



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"IZTACALA"

"OBTENCION Y CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS  
CONTRA PROGESTERONA Y ESTRADIOL Y ESTANDARI-  
ZACION DEL RADIOINMUNOANALISIS EN SUERO DE  
RUMIANTES"

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIADA EN BIOLOGIA

P R E S E N T A :

**Maria del Refugio Herrera Díaz**



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEXICO

1990



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Dedico esta tesis a:

Mis queridos padres Jorge y Carmen, por su amor, apoyo y por enseñarme lo valioso de la vida.

Martín, mi adorado esposo, por el inmenso amor que nos tenemos.

Mis hermanos: Carlos, Carmela, Ramón, Jorge y Lulú, por su comprensión y amor.

Todos mis sobrinos, sobre todo a Oscar, por que algún día se cumplan sus metas.

## A G R A D E C I M I E N T O S .

A la M. en C. Maricela Luna y el M.V.Z. Carlos Romero por su apoyo y paciencia durante el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Carmen Acéves, a la Q. Luz Navarro y al Dr. Carlos Arámburo por toda su ayuda.

A los Biólogos Martín Vargas, Martín Palomar y Arturo Sánchez por toda su ayuda y amistad.

A mis amigas y amigos: Gaby, Elizabec, Brenda, Bety, Angélica, Gustavo y Jesus, por su gran amistad.

De manera muy especial al Dr. Carlos Valverde, por su asesoría, apoyo y sobre todo por su valiosa amistad.

Este trabajo se realizó en el departamento de Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM bajo la dirección de la M. en C. Maricela Luna y Carlos Romero de la UAM-Iztapalapa, y con la asesoría del Dr. Carlos Valverde-R. Esta tesis fué apoyada parcialmente por CoNaCyT P219 CCOL 880224.

## INDICE

Abreviaturas	.....	2
Resumen	.....	3
Introducción	.....	5
1. El Ciclo Estral en los Rumiantes	.....	6
1.1. Aspectos Neuroendócrinos	.....	6
1.2. Acciones biológicas de la progesterona y el estradiol	.....	8
2. Generalidades de las hormonas esteroides	....	12
2.1. Estructura química y biosíntesis	.....	12
2.2. Transporte y mecanismo de acción	.....	12
3. Determinación de la progesterona y el estradiol	.....	15
3.1. Desarrollo metodológico	.....	15
3.2. Progesterona	.....	17
3.3. Estradiol	.....	18
4. Objetivos	.....	22
5. Material y Metodos	.....	23
5.1. Inmunización y obtención de los antisueros	..	25
5.2. Titulación y Caracterización de los antisueros	.....	25
5.3. Especificidad de los antisueros	.....	27
5.4. Preparación de los sueros control	.....	28
5.5. Estandarización de las curvas patrón	.....	28
5.6. Validación del ensayo	.....	33
5.7. Análisis estadístico	.....	34
6. Resultados	.....	35
7. Discusión	.....	51
8. Conclusiones	.....	57

9.	Anexo. El Radioinmunoanálisis	.....	58
9.1.	Antecedentes Históricos	.....	58
9.2.	Bases Cinéticas del RIA	.....	58
9.3.	Isótopos Radioactivos	.....	62
9.4.	Estandarización y Control de Calidad del RIA	.....	64
9.5.	Radioinmunoanálisis para Esteroides	.....	65
10.	Bibliografía	.....	67

## ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
AcQKP5	Antisuero contra Progesterona del conejo 5
AcQKP6	Antisuero contra Progesterona del conejo 6
AcQKEC	Antisuero contra Estradiol del conejo C
A.E.	Actividad Específica
Ag	Antígeno
Ag*	Antígeno Radioactivo
Ag-Ac	Complejo Antígeno-Anticuerpo
BSA	Albumina Sérica de Bovino
C/D	Carbón cubierto con Dextran
Ci/m mol	Curies/milimoles
CPBA	Ensayo de unión a proteínas
cpm	Cuentas por minuto
C. T.	Cuentas totales
C.V.	Coefficiente de variación
D. S.	Desviación Estandar
E.	Coefficiente de Extinción Molar
E <sub>2</sub>	Estradiol
ELISA	Ensayo Inmunoenzimático
E. S.	Error Estandar
F. C.	Factor de Corrección
F. L.	Fase Lútea
GnRH	Hormona Hipotalámica Liberadora de Gonadotropinas
GPBS	Amortiguador de Fosfatos Salino con gelatina
<sup>3</sup> H	Tritio



H.E.	Hormonas Esteroides
IRMA	Ensayo inmunoradiométrico
K	Constante de Afinidad
LH	Hormona Luteotrópica
P <sub>4</sub>	Progesterona
PPO	2,5-difeniloxasol
RIA	Radioinmunoanálisis
% de Rec	Porcentaje de Recuperación
SCA	Suero Control Alto
SCB	Suero Control Bajo
SCM	Suero Control Medio
SHGB	Globulinas Transportadoras de Hormonas Sexuales
UNE	Unión no Específica

## RESUMEN

Se ha establecido que el radioinmunoanálisis (RIA) es uno de los métodos mas importantes para la cuantificación de las hormonas esteroides (HE), ya que al emplear anticuerpos (Ac) específicos contra la hormona que se desee cuantificar, permite determinar los bajos niveles circulantes de estas hormonas, y con ello determinar la etapa reproductiva en la que se encuentran los animales a partir de pequeñas cantidades de sangre. El uso de esta técnica en nuestro país, contribuye al estudio y mejoramiento de la producción ganadera y los problemas de salud en humanos. Sin embargo, los estuches comerciales para la cuantificación de las HE que existen en el mercado, son de uso limitado, porque restringen las condiciones del ensayo y son de alto costo, ya que en su mayoría son de importación. Esto representa un problema económico y experimental para nuestro equipo de trabajo, ya que en el se requiere la cuantificación cotidiana de HE en algunas especies de ruminantes. Por lo anterior, se marcó el objetivo de obtener Ac específicos contra progesterona ( $P_4$ ) y estradiol ( $E_2$ ), así como establecer las condiciones óptimas del RIA para evaluar los niveles de estas hormonas en suero de cabras y vacas. Se inmunizaron conejos Nueva Zelanda con 160 o 100  $\mu$ g de  $P_4$ -CMO:BSA o  $E_2$ -CMO:BSA respectivamente; el primer sangrado se realizó a los 8 días de la primera inmunización y posteriormente se reinocularon con intervalos de una semana por 6 ocasiones, titulándose en cada una el suero cosechado. Con base en el mejor título, se seleccionaron los antisueros a los que se les determinó la especificidad mediante reacciones cruzadas con varios esteroides.

La reacción cruzada de los antisueros obtenidos contra  $P_4$  (con el AcQKP6) fue de 13.3% para epipregnenolona, 4.4 % para pregnenolona y menos de este porcentaje para los demás esteroides; y para el AcQKP5 fue de 4.4% para pregnenolona, 4.0 % para epipregnenolona y menos de este porcentaje para los restantes. Con respecto a la reacción cruzada del antisuero obtenido contra  $E_2$  fue de 3.6% para estrona y menos del 0.01% para estriol, androstendiona,  $17\alpha$ -estradiol, progesterona y testosterona. La sensibilidad de estos ensayos permite detectar desde 6.25 pg/ml de  $P_4$  y 0.5 pg/ml de  $E_2$ . Los coeficientes de variación intra e interensayo en el RIA fueron para  $P_4$  de 10.9 % y 12.8 % y para  $E_2$  de 5% y 10% respectivamente.

Las determinaciones de  $P_4$  y  $E_2$  con estos sistemas fueron los siguientes: La media en los niveles de  $P_4$  en cabras durante el último tercio de la gestación (90-150 días) fue de 8.3 ng/ml y durante el periodo periparto disminuyó a 5.4 ng/ml, en tanto que para  $E_2$  en este periodo fue de 55.1 pg/ml. En el caso de las vacas, los niveles de progesterona en el estro, fase lútea y durante la gestación, fueron 0.9, 8.6 y 6.4 ng/ml respectivamente; en cuanto a estradiol los niveles en los mismos periodos fueron 10.6, 3.3 y 17.3 pg/ml respectivamente.

El establecimiento de las condiciones óptimas de los RIAs para evaluar  $P_4$  y  $E_2$  nos permite señalar que el grado de sensibilidad y especificidad de los antisueros obtenidos son suficientes para

detectar cambios fisiológicos en cabras y vacas. Asimismo, el contar con estos antisueros hace posible el desarrollo de otras técnicas inmunométricas para determinar los niveles de  $P_4$  y  $E_2$  permitiendo consecuentemente el estudio de las etapas reproductivas en estas especies. La utilización de los anticuerpos descritos en este trabajo, abatirá los costos de las determinaciones futuras de estas hormonas en el laboratorio.

## INTRODUCCION

Durante los últimos treinta años, el conocimiento de la endocrinología de la reproducción ha avanzado considerablemente. Estos adelantos, se han logrado primordialmente gracias al desarrollo de diversos métodos, que permiten cuantificar las concentraciones circulantes de las diferentes hormonas que participan en el control y regulación del ciclo reproductivo en los mamíferos y otros vertebrados.

En el caso de los rumiantes domésticos, se ha puesto particular interés en desarrollar técnicas confiables y sensibles para cuantificar las concentraciones circulantes de las hormonas esteroides. La utilización de estas técnicas es importante porque al conocer los niveles sanguíneos de dichas hormonas, se puede inferir la etapa reproductiva (gestación, celo, anestro, etc,) en la que se encuentran los animales.

Así, y con el propósito de ubicar en su contexto fisiológico específico a la presente tesis, se decidió revisar de manera breve en la primera parte el conocimiento actual acerca de la reproducción en los rumiantes domésticos. En una segunda sección, se aborda el desarrollo de los métodos empleados para cuantificar progesterona y estradiol en las especies mencionadas.

Posteriormente se plantean los objetivos específicos, material y métodos, discusión y conclusiones y por último un anexo acerca de las principales características de los componentes del RIA.

## 1. EL CICLO ESTRAL EN LOS RUMIANTES.

### ASPECTOS NEUROENDOCRINOS.

El tracto reproductor de la hembra madura sufre periódicamente una serie de cambios anatómo-funcionales. Estos cambios dependen y están regulados por la operación secuencial y cíclica de una compleja cascada de mecanismos neuroendócrinos que se integran e inician a nivel del sistema nervioso central en el área funcional conocida con el nombre de hipotálamo (Asdell, 1977).

Externamente sólo es posible observar en las especies domésticas, los cambios conductuales que presenta la hembra durante la etapa receptiva. Esta conducta es característica para una especie dada y se conoce como celo o estro y el periodo que transcurre entre un celo y otro se ha denominado ciclo estral. Cuando no se establece la gestación la hembra presenta estro a los intervalos regulares que caracterizan al ciclo de dicha especie (Levasseur y Thibault, 1985). Tradicionalmente se ha denominado como día 0 al día de la iniciación del celo; la duración del estro es característica de cada especie y varía levemente de una hembra a otra dentro de la misma especie (Cuadro 1).

La secuencia de eventos neuroendócrinos durante los ciclos estrales de la oveja, la cabra y la vaca son semejantes, excepto por su cronología. Por esta razón, sólo se describirá a manera de ejemplo el ciclo estral en la oveja.

Como se observa en el cuadro 1, la duración total del ciclo estral de la oveja es de 16 a 17 días y puede repetirse varias ocasiones en una estación reproductiva. Considerando como día

CUADRO 1. PRINCIPALES CARACTERISTICAS DEL CICLO ESTRAL EN ALGUNOS RUMIANTES DOMESTICOS.\*

ESPECIE	DURACION TOTAL DEL CICLO ESTRAL	DURACION DEL ESTRO	MOMENTO DE LA OVULACION
Cabra	21 días	32 a 40 horas	30 a 36 horas de iniciado el estro.
Vaca	21 a 22 días	18 a 19 horas	9 a 11 horas despues del estro.
Oveja	16 a 17 días	24 a 36 horas	24 a 30 horas de iniciado el estro.

\* Tomado de: Levasseur y Thibault, 1985.

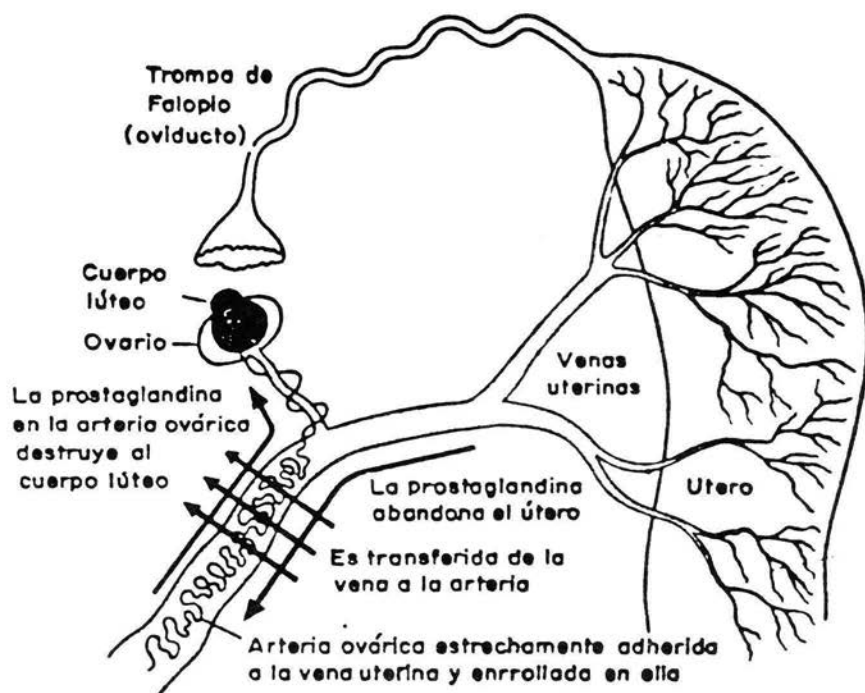
cero el día del estro, en esta especie la ovulación ocurre el día uno. A partir de ese día el cuerpo lúteo inicia su desarrollo secretando concentraciones crecientes de progesterona ( $P_4$ ) a partir del séptimo y hasta el día 15 (1.5-3 ng/ml); en ese momento la secreción de  $P_4$  declina bruscamente hasta concentraciones no detectables y permanece así por 2 días mas (Goodman, 1988; Romero y col, 1989). En el caso de no haber implantación de un cigoto, el endométrio secreta prostaglandina  $F2\alpha$ . Esta prostaglandina, esta presente en la sangre venosa uterina en altas concentraciones en el día 15 del ciclo y es responsable de la luteolisis y de la consiguiente caída en las concentraciones sanguíneas de  $P_4$  (ver figura 1). Como resultado de esta reducción de  $P_4$ , se libera hormona estimulante del foliculo (FSH) y un foliculo de Graaf inicia su desarrollo y secreta grandes cantidades de estrogénos y androgénos, que alcanzan sus valores máximos dentro de las 24 horas siguientes (día 15-16). En este periodo la hembra presenta comportamiento de celo. El incremento en la

secreción de estrógenos desencadena, 12 horas después, un aumento en la frecuencia de secreción de la hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas (GnRH) que induce a nivel hipofisiario, la liberación también pulsátil de FSH y de hormona luteinizante (LH). Este pico ovulatorio de LH solo puede ser inducido por el estrógeno en ausencia de la  $P_4$ . Así, la ovulación ocurre 24 horas después de iniciada la secreción pulsátil de LH. En este momento las células de la granulosa incrementan su permeabilidad y pueden obtener un mayor aporte sanguíneo y empezar a secretar  $P_4$  (Short, 1982).

Conforme se desarrolla nuevamente un cuerpo lúteo, se reinicia la secreción de  $P_4$ ; gradualmente el cuerpo lúteo adquiere una gran dependencia de la secreción baja, pero constante, de la LH y de la prolactina hipofisiarias que le son necesarias para su mantenimiento y su actividad secretoria. Los altos niveles de  $P_4$  en la fase luteínica impiden cualquier incremento repentino en la liberación de la LH como respuesta a las variaciones ocasionales del desarrollo folicular y de la secreción de estrógenos (Fig. 2) (Short, 1982).

## 1.2. ACCIONES BIOLÓGICAS DE LA $P_4$ Y EL $E_2$ .

a) En todos los mamíferos, incluyendo los rumiantes domésticos, la  $P_4$  sinergiza algunas acciones de los estrógenos. A nivel uterino, la  $P_4$  reduce la excitabilidad y contractilidad del miometrio y en el endometrio conjuntamente con los estrógenos, aumenta la secreción del líquido endometrial necesario para nutrir el blastocisto preimplantado. En el caso de la glándula



**FIGURA 1. HIPOTESIS LUTEOLITICA DE LA PROSTAGLANDINA.** Se postula la ruta por la cual la prostaglandina producida por el útero sensibilizado con progesterona puede entrar en la vena ovárica y destruir el cuerpo lúteo en la oveja. (Tomado de Short, 1982).



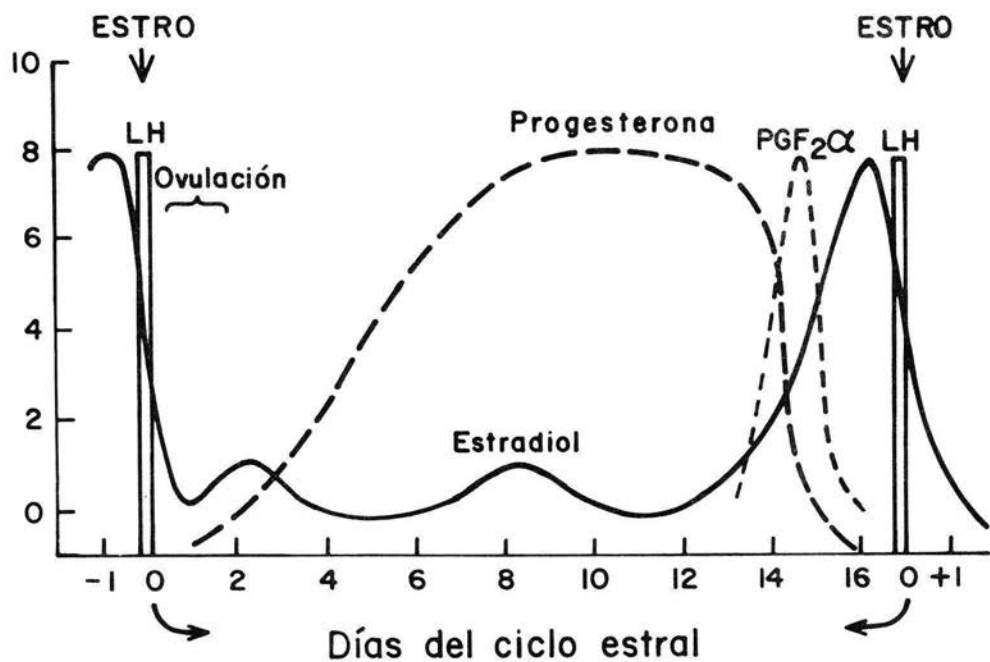


FIGURA 2. CURSO TEMPORAL Y SECUENCIA DE LOS CAMBIOS HORMONALES QUE CONDUCEN AL ESTRO Y A LA OVULACION EN LA OVEJA. (Tomado de McDonald, 1975).

mamaria, la  $P_4$  constituye parte del complejo neuroendócrino lactotrópico que participa en el crecimiento y desarrollo del sistema lóbulo alveolar de la glándula (Kaltenbach y Dunn, 1985). Por otra parte, a nivel hipotalámico, se ha relacionado esta hormona con la conducta sexual (Beyer y Gonzalez, 1986).

b) Los estrógenos son necesarios para que se manifieste la conducta de celo o estro a través de su efecto a nivel del sistema nervioso central. Inducen la queratinización del epitelio vaginal durante el ciclo estral, el crecimiento de los conductos de las glándulas del endometrio uterino y el crecimiento de los conductos en la glándula mamaria durante la lactogénesis. Otros efectos del estradiol en relación con la reproducción incluyen su capacidad para regular a través de mecanismos transhipotalámicos (GnRH) e hipofisarios directos, la liberación de las gonadotropinas FSH y LH (Henricks y Mayer, 1977).

Por otra parte, se ha visto que el  $E_2$  potencia los efectos de la oxitocina y estimula la producción de prostaglandinas durante el trabajo de parto. Los efectos del  $E_2$  en procesos no reproductivos, incluyen la estimulación de la utilización del calcio y la osificación de los huesos; también tiene un efecto anabólico protéico e incrementa el peso y la eficiencia alimenticia en los rumiantes (Kaltenbach y Dunn, 1985; Malkinson, 1975).

## **2. GENERALIDADES DE HORMONAS ESTEROIDES.**

### **2.1. ESTRUCTURA QUIMICA Y BIOSINTESIS.**

Todos los esteroides, mineralcorticoides, glucocorticoides, progestagenos, androgenos y estrogenos comparten la estructura química básica de un ciclo-pentano-perhidro-fenantreno (figura 3) como el del colesterol, que es su precursor principal, el cual se origina a partir de acetato.

La primera etapa de la síntesis de las hormonas esteroides ocurre a nivel mitocondrial y consiste en la eliminación de la cadena lateral del colesterol entre el carbono 20 y 22 (fig. 3, incisos 1,2,3) para formar la pregnenolona. Esta se convierte subsecuentemente a  $P_4$  en el retículo endoplásmico, mediante la  $3\beta$ -OH-deshidrogenasa y  $\delta 5,4$ -Isomerasa (inciso 4, fig 3.). La  $P_4$  puede transformarse en hidroxiandrostendióna mediante una hidroxilación (inciso 5) y una descarboxilación (inciso 6) y por otro lado puede seguir su transformación hacia cortisol. Los estrogenos se derivan de los androgenos por eliminación del grupo metilo del C19 y por aromatización del anillo A (inciso 7, fig 3.) (Kaltenbach y Dunn, 1985).

### **2.2. TRANSPORTE Y MECANISMO DE ACCION.**

Las hormonas esteroides circulan en el torrente sanguíneo íntimamente ligadas a proteínas plasmáticas. Esta unión a proteínas permite el transporte de los esteroides ya que sus características lipofílicas los hace relativamente insolubles en medio acuoso. Estas proteínas transportadoras son globulinas y de ahí su

BIOSINTESIS DE LA PROGESTERONA Y ESTRADIOL

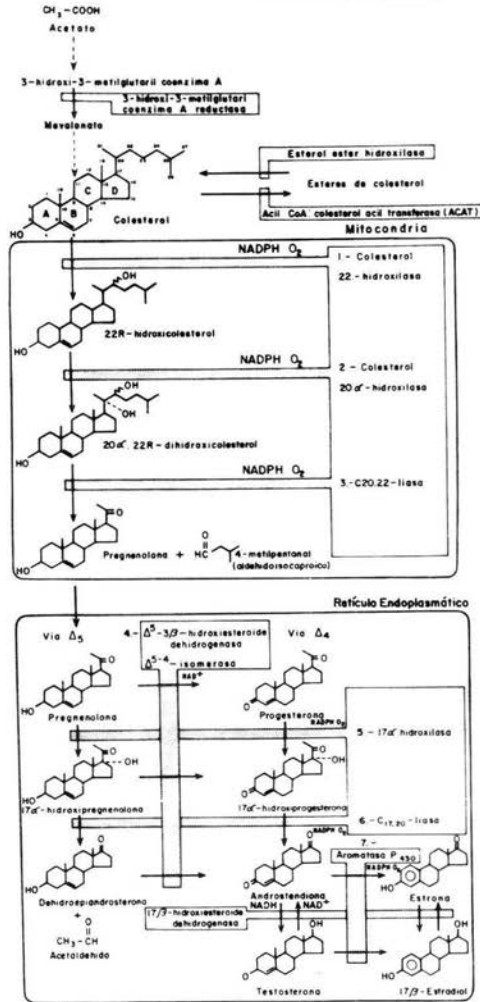


FIGURA 3. PRINCIPALES VIAS BIOSINTETICAS EN OVARIO PARA LA ESTEROIDOGENESIS. Los sistema enzimáticos están distribuidos en diferentes sitios subcelulares como se indica. (Tomado de Gore-Lagton y Armstrong, 1988.)

nombre genérico de globulinas transportadoras de hormonas sexuales (SHBG). Además de su función acarreadora, las SHBG aumentan la vida media circulante de los esteroides al disminuir su excreción y catabolismo. De la cantidad unida total (aproximadamente el 80 %) un porcentaje permanece libre (20 %) y es este el biológicamente activo (Penitik y col, 1982).

La mayoría de los esteroides se inactivan a nivel hepático por conjugación con sulfato o con un residuo de ácido glucurónico. Tales conjugados son hidrosolubles y por tanto se excretan como productos de desecho en la orina o las heces (Kaltenbach y Dunn, 1985).

Por sus propiedades liposolubles se ha propuesto que las hormonas esteroides pasan a través de la membrana celular mediante difusión simple, aunque algunos datos sugieren la posibilidad de un transporte mediado por proteínas. Una vez dentro de la célula, los esteroides se unen a proteínas citoplasmáticas llamadas receptores, los cuales son estereoespecíficos y poseen alta afinidad por un esteroide en particular. Esto es de esperarse ya que los niveles circulantes se encuentran entre  $10^{-10}$  a  $10^{-8}$  M. La interacción o unión hormona-receptor induce cambios conformacionales en este último que permite la translocación del complejo hormona-receptor del citoplasma al núcleo (Malkinson, 1975). Sin embargo, esta hipótesis del modelo del receptor citoplasmático y su translocación al núcleo, ha sido cuestionada por varios autores, los cuales han concluido que los receptores a esteroides residen principalmente en el núcleo (ver esquema 1) (Clark y Markaverich, 1988). A este nivel se une el complejo esteroide-receptor con un segmento definido del DNA, para modificar la

velocidad de transcripción de ciertos genes y dan como resultado la síntesis de moléculas de mRNA específicas. El mRNA resultante se transloca al citoplasma donde dirige la síntesis de proteínas específicas. La proteína recién sintetizada es responsable de los cambios observados en los tejidos blanco después de su exposición a los esteroides (Kaltenbach y Dunn, 1985).

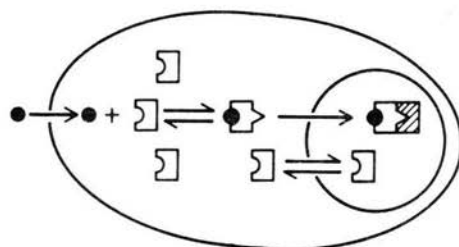
Con respecto a la similitud estructural y funcional de los receptores, ha sido investigado y parece ser que los receptores a hormonas tiroideas, son miembros de una familia de proteínas en las que se encuentran los receptores a hormonas esteroides; esto sugiere que los genes que codifican esta familia de proteínas, provienen de un gen ancestral común (Parker, 1988).

### **3. DETERMINACION DE PROGESTERONA Y ESTRADIOL**

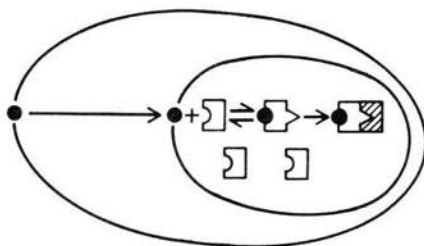
#### **3.1. DESARROLLO METODOLOGICO..**

Al igual que el resto de las hormonas conocidas, la cuantificación de los esteroides puede realizarse mediante uno o más de los siguientes métodos: ensayos de actividad biológica o bioensayos, determinaciones químicas, análisis de receptores e inmunoensayos. La información que brindan los bioensayos es insustituible para determinar la bioactividad o potencia biológica de la hormona aun cuando su sensibilidad es relativamente baja (Allen, 1930). La utilización de los bioensayos sigue siendo indispensable durante el aislamiento y purificación de las hormonas.

A. MODELO DE TRANSLOCACION



B. MODELO DE LOCALIZACION NUCLEAR



**ESQUEMA 1. LOCALIZACION CELULAR DE RECEPTORES A ESTEROIDES.** En el esquema superior (A), se muestra el modelo de translocación y en el inferior (B), el modelo de localización nuclear. Tomado de Clark y Markaverich, 1988).

### 3.2. PROGESTERONA.

La P<sub>4</sub> y otros progestagenos biológicamente activos pueden cuantificarse por su acción sobre el útero al reducir la excitabilidad y contractilidad del miometrio; con este método introducido por Allen (1930) se logró el aislamiento y, mas tarde, la caracterización de la progesterona. Posteriormente (Hooker y Forbes, 1949), se logró una mayor sensibilidad del ensayo depositando las muestras a determinar directamente en la luz del útero. Mas tarde y con base en las propiedades fisicoquímicas de los esteroides, se desarrollaron varias técnicas de determinación química para la P<sub>4</sub>. Así Edgar en 1953 publicó un metodo para aislarla y medirla de sangre y detectó concentraciones menores a 0.1 µg/ml en suero de ovejas. El desarrollo de las técnicas de cromatografía de gases significó un gran avance y permitió, no obstante su dificultad, detectar concentraciones en el orden de 10<sup>-6</sup> ng/muestra. Esta concentración aunque suficiente para cuantificar los niveles de la hormona durante el embarazo, carecía de la sensibilidad necesaria para analizar la producción ovárica de progesterona. Como ya se menciona, la introducción de los ensayos por saturación, marcó el inicio de una nueva era en la medición de las hormonas (Klopper y Fritz, 1982).

En el cuadro 2 se resumen en forma cronológica algunos estudios que reportan los niveles circulantes de P<sub>4</sub> en algunos rumiantes. Se indican las diferentes etapas del ciclo reproductivo, así como la técnica empleada. Se puede apreciar que la técnica más actual y la más sensible es el RIA independientemente de la especie estudiada y de la etapa del ciclo reproductivo.



CUADRO 2. NIVELES CIRCULANTES (promedio o intervalo) DE PROGESTERONA EN RUMIANTES (ng/ml)

AÑO	TECNICA	ESPECIE	(n)	ETAPA DEL CICLO			REFERENCIA
				Estro	F Lútea	Gest	
1964	Flsc	Cab	(5)	4.5			(23)
1966	Flsc	Cab	(15)	3.4	10.7	10.0	(24)
1972	CBPA	Cab	(6)	0.2	2.5-3.5	4.5-5.5	(65)
1972	CBPA	Cab	(10)			5.7-6.6	(30)
1976	RIA	Cab	(4)			4.0	(66)
1980	RIA	Cab	(20)	0.2	8.0		(48)
1984	RIA	Cab	(10)	0.2			(46)
1963	Crom	Vac	(2)	8.8-9.6			(42)
1962	Crom	Vac	(2)			7.5	(21)
1969	Crom	Vac	(7)	0.4	6.6	4.7-6.1	(62)
1970	CBPA	Vac	(6)	0.4	6.8	5.9	(15)
1971	CBPA	Vac	(10)		7.2		(25)
1973	RIA	Vac	(5)			7.0-8.0	(63)
1973	RIA	Vac	(2)	0.5			(18)
1975	CBPA	Vac	(3)	0.5			(37)
1976	RIA	Vac	(6)	0.1			(32)
1981	RIA	Vac	(5)		3.5-5.7		(67)
1982	RIA	Vac	(4)		5.4		(70)
1984	RIA	Vac	(9)		12.3		(68)
1985	RIA	Vac	(4)	0.4			(58)
1986	RIA	Vac	(7)	0.7			(41)
1987	RIA	Vac	(35)	1.2-1.3			(8)
1987	RIA	Vac	(12)	0.3			(11)
1987	ELISA	Vac	(2)	0.5			(52)
1987	RIA	Vac	(2)	0.5			(52)
1988	RIA	Vac	(10)	1.9	6.0		(36)
1969	Crom	Ove	(7)	0.1	1.5-3.1		(64)
1982	RIA	Ove	(6)		3.0		(70)
1984	RIA	Ove	(10)	3.9			(45)
1987	RIA	Ove	(5)	1.3			(44)
1989	RIA	Ove	(10)	0.3-0.5	1.0-1.6		(54)

Flsc:fluorescencia; CBPA:ensayo de unión a proteínas; Crom:cromatografía de gas; ELISA:inmunoensayo enzimático; F Lútea:fase lútea; Gest:gestación; Cab:cabra; Vac:vaca; Ove:oveja.

### 3.3. ESTRADIOL.

El desarrollo metodológico para la cuantificación de estrógenos ha sido paralelo al de la P<sub>4</sub>. El primer estrógeno identificado fue la estrona, cuyo aislamiento en forma cristalina pura tuvo lugar en 1929, siendo el segundo el estriol, menos activo, en 1930. Ambos se obtuvieron a partir de orina de mujer embarazada,

tratandose de productos de excreción. En 1935 se aislaron, a partir de cuatro toneladas de ovario de cerdo, 12 mg de un estrogeno mucho mas potente, el 17- $\beta$ -Estradiol (Barrington, 1975). En los últimos años se han desarrollado diversos métodos para su cuantificación tanto en orina como en plasma. Estos métodos incluyen el análisis de estrogenos en cromatografía en fase sólida realizadas por Abraham en 1969, utilizando el doble anticuerpo, el cual separa la hormona libre y unida mediante sulfato de amonio o carbón-dextran, hasta los radioinmunológicos más utilizados actualmente (ver anexo) (Haning y col, 1979).

La producción de Ac altamente específicos ha permitido el desarrollo y avance en las determinaciones para estradiol, sin el aislamiento cromatográfico o la previa extracción de la hormona a partir del suero problema. Las modificaciones realizadas del RIA original para estrogenos, incluyen la separación de los esteroides unidos a partir de los esteroides libres mediante filtración en gel o polietilén-glicol y el uso de E<sub>2</sub> marcado como radioligando. Sin embargo, actualmente se basan en los métodos descritos por Hotckiss y por Berhrman, en los cuales se emplean carbón/dextran para separar la fracción unida de la libre, tales modificaciones han llevado al establecimiento de un RIA mas rápido, barato y sensible (Beling, 1979).

A continuacion se presenta un cuadro sinóptico en el cual se aprecian las metodologías utilizadas en la actualidad para la cuantificación de E<sub>2</sub>.

CUADRO 3. NIVELES DE ESTRADIOL (promedio o intervalo)  
EN SUERO DE RUMIANTES (pg/ml).

AÑO	TECNICA	ESPECIE	(n)	ETAPA DEL CICLO			REFERENCIA
				Estro	F Lútea	Gest	
1976	RIA	Cab	(4)			165-260	(66)
1981	RIA	Cab	(6)			32.0	(13)
1984	RIA	Cab	(10)	10.0			(46)
1971	RIA	Vac	(10)	10.0	3.3		(25)
1972	CBPA	Vac	(9)	8.0			(57)
1972	RIA	Vac	(6)			3.7-4.8	(27)
1973	RIA	Vac	(2)	5.0			(18)
1973	RIA	Vac	(5)			900-1700	(63)
1974	RIA	Vac	(5)	8.0		300-400	(14)
1975	RIA	Vac	(3)	10-25			(37)
1976	RIA	Vac	(6)	13.5			(32)
1981	RIA	Vac	(6)	27.3			(47)
1982	RIA	Vac	(4)	6.6			(55)
1984	RIA	Vac	(9)	7.7			(68)
1986	RIA	Vac	(7)	7.1			(41)
1977	RIA	Ove	(6)	9.0			(33)
1985	RIA	Ove	(24)	6.9			(50)

CBPA:ensayo de unión a proteínas; Crom:cromatografía; F Lútea: fase lútea; Gest:gestación; Cab:cabra; Vac:vaca; Ove:oveja.

Como se muestra en los cuadros 2 y 3, las técnicas más utilizadas en los últimos 10 años son el RIA y el ELISA. Ambos métodos poseen la sensibilidad y precisión necesarias para cuantificar las pequeñas concentraciones de estas hormonas en la sangre de los rumiantes. También se aprecia en los cuadros mencionados, que existen discrepancias (dependiendo de la etapa del ciclo) en cuanto a los niveles de estas hormonas; esto se ha adjudicado, entre otras razones, a la raza de los animales (Kelly y col, 1984; Stabenfeldt y col, 1969), al manejo de las muestras (Wiseman y col, 1982) y a las técnicas utilizadas (Thorburn y col, 1969). Por el momento no se cuenta con valores universales válidos para los rumiantes domésticos.

Como ya se mencionó con anterioridad, los métodos más utilizados actualmente son el ELISA y el RIA ya que son los más sensibles y reproducibles. Sin embargo, el uso de estas técnicas representa varios problemas desde diferentes puntos de vista: uno es con respecto a las características restringidas del ensayo que exigen los estuches comerciales y otro es desde el punto de vista económico, ya que el costo de estos estuches es elevado y además por ser de importación.

Lo anterior ha originado la necesidad de obtener tanto los anticuerpos contra hormonas esteroides ( $P_4$  y  $E_2$ ) como estandarizar un RIA en el laboratorio, con el objeto de determinar los perfiles hormonales en diferentes etapas reproductivos en vacas y cabras. Por otra parte se determinaron los parametros para establecer un control de calidad mediante sueros control. La evaluación de estos sueros control y los experimentales, permitiran establecer en otros laboratorios valores de referencia con respecto a estas hormonas al determinarse bajo las mismas condiciones y será más factible poder hacer estudios comparativos. Por lo anterior, para la realización de la presente tesis se plantearon los siguientes objetivos:

#### 4. OBJETIVOS.

- Obtención y caracterización de anticuerpos contra P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub>.
- Estandarización del RIA.
- Validación del RIA en suero de rumiantes.

## 5. MATERIAL Y METODOS.

### 5.1. INMUNIZACION Y OBTENCION DE LOS ANTISUEROS

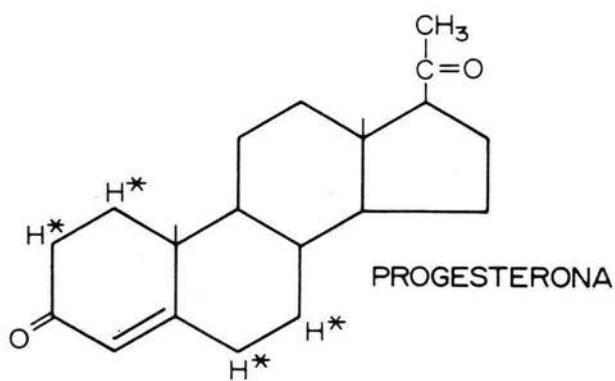
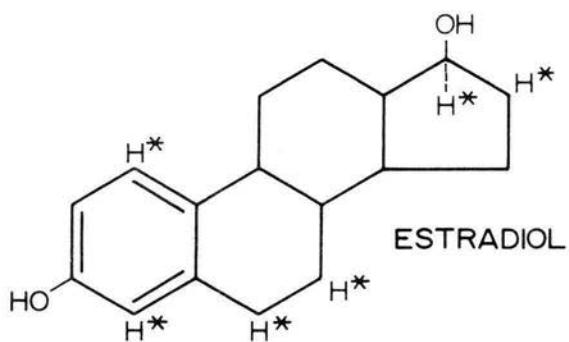
#### Material Biologico.

Para obtener los antisueros contra P<sub>4</sub> (Anti-P<sub>4</sub>) se utilizaron 5 conejos Nueva Zelanda machos, de aproximadamente 3 meses de edad. En el caso del E<sub>2</sub> (Anti-E<sub>2</sub>) se emplearon 4 conejos California castrados, de 1.8 a 2.0 Kg de peso. Estos animales se designaron con las letras A, B, C y D. Ambos grupos se mantuvieron en cuartos con temperatura controlada (25.0 ± 1.0 C), y con alimento y agua Ad libitum.

#### Reactivos.

La P<sub>4</sub> y el E<sub>2</sub> se conjugaron a la albúmina sérica de bovino (BSA). En el primer caso, se utilizó el conjugado 4-pregnen-3,20-diona (3-{O-Carboximetil}oxima: BSA) y para el estradiol, fue el 1,3,5,(10)-Estratien-3,17-β-diol, 6-{O-Carboximetil}oxima: BSA); adyuvante completo e incompleto de Freund, y solución salina 0.9%. Las hormonas se obtuvieron de Sigma Chem. Co.

Se utilizó en el RIA una solución amortiguadora de fosfatos 1 mM, adicionado de NaCl 150 mM y gelatina 1% (GPBS) ajustado a pH 7.0. Los esteroides radiactivos fueron obtenidos de New England Nuclear Co. (1,2,6,7,-<sup>3</sup>H{N}): progesterona (Actividad especifica {A.E.}: 101.7 Ci/m mol) y (2,4,6,7,16,17,-<sup>3</sup>H{N}): estradiol (A.E.:169.0 Ci/m mol) y se almacenaron en benceno y etanol respectivamente (ver fig. 4).



**FIGURA 4. FORMULA DESARROLLADA DE LOS ESTEROIDES RADIATIVOS EMPLEADOS EN ESTE TRABAJO. El asterisco indica la localización del isótopo en la molécula.**

### **Esquema de Inmunización.**

En el caso de la P<sub>4</sub>, se inocularon 10 µg del conjugado P<sub>4</sub>-CMO:BSA, resuspendidos en 160 µl de solución salina adicionados a 1.0 ml de adyuvante completo de Freund. La vía de administración fue intradérmica, en diferentes puntos de la región dorsal de los animales (ver esquema 2), con intervalos de una semana durante un mes (Dhafir y col, 1987).

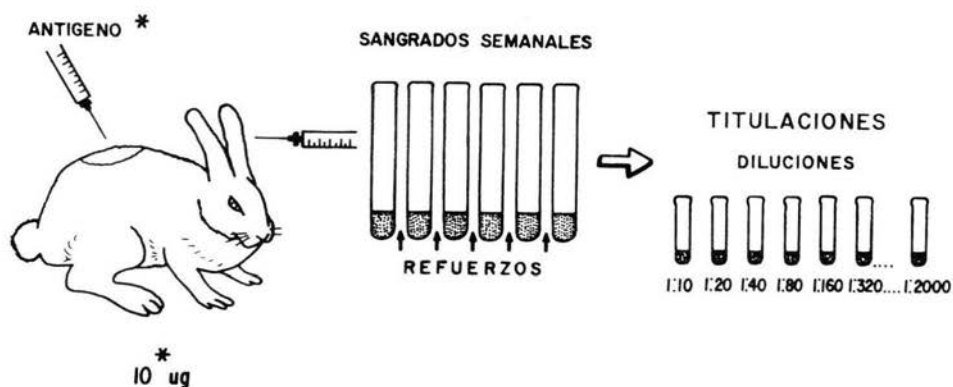
Para E<sub>2</sub>, el esquema de inmunización consistió en inocular 10 µg del conjugado E<sub>2</sub>-CMO:BSA disuelto en 100 µl de solución salina, adicionado a 1.0 ml de adyuvante completo de Freund. La vía de administración fue en el ganglio poplíteo solo la primera vez, sin el adyuvante de Freund y las inoculaciones posteriores fueron intradérmicamente con el adyuvante incompleto de Freund; la aplicación del antígeno fue semanal durante dos meses.

### **5.2. TITULACION Y CARACTERIZACION**

A partir de la primera aplicación del Ag, todos los animales se sangraron (vena auricular) semanalmente. Una vez obtenida esta muestra sanguínea (3.0 ml), los animales recibían el inóculo de refuerzo. El suero de las muestras se emplearon para la titulación.

La titulación de los antisueros se realizó por duplicado en diluciones seriadas 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 y 1:3200 que se incubaron en presencia de una concentración constante (10 pg/ml) de la hormona marcada correspondiente. Entre las 18 y 24 hr. de incubación se cuantificó la distribución de la hormona marcada entre la fracción unida y la libre. En base al porcentaje de unión obtenido, se seleccionaron los animales con mejor





P<sub>4</sub>-CMO:BSA

E<sub>2</sub>-CMO:BSA

160 ul SOL. SALINA

100 ul SOL. SALINA

1 ml ADYUVANTE COMPLETO

FREUND

**ESQUEMA 2. PROGRAMA DE INMUNIZACION.** Los refuerzos se aplicaron semanalmente. Los antisueros se titularon a las diluciones que se indican. P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub>-CMO:BSA, hapteno progesterona- y/o estradiol-orto-carboximetil:albúmina sérica de bovino.

respuesta inmune. En este momento se cosecharon los antisueros, para lo cual se procedió a sangrar a blanco por la vena auricular de la oreja a los animales seleccionados. Luego de obtenerse los antisueros respectivos, para su almacenamiento se hicieron fracciones de 500  $\mu$ l y se liofilizaron conservandose en un desecador a 4 C.

A los anticuerpos obtenidos se les asignó la siguiente clave: para P<sub>4</sub> AcQKP5 y AcQKP6 y para E<sub>2</sub> fue AcQKEc. Para establecer la dilución de trabajo para ser utilizada en la elaboración de la curva estandar, se determinó aquella dilución que uniera entre el 30 y 50 % de la hormona marcada.

### **5.3. ESPECIFICIDAD DE LOS ANTISUEROS.**

Las reacciones cruzadas incluyeron aquellos esteroides de mayor importancia biológica que por sus niveles circulantes pudieran interferir en el RIA. Los esteroides empleados se indican en el cuadro 4. Una vez determinada la especificidad de los anticuerpos, se procedio a validar el ensayo utilizando sueros controles de borregas, para determinar la fracción mínima necesaria para la sensibilidad del ensayo, a partir de la extracción.

CUADRO 4. ESTEROIDES EMPLEADOS PARA DETERMINAR LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTISUEROS ANTI-P<sub>4</sub> Y ANTI-E<sub>2</sub>.

COMUN	NOMENCLATURA	ESTRUCTURAL
-----		
PROGESTERONA		
Pregnenolona		5-β-pregnen-3-β-ol-20-ona
Allopregnenolona		5-α-pregnan-3-β-ol-20-ona
Epipregnenolona		5-β-pregnan-3-α-ol-20-ona
Testosterona		17-β-hidroxi-4-androsten-3-ona
17-β-Estradiol		1,3,5(10)-estatién-3,17 β-diol
ESTRADIOL		
Estrona		5-α-pregnan-3-β-ol-20-ona
Estriol		1,3,5(10)-estratién 3,17 β-diol
Androstendiona		4-Androsten-3-17-diona
17-α-Estradiol		1,3,5(10)-estratién-3,17 α-diol
progesterona		4-pregnen-3,20-diona

#### 5.4. PREPARACION DE LOS SUEROS CONTROL.

Estos sueros se obtuvieron de 3 borregas en diferentes etapas reproductivas y se clasificaron de la siguiente manera: suero control bajo (SCB) correspondiente a la etapa de estro, suero control medio (SCM) en fase lútea y suero control alto (SCA) en la gestación. Inicialmente se llevo a cabo la extracción de las muestras variando las cantidades de suero. Los diferentes volúmenes de los sueros control utilizados fueron los siguientes: para P<sub>4</sub> de 100, 200 y 250 μl en tanto que para E<sub>2</sub> se probaron 100, 200 y 500 μl.

Quando se estableció el volúmen adecuado para los controles, problemas y recuperaciones, se procedió al montaje de las curvas patrón.

#### 5.5. ESTANDARIZACION DE LAS CURVAS PATRON.

**Preparacion de soluciones estandar.** Se prepararon soluciones madre de P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub> de 1.0 mg/10 ml de etanol (grado espectrofoto-

métrico). La concentración de cada hormona se corroboró y ajustó por espectroscopía de U.V. Para  $P_4$  en un intervalo de longitud de onda de 210-270 nm (pico máximo de absorbencia: 240 nm, coeficiente de extinción molar  $\{E\}$  17000), y para  $E_2$  235-300 nm (pico máximo de absorbencia: 280 nm,  $E$  272.3) (Windholz, 1976). A partir de estas soluciones se realizaron diluciones para obtener las concentraciones de hormona correspondientes a los estándares empleados en los ensayos, las cuales abarcan los siguientes intervalos: 0.25 - 3.2 ng/ml para  $P_4$  y 0.5 - 32.0 pg/ml para  $E_2$ .

**Preparación de las hormonas radiactivas o trazador.** Se utilizó  $P_4$ -(1,2,6,7- $^3H(N)$ ) A.E. 101.7 Ci/m mol y  $E_2$ -(2,4,6,7,16,17- $^3H(N)$ ), A.E. 169 Ci/m mol. se diluyeron en GPBS hasta tener 10 pg. En ambos casos esta dilución equivale aproximadamente a 10,000 cpm/100  $\mu$ l.

**Extracción de las hormonas esteroides.** En tubos vacutainer se adicionaron 100  $\mu$ l (para  $P_4$ ) o 500  $\mu$ l (para  $E_2$ ) del suero a medir. Se agregaron 5.0 ml de eter y se agitaron los tubos por un minuto. se dejaron separar las fases (acuosa y orgánica) por 20-30 min., posteriormente se decantó la fase orgánica a otro tubo, este se evaporó a sequedad a 37 C y a estos tubos se les adicionó 2.0 ml de amortiguador (GPBS) y se resuspendieron con agitación por 1 min. incubandose a 37 C por una hora. Finalmente los tubos se agitaron por 1 min. y de esta suspensión se utilizó una fracción por duplicado para montar el RIA.

Para determinar la eficiencia de este método de extracción, se realizó la misma técnica con sueros agregados. Para preparar los

sueros agregados se adicionó a tubos vacutainer 400  $\mu$ l de suero para extracciones (se realizó mezclando el suero de 10 cabras mestizas en periodo periparto) y 100  $\mu$ l del trazador (10,000 cpm). De la suspensión final, 500  $\mu$ l se transfirieron a viales que contenían 5.0 ml de líquido de centelleo. Posteriormente los viales se agitaron y contaron por un minuto en un espectrofotómetro de emisión  $\beta$ . El porcentaje de recuperación del ensayo se determinó utilizando los siguientes calculos:

$$\text{Para corregir por volúmen} \quad \frac{2.0 \text{ ml vol. final}}{0.5 \text{ ml vol. fracc}} = 4$$

$$\% \text{ de Rec} = \frac{\text{promedio de las cpm de las fracciones} \times 4}{\text{c.p.m. totales}} \times 100$$

**Sistema de separación.** Se determinó el sistema óptimo de separación de las fracciones libre y unida con una suspensión de carbón recubierto con dextran en GPBS, la función de estas partículas es de absorber moléculas pequeñas que se encuentran en el sistema. Las diferentes concentraciones de carbón-dextran (c/d) que se probaron fueron las siguientes:

$P_4$	$E_2$
Carbón - Dextran	Carbón - Dextran
0.006% - 0%	0.005% - 0%
0.06% - 0.006%	0.05% - 0.005%
0.6% - 0.06%	0.5% - 0.05%

**Control de calidad.** Para determinar la reproducibilidad y la sensibilidad de los ensayos, se realizaron curvas estandar para AcQKP5, AcQKP6 y AcQkEc. Las condiciones para desarrollar las

curvas estandar se describen en el siguiente cuadro:

**CUADRO 5. REACTIVOS Y VOLUMEN ( $\mu$ l) QUE SE ADICIONA A LOS DIFERENTES GRUPOS DE TUBOS**

TUBO	GPBS	AC	ESTANDAR	PROBLEMA	TRAZADOR	C/D
CT	800	-	-	-	100	-
UNE	600	-	-	-	100	200
CERO	500	100	-	-	100	200
CURVA	-	100	500	-	100	200
PROBL.	-	100	-	500	100	200

En el cuadro 5 se indican los grupos de tubos que se preparan para cada ensayo, así como los reactivos y el volumen que se adiciona en cada caso. El volumen final del ensayo es de 900  $\mu$ l. Los tubos denominados cuentas totales (CT) solo contiene GPBS y el trazador. El grupo de tubos UNE incluye al GPBS, el trazador y la solución de C/D; la ausencia de Ac en ellos permite cuantificar la unión no específica del Ag\* o daño del ensayo. Los tubos denominados CERO incluyen el GPBS, anticuerpo (ya sea AcQKP5, AcQKP6 o AcQKEc), el trazador y al C/D; en estos tubos se calcula el porcentaje de unión del Ac y la hormona marcada. Los tubos de la CURVA incluyen el estandar respectivo, el Ac, el trazador y el C/D; aquí se cuantifica la competencia por los sitios de unión al Ac de parte del Ag frío o estandares y del trazador. En los tubos PROBLEMA que contienen la fracción de los sueros a medir, el Ac, el trazador y el C/D, se mide la cantidad de hormona desconocida contenida en la muestra problema mediante la competencia por los sitios de unión al Ac de parte del estandar, trazador y muestra problema.

**Desarrollo del ensayo.** El ensayo se llevo a cabo por duplicado empleando tubos de vidrio 100 x 75 mm. Los tubos se agitaron e incubaron 24 hr a 4 C. Para separar la hormona libre de la unida se agrego el C/D y se centrifugó a 2500 rpm durante 30 min, 4 C. Los tubos se decantan y al sobrenadante se le adicionó líquido de centelleo. Los viales se contaron por un minuto en un espectrómetro de emisión  $\beta$ .

**Calculos.** Al termino del conteo, se calculó el porcentaje de unión no específica. Este calculo se realizó según la ecuación 1 y su resultado constituye un factor de corrección para el resto del ensayo.

$$\% \text{ UNE} = \frac{\text{c.p.m. del sobrenadante}}{\text{c.p.m. totales}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

El porcentaje de unión del CERO ( $B_o$ ) se calculó de acuerdo a la ecuación 2.

$$B_o = \frac{\text{c.p.m. del sobrenadante del CERO} - \text{c.p.m. UNE}}{\text{c. p. m. totales}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Para determinar lo unido sobre el total (U/T o B) se realizó de la siguiente forma:

$$B = \frac{\text{c.p.m. del sobrenadante} - \text{c.p.m. del UNE}}{\text{c. p. m. totales}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Para determinar el porcentaje de unión de los estandares (B/ $B_o$ ), se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$B/B_o = \frac{\text{Ecuación 3}}{\text{Ecuación 2}} = \frac{U/T}{B_o} \times 100$$

Luego de calcular el B/Bo se graficó en escala logarítmica, colocando en el eje de las ordenadas este porcentaje y en el eje de las abscisas la concentración de los estándares en ng/tubo (para P<sub>4</sub>) o pg/tubo (para E<sub>2</sub>), y así se construye la curva estándar. Para obtener los ng o pg/ml de las muestras problema, el valor obtenido de B/Bo se extrapola en la curva estándar y se multiplica por el factor de corrección (F.C.), que es obtenido como sigue:

Partiendo de 0.1 ml de suero problema, se corrige primero por ml.

$$\frac{1 \text{ ml}}{0.10 \text{ ml}} = 10$$

Y después se incluye el % de recuperación

$$F. C. = \frac{4 \times 10}{\% \text{ de Rec.}} \times 100$$

En el caso de 0.5 ml de suero problema el factor se modifica

$$F. C. = \frac{4 \times 2}{\% \text{ de Rec.}} \times 100$$

## 5.6. VALIDACION DEL ENSAYO.

### a) Vacas.

Se determinaron las concentraciones de P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub> utilizando 26 animales de la raza Holstein. Los animales pertenecían a un hato de vacas superovuladas, registradas en agosto de 1989 en LICONSA



Edo. de Méx. y al hato H-V2 de la Universidad de Aguascalientes en 1984 y sus edades oscilan de 3 a 5 años. Todos los animales estaban sujetos a un manejo como se indica en el cuadro 6; los animales se encontraban en diferentes fases o periodos del ciclo reproductivo, los cuales fueron determinados de acuerdo a los criterios ahí señalados.

CUADRO 6. PERIODO REPRODUCTIVO DE LAS VACAS INCLUIDAS EN EL PRESENTE ESTUDIO

NUMERO	FASE REPRODUCTIVA	CRITERIO
9	Estro	Conducta (celador)
5	Fase Lútea (día 12 a 15 del ciclo estral)	Palpación cuerpos lúteos
15	Gestación	Inseminación Natural

#### **Cabras.**

Se utilizaron 12 cabras mestizas pertenecientes al hato H-1 y H-2 del rancho La Serpentina Queretaro, Qro. y sus edades estaban entre los 12 a 18 meses. Todos los animales se encontraban bajo pastoreo de agostadero natural y se registró el día de empadre. Se determinó los niveles de  $P_4$  y  $E_2$  en estos animales durante el último tercio de la gestación (90 - 150 días) y durante periodo periparto (145 - 150 días). Todos los animales se sangraron semanalmente por venopunción yugular.

#### **5.7. ANALISIS ESTADISTICO.**

Todos los datos se expresaron como medias  $\pm$  desviación estandar (D.S.), y error estandar (E.S.). Los coeficientes de variación se calcularon mediante la formula: Coeficiente de Variación = C.V.

## 6. RESULTADOS.

### TITULACION Y CARACTERIZACION DE LOS ANTISUEROS.

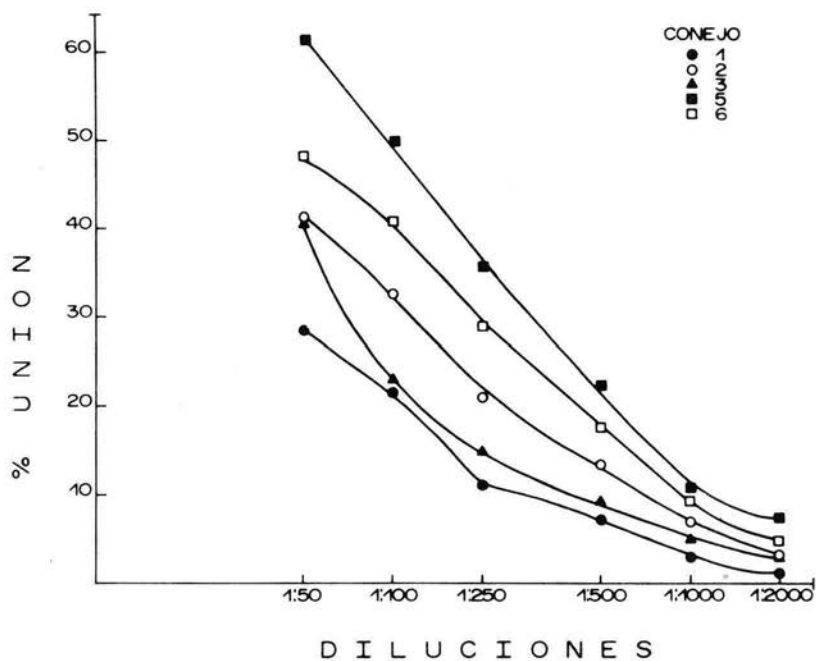
Antisueros a Progesterona (Anti-P<sub>4</sub>). Al cabo del primer mes de iniciada la inmunización, el porcentaje de unión de los Anti-P<sub>4</sub> de los conejos 1, 2, 3, 5 y 6 fue del 12, 20, 15, 35 y 30 % respectivamente, a la dilución 1:250 (gráfica 1). Estos títulos iniciales permitieron seleccionar a los conejos 5 y 6 por su mejor respuesta y se reinocularon, una vez más, antes de obtener los antisueros que se denominaron AcQKP5 y AcQKP6.

Antisueros a Estradiol (Anti-E<sub>2</sub>). En el caso de los Anti-E<sub>2</sub> la respuesta inmunológica fue más lenta y se necesitaron ocho semanas de reinoculación para obtener un porcentaje de unión de apenas 1, 4 y 18 % para los conejos A, B y C respectivamente a la dilución de 1:320 (gráfica 2). Por lo tanto, se decidió eliminar a los conejos A y B, y solamente se reinoculó una vez más al conejo C.

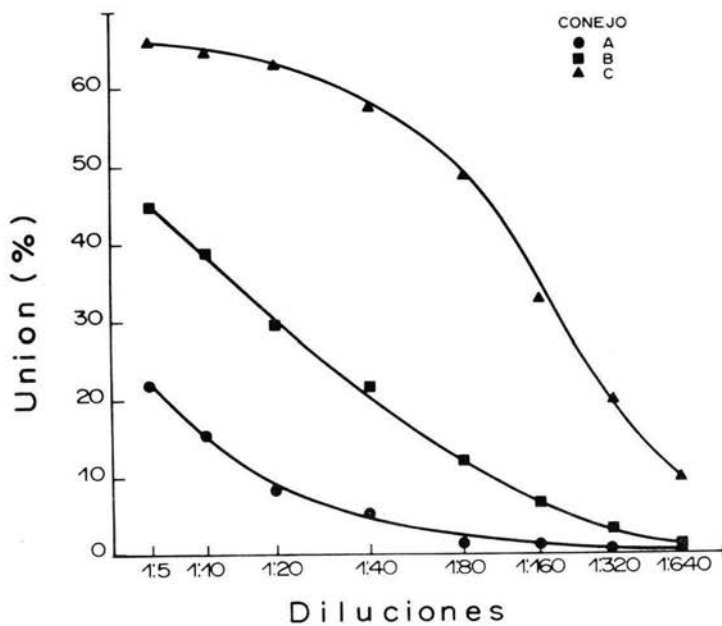
En el cuadro 7 se muestra el título alcanzado por los Anti-P<sub>4</sub> (AcQKP5 y P6) durante la quinta semana y por el Anti-E<sub>2</sub> (AcQKEC) durante la novena semana de inoculación.

### Especificidad de los Antisueros.

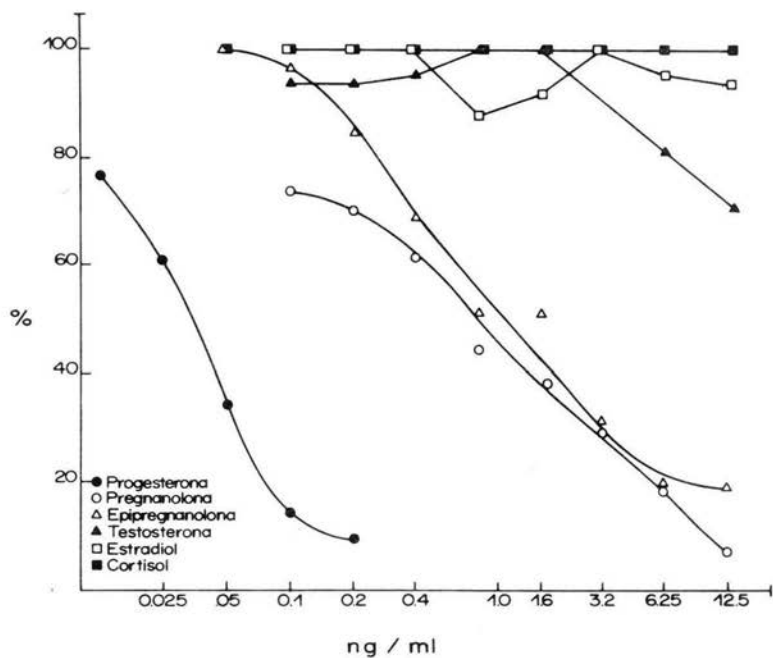
Los resultados correspondientes para los Anti-P<sub>4</sub> (AcQKP5 y AcQKP6) se resumen en el cuadro 8. Es claro que en ambos casos los porcentajes de reacción cruzada con los metabolitos o los precursores de esta hormona son despreciables. En la gráfica 3 se muestran estos mismos resultados para el AcQKP5 ya que este fué



GRAFICA 1. TITULACION DE LOS DIFERENTES ANTISUEROS A PROGESTERONA. En el eje de las ordenadas se muestra el porcentaje de unión del ligando radioactivo ( $P_4-^3H$ ) con respecto a las diluciones ensayadas (eje de las abscisas).



**GRAFICA 2. TITULACION DE LOS DIFERENTES ANTISUEROS A ESTRADIOL.** En el eje de las ordenadas se muestra el porcentaje de unión del ligando radioactivo ( $E_2-^3H$ ) con respecto a las diluciones ensayadas (eje de las abscisas).



**GRAFICA 3. INMUNOREACTIVIDAD CRUZADA DE LOS ANTISUEROS COSECHADOS.** Reacciones cruzadas del AcQKP5 en presencia de precursores de progesterona y otras hormonas esteroides de importancia biológica. Las ordenadas muestran el porcentaje de unión y las abscisas la concentración de los diferentes ligandos ensayados.

el antisuero empleado en el resto de la estandarización

CUADRO 7. TITULO DE LO ANTISUEROS CONTRA P<sub>4</sub> (AcQKP5 y P6) Y E<sub>2</sub>(AcQKEc) COSEHADOS EN LA PRESENTE TESIS.

	Ac QKP5	AcQKP6	AcQKEc
dil. inicial	1:250	1:300	1:1400
dil. final	1:2250	1:2700	1:12600
% de unión	30	30	45

incluyendo la validación del RIA correspondiente. Esta selección se baso primordialmente en el hecho de que el AcQKP6 resultó ser más termolábil que el AcQKP5. En la gráfica 4a. se observa que el AcQKP6 a temperatura ambiente muestra porcentajes de unión menores que los observados en la curva estandar típica (gráfica 4b). Esta diferencia se observa desde el promedio de los CEROS ( $16.6 \pm 4.8\%$ ) con respecto a la gráfica 4b, ( $30.0 \pm 1.3$ ), y sugiere un desplazamiento dependiente de temperatura, ya que las curvas (4a y 4b) se realizaron a 37 y 4 C respectivamente. En el siguiente cuadro se muestran los % de reacción cruzada con los 2 antisueros Anti-P<sub>4</sub>.

CUADRO 8. INMUNOREACTIVIDAD CRUZADA DE LOS AcQKP5 y AcQKP6 PARA LOS PRINCIPALES LIGANDOS DEL GRUPO DE PROGESTINAS Y OTROS ESTEROIDES AFINES.

L I G A N D O

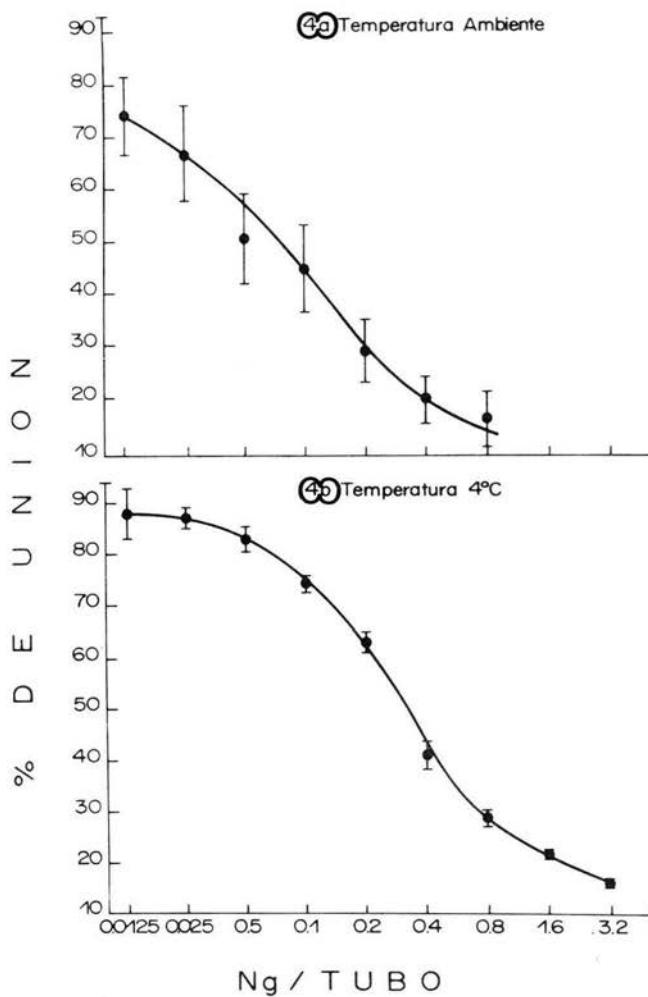
NOMBRE COMUN	NOMBRE QUIMICO	REACCION CRUZADA (%)	
		AcQKP5	AcQKP6
Progesterona	4-pregnan-3-20-diona	100.0	100.0
Pregnenolona	5-β-pregnan-3-β-ol-20-ona	4.4	4.4
Epipregnenolona	5-β-pregnan-3-α-ol-20-ona	4.0	13.3
Allopregnenolona	5-α-pregnan-3-β-ol-20-ona	0.0	0.0
Testosterona	17-β-hidroxi-4-androsten-3-ona	0.0	0.0
Estradiol	1,3,5(10)-estratien 3,17 β-diol	0.0	0.0
Cortisol	4-pregnen-11 B,17α,21-triol-3,20-diona	0.0	0.0

Estos ensayos se realizaron a 4 C.

Anti-E<sub>2</sub>. Los resultados se muestran en la gráfica 5. Es claro que al 50% de unión a estradiol, la estrona solo compete con un 3.5%, el estriol con 0.1% y menos del 0.01% para los esteroides restantes. Estos resultados se encuentran resumidos en el recuadro de la misma gráfica 5.

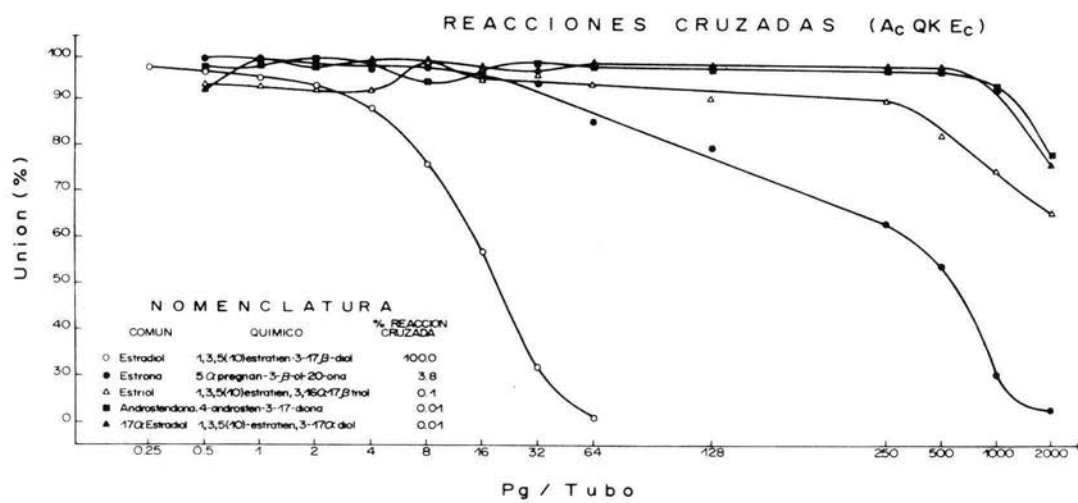
**Sueros Control.**

El volúmen ideal para detectar con confiabilidad los niveles circulantes de P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub> en sueros de ovejas (controles) fué de 100 y 500 μl respectivamente ya que los niveles detectados caen dentro de los intervalos de sensibilidad de sus respectivas curvas estandar. Con estos volúmenes de suero los niveles de P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub> durante el estro (SCB) oscilaron de 0.2 a 1.5 ng/ml y de 9.7 a 23.0 pg/ml respectivamente. Durante la fase lútea (SCM) los niveles de P<sub>4</sub> practicamente duplicaron el valor obtenido durante el estro (ver cuadro 9). En este periodo el E<sub>2</sub> registró los valores mas bajos con respecto al estro y a la gestación. En cuanto a la gestación (SCA), los valores de la P<sub>4</sub> oscilaron de



**GRAFICA 4. TERMODEPENDENCIA DE LA REACCION ANTIGENO-ANTICUERPO.** En la mitad superior se muestra la curva estandar y la afinidad del AcQKP6 a temperatura ambiente. La mitad inferior muestra la curva estandar del mismo anticuerpo a 4 C. En ambas graficas, cada punto representa la media  $\pm$  E.E. (n = 10).





**GRAFICA 5. INMUNOREACTIVIDAD CRUZADA CON AcQKEc.** En el recuadro inferior se observan los porcentajes de reacción cruzada de los esteroides empleados en esta tesis.

5.5 a 6.5 ng/ml siendo 5 veces mayor con respecto al estro, en tanto que los niveles de E<sub>2</sub> aumentaron con respecto al estro y la fase lútea.

CUADRO 9. CONCENTRACIONES PROMEDIO ± E.E. DE P<sub>4</sub> Y E<sub>2</sub> EN 100 Y 500 μl DE SUERO CONTROL RESPECTIVAMENTE, n= 5

SUERO CONTROL	PROGESTERONA (ng/ml)	ESTRADIOL (pg/ml)
S. C. B.	1.3 (±) 0.6	17.9 (±) 6.4
S. C. M.	3.3 (±) 1.2	0.8 (±) 0.07
S. C. A.	5.8 (±) 1.05	27.5 (±) 5.4

#### Estandarización de las curvas patrón del ensayo.

Para establecer las condiciones óptimas del RIA, se estudiaron los siguientes parametros:

a) Sistema de Separación. En el cuadro 10 se muestran los resultados a este respecto. Es claro que las proporciones carbón:dextran (C/D) de 0.6 : 0.06 y de 0.5 : 0.05 son las óptimas para separar P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub> respectivamente.

CUADRO 10. SISTEMA OPTIMO PARA SEPARAR P<sub>4</sub> Y E<sub>2</sub>)

P <sub>4</sub>	PROPORCION C/D		E <sub>2</sub>	UNE CERO	
	UNE	CERO		UNE	CERO
0.6 : 0.0	3.5	28.0	0.5 : 0.0	2.3	31.0
0.6 : 0.03	3.9	29.7	0.5 : 0.02	3.2	30.9
0.6 : 0.06	3.2	30.2	0.5 : 0.05	1.9	42.5

Las proporciones del C/D, UNE y CERO se expresan como porcentaje. Se empleó al AcQKP5 para calcular el CERO en el ensayo para P<sub>4</sub>.

b) Eficiencia de la reproducibilidad del método de extracciones. Vario entre 87 a 90 % para P<sub>4</sub> (n = 20) y entre 90 a 95 % para E<sub>2</sub>

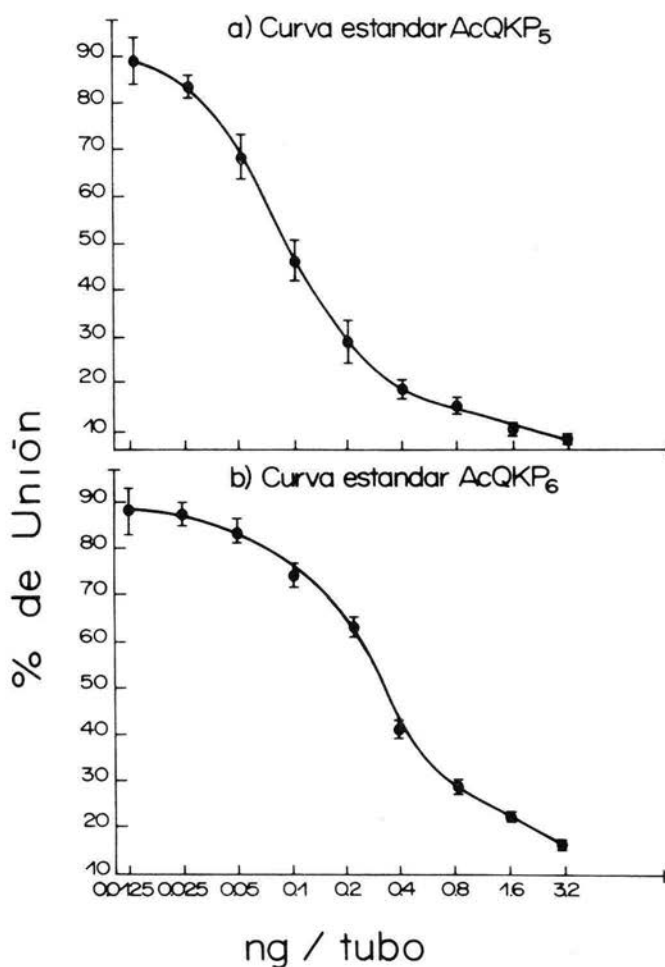
(n = 20).

c) Control de Calidad. En las gráficas 6 y 7 se muestran las curvas patrón para  $P_4$  y  $E_2$  respectivamente. Cabe señalar que el comportamiento de estas gráficas representan el de una curva tipo. Los coeficientes de variación intraensayo para  $P_4$  (n=20) y  $E_2$  (n=10) fueron de 10.9% y de 5.02% respectivamente. Es importante señalar que este coeficiente incluye no solo el procedimiento de extracción sino también al desarrollo del RIA. La variación interensayo en 10 muestras analizadas en 10 diferentes fechas por un periodo de 3 meses, fué de un coeficiente de 12.8% y de 10.4% para  $P_4$  y  $E_2$  respectivamente.

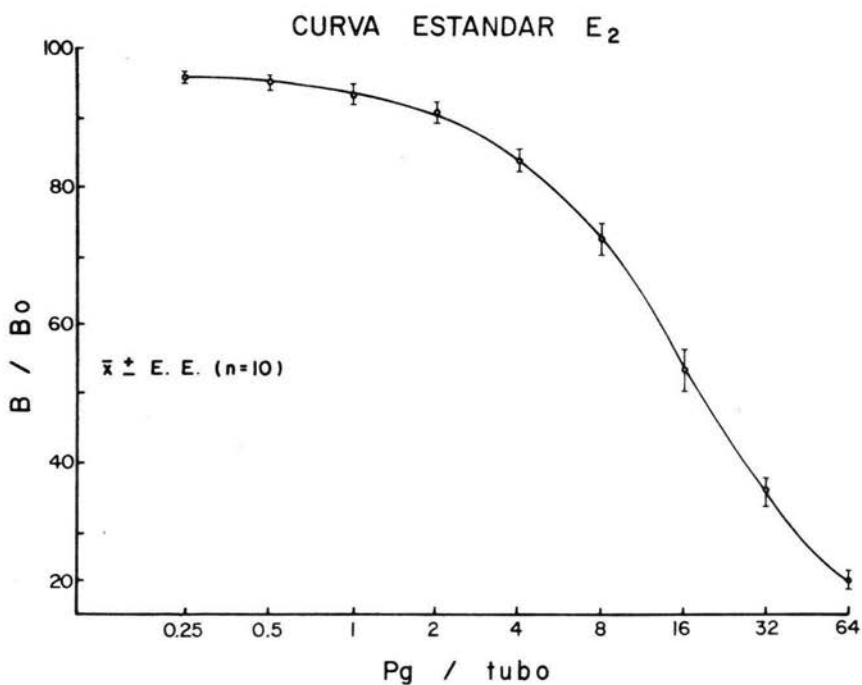
f) Desarrollo final del ensayo. El tiempo de incubación necesario para alcanzar el equilibrio de la reacción Ag-Ac, fué de 18 a 24 horas a 4 C. El volumen final de cada tubo, que incluía los elementos señalados en el cuadro 5, fue de 900  $\mu$ l; la fracción de los sueros control y problema fue de 100  $\mu$ l para  $P_4$  y de 500  $\mu$ l para  $E_2$ .

#### **Validación del Ensayo.**

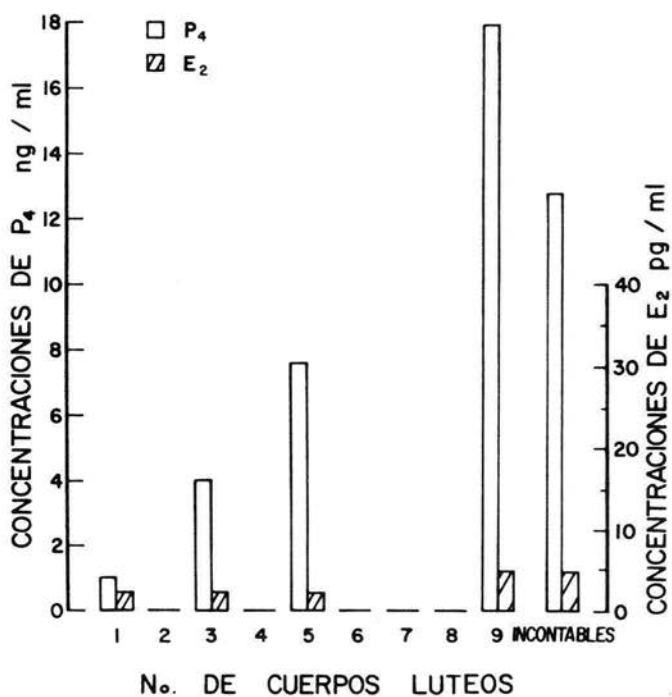
Niveles Circulantes de  $P_4$  y  $E_2$  en Vacas. Como se resume en el cuadro 11, los niveles de  $P_4$  durante el estro son significativamente menores ( $0.9 \pm 0.08$ ) a los detectados en el resto de los periodos analizados en esta especie. En contraste, y como se muestra en la gráfica 8, durante la fase lútea se observa un incremento proporcional de progesterona con respecto al número de cuerpos lúteos, alcanzando valores de hasta 18 ng/ml cuando se



**GRAFICA 6. CURVAS PATRON DE PROGESTERONA.** En la grafica superior (6a) se muestra la curva estandar realizada con el AcQKP<sub>5</sub>. En la grafica inferior (6b) se ilustra la curva patrón con el AcQKP<sub>6</sub>, ambas curvas se realizaron a 4 C. Cada punto representa la media  $\pm$  E.E. (n = 22). Cabe señalar que la zona de mayor linealidad es de 0.05 a 0.4 ng/tubo para la curva 6a y de 0.1 a 0.8 ng/tubo para la 6b.



**GRAFICA 7. CURVA PATRON DEL 17-β-ESTRADIOL.** En esta grafica se observa la curva estandar con el AcQKEc. El intervalo de mayor sensibilidad es de 2.0 a 32.0 pg/tubo. Cada punto representa la media ± E.E. (n = 10).



**GRAFICA 8. NIVELES DE PROGESTERONA Y ESTRADIOL EN FASE LUTEA DE VACAS.** En esta grafica se muestra en el eje de las ordenadas la concentración de las hormonas mencionadas y en el eje de las abscisas el número de cuerpos lúteos. Cada punto corresponde a un animal.

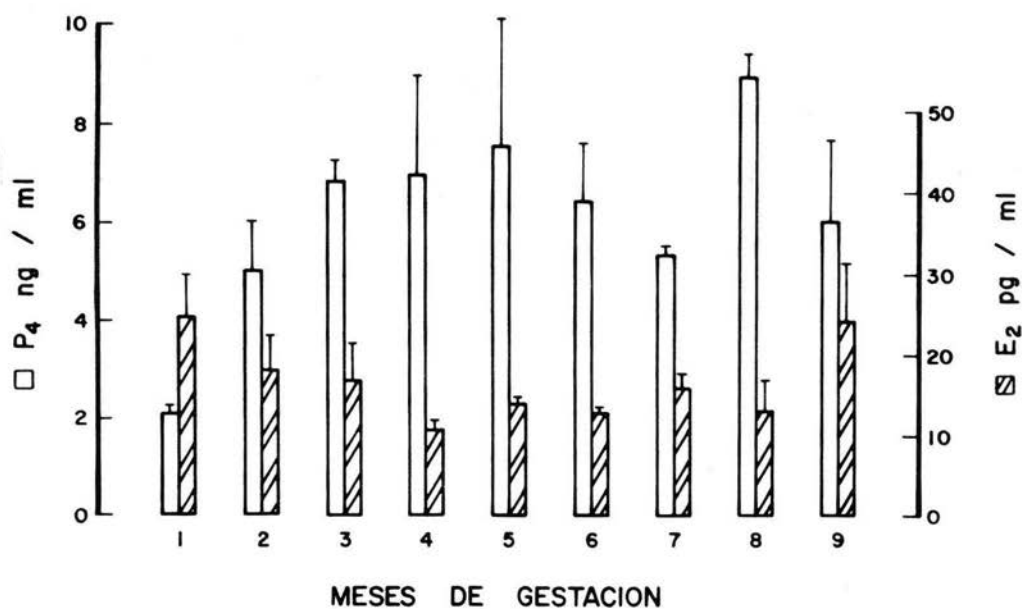
presentan 9 cuerpos lúteos. Durante este estadio reproductivo se observa que los niveles promedio de  $E_2$  ( $3.3 \pm 0.6$ ) son los más bajos de todo el estudio.

El estudio durante la gestación abarcó los nueve meses. En la gráfica 9 se puede observar que la  $P_4$  aumenta conforme avanza la gestación hasta el periodo periparto donde las concentraciones de la hormona descienden significativamente. Las concentraciones de estradiol durante la gestación muestran un patrón bifásico que alcanza concentraciones mínimas (10 pg/ml) alrededor del segundo tercio.

2) Otra especie en la que se cuantificaron los niveles de estas hormonas fue en cabras gestantes, durante el último tercio (90 al 150 días de gestación), el promedio global de los niveles de  $P_4$  fué de 8.3 ng/ml ( $n= 87$ ) con un intervalo de concentración que va de 1.3 a 17.0 ng/ml. En esta etapa de la gestación, los niveles de progesterona no variaron significativamente aunque se observó un aumento paulatino conforme se acercaba al momento del parto. Con respecto al periodo periparto (145-150 días) los niveles promedio de  $P_4$  fueron de 5.1 ng/ml ( $n=12$ ) con un intervalo de 3.0 a 14.0 ng/ml; el nivel mayor de esta hormona, se registró 5 días antes del parto y los valores más bajos correspondieron a este momento.

Los niveles de  $E_2$  fueron de 55.1 pg/ml ( $n=10$ ) con un intervalo de concentración que osciló de 20.0 a 128.0 pg/ml, el límite superior se registró en el día en que el animal pario. Los promedios globales de los niveles hormonales antes señalados se resumen en el siguiente cuadro:

### NIVELES DE P<sub>4</sub> Y E<sub>2</sub> VACAS GESTANTES



**GRAFICA 9. NIVELES DE PROGESTERONA Y ESTRADIOL EN VACAS GESTANTES.** En la grafica se ilustra el perfil de la P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub> durante los 9 meses de gestación. Cada barra representa la media ± E.E. (n =3).



CUADRO 11. NIVELES CIRCULANTES DE P<sub>4</sub> Y E<sub>2</sub> (promedio ± E.E.) EN SUERO DE VACAS Y CABRAS DURANTE DIFERENTES ESTADIOS FUNCIONALES DEL CICLO REPRODUCTIVO.

ESPECIE	(n)	ESTADIO FUNCIONAL	P <sub>4</sub> (ng/ml)	E <sub>2</sub> (pg/ml)
Vaca	(9)	Estro	0.9 (±) 0.08 (0.5-1.3)	10.6 (±) 2.4 (2.1-27.0)
Vaca	(5)	F Lútea	8.6 (±) 2.7 (1.0-17.0)	3.3 (±) 0.6 (2.1-5.2)
Vaca	(24)	Gest.	6.4 (±) 0.6 (1.5-13.1)	17.3 (±) 1.6 (0.2-35.3)
Cabra	(87)	G-3er T	8.3 (±) 0.4 (1.3-17.0)	
Cabra	(10)	G-P.P	5.4 (±) 0.8 (3.0-14.0)	55.1 (±) 8.1 (20.0-128.0)

Entre parentesis se indican los intervalos de concentración.

F Lú tea.: fase lútea; Gest: gestación; G-3er T: gestación tercer tercio; G-P.P: gestación periodo periparto.

## 7. DISCUSION.

Los resultados de la presente tesis muestran que los métodos de inmunización utilizados fueron adecuados para obtener antisueros contra  $P_4$  y  $E_2$ . En el caso de  $E_2$ , fue necesario combinar el método tradicional de inoculación intradérmica con el de la administración directa en el ganglio poplíteo. Los antisueros cosechados y caracterizados en esta tesis tienen una alta especificidad y afinidad para el ligando correspondiente. Para los antisueros contra  $P_4$  el porcentaje de reacción cruzada no excedió de 4.5 % para pregnenolona y epipregnenolona, lo cual indica que se requiere una masa aproximadamente 20 veces mayor de estos esteroides para desplazar a la  $P_4$ , y normalmente la pregnenolona y la epipregnenolona no alcanzan estos niveles en la circulación (McKay y col, 1987 y Pearce, 1985). El antisuero a  $E_2$  mostró una mayor especificidad, ya que sólo cruzó un 3.5 % con estrona y 0.1 % con estriol, lo que implica que se requieren concentraciones de hasta 26 y 50 veces más respectivamente.

La obtención de este material permitió desarrollar, estandarizar y validar dos sistemas de RIA cuya sensibilidad es suficiente para cuantificar, en 100 y 500  $\mu$ l de suero, concentraciones circulantes de  $P_4$  y  $E_2$  que abarcan el intervalo de 0.05 a 3.2 ng/ml para la primera y de 0.5 a 32.0 pg/ml para  $E_2$ . Los parámetros del control de calidad para ambos RIAs son similares a los descritos en la literatura (Henricks y col. 1971, Wiseman y col, 1982) y satisfacen los criterios requeridos para este tipo de métodos. Así, el porcentaje de repetitibilidad fué de 89.1 y 94.9% y de reproducibilidad de 87.2 y 89.6 % para  $P_4$  y  $E_2$  respec-

tivamente; estos porcentajes caen dentro de los valores establecidos para este tipo de metodologías (Chard, 1978 y Ray, 1985).

Los resultados obtenidos al analizar los niveles circulantes de  $P_4$  y  $E_2$  en el suero de vacas y cabras, muestran que con el empleo de los sistemas de RIA desarrollados y estandarizados en la presente tesis, es posible cuantificar y distinguir las fluctuaciones fisiológicas que exhiben ambas hormonas durante los diferentes estadios reproductivos de esas especies.

Así y como se resume en el cuadro 2, para el caso de la vaca durante el estro, las concentraciones de  $P_4$  son semejantes a las reportadas por otros autores (Stabenfeldt y col, 1969; Donalson y col, 1970; Glencross y col, 1973; Lemon y col, 1975; Davidge y col, 1987; Prakash y col, 1987; Byerley y col, 1987 y Knutson y Allrich, 1988); mientras que las de  $E_2$  durante este mismo periodo, coinciden con algunos (Henricks y col, 1971; Shemesh y col, 1972; Dobson y col, 1974; Kanchev y col, 1976 y Mattew y Stevenson, 1986), pero no todos los estudios referidos en ese cuadro. La diferencia con estos últimos trabajos puede explicarse por la elevada inmunoreactividad cruzada (50 % con 17  $\alpha$  estradiol y estrona) del antisuero empleado (Nessan y King, 1981); o bien por el diseño del estudio (muestras c/2 horas) que permite detectar el aumento progresivo que va desde 10 pg/ml hasta el pico máximo de 25 pg/ml (Lemon y col, 1975).

Las concentraciones de  $P_4$  durante la fase lútea en la vaca aquí reportadas, son prácticamente similares a las informadas por la mayoría de los autores referidos en el cuadro 2 (McCracken, 1963,

Stabenfeldt y col. 1969, Donaldson y col, 1970 y Henricks y col., 1971). Sin embargo, son discretamente menores a las reportadas por Walter y col, 1984, y mayores a las informadas por Vadhat y col, 1981, Wiseman y col, 1982 y Knutson y Allrich, 1988. Además, los niveles circulantes de  $P_4$  que se determinaron, correlacionan con el número de cuerpos lúteos detectados por palpación rectal. Aunque no conocemos estudios semejantes en la vaca, estas observaciones coinciden con reportes previos realizados en la oveja (Short y Rowell en 1962 y Thorburn y col. en 1969) y con la sugerencia de que la concentración de  $P_4$  circulante depende de la cantidad de tejido lúteo (Thorburn y col, 1969 y Romero y col, 1989). Durante esta misma fase los valores promedio de  $E_2$  son comparables a los obtenidos por Henricks y col, 1971 (cuadro 3). En este mismo cuadro puede observarse que Walter y col, 1984, y Shaumade y López, 1982, encuentran valores mayores. Esta diferencia obedece quizá a razones metodológicas, así como a la variabilidad biológica implícita en las razas estudiadas por esos autores.

Los resultados obtenidos en esta tesis confirman estudios ahora clásicos que muestran que los niveles de  $P_4$  aumentan conforme avanza la gestación, alcanzando su valor máximo durante el octavo mes para disminuir posteriormente durante el periodo periparto (Short, 1958; Donaldson y col. en 1970). Aunque en esta tesis se observó que alrededor del séptimo mes los niveles de  $P_4$  tienden a disminuir, este decremento no es significativo y probablemente es consecuencia del pequeño número de animales muestreados durante ese lapso. Además, los niveles promedio de  $P_4$  de todo el periodo

**Falta página**

**N° 54**

cual pudo influir en sus elevados niveles detectados.

Los resultados anteriores muestran claramente que los RIAs desarrollados en la presente tesis, permitieron evaluar satisfactoriamente los niveles de  $P_4$  y  $E_2$  en suero de vacas durante el estro, la fase lútea y la gestación.

Por otra parte, el valor promedio de  $P_4$  en cabras durante el último tercio de la gestación (90 - 150 días), es semejante al informado por otros autores (vease cuadro 2). Igualmente, durante el periodo periparto (140 - 145 días) los niveles de esta hormona disminuyen significativamente. Este hallazgo confirma estudios previos de otros autores (Irving y col, 1972, Thorburn y Schneider, 1972; Umo y col, 1976), y coincide con la hipótesis de López, 1990, en la que se plantea el aumento progresivo de la progesterona en cabras durante el último tercio de gestación y la disminución de esta hormona en el periodo periparto.

En cuanto a los niveles de  $E_2$  fueron evaluados solamente en el periodo periparto ya que en la etapa previa (90-120 días), no se han observado cambios significativos, obteniéndose un valor promedio de  $55.1 \pm 8.1$  pg/ml. Este valor es semejante al encontrado por Dhindsa y col., 1981 determinado en cabras pigmeas. Por otra parte Umo y col., 1976 reportaron valores más elevados que el presente trabajo; esto se puede explicar en base a que la cuantificación de la hormona la realizaron en sangre de la vena uterina y no en la vena yugular como en esta tesis o bien a las diferentes razas de los animales estudiados.

Los resultados anteriores muestran que la cuantificación de los niveles circulantes de  $P_4$  y  $E_2$  en cabras gestantes durante el último tercio y el periodo periparto, son confiables y este es uno de los pocos trabajos que se ha reportado hasta ahora.

Este estudio permitió mostrar la importancia de obtener antisue-  
ros específicos para progesterona y estradiol así como, la imple-  
mentación y estandarización de un RIA, para determinar los per-  
files hormonales en diferentes estados reproductivos de vacas y  
cabras.

## 8. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron los anticuerpos QKP5 y QKP6 contra  $P_4$  y  $E_2$ , el QKEc, los que presentaron una alta especificidad.
- Se estandarizó el RIA para cuantificar  $P_4$  y  $E_2$  con una alta sensibilidad.
- La determinación de los niveles circulantes de  $P_4$  y  $E_2$  mediante la técnica estandarizada permitió diferenciar en suero de vacas y cabras las fases de estro, lútea y de gestación.
- La confiabilidad de los RIAs se corroboró al comparar los niveles hormonales aquí determinados con otros autores.
- Con lo anterior, queda establecido que los antisueros obtenidos aquí pueden ser empleados para desarrollar y estandarizar además del RIA otras técnicas inmunométricas.
- Finalmente la versatilidad de estos antisueros hacen económicamente redituable su utilización en el laboratorio.



## **9. ANEXO. EL RADIOINMUNOANALISIS.**

### **9.1. ANTECEDENTES HISTORICOS.**

Es indiscutible que el desarrollo conceptual y práctico de los métodos analíticos llamados genericamente "Ensayos o análisis de saturación", representó en su momento una verdadera revolución tecnológica con importantes repercusiones en el campo de las ciencias biológicas y muy especialmente en las ciencias médicas (Yalow, 1978).

El radioinmunoanálisis (RIA) es una variante de estos métodos y sus antecedentes se remontan a los trabajos pioneros de Yalow y Berson en 1960, quienes introdujeron el método por primera vez, cuantificando la insulina en plasma de pacientes diabeticos (Yalow y Berson, 1959).

El explosivo desarrollo de esta técnica analítica la ha convertido en una herramienta de uso general en las diversas áreas de investigación biomédica y diagnostico clínico. Entre las sustancias analizadas hasta ahora por RIA se encuentran las hormonas proteicas, las hormonas esteroides y un gran número de sustancias no hormonales, como se muestra en el cuadro 12.

### **9.2. BASES CINETICAS DEL RIA.**

La ley de acción de masas establece que la velocidad de reacción de los reactantes es proporcional a los productos de los reactantes elevadas a una potencia igual a su coeficiente en la ecuación balanceada de la reacción.

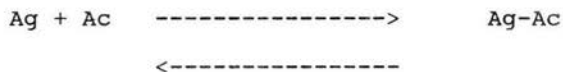
Para la reacción general de Ag-Ac en el equilibrio (si la reac-

CUADRO 12

HORMONAS PEPTIDICAS	HORMONAS NO PEPTIDICAS	SUSTANCIAS NO HORMONALES
<u>H. Hipofisiarias</u>	<u>H. Tiroideas</u>	<u>Drogas y Vitaminas</u>
H. de Crecimiento	Tiroxina (T <sub>4</sub> )	Glicosidos cardiacos
H. Adrenocorticotrópica	Triyodotironina (T <sub>3</sub> )	Antibióticos
H. Estimulante de los Melanocitos	rT <sub>3</sub> (reversa)	Vitamina A
H. Estimulante de la Tiroides	<u>Esteroides</u>	Acido fólico
H. Folículo Estimulante	Aldosterona	<u>Enzimas</u>
H. Luteinizante	Corticosteroides	Cl esterasa
Prolactina	Estrogenos	Plasminógenos
Vasopresina	Progestagenos	Carobixipeptidasa
Oxitocina	Androgenos	<u>Virus</u>
<u>H. Coriónicas</u>	<u>Prostaglandinas</u>	<u>Antígenos tumorales</u>
<u>H. Pancreáticas</u>	<u>Aminas biológicas</u>	<u>Proteínas séricas</u>
<u>H. Vasoactivas</u>	Serotonina	
<u>H. Gastrointestinales</u>	Melatonina	

LISTA PARCIAL DE ALGUNAS SUSTANCIAS ANALIZADAS POR RIA.  
 Datos originales tomados de (Yalow, 1978).

ción es mol a mol) se tiene lo siguiente:



En el equilibrio, la relación de los productos de las concentraciones en ambos lados de la ecuación será una constante, la cual se designa como K.

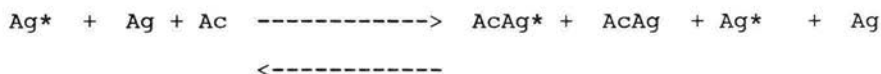
$$\frac{[\text{Ag} - \text{Ac}]}{[\text{Ag}] [\text{Ac}]} = K$$

En esta ecuación [Ag], [Ac] y [Ag-Ac] son las concentraciones de Antígeno libre, Anticuerpo libre y el complejo Antígeno-Anticuerpo respectivamente y la K es la constante de afinidad, siendo sus unidades litros/mol.

La conclusión que se puede derivar de esta ecuación es, que dada una cantidad constante de proteína fijadora (Ac) con un valor fijo de K, la relación de lo unido a lo libre en el equilibrio, estará cuantitativamente relacionado a la cantidad total del ligando (Ag) presente. Este es el principio básico de todos los ensayos de unión (RIA, ELISA, CPBA, IRMA, etc) (Chard, 1978).

Cuando una cantidad dada de Ag y Ac se dejan reaccionar juntos hasta alcanzar el equilibrio forman un complejo Ag-Ac junto con la proporción de Ag y Ac que quedan libres (F). Si se mantiene constante la cantidad de Ac, pero se aumenta la cantidad de Ag, entonces en el equilibrio la cantidad del complejo Ag-Ac (B) aumenta, y también aumenta relativamente la fracción libre (F) de Ag, lo que da una relación B/F más baja.

Si se ponen a competir por una cantidad fija de anticuerpo dos poblaciones en exceso de Ags (Ag, Ag\*) con la misma afinidad por el Ac pero diferenciables entre sí, se producirá entonces un equilibrio como el siguiente:



Si la población de Ag\* se mantiene constante, y la de Ag se incrementa, la segunda tendrá más probabilidades de unirse al Ac, disminuyendo la fracción de Ac-Ag\* e incrementándose la fracción de Ag\*. Una de las formas más comunes de marcar el Ag\* es la incorporación de radioisótopos a su molécula (Chard, 1978).

#### **Elementos del RIA.**

En el RIA se utilizan los siguientes componentes fundamentales:

**Antígeno (Ag):** Se considera que un antígeno es toda aquella sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos cuando se aplica a un animal de prueba, y que reacciona específicamente con los anticuerpos producidos.

**Hapteno:** Con este nombre se designa a un grupo de sustancias de bajo peso molecular que a diferencia de los antígenos naturales cuando son inyectados a un animal no inducen la formación de anticuerpos, pero pueden reaccionar con anticuerpos específicos. Para que un hapteno pueda inducir la formación de anticuerpos es necesario que se encuentre unido a una proteína, polipéptido u otra sustancia de alto peso molecular.

Anticuerpo (Ac): Es una proteína del grupo de las inmunoglobulinas (Igs), que reacciona en forma específica contra un Ag. Cada molécula de Ig activa esta compuesta de 4 cadenas: dos cadenas ligeras (L) idénticas entre sí y dos cadenas pesadas (H) también idénticas. Tanto la ligera como la pesada tienen dos regiones de acuerdo a su estructura y función: la región variable (v) y la constante (c). La región v se llama así porque su secuencia de aa varía incluso en Ac de la misma clase; por el contrario, la secuencia de aa de la región c, es igual en cada una de las diferentes clases de Ac. Las Igs se clasifican en tres niveles sucesivos de fineza y resolución. La primera subdivisión separa a estas proteínas en base a las estructuras y diferencias inmunológicas para dar como resultado a 5 tipos llamados isotipos (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE). La segunda es cuando cada uno de los isotipos se dividen en subgrupos llamados alotipos. Las diferencias alotípicas son variaciones menores de aa observadas de un individuo a otro, esto es hay formas alélicas con un isotipo. El tercer nivel de clasificación es llamado idiotipos, las cuales son variaciones estructurales que se dan cerca del sitio de unión al ligando, dependen de diferencias específicas de clonas de células productoras de Igs (Bach, 1984).

Ligando radiactivo (Ag\*): Es el antígeno radiactivo que va a competir con el Ag "frío" o no marcado por los sitios de acoplamiento al anticuerpo o ligando.

#### **Eficiencia del RIA.**

Para que un RIA sea más eficiente, se deben considerar los si-

guientes puntos (Chard, 1978):

a) La dilución del Ac debe ser tal, que permita unir un 30-50% de Ag\* en ausencia de Ag no marcado.

b) El comportamiento del Ag\* debe ser indistinguible del Ag frío y debe ser tan puro como sea posible y de suficiente actividad específica (A. E.= radiactividad / masa), para que sea detectable y contenga el mínimo de masa (generalmente entre 6000 y 10000 cuentas por minuto y menos de 100 pg/ml, según la eficiencia del detector).

c) El comportamiento del Ag (de la curva estandar) y el Ag contenido en las muestras problema, deben ser semejantes, o sea que deben ser capaces de competir con la misma eficacia por el sitio de unión del Ac, e impedir la unión del Ag\* al Ac y por lo tanto la formación del complejo Ag\*-Ac.

d) La temperatura adecuada para la reacción es de 4 C durante 24-48 horas, con el objeto de tener mayor sensibilidad y estabilidad en la reacción.

e) El sistema de separación de la fracción unida y la libre debe ser el óptimo como es el caso del carbón cubierto de dextran o proteínas, o de un segundo anticuerpo.

### **9.3. ISOTOPOS RADIOACTIVOS.**

Un radioisótopo es un átomo inestable, el cual en un tiempo dado se desintegrará y emitirá partículas subatómicas en la forma de radiación en ondas electromagnéticas. Estas partículas y/o energía se miden en un sistema apropiado de detección.

Una característica importante dentro de los isótopos es su vida media, que es el tiempo empleado por un número de átomos radioisotópicos para desintegrarse dejando la mitad del número original. Cada isótopo se caracteriza por una vida media específica mientras más corta es esta, más desintegraciones ocurren en un tiempo dado (Chard, 1978).

En este trabajo se utilizó como isótopo al Tritio ( $^3\text{H}$ ). Sus características y las de otros radioisótopos se muestran en el cuadro 13.

CUADRO No.13 RADIOISOTOPOS MAS UTILIZADOS COMO MARCADORES EN EL RIA.

ISOTOPO	VIDA MEDIA	ENERGIA	DETECCION
$^3\text{H}$	12.26 a	$\beta$	Líquido de centelleo
$^{14}\text{C}$	5730 a	$\beta$	"
$^{57}\text{Co}$	270 d	$\gamma$	Cristal de centelleo
$^{75}\text{Se}$	120.4 d	$\gamma$	"
$^{125}\text{I}$	60 d	$\gamma$ y $\beta$	"
$^{131}\text{I}$	80 d	$\gamma$ y $\beta$	"

a:años; d:días;  $\beta$ :emisión beta;  $\gamma$ :emisión gamma (Ray, 1985).

La detección y cuantificación de un isótopo en un RIA se realiza en un contador de centelleo. El tipo de contador utilizado depende de la naturaleza de la radiación emitida; por ejemplo: se empleará un contador de emisión beta ( $\beta$ ) cuando se trabaje con isótopos como el  $^3\text{H}$  o el  $^{14}\text{C}$  y cuando el detector es de rayos gamma ( $\gamma$ ) se utilizan isótopos como el  $^{131}\text{I}$  o el  $^{125}\text{I}$ . Las partículas  $\beta$  tienen un bajo poder penetrante se encuentra en la materia y solo se pueden detectar cuando el isótopo en un solvente aromático, junto con una sustancia también aromática que tenga la propiedad de fluorescer cuando es excitada por una

radiación ionizante. El mas utilizado es el (PPO) 2,5-difeniloxasol (Chard, 1978).

#### 9.4. ESTANDARIZACION Y CONTROL DE CALIDAD DEL RIA..

Para lograr estos propositos de la estandarización se requieren los siguientes requisitos: (Chard, 1978)

Sensibilidad: se refiere a la cantidad mas pequeña de Ag no marcado que puede ser detectado. La sensibilidad máxima depende de la afinidad del Ac y se obtiene cuando la concentración del Ag marcado es insignificante, y la del Ag no marcado o frío se aproxima a cero. Una de las ventajas del RIA, es la alta sensibilidad que resulta de la interacción Ag-Ac y hace posible medir concentraciones de Ag en el orden de  $10^{-9}$  a  $10^{-12}$  gramos.

Especificidad: se define como el grado de interferencia creado por sustancias diferentes a la que se desea medir. La especificidad del Ac es influida por que la heterogeneidad del antisuero, reactividad cruzada con Ag similares o moléculas que puedan ocupar los sitios inmunoreactivos, y la interferencia de la reacción debida al bajo peso molecular del material que altera el medio o las condiciones de la reacción.

Exactitud: es el grado de coincidencia entre la medición experimental de una sustancia con el valor de la medición estandar o de referencia. Para poder evaluarlo se comparan los resultados obtenidos en un número de ensayos semejantes.

Precisión: es el grado de similitud en las mediciones repetidas de una misma muestra y se valora cuantitativamente por medio de



la desviación estandar de una serie de mediciones y es expresada en terminos de repetitibilidad y/o reproducibilidad.

a) La repetitibilidad es la precisión de un método expresada como la concordancia de los valores obtenidos de determinaciones independientes llevadas a cabo por un solo analista usando la misma técnica y los mismos aparatos. En este trabajo se utilizó para evaluar la precisión a la repetitibilidad, la cual es determinada como sigue:

$$\text{Coeficiente de Variación} = \text{CV} = \text{D.S.} / X$$

Donde: D.S.= a la desviación estandar  
de las mediciones.

X = a la media de las mediciones.

b) La reproducibilidad es la precisión de un método expresada como la similitud de los valores obtenidos entre las determinaciones llevadas a cabo en diferentes ensayos y tambien entre diferentes laboratorios, realizado por diferentes analistas y con diferente equipo (Horwitz, 1977).

#### **9.5. RIA PARA ESTEROIDES.**

El RIA para hormonas esteroides (H.E.) presenta diferencias con otros RIAs. En primer lugar y basandose en su estructura química más sencilla, permite realizar la obtención de los estandares de estas hormonas más facilmente, ya sea por purificación de fuentes naturales o por sintesis química. De igual forma se puede reali-

zar el marcaje de las H.E. al incorporar a la molécula átomos de  $^3\text{H}$  o  $^{14}\text{C}$  que van a dar como resultado compuestos con actividad específica y con ello, la sensibilidad del sistema analítico (Bermúdez, 1984).

La obtención de los Ac con afinidad para las H.E. se dificulta por el bajo peso molecular, al igual que por su distribución biológica, ya que, los esteroides se encuentran en la mayoría de los vertebrados. La falta de grupos químicos que pueden provocar una reacción antigénica, obliga a manejar estos compuestos como haptenos y unirlos a moléculas que si tengan actividad inmunológica tales como las proteínas, para obtener los Ac correspondientes (Franek, 1987).

Como las H.E. no se unen directamente a las proteínas, es necesario utilizar moléculas de enlace (como el O-carboxi-metil-hemisuccinato) que permiten la conjugación entre esteroides y las proteínas y de esta manera obtener los Ac contra los esteroides (Schall y Tenoso, 1981).

## 10. BIBLIOGRAFIA.

1. Allen, W. M. (1930). Physiology of the corpus luteum. *Am. J. Physiol.* 92: 174-178.
2. Asdell, A. S. (1977). Historical introduction. En: *Reproduction in domestic animals*. Cole, H. y Cupps, P. ed. 3ra. Ed. Academic Press, New York. pag 9-11.
3. Bach, J. F. (1984). *Inmunología*. Limusa, México. pag 908.
4. Barrington, E. J. (1975). *Introducción a la endocrinología general y comparada*. Blume. España. pag 145-160.
5. Beling, C. (1982). Estrogenos. En: *Endocrinología de la gestación*. Fritz, F y Klopper, A. ed. Salvat Editores México. pag 83-96.
6. Bermudez, J. y Herrera, J. (1984). Analisis por saturación en endocrinología. En: *Endocrinología*. Lozano, F. y Cabeza, F. ed. Francisco Méndez Cervantes, México. pag 553-560.
7. Beyer, C. y González, M. G. (1986). Elevation in hipotalamic cyclic AMP as a common factor in the facilitation of lordosis in rodents: a working hypothesis. *Annals N. Y. Acad. Sci.* 474: 270-281
8. Byerley, D. J., Berardinelli, J. G., Staigmilller, R. B. y Short, R. E. (1987). Progesterone concentrations in beef heifers bred at puberty or third estrus. *J. Anim. Sci.* 65: 1571-1575.
9. Chard, T. (1978). Introduction to radioimmunoassay and related techniques in laboratory. En: *Thechniques in Biochemistry and Molecular Biology*. T.S Work and E. Work eds. Ed. North Holland Publ. Co. Part II, 5: 291-534.
10. Clark, H. y Markaverich, M. (1988). Actions of ovarian steroid hormones. En: *The physiology of reproduction*. Knobil, E. y Neil, D. ed.) Raven Press USA. 1:675-695.
11. Davidge, S. T., Wiebold, J. L., Senger, P. L. y Hillers, J. K. (1987). Influence of varying levels of blood progesterone upon estrous behavior in cattle. *J. Anim. Sci.* 64: 126-132.
12. Dhafir, M. A., Azawie-A., Graham, F. D., Walker, F. R. y Riad-F. (1987). Improved production of high-affinity antisera to progesterone by castration and adrenalectomy of the immunised animals. *J. Immunological Methods.* 97:87-91.
13. Dhindsa, D. S., Metcalfe, J. y Resko, J. A. (1981). Oestrogen concentrations in systemic plasma of pregnant pygmy goats. *J.*

Reprod. Fert. 62: 99-103.

14. Dobson, H. y Dean, G. P. (1974). Radioimmunoassay of estrone, oestradiol-17-~~α~~,17-β in bovine plasma during the oestrous cycle and last stages of pregnancy. J. Endocr. 61: 479-486.
15. Donalson, L. E., Basset, S. M. y Thorbur, G. D. (1970). Peripheral plasma progesterone concentration of cows during puberty oestrous cycles, pregnancy and lactation and the effects of undernutrition or exogenous oxytocin on progesterone concentration. J. Endocr. 48: 599-614.
16. Edgar, D.G. (1953). The Chemical Assay of progesterone. Biochem. J. 54: 50-55.
17. Franek, M. (1987). Structural aspects of steroid-antibody specificity. J. Steroid Biochem. 28: 95-108.
18. Glencross, G. R., Munro, B. I., Seniore, E. B. y Pope, S. G. (1973). Concentrations of oestradiol-17-β, estrone and progesterone in jugular venous plasma of cows during the oestrous cycle and in early pregnancy. Acta Endocrinológica. 73: 374-384.
19. Goodman, L. (1988). Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. En: The physiology of the reproduction. Knobil, E. y Neil, D. ed. Raven Press USA. 2: 1929-1961.
20. Gore-Langton, E. y armstrong, T. (1988). Follicular steroidogenesis and its control. En: The physiology of reproduction. Knobil, E. y Neil, D. ed. Raven Press USA. 1: 331-337.
21. Gupta, K. S. y Pope, S. G. (1962). Variation in the nevel of progesterone in the systemic plasma of the cow. J. Endocrin. 40: vii.
22. Haning, R., Orczyk, P., Caldwell, V. y Behrman, R. (1979). Plasma estradiol, estrone, estriol, and urinary estriol glucuronide. En: Methods of hormone radioimmunoas say. Jaffe, B. ed. 2a Ed. Academic Press, New York. pag 675-687.
23. Heap, R. B. (1964). A Fluorescence assay of progesterone. J. Endocrin. 30: 293-305.
24. Heap, R. B y Linzell, L. J. (1966). Arterial concentration ovarian secretion and mamary uptake of progesterone in goats during the reproductive cycle. J. Endocrinol. 36: 389-399.
25. Henricks, D. M., Dickey, J. F. y Hill, J. R. (1971). Plasma estrogen and progesterone levels in cow prior to and during estrus. Endocrinol. 89: 1350-1355.
26. Henricks, D. y Mayer, T. (1977). Gonadal hormones and

- uterine factors. En: Reproduction in domestic animals. Cole, H. y Cupps, P. ed. 3ra. Ed. Academic Press, New York. pag 102-107.
27. Henricks, D. M., Dickey, J. F., Hill, J. R. y Johnston, W. E. (1972). Plasma estrogen and progesterone levels after mating, and during late pregnancy and postpartum in cows. *Endocrinology* 90: 1336-1342.
  28. Hooker, C. W. y Forbes, T. R. (1949). A bio-assay for minute amounts of progesterone. *Endocrinology* 41: 158-163.
  29. Horwitz, W. (1977). The variability of AOAC methods of analysis used in analytical pharmaceutical chemistry. *J. A.O.A.C.* (60):1355-1363.
  30. Irving, G., Jones, D. y Knifton, A. (1972). Progesterone concentration in the peripheral plasma of pregnant goats. *J. Endocrinol.* 53: 447-452.
  31. Kaltenbach, C. y Dunn, T. (1985). Endocrinología en la reproducción. En: Reproducción e inseminación artificial. Hafez, E. ed. 4a. Ed. Interamericana. pag 83-109.
  32. Kanchev, N., Dobson, H., Ward, R. y Fitz, P. (1976). Concentrations of steroids in bovine peripheral plasma during the oestrous cycle and the effect of betametasone treatment. *J. Reprod. Fert.* 48: 341-345.
  33. Karsch, J. F., Legan, J. S., Hauger, L. R. y Foster, D. L. (1977). Negative feedback action of progesterone on tonic luteinizing hormone secretion in the ewe: dependence on the ovaries. *J. Endocrinol.* 101: 800-806.
  34. Kelly, R. W., Owens, J. L., Crosbie, S. F., McNatty, K. P. y Hudson, N. (1983/1984). Influence of booroola merino genotype on the responsiveness of ewes of pregnant mares serum gonadotrophin, luteal tissue weights and peripheral progesterone concentrations. *anim. Reprod. Sci.* 6: 199-207.
  35. Klopper, A. y Fritz, F. (1982). Progestagenos. en: Endocrinología de la gestación. Fritz, F. y Klopper, A. ed. Salvat Editores México. pag 109-125.
  36. Knutson, R. J. y Allrich, R. D. (1988). Influence of nutrition on serum concentrations of progesterone, luteinizing hormone and estrous behavior in dairy heifers. *J. Anim. Sci.* 66: 90-97.
  37. Lemon, M., Pelletier, J., Saomande, J. y Signoret, J. P. (1975). Peripheral plasma concentrations of progesterone, oestradiol-17- $\beta$  and luteinizing hormone around oestrous in the cow. *J. Reprod. Fert.* 48: 341-345.
  38. Levasseur, M. y Thibault, C. (1985). Ciclos vitales re

- productivos. En: Reproducción e inseminación artificial en animales. Hafez, E. ed. 4a. Ed. Interamericana, México. pag 124-143.
39. López, G. (1990). Asociación entre niveles plasmáticos maternos de cortisol y progesterona, aborto en cabras y cambios en la temperatura ambiental. Tesis de Licenciatura. ENEP-Iztacala, UNAM.
  40. Malkinson, A. M. (1975). Hormone action. Chapman and Hall London-USA. pag 206-241.
  41. Matthew, C. L. y Stevenson, S. J. (1986). Gonadotropin-Releasing hormone at estrus: luteinizing hormone, estradiol, and progesterone during the periestrual and postinsemination periods in dairy cattle. Biol. Reprod. 35: 300-311.
  42. McCracken, J. A. (1963). Plasma progesterone concentration after removal of the corpus luteum in the cow. Nature. 198: 507-508.
  43. McDonald, L. E. (1975). Veterinary endocrinology and reproduction. 2nd. ed. LEA and Febiger USA. pag: 247-303.
  44. McKay, S. A., Jenkin, G. y Thorburn, G. D. (1987). Peripheral plasma concentrations of pregnenolone sulphate, progesterone and 20-hidroxy-4-pregnen-3-one in ewes throughout the oestrous cycle. J. Endocrinol. 113: 231-237.
  45. McNeilly, A. S. (1984). Changes in FSH y the pulsatile secretion of LH during the delay in oestrus induced by treatment of ewes with bovine follicular fluid. J. Reprod. Fert. 72: 165-172.
  46. Mori, Y. y Kano, Y. (1984). Changes in plasma concentrations of LH, progesterone and oestradiol in relation to the occurrence of luteolysis oestrus and time of ovulation in the Shiba goat capra hircus. J. Reprod. Fert. 72: 223-230.
  47. Nesson, K. G. y King J. G. (1981). Sexual behaviour in ovariectomized cows treated with oestradiol benzoate and testosterone propionate. J. Reprod. Fert. 61: 171-178.
  48. Ott, R. S., Dum, M. S., Nelson, D. R. y Hison, J. E. (1980). Peripheral serum progesterone and luteinizing hormone concentration of goats during synchronization of estrus and ovulation with prostaglandin F<sub>2</sub>α. Am. J. Vet. Res. 41: 1432-1434.
  49. Parker, G. M. (1988). The expanding family of nuclear hormone receptors. J. Endocrinol. 119: 175-177.
  50. Pearce, D. T. (1985). Plasma progesterone concentrations, ovarian and endocrinological responses and sperm transport in ewes with synchronized oestrus. J. Reprod. Fert. 75: 49-62.

51. Penittik, S., James, T., Morai, G., Hammond, J., Nisker, W., Raymoure, J. y Wkohn, R. (1982). The serum transport of steroid hormones. Recent progress in hormone research. 38: 457-510.
52. Prakash, B. S., Meyer, H. H., Schallenberger, E. y De Wiei, V. D. (1987). Development of a sensitive enzymeimmunoassay (EIA) for progesterone determination in unextracted bovine plasma using the second antibody technique. J. Steroid. Biochem. 28: 623-627.
53. Ray Edwards. (1985) Immonoassay an introduction. Willam Heinemann Medical Books, London. pag: 25, 26, 35, 36.
54. Romero, R. C., Damian, M. P., Lueje, T. V. y Morato, C. T. (1989). Perfil estral de progesterona en ovejas. Veterinaria Méx. 20: 27-32.
55. Shaumande, J. y Lopez-Sebastian, A. (1982). Changes in the plasma concentrations of free and conjugated oestrogens in the heifers after treatment to induce superovulation and the relationship with number of ovulations. J. Reprod. Fert. 66: 411-416.
56. Schall, F. R. y Tenoso, J. H. (1981). Alternatives to radioimmunoassay: labels and methods. Clin. Chem. 27, # 7:1157-1164.
57. Shemesh, M., Ayalon, N. y Lindner, H. R. (1972). Oestradiol levels in the peripheral blood of cows during the oestrous cycle. J. Endocr. 55: 73-78.
58. Sherblom, A. P., Smagula, R. M., Moody, C. E., y Anderson, G. W. (1985). Immunosuppression, sialic acid, and sialyltransferase of bovine serum as a function of progesterone concentration. J. Reprod. Fert. 74: 509-517.
59. Short, R. V. (1958). Progesterone in blood. I. The chemical determination of progesterone in peripheral blood. J. Endocrinol. 16: 415-425.
60. Short, R. V. (1982). Papel de las hormonas en los ciclos sexuales. En: (Hormonas en la reproduccion. Austin, C. y Short, R. ed.) La Prensa Médica Mexicana. pag 52-82.
61. Short, R. V. y Rowell, J. G. (1962). The half-life of progesterone in the peripheral blood of a ewe at two stages gestation. J. Endocrinol. 25: 369-374.
62. Stabenfeldt. G. H., Ewing, L. L., Patton, J. P. y Mc Donald, L. E. (1969). Gas-liquid chromatography for estimation of peripheral plasma progesterone in domestic animals. J. Endocrinol 44: 23-38.

63. Symons, A. M. (1973). Levels of oestrogen and progesterone in the plasma of cow during the last month of pregnancy. *J. Endocrinol.* 56: 327-328.
64. Thorburn, D. G., Basset, M. J. y Smith, D. I. (1969). Progesterone concentrations in the peripheral plasma of sheep during the oestrus cycle. *J. Endocrinol.* 45: 459-469.
65. Thorburn, D. G. y Schneider, W. (1972). The progesterone concentration in the plasma of the goat during the oestrous cycle. *J. Endocrinol.* 113: 231-237.
66. Umo, I., Fitzpatrick, J. R. y Ward, R. W. (1976). Parturition in the goat: plasma concentrations of prostaglandin F and steroid hormones and uterine activity during late pregnancy and parturition. *J. Endocrinol.* 68: 383-389.
67. Vahdat, F., Horgen, J. P., Whitmore, H. L., Seguin, B. E. y Johnston, S. D. (1981). Decline in assayable progesterone in bovine plasma: effect of time, temperature, anticoagulant and presence of blood cells. *Am. J. Vet. Res.* 42: 521-522.
68. Walters, D. L., Schams, D. y Schallenberger, E. (1984). Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the luteal phase of the oestrous cycle in the cow. *J. Reprod. fert.* 71: 479-491.
69. Windholz, M. (1976). The merck index. An encyclopedia of chemicals and drugs. 9na Ed. Merck and Co. INC, USA. pag 485-486, 1007.
70. Wiseman, D. L., Vicent, P. J., Thomford, N. S., Scheffranhn, G. F. y Kester, D. J. (1982). Changes in porcine, ovine bovine and equine blood progesterone concentrations between collection and centrifugation. *Anim. Reprod. Sci.* 5: 157-165.
71. Yalow, R. S. y Berson, S. A. (1959). Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature.* 184: 1648-1654.
72. Yalow, S. R. (1978). Radioimmunoassay: A probe for the fine structure of biologic systems. *Science.* (200): 1236-1245.