antisueros de Sigma.

Cuadro 2

PORCENTAJE DE UNIÓN MÁXIMA OBTENIDA EN DIFERENTES DÍAS CON EL SUERO DE CADA CONEJA

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 3

RENDIMIENTO OBTENIDO DURANTE LOS DIFERENTES PASOS DE PURIFICACIÓN DE LOS SUEROS DE CONEJO Y DE LA YEMA DE HUEVO

	Concentración de proteína total (mg)		
	Primer sobrenadante	Segundo sobrenadante	Precipitado final
Coneja 1	106.446	21.268	13.825
Coneja 2	399.672	11.228	26.180
Coneja 3	227.403	45.526	34.52
Coneja 4	124.100	8.847	3.384
Coneja 5	316.758	60.791	48.178
Gallina 10	89.784	31.412	22.279

ner tres fracciones de cada suero, así como de la solución de yema de huevo libre de lípidos, las cuales correspondieron a primer sobrenadante, segundo sobrenadante y precipitado final (IgG o IgY). El Cuadro 3 resume el rendimiento final de cada paso de purificación.

Las figuras 1 y 2 presentan el comportamiento electroforético típico en condiciones nativas (TRIS-PAGE) de yema de huevo y suero de conejo anti-testosterona, respectivamente, la concentración de proteína total por tubo fue de 50 mg.

En cuanto a la titulación del anticuerpo antitestosterona, obtenido de la yema de los huevos de la gallina 10, el comportamiento muestra que no hay reconocimiento del anticuerpo (IgY) por su hormona marcada, ni siquiera a altas concentraciones del anticuerpo (Figura 3).

Los anticuerpos purificados del suero de cada conejo mostraron inmunorreactividad variable (Figura 4), por

lo que la concentración de proteína necesaria para alcanzar 50% de unión máxima con la hormona tritada fue diferente para cada anticuerpo (Cuadro 4).

Se desarrolló una curva estándar con los anticuerpos derivados de cada conejo, utilizando para ello la concentración con la que se obtuvo una unión máxima del 30% y concentraciones seriadas de hormona marcada, en rangos de 9.6 hasta 633.68 pg/ml (Figura 5).

Las pruebas de especificidad para los anticuerpos antitestosterona (IgG) mostraron porcentajes de unión contra androstenediona, estradiol y 17-hidroxiprogesterona en rangos de 0.04% a 3.9%. La unión contra dihidrotestosterona fue mayor, ya que se obtuvieron rangos entre 0.5% y 9.8% (Cuadro 5).

Con la mezcla de antisueros antitestosterona de conejos, se realizó una nueva prueba de inmunorreactividad,

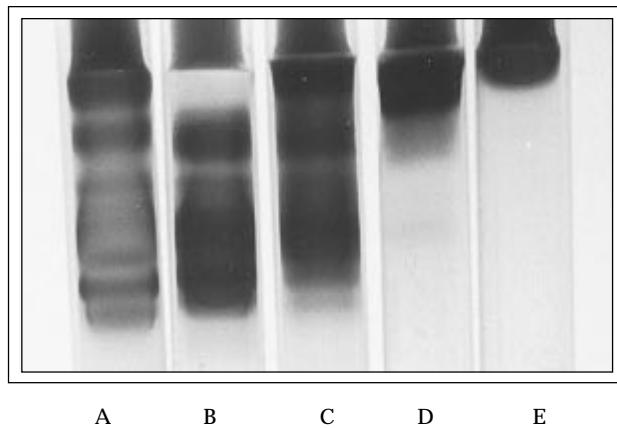


Figura 1. Comportamiento electroforético típico en condiciones nativas (TRIS-PAGE) de suero de gallina inmunizada contra testosterona: a) Yema de huevo antes de precipitar con SSA; b) primer sobrenadante; c) segundo sobrenadante; d) precipitado final; e) IgG de referencia.

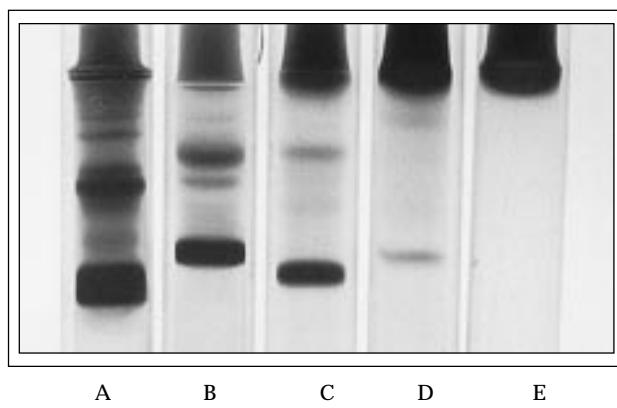


Figura 2. Comportamiento electroforético típico en condiciones nativas (TRIS-PAGE) de suero de coneja inmunizada contra testosterona: a) Suero crudo; b) primer sobrenadante; c) segundo sobrenadante; d) precipitado final; e) IgG de referencia.

Cuadro 4

CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA NECESARIA DE CADA ANTICUERPO ANTITESTOSTERONA (IgG), PARA ALCANZAR 50% DE UNIÓN MÁXIMA (Bo)

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

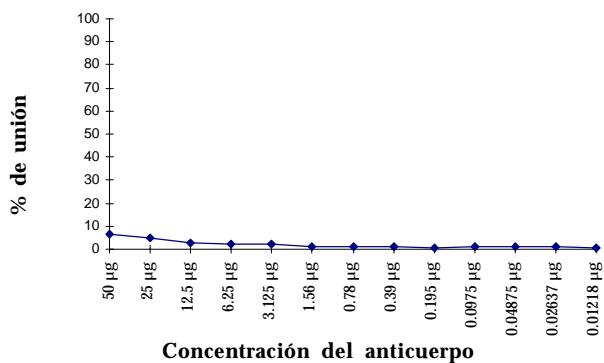


Figura 3. Inmunorreactividad de los anticuerpos antitestosterona (IgY) de la gallina 10 (UNE 2.4%).

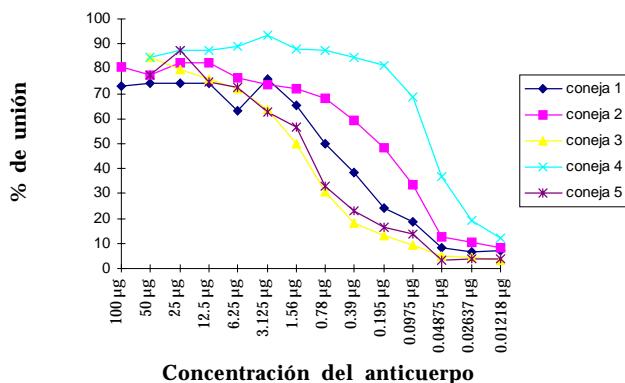


Figura 4. Inmunorreactividad de los anticuerpos antitestosterona (IgG) (UNE 4.0%).

para determinar la concentración adecuada de anticuerpo para el desarrollo de la curva estándar (Figura 6).

Los resultados mostraron la unión máxima al 50% para testosterona con una concentración del anticuerpo de 0.78 mg. Utilizando dicha concentración de anticuerpo, se realizaron curvas estándar ($n = 3$) para los anticuerpos antitestosterona (Cuadro 6). Por otro lado, se obtuvo un porcentaje de recuperación promedio de 95.8 y 90.5 para los estándares bajo (19.8 pg/ml) y medio (79.2 pg/ml), respectivamente.

Durante la validación de los sistemas de radioinmunoanálisis se obtuvieron los valores de los coeficientes de variación (CV) intraensayo, que se midieron en estándares alto (633.6 pg/ml), medio (79.2 pg/ml) y bajo (19.8 pg/ml); para el primero se obtuvo un CV de 0.9 a 10.7% (5.6% en promedio); para el segundo, un CV de 0.1% a 3.2% (1.4% en promedio); y para el último se obtuvo un CV de 1.2% a 5.5% (2.8% en promedio).

El rendimiento de los anticuerpos del suero de conejo, en forma de mezcla, correspondió a 126.087 mg de proteína total para antitestosterona; para obtener 50% de unión a su correspondiente antigénico, se requirió 0.78 mg/ml; por lo tanto, los anticuerpos obtenidos durante el presente trabajo sirven para trabajar 1.6×10^5 tubos de testosterona.

Discusión

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

Cuadro 5

PORCENTAJE DE UNIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTITESTOSTERONA (IgG) A HORMONAS DIFERENTES A LA TESTOSTERONA

Anticuerpo	Androstenediona	Estradiol	17-hidroxi-proges- terona	Dihidro- testos- terona
Coneja 1	0.2	0.3	0.3	6.8
Coneja 2	0.3	2.7	0.3	4.6
Coneja 3	0.8	0.1	0.2	0.5
Coneja 4	0.2	0.5	0.8	7.5
Coneja 5	0.1	0.04	3.9	9.8

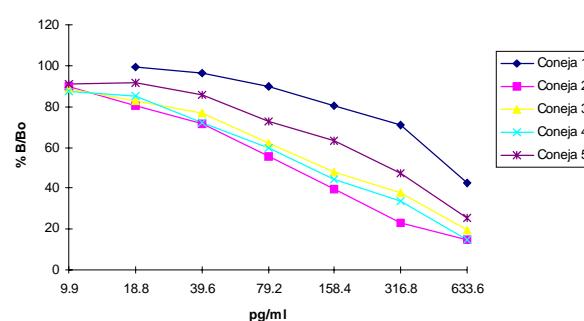


Figura 5. Curvas estándar de los anticuerpos antitestosterona (IgG).

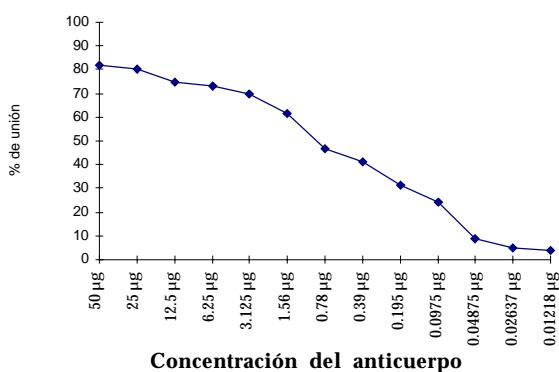


Figura 6. Inmunorreactividad de la mezcla de anticuerpos antitestosterona del suero de conejos (UNE 4.2%).

Cuadro 6

RESULTADOS DE LAS CURVAS ESTÁNDAR DEL ANTICUERPO ANTITESTOSTERONA, COLOCANDO EL ANTICUERPO A UNA CONCENTRACIÓN DE 0.78 µg/ TUBO (UNE PROMEDIO 5.8%)

	Promedio	Desviación estándar (±)	C.V. interensayo
Intercepto	5.877	0.9	15.4
% Bo	48.1	4.4	9.1
Pendiente (m)	-1.200	0.1	12.3
Coeficiente de correlación (r)	96.5	3.3	3.4
Dosis en pg/500 µl al 80% B/Bo	46.5	16.8	36.0
Dosis en pg/500 µl al 50% B/Bo	150.4	50.1	33.3

Durante el proceso de inmunización en ambas especies, utilizando el adyuvante completo de Freund, se observó que las lesiones macroscópicas ocasionadas en conejos no se presentan en las gallinas, estos resultados concuerdan con lo mencionado por Ermeling *et al.*²⁰

En cuanto a los resultados obtenidos en las gallinas, solamente una gallina (20% de los animales) desarrolló títulos de anticuerpos en el suero, aun cuando el mismo esquema de inmunización tuvo 60% de efectividad en el caso de la inmunización contra progesterona⁵ y cortisol.⁷

En otros trabajos se ha logrado obtener buenos rendimientos de anticuerpos contra algunas hormonas esteroideas, a partir de la yema de huevos de gallinas inmunizadas.^{5,7} Sin embargo, los resultados del presente trabajo indican que en el caso de la testosterona, existen dificultades especiales, ya que aunque las gallinas que no respondieron a la inmunización continuaron su postura durante el estudio, la única gallina que desarrolló títulos de anticuerpos en el suero interrum-

pió su postura, por lo que únicamente fue posible colectar tres huevos de ella.

Tanto la falta de títulos de anticuerpos contra testosterona, como la suspensión de la postura en la gallina que respondió a la inmunización, pueden estar relacionadas con la fisiología del folículo ovárico, en el cual se produce testosterona. Los anticuerpos de tipo secretor (IgY) contra la testosterona, presentes en el suero, debieron pasar a la yema de huevo a través del folículo ovárico, donde probablemente se unieron a la testosterona presente en el folículo, lo que resultó en un bloqueo de la producción de estrógenos y la ovulación, quedando así secuestrados. En las aves se ha estudiado la presencia de un pico preovulatorio de testosterona en plasma, que precede al pico de LH, lo que hace pensar que la testosterona es la responsable de iniciar el pico preovulatorio de LH y la ovulación.²¹ 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.^{22,23} Los únicos tres huevos que la gallina 10 puso, fueron colectados dentro de las dos primeras semanas siguientes a la obtención de los títulos altos de anticuerpos en suero. Probablemente estos folículos pudieron ovular aun cuando los anticuerpos antitestosterona se unieron a la testosterona presente y no pasaron a la yema, debido a que se ha comprobado que en los folículos yerosos mayores (folículos próximos a ovular) la producción de estrógenos no es dependiente de la disponibilidad de testosterona.²²

Por otro lado, los folículos y el estroma ovárico son las fracciones de tejido que reciben el 50% del fluido sanguíneo que entra al ovario,²⁴ y, por lo tanto, son las que deben recibir la mayor parte de los anticuerpos que pasan a la yema del huevo. De esta manera, los anticuerpos habrían quedado secuestrados en el tejido y no habrían llegado a la yema, lo que explicaría la falta de inmunorreactividad contra testosterona de los anticuerpos purificados de la yema del huevo, aun cuando existiesen en el suero y a pesar de que el precipitado final era rico en IgY, tal como lo informaron Rangel *et al.*⁷

Finalmente, los anticuerpos purificados a partir de la yema de éstos, mostraron una inmunorreactividad casi nula, por lo que no fueron útiles para el desarrollo de radioinmunoanálisis.

Utilizando el mismo calendario de inmunización en conejos, Munro y Stabenfeldt¹⁴ informaron haber obtenido un título de anticuerpos antiprogestérone 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. Montes *et al.*⁵ obtuvieron anticuerpos

antiprogestrona de conejos el día 105 de inmunización, con una unión aproximada de 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 contra testosterona utilizado en conejos fue exitoso, ya que permitió obtener altos títulos de anticuerpos en todos los animales (100%).

Con los resultados de la inmunización antes descritos, podemos sugerir que la respuesta, fue mejor en los conejos que la lograda por las gallinas (dilución de trabajo 1:4 000 vs 1:1 000, respectivamente). Estos resultados son iguales a lo descrito por Rangel *et al.*⁷ y coinciden con lo encontrado por Svendsen *et al.*⁶ 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.*²⁵ en su estudio para producir anticuerpos anti-as1-caseína, también registran mejor título en suero de conejos que en suero de gallinas o en la yema de huevo.

La purificación de inmunoglobulinas IgG o IgY de cada antisuero o mezcla de yemas, mostró claramente que entre más se avanza en el proceso de purificación, se obtiene un mayor grado de pureza, pero con menor rendimiento de proteínas totales (Cuadro 3). 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 IgG,²⁶ se incrementa en cada paso de purificación, al mismo tiempo que disminuye el resto de las proteínas (Figuras 1 y 2).

Los anticuerpos antitestosterona obtenidos del suero de conejo mostraron un promedio de unión de 5.84% con la dihidrotestosterona. En este punto es normal que la actividad de estos anticuerpos con la dihidrotestosterona sea alta, ya que ambas moléculas son idénticas, a excepción de un hidrógeno en el carbón cinco de esta última. La reacción cruzada contra dihidrotestosterona de los anticuerpos antitestosterona obtenidos en este trabajo fue menor a la informada por Prat *et al.*²⁷ y la indicada en el paquete comercial de testosterona de doble anticuerpo de Diagnostic Products Corporation (DPC),* quienes informan 40.7% y 34.0%, respectivamente; sin embargo, los paquetes comerciales de RIA para testosterona de doble anticuerpo de ICN Biomedicals** y de testosterona total de DPC*** mostraron menor reacción cruzada, 3.4% y 3.1%, respectivamente. Sin embargo, la reacción cruzada con dihidrotestosterona

no debe 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.²⁸

Por otro lado, el porcentaje promedio de unión de los anticuerpos antitestosterona con androstenediona, estradiol y 17-hidroxiprogesterona fue de 0.72%, valor muy semejante al indicado por los paquetes comerciales antes mencionados. Con todo lo anterior, podemos concluir que los anticuerpos antitestosterona obtenidos del suero de conejos en este estudio son específicos para la testosterona.

La sensibilidad del sistema, utilizando la mezcla de los anticuerpos antitestosterona de conejo, fue de 39.6 pg/ml con 90% de unión B/Bo. Dicha sensibilidad es idéntica a la del paquete comercial de testosterona total de DPC, menor a la de 2.4 pg/tubo del paquete comercial de testosterona de doble anticuerpo de DPC, y mayor a la 0.1 ng/ml del paquete comercial de ICN.

Cabe aclarar que los niveles sanguíneos de testosterona en diversas especies animales oscilan entre 0.1 y 6.7 ng/ml,²⁹ por lo cual la sensibilidad del sistema con los anticuerpos generados en este trabajo es adecuada para medir los niveles plasmáticos de testosterona en diferentes especies animales.

Las dosis al 50% y 80% en las curvas estándar para testosterona fueron 300.8 pg/ml y 93.0 pg/ml, respectivamente, con coeficientes de variación interensayo de 36% y 33.3%. La precisión mostrada no es la adecuada, pero esto puede deberse a que el número de observaciones con el que se calculó fue bajo (n = 9), por lo cual, si éstas se incrementan, es posible que los coeficientes de variación se logren reducir.

Los porcentajes de recuperación (90.5 y 95.8 g) correspondientes a la exactitud del sistema se encuentran dentro de los valores recomendados para el radioinmuanoanálisis.³⁰

Con base en lo anterior, se concluye que con los anticuerpos anti testosterona de conejo, producidos en este trabajo, es factible desarrollar un sistema de radioinmuanoanálisis específico, sensible y exacto, para cuantificar muestras sanguíneas de testosterona en diversas especies animales. En cambio, no es posible utilizar la yema de huevo de gallinas inmunizadas como fuente de anticuerpos antitestosterona, posiblemente debido a que dichos anticuerpos interfieren con la fisiología ovárica de las aves.

Referencias

1. Abraham G, Garza R. Radioimmunoassay of steroids. In: Abraham GE, editor. *Handbook of radioimmunoassay*. New York: Morton K. Schwartz, 1977.
2. Schade R, Pfister C, Halatsch R, Henklein P. Polyclonal IgY antibodies from chicken egg yolk: an alternative to the

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

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

*** DCP Manual para la prueba de testosterona total.

- production of mammalian IgG type antibodies in rabbits. *Altern Lab Anim* 1991;19:403-419.
3. Leslie GA, Clem LW. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III Immunoglobulins of the chicken. *J Exp Med* 1969;130:1337-1352.
 4. Ambrosius H, Hadge D. Chicken immunoglobulins. *Vet Immunol Immunopathol* 1987;17:57-67.
 5. 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.
 6. 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.
 7. Rangel PL, Perera MG, Lassala IA, Zarco QL. Desarrollo de un método de radioinmunoanálisis para cortisol, utilizando anticuerpos obtenidos y purificados de la yema de huevo de gallinas inmunizadas. *Vet Méx* 1999;30:289-295.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. Amyx HL. Control of animal pain and distress in antibody production and infectious disease studies. *J Am Vet Med Assoc* 1987;191:1287-1293.
 12. Broderson JR. A retrospective review of lessons associated with the use of Freund's adjuvant. *Lab Anim Sci* 1989;39:400-405.
 13. Vaitukaitis J, Robbins B, Nieschlag E, Ross G. A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J Clin Endocrinol* 1971;33:988-991.
 14. Munro C, Stabenfeldt G. Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J Endocrinol* 1984;101:41-49.
 15. IAEA. Laboratory training manual on radioimmunoassay in animal reproduction. Technical reports series No. 233. Vienna, Austria: FAO, International Atomic Energy Agency, 1984.
 16. Garvey S, Cremer E, Sussdorf H. Methods in immunology. 3rd ed. London (UK): WA Benjamin, 1979.
 17. 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.
 18. Nicoll SC, Licht P. Evolutionary biology of prolactin and somatotropins. II. Electrophoretic comparison of tetrapod somatotropins. *Gen Comp Endocrinol* 1971;17:490-507.
 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. 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.
 21. Sturkie PD. Avian physiology. 4th ed. New York: Springer-Verlag, 1986.
 22. Armstrong DG. Ovarian aromatase activity in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J Endocrinol* 1984;100:81-86.
 23. Porter TE, Hargis BM, Silsby JL, El Halawani ME. Differential steroid production between theca interna and theca externa cells: a three-cell model for follicular steroidogenesis in avian species. *Endocrinology* 1989;125:109-116.
 24. Scanes CG, Mazelic E, Kavanagh E, Merrill G, Rabbi J. Distribution of blood flow in the ovary of the domestic fowl (*Gallus domesticus*) and changes after prostaglandin F2a treatment. *J Reprod Fertil* 1982;64:227-231.
 25. 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.
 26. Tizard I. Inmunología Veterinaria. 3^a ed. México (DF): Interamericana, 1989.
 27. Prat F, Carrillo M, Mones A. R.I.A. de esteroides plasmáticos. *Invest Pesq Barc* 1986;50:279-295.
 28. Fletcher RF. Lecture notes on endocrinology. 4th ed. Oxford (UK): Blackwell Scientific Publications, 1987.
 29. Pineda MH. Reproducción del macho. En: MacDonald L, editor. Endocrinología veterinaria y reproducción. México (DF): Interamericana, 1989.
 30. Libertun C. Radioinmunoanálisis. Fundamentos y aplicaciones. Buenos Aires, Argentina: López Libreros Editores, 1980.