



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**DETERMINACION DE LOS NIVELES DE LA HORMONA
LUTEINIZANTE (LH) POR MEDIO DE RADIOINMUNOANALISIS
HOMOLOGO EN CABRAS TRATADAS CON DIFERENTES DOSIS
DE HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS (GnRH)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
L A U R A R A M O S M E Z A**

**ASESORES: MVZ. CLARA MURCIA MEJIA
M. EN C. J. GERARDO PERERA M.
MVZ. SUSANA ROJAS MAYA**



MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

CONTENIDO**Página**

| | |
|-------------------------|----|
| RESUMEN..... | 1 |
| INTRODUCCION..... | 2 |
| MATERIAL Y METODOS..... | 6 |
| RESULTADOS..... | 12 |
| DISCUSION..... | 28 |
| LITERATURA CITADA..... | 34 |

RESUMEN

RAMOS MEZA, LAURA. Determinación de niveles de la Hormona Luteinizante (LH) por medio de Radioinmunoanálisis Homólogo en cabras tratadas con diferentes dosis de Hormona Liberadora de Gonadotropinas (bajo la dirección de J. Gerardo Perera M., Clara Murcia Mejía y Susana Rojas Maya).

Se trabajó con 24 cabras mestizas, las cuales se dividieron al azar en 5 grupos; los grupos I (n=5), II (n=5), III (n=5) y IV (n=4; grupo testigo) se sincronizaron con esponjas intravaginales conteniendo acetato de fluorogestona (FGA) durante 9 días. El grupo V (n=5) permaneció como control. Los grupos I, II y III recibieron una dosis única de 2, 4 y 8 µg de GnRH, respectivamente, con el fin de inducir secreción de LH y cuerpo lúteo funcional; al grupo IV se le administró solución salina fisiológica. Los niveles de LH fueron cuantificados por medio de un radioinmunoanálisis homólogo para LH caprina. El grupo I, respondió 2.5 veces más ($P < 0.05$) que los grupos II y III ($P > 0.05$). En el grupo IV, no se detectaron niveles de LH, mientras que en el grupo V sí, pero sin que estos llegaran a ser significativos ($P > 0.05$). Ni un solo animal que presento niveles de LH, presentó cuerpo lúteo funcional, ya que no se detectaron niveles de progesterona durante 30 días posteriores al estímulo con GnRH; por lo cual se sugiere probar dosis más pequeñas y en forma repetitiva, o dosis más altas y en forma única con el fin de inducir el pico preovulatorio de LH, y por lo tanto cuerpo lúteo funcional.

INTRODUCCION

El conocimiento de las bases endocrinológicas de la reproducción y de los complejos mecanismos que regulan la secreción hormonal ha permitido el control reproductivo.

En los animales domésticos el control de la reproducción presenta varias ventajas como son: la reducción de los periodos improductivos (acortando el anestro estacional y adelantando la pubertad); aumento en el número de partos, disminución del periodo posparto, y mejoramiento genético en el hato (13).

Para la sincronización de estros en caprinos se han utilizado diferentes progestágenos por vía oral, acetato de melengestrol (MGA) o por vía vaginal, acetato de fluorogestona (FGA), y por vía intramuscular (Prostaglandina F_{2α}) (2, 13, 22). El mejoramiento en la eficiencia de sincronización de estros depende del patrón endocrinológico que ocurre durante la inducción y sincronización del estro (5). Para una mejor sincronización hay que considerar la estacionalidad, la edad de los animales, el estado fisiológico (anestro y lactación) y la nutrición, que es uno de los factores más importantes porque de éste depende la fertilidad (11).

Los tratamientos en la sincronización de estros no necesariamente traen consigo la ovulación sobre todo cuando las hembras presentan un anestro marcado. Para inducir la ovulación se debe estimular la maduración de un folículo o grupo de folículos de manera que un pico natural de hormona luteinizante (LH) cause la ovulación. En la mayoría de los casos se producirá

una secreción natural de LH como resultado de una retroalimentación positiva de la secreción de estrógenos por el folículo en desarrollo. En algunos casos es apropiado estimular la secreción de LH con la administración de GnRH o simular la secreción de tipo LH administrando gonadotropina coriónica humana (HCG) (13).

Durante la estación de anestro se ha recurrido a una exposición por un periodo corto de LH, GnRH o a la presencia de un macho para estimular la restauración permanente de la actividad del ciclo ovárico durante la época no reproductiva (20).

Se ha demostrado que aplicaciones continuas de GnRH elevan la concentración de LH en el plasma en la estación de anestro y esto simula la regresión del folículo en crecimiento e induce la ovulación normal (18).

Se han utilizado diversos tratamientos con GnRH para inducir la ovulación en cabras (3, 16, 21, 27).

El tratamiento con un progestágeno en la estación de anestro en cabras lactando, seguido de aplicaciones repetidas de GnRH cada 2 horas por 52 horas inducen picos preovulatorios de LH, estrógeno y ovulación (16), pero la producción de progesterona por el cuerpo luteo es baja o no detectable indicando que el cuerpo luteo no es funcional (3, 7).

Administraciones intravenosas únicas o múltiples de GnRH durante el anestro estacional de las ovejas estimulan el crecimiento folicular e inducen una ovulación normal (18, 19), también se ha asociado con buena fertilidad (17).

En forma natural, la descarga preovulatoria de gonadotropinas provoca la luteinización inmediata del folículo y la ovulación se produce alrededor de 20 horas después del pico preovulatorio de LH. En el caso de utilizar PMSG, la estimulación folicular es inmediata, pero el pico preovulatorio es más tardío y la ovulación ocurre 24 horas después del pico preovulatorio de LH; por lo cual, se decidió utilizar GnRH, además de que presenta una mínima antigenicidad.

Las investigaciones en reproducción se han visto muy favorecidas por las técnicas de medición de las concentraciones de hormonas en sangre y otros líquidos corporales por medio del radioinmunoanálisis (RIA), el desarrollo de esta técnica representa el avance más significativo en los últimos 30 años, ya que permite la medición de una gran variedad de hormonas, lo que ha ayudado a comprender la fisiología y endocrinología de las diferentes especies domésticas.

Para la determinación de la hormona luteinizante, en otras especies, se han desarrollado RIAs homólogos (10, 23) y heterólogos (15), sin embargo, los más utilizados para las determinaciones de esta hormona en cabras han sido los heterólogos (3, 5, 6, 8, 16, 22) ya que no se cuenta con un RIA homólogo para esta especie; por lo cual se realizó la validación de este sistema en el laboratorio.

Actualmente el Banco de Hormonas Proteicas de origen animal del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de

la Universidad Nacional Autónoma de México ha desarrollado un RIA de 2º Anticuerpo para LH de cabra (gLH) (24) el cual permitirá el desarrollo de la investigación básica y clínica de esta especie.

La finalidad del presente estudio es la determinación de los niveles de LH por medio de un RIA homólogo en suero de cabras estimuladas con GnRH para inducir la ovulación, utilizando como referencia las dosis descritas en el trabajo realizado por Knight et al. (1988), ya que estas dosis son utilizadas para inducir la liberación de LH en cabras y no existen otras referencias para este mismo fin.

HIPOTESIS

Los niveles determinados por RIA homólogo serán menores a los reportados en RIAs heterólogos.

OBJETIVOS

- * Determinar la concentración de LH por medio de un RIA homólogo en cabras.
- * Encontrar la dosis óptima de GnRH para inducir ovulación y la presentación de un ciclo estral normal por medio de determinaciones de progesterona.

MATERIAL Y METODOS

1.- UBICACION DEL TRABAJO DE CAMPO: La investigación se realizó en el Centro de Enseñanza Práctica, Investigación y Extensión en Rumiantes (C.E.P.I.E.R.) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. El cual se ubica en el km 29 de la Carretera Federal México-Cuernavaca, Delegación Tlalpan, D.F., a 2760 m sobre el nivel del mar, con una latitud de 19° 13', longitud oeste de 99° 1', con una precipitación pluvial de 800 a 1200 mm en promedio al año; y una temperatura promedio anual de 13.7 C, cuenta con un tipo de clima semifrío-subhúmedo con lluvias en verano.

El experimento se realizó en el mes de julio, cuando los animales se encontraban en anestro estacional.

2.- TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES: El Centro proporcionó 24 hembras caprinas cruzas de las razas Saanen, Murciana granadina y Alpina, las que se dividieron al azar en cinco grupos. A cuatro de ellos se les colocó esponjas intravaginales (Intervet: Chronogest en una concentración de 45 mg/animal) de acetato de fluorogestona (FGA) durante 9 días (26). 24 horas después de su retiro, los grupos I (n=5), II (n=5) y III (n=5) recibieron una dosis única de 2, 4 y 8 µg de GnRH (Intervet: Fertagyl: Gonadorelina 0.1 mg/ml) respectivamente, en un volumen de 0.5 ml de solución salina fisiológica (SSF-NaCl 0.14 M) estéril intravenoso. Al grupo IV (testigo sincronizado) sólo se le administró SSF (n=4), y al grupo V (n=5) se le consideró como el blanco del experimento (grupo control). No se sincronizo para ver la respuesta a la sincronización.

3.- MUESTRA PARA LA DETERMINACION DE LH: Para la obtención de las muestras, los animales se sangraron por vía intravenosa (vena yugular) con agujas del número 21G 1½ y las muestras (aproximadamente 2 ml) se colectaron en tubos Vacutainer. Una vez obtenidas se centrifugaron (centrifuga Sol-Bat) a 3000 rpm durante 15 minutos y el suero obtenido se conservó a 4 C. Al término del experimento, las muestras se llevaron al Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, conservándose en congelación hasta su procesamiento.

4.- TOMA DE MUESTRAS: Esta se realizó cada 15 minutos, por un periodo de 5 horas; 2 horas antes de la aplicación del estímulo y 3 horas después.

5.- RADIOINMUNOANALISIS (RIA) HOMOLOGO CON 2º ANTICUERPO EN FASE LIQUIDA PARA LA HORMONA LUTEINIZANTE CAPRINA (gLH)

Como paso inicial, para la determinación de los niveles de LH en suero, fue necesario el montaje del sistema analítico (RIA homólogo caprino), en el laboratorio; para tal propósito se procedió de la siguiente forma:

A) MARCACION DE gLH: La marcación de la hormona luteinizante caprina (obtenida en el Banco de Hormonas Proteicas de Origen Animal. IIB-UNAM) se realizó a temperatura ambiente, con la técnica de cloramina T (12) utilizando como isótopo radiactivo NaI-125 (Amersham, actividad específica 17.4 mCi/ug).

La hormona (2.5 µg de proteína) se disolvió en 10 ul de amortiguador de fosfato (PB) 0.05 M, pH 7.4. a lo que se le

añadió 1 mCi de NaI-125. La reacción se inició agregando un agente oxidante (cloramina T) en un volumen de 10 μ l (1 mg/ml) disuelto en PB 0.05 M, pH 7.4, seguida de agitación suave durante 30 segundos, la reacción se detuvo añadiendo un agente reductor (metabisulfito de sodio) en un volumen de 25 μ l (1 mg/ml), finalmente se añadieron 100 μ l de solución de transferencia (sacarosa al 16 % con yoduro de potasio al 0.01 %). La mezcla de la reacción se separó en una columna (0.5 X 26 cm) de Sephadex G50-150, equilibrada previamente con PB 0.05 M, pH 7.4, y saturada con 2 ml de BSA al 5 % para evitar el pegado inespecífico del material a la columna, la columna presentó flujo de 60 ml/hora. Las fracciones obtenidas (1ml), se colectaron (colector de fracciones automático Buchler) en tubos que contenían 1 ml de PB 0.05 M con albúmina sérica bovina (BSA) al 3 %. Con el propósito de conocer el patrón de elución de la proteína marcada y el Iodo libre, se tomaron 10 μ l de cada fracción y se contaron durante 0.1 minuto en un contador de radiaciones gamma (Packard modelo 5110).

El daño de las fracciones de proteína obtenidas en la cromatografía durante la marcación, se evaluó mediante la precipitación de la proteína con ácido tricloroacético (TCA) al 30 %. El procedimiento consistió en colocar 10 μ l de cada fracción en tubos de 10 x 0.75 mm, se le añadieron 500 μ l de suero normal de conejo (SNC) diluido 1:400 en PB 0.05 M, pH 7.4 y 500 μ l de TCA al 30 %. La mezcla se agitó y centrifugó (Beckman-GPR) a 3000 rpm, durante 30 minutos a 4 C, después se decantó el sobrenadante y se contó el precipitado.

B) VALIDACION DE LA HORMONA MARCADA: La validación de la hormona se realizó por medio de los siguientes parámetros:

1.- Eficiencia de marcación: se calculó en base al yodo incorporado a la proteína en relación al yodo total utilizado y se expresó en porcentaje (%).

2.- Actividad específica: se definió como la radiactividad por unidad de masa del ligando (mCi/ μ g), y se calculó dividiendo la cantidad de radiactividad entre los μ g de proteína utilizada.

3.- Incorporación de yodo: Se expresó como la cantidad de yodo incorporado (μ mol de NaI-125) por μ mol de hormona (μ molI/ μ molH*).

C) TITULO DEL PRIMER ANTICUERPO: Con el propósito de conocer el título adecuado del primer anticuerpo para el ensayo, fue necesario determinar el porcentaje de unión máxima (% Bo) de cada una de las fracciones útiles en la cromatografía, esto se llevó a cabo con diluciones iniciales del primer anticuerpo desde 1:1000 hasta 1:32000.

El procedimiento experimental consistió en tomar 500 μ l de amortiguador del ensayo (PBS-BSA 1 % pH 7.4), al que se le añadió 200 μ l de PBS-EDTA (0.02 M, pH 7.4) que contenía, la dilución correspondiente del 1er anticuerpo en presencia de suero normal de conejo (SNC) diluido 1:400, finalmente se añadieron 100 μ l de solución de hormona marcada (20000 cpm) y se incubó durante 24 horas a 4 C. Al término de la incubación se colocaron 200 μ l del segundo anticuerpo frío (Anti IgG Conejo) diluido 1:40 en PBS, pH 7.4 y se procedió a una segunda incubación; 24 horas después se

agregó 1 ml de polietilenglicol (PEG 6000) al 6 %, se centrifugó a 3000 rpm durante 30 minutos a 4 C, posteriormente se decantó y la fracción unida se contó durante 1 minuto. La tabla I resume este procedimiento.

D) CURVA ESTANDAR: Para la curva estándar se prepararon soluciones patrón de la hormona no marcada (hormona fría) en concentraciones de 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0 y 64 ng/tubo en amortiguador PBS-BSA 1%; en los tubos de reacción (10x 75 mm), se colocó 450 μ l de este amortiguador, posteriormente se adicionaron 50 μ l de las soluciones patrón, 200 μ l del primer anticuerpo (dilución inicial 1:4000) y 100 μ l de la hormona marcada, se procedió a una incubación a 4 C durante 24 horas. Al término se agregaron 200 μ l de IgG de conejo (dilución 1:40) y 24 horas después, los tubos recibieron 1 ml de PEG-6000 (6 %), se centrifugaron y posteriormente se decantaron contándose la fracción unida. La tabla II resume este procedimiento.

El apéndice I muestra la forma de preparar los amortiguadores utilizados en este sistema.

6.- RADIOINMUNOANALISIS EN FASE SOLIDA PARA PROGESTERONA

Con el fin de monitorear el desarrollo del cuerpo luteo en cada una de las cabras, se tomaron muestras de sangre dos veces por semana bajo las mismas condiciones del muestreo para LH, por un periodo de 21 días.

La determinación de progesterona en suero se llevó a cabo con un RIA en fase sólida, ya implementado en el laboratorio (24).

TABLA I.

Dilución del primer anticuerpo

| | Amortiguador μl | 1er Ab μl | H+ μl | | 2 Ab μl | | PEG μl | |
|---------|--------------------|--------------|----------|-----------------------------|------------|-----------------------------|-----------|--|
| CT | --- | --- | 100 | incubación a 4 C por 24 hrs | --- | incubación a 4 C por 24 hrs | --- | Centrifugación a 3000rpm 4 C por 30 min |
| UNE | 700 | --- | 100 | | 200 | | 1000 | |
| 1:1000 | 500 | 200 | 100 | | 200 | | 1000 | |
| 1:2000 | 500 | 200 | 100 | | 200 | | 1000 | |
| 1:4000 | 500 | 200 | 100 | | 200 | | 1000 | |
| 1:8000 | 500 | 200 | 100 | | 200 | | 1000 | |
| 1:16000 | 500 | 200 | 100 | | 200 | | 1000 | |
| 1:32000 | 500 | 200 | 100 | | 200 | | 1000 | |

CT = cuentas totales

Ab = anticuerpo

UNE = unión no específica

H+ = hormona marcada

PEG = polietilenglicol

TABLA II.

Preparación de la curva estándar

| | | Amortiguador μl | | 1er Ab μl | H+ μl | | 2 Ab μl | | PEG μl | |
|---------|----|--------------------|--|--------------|----------|----------------------------|------------|--|-----------|-------------------------------------|
| CT | | ---- | | ---- | ---- | | ---- | | ---- | |
| UNE | | 700 | | ---- | 100 | Incubación 4 C por 24 hrs. | 200 | | 1000 | Centrifugación a 3000 rpm (30 min.) |
| Bo | | 500 | | 200 | 100 | | 200 | | 1000 | |
| 64 ng | 50 | 450 | | 200 | 100 | | 200 | | 1000 | |
| 16 ng | 50 | 450 | | 200 | 100 | | 200 | | 1000 | |
| 8 | . | . | | . | . | | . | | . | |
| 4 | . | . | | . | . | | . | | . | |
| 2 | . | . | | . | . | | . | | . | |
| 1 | . | . | | . | . | | . | | . | |
| 0.50 | . | . | | . | . | | . | | . | |
| 0.25 | . | . | | . | . | | . | | . | |
| 0.10 ng | 50 | 450 | | 200 | 100 | | 200 | | 1000 | |

Bo = Unión máxima

7.- ANALISIS DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos de la secreción de LH, se analizaron por medio del método estadístico Experimento Factorial (28).

RESULTADOS

VALIDACION DEL SISTEMA EN EL LABORATORIO

A) DESARROLLO DE LA TECNICA:

1.- Yodación: Se marcó hormona luteinizante caprina (gLH) con la técnica de la cloramina T modificada en el laboratorio y descrita en material y métodos. El patrón cromatográfico obtenido en esta marcación se muestra en la figura 1.

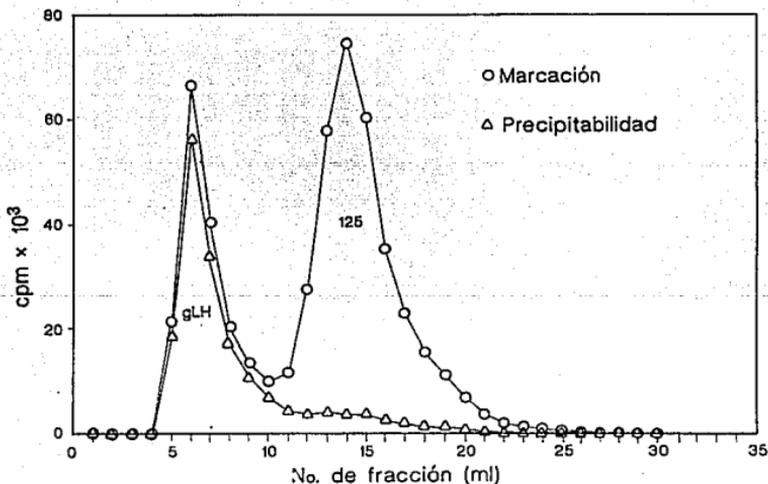


Figura 1.- Cromatografía de exclusión molecular [Sephadex G-50-150 (0.5 x 26 cm.)] y precipitabilidad de cada una de las fracciones.

El primer pico que corresponde a las fracciones 5 a 10 contiene a la hormona marcada, el segundo pico que se refiere a las fracciones 11 a la 30 corresponden al iodo libre.

Las fracciones de la cromatografía analizadas con TCA al 30 % mostraron que la parte más alta del primer pico y fracciones descendentes, tenían una precipitabilidad cercana al 90 %, demostrando que en su mayoría contenían a la proteína marcada.

Los parámetros calculados para validar la marcación aparecen en el cuadro I.

| Cuadro I | |
|--|---|
| Parámetros de marcación de la hormona luteinizante caprina | |
| Parámetros | |
| Actividad específica | 155.03 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ de proteína |
| Eficiencia de marcación | 33.58 % |
| Iodo incorporado | 1.012 $\mu\text{mol I}/\mu\text{mol H}^*$ |

μCi = microcuries, μg = microgramo, $\mu\text{mol I}$ = micromol de Iodo, H^* = hormona marcada

B) TITULACION DEL PRIMER ANTICUERPO

El patrón de titulación del primer anticuerpo con las fracciones 6 y 7 de la hormona obtenidos durante la marcación se muestran en la figura 2; Se observa que disminuye el porcentaje de unión máxima (% Bo) con el incremento de la dilución del anticuerpo. La fracción 7 mostró una mejor inmunoreactividad, así que para el desarrollo del sistema se

decidió emplear una dilución de trabajo de 1:4000 (dilución final 1:20000) de la fracción 7, con lo cual se obtuvo un porcentaje de unión máxima cercano al 50 % en el momento de la titulación lo que nos permitió obtener la mejor sensibilidad del sistema.

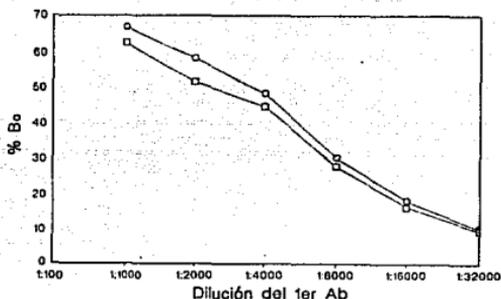


Figura 2.- Curva de titulación del primer anticuerpo. Incubación del primer anticuerpo con diferentes diluciones durante 24 horas a 4 C con las fracciones 6 y 7 de la hormona marcada
 ---- Fracción 6; ---*--- Fracción 7

El cuadro II resume los valores obtenidos durante la titulación del primer anticuerpo.

| Cuadro II | | |
|---|------------|------------|
| Porcentajes de unión máxima (% Bo) de las diferentes diluciones del primer anticuerpo, con las fracciones 6 y 7 de la hormona marcada | | |
| Dilución 1er Ab | Fracción 6 | Fracción 7 |
| | % Bo | |
| 1:1000 | 62.37 | 66.89 |
| 1:2000 | 51.56 | 57.97 |
| 1:4000 | 44.56 | 48.26 |
| 1:8000 | 27.64 | 30.16 |
| 1:16000 | 16.34 | 17.94 |
| 1:32000 | 9.35 | 9.90 |

C) CURVA ESTANDAR: Una vez conocida la concentración adecuada de anticuerpo, se llevó a cabo el montaje de la curva estándar, la figura 3, presenta la curva obtenida con las diferentes concentraciones de gLH fría utilizada como estándar. Los valores de cada punto corresponden al promedio de 10 ensayos independientes, durante la determinación de LH en las muestras; note que la respuesta es inversa a la concentración de hormona.

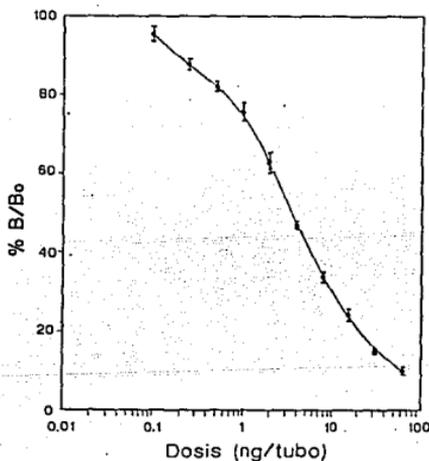


Figura 3.- Curva estándar de gLH % B/Bo vs. dosis (ng/tubo). Cada punto representa el valor promedio de 10 ensayos independientes y se presenta el error estándar de la media (SEM)

El cuadro III resume el promedio de los valores obtenidos de cada una de las concentraciones utilizadas en la curva estándar en relación a B/Bo \pm su error estándar de la media (SEM) así como su

coeficiente de variación (CV) interensayo para cada dosis.

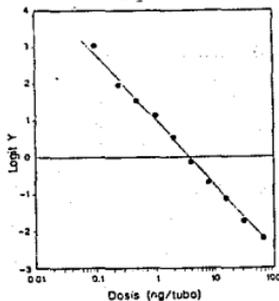
Cuadro III

Dosis de hormona luteinizante caprina (gLH) con respecto al porcentaje de unión de B/Bo y su correspondiente error estándar de la media (SEM) y su coeficiente de variación interensayo (CV)

| Dosis (ng/tubo) | % B/Bo \pm SEM | CV (% Interensayo) |
|-----------------|------------------|--------------------|
| 64 | 10.03 \pm 1.69 | 16.89 |
| 32 | 15.02 \pm 0.88 | 5.90 |
| 16 | 24.33 \pm 3.76 | 15.45 |
| 8 | 33.81 \pm 3.06 | 9.05 |
| 4 | 47.08 \pm 1.27 | 2.67 |
| 2 | 62.85 \pm 7.04 | 11.21 |
| 1 | 75.66 \pm 6.03 | 7.97 |
| 0.50 | 82.14 \pm 2.51 | 3.05 |
| 0.25 | 87.73 \pm 3.34 | 3.81 |
| 0.10 | 95.36 \pm 4.67 | 4.90 |

Ver apéndice II para cálculos del ensayo.

La transformación logit de los datos previamente obtenidos, permitieron calcular la pendiente (m), que corresponde a -1.83, con una ordenada en el origen (b) de 1.04 con un coeficiente de correlación (r) de 0.999. La figura 4 muestra la gráfica.



La figura 4, muestra la curva de desplazamiento de gLH utilizando la transformación Logit-Log del porcentaje de B/Bo. Para cálculos ver apéndice II.

La dosis calculada al 50 % de desplazamiento fue de 3.45 ng/tubo.

El cuadro IV resume los parámetros de la curva estándar

Cuadro IV
Promedio (\bar{X}) de los parámetros de la curva estándar con su correspondiente desviación estándar (DS) y su coeficiente de variación (CV)

| | % B/Bo | UNE | 50 % Bo | Pendiente |
|-----------|--------|-------|---------|--------------|
| \bar{X} | 23.73 | 1.79 | 3.45 | $m = - 1.83$ |
| DS | 1.63 | 0.42 | 0.35 | $r = 0.999$ |
| CV | 6.85 | 23.00 | 10.08 | $b = 1.04$ |

m = pendiente, r = coeficiente de correlación,
 b = ordenada en el origen.

SECRECION DE LH

La figura 5, muestra la concentración de LH promedio de cada grupo antes y después del estímulo con las diferentes dosis de GnRH. Se observa que el grupo testigo y el grupo control no tienen una diferencia significativa ($P \geq 0.05$) en el diseño experimental. En el caso de la dosis de 2 μg , se tiene un incremento de 2.5 veces ($P \leq 0.05$), y con 4 y 8 μg no se observa ninguna diferencia antes y después del estímulo, sin embargo existe una tendencia a incrementar los niveles hormonales.

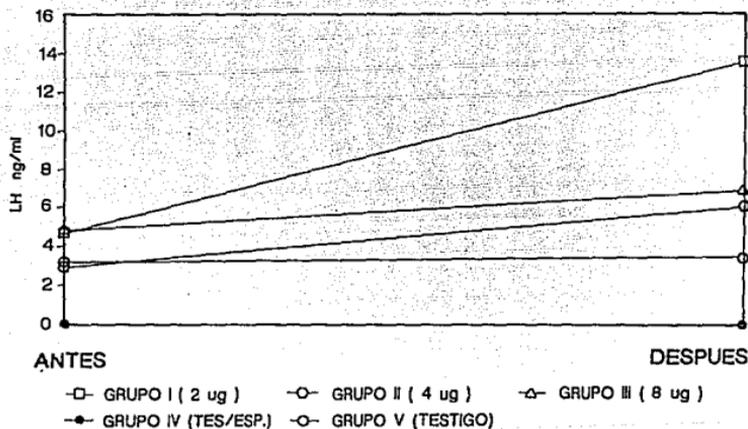


Figura 5. Secreción de LH antes y después del estímulo con diferentes dosis de GnRH

El grupo I (2 μ g de GnRH), presentó un 80 % de respuesta al estímulo de GnRH. De manera general se observó un incremento en la concentración de la hormona en un periodo que fue desde los 45 hasta los 90 minutos; así el animal 96 mostró elevación en sus niveles de LH a los 45 minutos después del estímulo, alcanzando

una concentración máxima de 43.4 ng/ml. El animal 78 presentó el pico máximo a los 60 minutos con una concentración de 17.4 ng/ml. El animal 87 alcanzó el pico a los 75 minutos, siendo éste de 16.3 ng/ml; finalmente, el animal 85 presentó el pico a los 90 minutos, con una elevación máxima de 19.5 ng/ml. El Cuadro V resume dichos resultados y la figura 6 esquematiza la respuesta del grupo completo.

El grupo II (4 µg de GnRH), mostró un 80 % de respuesta en el aumento en los niveles de LH. En general se puede señalar que el pico de LH apareció entre el minuto 60 hasta el 105 después del estímulo, es decir 15 minutos después en comparación al grupo I. El animal 64 mostró elevación de los niveles hormonales a los 60 minutos después del estímulo, alcanzando una concentración máxima de 22.53 ng/ml; sin embargo, los animales 28 y 101, presentaron el pico máximo a los 75 minutos, siendo éstos de 16.4 y 7.5 ng/ml respectivamente; finalmente, el animal 79 mostró el pico máximo a los 105 minutos, con una elevación de 17.5 ng/ml. El cuadro VI resume los valores obtenidos para cada animal y la figura 7 agrupa el patrón de secreción del grupo.

El grupo III, que fue estimulado con 8 µg GnRH respondió en un 100 %. Los animales 50 y 92, mostraron elevación de los niveles hormonales a los 15 minutos después de administrado el GnRH, siendo el valor más alto de 10 y 7.8 ng/ml respectivamente; sin embargo el animal 74 presentó el pico máximo a los 30 minutos correspondiendo a 1.7 ng/ml; el animal 63 presentó el pico a los 45 minutos, de 5.9 ng/ml; finalmente el animal 83 mostró el pico a los 90 minutos con una elevación de 45.5 ng/ml. Los resultados

se muestran gráficamente en la figura 8, y se resumen en el cuadro VII.

En el grupo IV (testigo con esponja), en el 100 % de los animales no se detectaron niveles de LH; mientras que en el grupo V (testigo o control), el 60 % de los animales presentaron niveles de LH, sin sobrepasar los 3.49 ng/ml durante todo el muestreo. La Figura 9 Únicamente muestra los niveles de LH del grupo control.

Cuadro V
Concentración de LH antes y después de la
aplicación de 2 µg de GnRH

| Nº de cabra | Niveles antes del estímulo ng/ml ± SEM | Pico de LH ng/ml ± SEM | Tiempo (min) |
|-------------|--|------------------------|--------------|
| 96 | 13.6 ± 0.07 | 43.4 ± 11.8 | 45 |
| 78 | N.D. | 17.4 ± 1.9 | 60 |
| 87 | 10.8 ± 0.50 | 16.3 ± 1.0 | 75 |
| 85 | N.D. | 19.5 ± 2.0 | 90 |

N.D.= no detectado.

Cuadro VI
Concentración de los niveles de LH, antes y
después de la aplicación de 4 µg de GnRH.

| No. cabra | Nivel antes del estímulo ng/ml ± SEM | Pico de LH ng/ml ± SEM | Tiempo (min.) |
|-----------|---|---------------------------|------------------|
| 64 | 12.3 ± 1.3 | 22.5 ± 3.7 | 60 |
| 28 | 11.2 ± 6.1 | 16.4 ± 2.9 | 75 |
| 101 | 2.0 ± 0.5 | 7.5 ± 1.3 | 75 |
| 79 | 2.4 ± 0.3 | 17.5 ± 8.0 | 105 |

Cuadro VII
Secreción de LH en cabras, antes y después
de la aplicación de 8 µg de GnRH.

| Nº cabra | nivel de LH antes del estímulo. (ng/ml ± SEM) | pico de LH ng/ml ± SEM | tiempo (min) |
|----------|--|---------------------------|-----------------|
| 50 | 4.4 ± 2.8 | 10.0 ± 0.3 | 15 |
| 92 | 5.1 ± 0.8 | 7.8 ± 0.2 | 15 |
| 74 | 0 | 1.7 ± 0.2 | 30 |
| 63 | 3.0 ± 4.1 | 5.9 ± 5.5 | 45 |
| 83 | 10.0 ± 1.1 | 45.5 ± 3.5 | 90 |

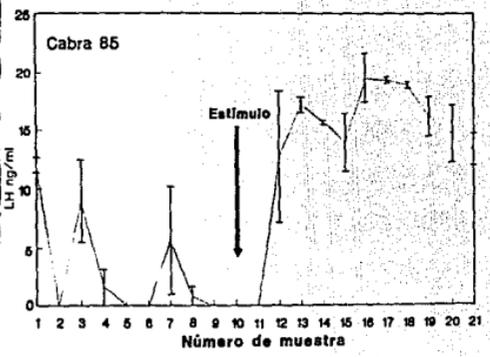
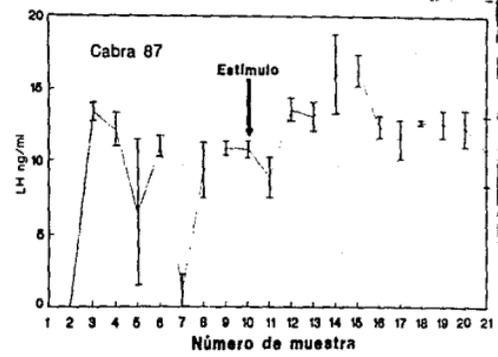
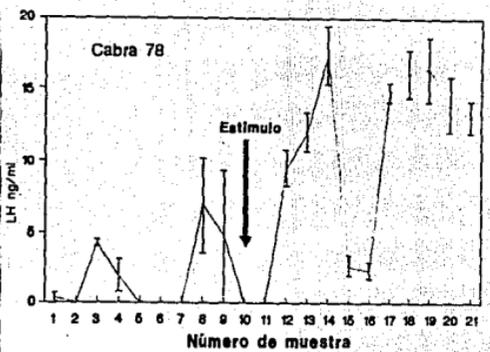
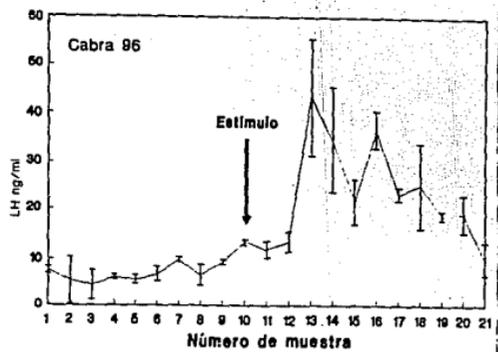


Figura 6. Concentración de LH (+ SEM) en suero de cabras en anestro estacional. La flecha indica el momento de la inyección de 2 ug de GnRH.

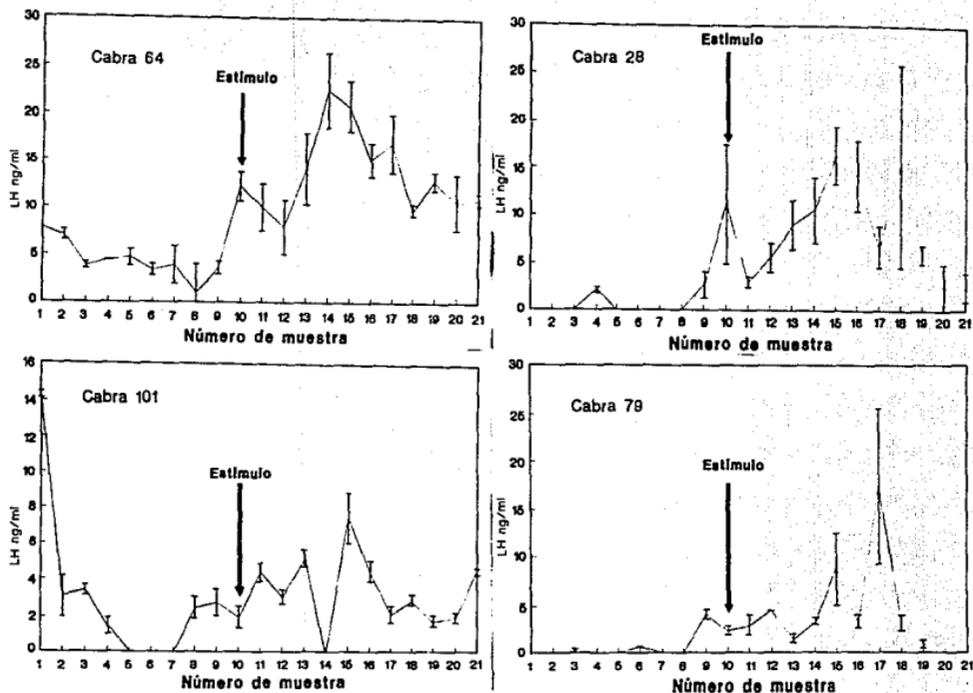


Figura 7. Concentración de LH en cabras tratadas con GnRH. La flecha indica el momento de la inyección de 4 ug de GnRH. Las líneas verticales representan el error estándar de la media (SEM).

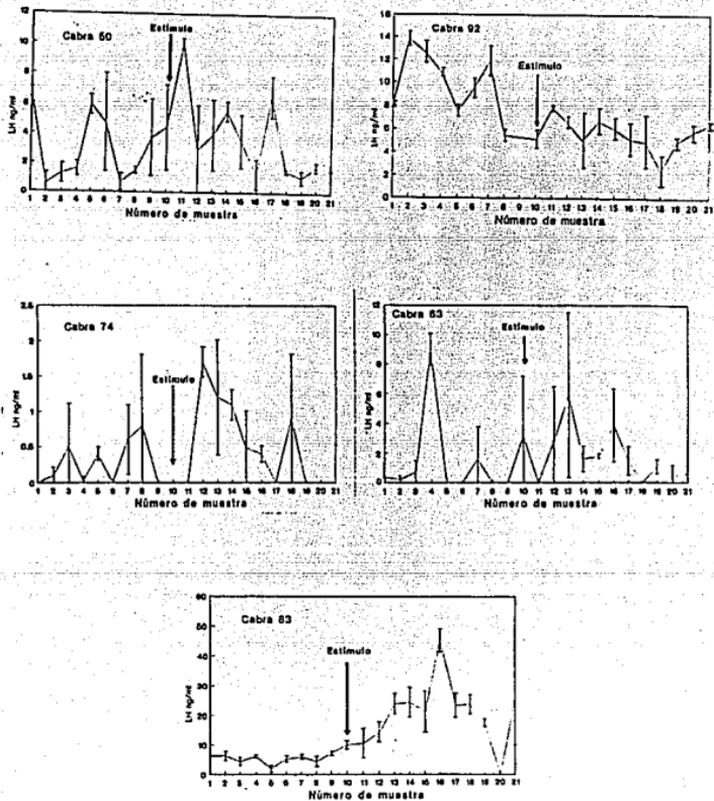


Figura 8. Concentración de LH en cabras tratadas con GnRH. La flecha indica el momento de la inyección de 8 ug de GnRH. Las líneas verticales indican el error estándar de la media (SEM).

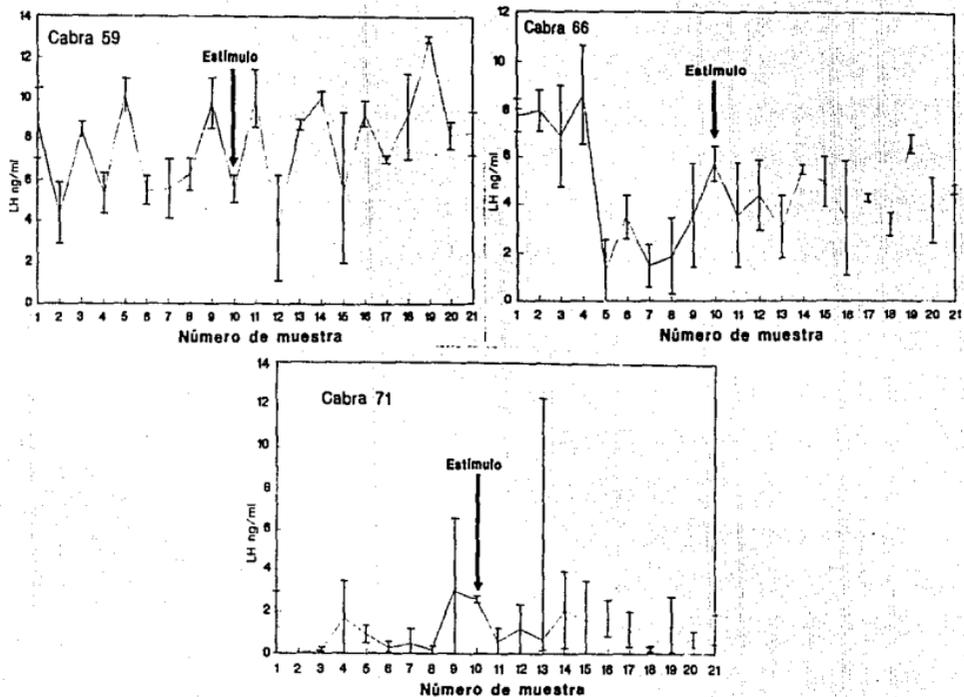


Figura 9. Presenta los niveles de LH del grupo control. Las líneas verticales representan el error estándar de la media (SEM).

El análisis en la duración de la secreción de LH, en los grupos tratados con GnRH, se ejemplifica en el cuadro VIII. Se observa que existe una respuesta inversa en la duración de la secreción de LH con respecto a las dosis utilizadas.

CUADRO VIII
Promedio de la duración en la
secreción de LH

| GRUPO | DOSIS | AMPLITUD (hrs) |
|-------|-------------|-------------------|
| Baja | (2 μ g) | 2.31 \pm 0.12 |
| Media | (4 μ g) | 2.12 \pm 0.32 |
| Alta | (8 μ g) | 1.7 \pm 0.75 |

En cuanto a la actividad ovárica, se encontró que el grupo I correspondiente a la dosis de 2 μ g, sólo mostró cambios en los niveles de progesterona (5.04 ng/ml) el animal que no respondió al estímulo de GnRH.

En el grupo II (4 μ g) el animal N^o 73 se excluyó del trabajo por estar gestante, aunque previamente no se detectaron niveles de progesterona.

El grupo III de 8 μ g sólo una cabra presentó niveles de progesterona durante los 30 días de muestreo posteriores al estímulo de GnRH, los niveles se elevaron en el día 7, alcanzando una concentración máxima de 6.81 ng/ml, y disminuyeron en el día 16.

Las cabras restantes, incluyendo los grupos testigos, presentaron niveles basales de progesterona durante los 30 días posteriores al tratamiento con GnRH.

DISCUSION

Una de las aportaciones de este estudio, es que la cuantificación de los niveles de LH se realizó con un radioinmunoanálisis (RIA) homólogo de doble anticuerpo en fase líquida para LH caprina, mientras que Knight (16) utilizó un RIA heterólogo para la especie en estudio, por lo cual se podría explicar la diferencia en la concentración de LH, como ya se ha informado de la especificidad de especie para las hormonas adenohipofisarias, además de considerarse, las condiciones de realización del experimento (clima, alimentación y raza), también es importante señalar que la aplicación de GnRH fue única, y Knight aplicó inyecciones múltiples.

En el cuadro IX, se presentan los niveles de la secreción de LH, como respuesta a las diferentes dosis de GnRH utilizando un RIA homólogo y un RIA heterólogo.

| SISTEMA DOSIS DE GnRH (μ g) | HOMOLOGO | HETEROLOGO |
|--|------------------|-----------------|
| | ng/ml | |
| 2 | 13.60 \pm 4.03 | 1.46 \pm 0.27 |
| 4 | 6.06 \pm 3.86 | 2.04 \pm 0.11 |
| 8 | 6.90 \pm | 3.67 \pm 0.60 |

El pretratamiento con progestágenos, antes de la aplicación del GnRH en pequeños rumiantes, se realiza principalmente fuera de la época reproductiva (anestro estacional) lo que resulta en un comportamiento estral asociado con ovulación, función normal del cuerpo lúteo y ciclo estral de duración normal (9, 18); por otro lado también se aplica durante el anestro lactacional con el mismo fin (16).

En el presente estudio, se muestran los resultados obtenidos en cabras mestizas en anestro estacional, pretratadas con el progestágeno FGA, a las cuales se les administró una sola dosis de GnRH (2, 4 y 8 µg).

El análisis de la literatura mostró que no existe un estudio en donde se utilice a cabras sincronizadas con el progestágeno FGA y estimuladas con una sola dosis de GnRH como se informa en este trabajo, sin embargo, existen reportes, en los que sincronizan a las cabras con FGA y estimulan la liberación de LH con dosis de PMSG o estradiol más GnRH (14, 21), PMSG más GnRH (27) y por otro lado se ha informado de la sincronización de cabras con FGA y estimuladas con PMSG (5, 14, 27), trayendo consigo la liberación de LH y estrógeno con cuerpo lúteo funcional.

En función de lo previamente señalado, los resultados aquí reportados, se comparan con el trabajo de Knight (16), quien trabajó en cabras, y estudios realizados en ovejas en condiciones fisiológicas semejantes a las de este estudio.

Los niveles de LH secretados durante el estímulo de 2 µg de GnRH, mostraron una respuesta de 9 veces más a lo reportado por Knight (16), quien utilizando cabras en el mismo estado fisiológico y con la misma dosis aquí informada, con la

diferencia de aplicarla en cuatro inyecciones. Dato que llama la atención ya que la mayoría de los reportes informan que la aplicación de GnRH administrado en forma de inyecciones múltiples inducen una mejor respuesta en la secreción de LH, muy parecida a la secreción que se produce en forma natural (7, 18, 20, 21, 26), por ejemplo el caso de Crighton (7), quien observó que al aplicar inyecciones múltiples de GnRH en ovejas en anestro estacional (5 inyecciones de 30 μg cada una) induce una mejor respuesta en la secreción de LH, siendo sus valores de 172 ± 16 ng/ml, comparado con 98 ± 12 ng/ml, como respuesta a una sola aplicación de 150 μg de GnRH.

El estudio con 4 μg de GnRH en nuestro caso mostró, una respuesta irregular en el patrón de secreción de LH ya que los niveles se elevaron desde 7.5 ng/ml hasta 22.5 ng/ml. Estos datos mostraron ser 3 veces más que lo informado por Knight (16), por otro lado, Brown et al (4), observó que al aplicar 4.25 μg de GnRH en ovejas en anestro estacional, en forma múltiple (17 aplicaciones, cada una de 0.250 μg), se elevaron los niveles de LH alcanzando un máximo de 2.2 ± 0.1 ng/ml, induciendo la aparición del pico preovulatorio de LH aplicando 125 μg de GnRH después del tratamiento inicial, elevándose los niveles hasta 21.9 ± 1.9 ng/ml.

Con 8 μg de factor liberador de las gonadotropinas en este estudio mostró una elevación de los niveles de LH desde 1.7 hasta 45.5 ng/ml, lo que demuestra una gran variabilidad de respuesta de los animales, sin embargo el promedio mostró una respuesta de 2 veces mayor a lo informado por Knight (16).

Los resultados obtenidos en este estudio muestran, que es necesario estudiar dosis más pequeñas para encontrar una respuesta dependiente de la dosis, ya que como se observó las dosis de 4 y 8 μg presentan una respuesta menor a la dosis de 2 μg utilizada en este estudio, sugiriendo que se encuentra en exceso de dosis.

Los resultados analizados de manera general mostraron que ninguna de las dosis utilizadas en este estudio mostró un pico preovulatorio de LH, ya que los niveles de progesterona determinados durante 30 días posteriores al estímulo de GnRH no se elevaron, indicando que no se formó un cuerpo lúteo funcional. McNatty et al. (20) cita a McLeod et al. (19) quien señala que el tratamiento únicamente con GnRH en ovejas en anestro estacional sin tratamiento previo con un progestágeno puede inducir ovulación, pero no estró, con la subsecuente formación de un cuerpo lúteo el cual no presenta una función normal, aunque sí provoca la elevación en la concentración de LH en suero o plasma; estudios publicados por McLeod et al. (18) en ese mismo año, demuestran que en ovejas en anestro estacional y sincronizadas previamente con FGA, y sometidas a aplicaciones de 24, 48 y 96 μg de GnRH en forma múltiple (96 aplicaciones cada una de 0.250, 0.500 y 1 μg /aplicación) observa que cada inyección inducía una elevación inmediata pero transitoria de LH, siendo ésta más grande en las primeras 3 ó 4 aplicaciones. En el día 4 del tratamiento, el patrón de secreción fue el mismo, sólo que en la dosis de 1 μg , la secreción de LH retornaba a niveles basales entre cada aplicación, sin embargo todos los animales presentaron

pico preovulatorio de LH entre 68 y 145 ng/ml, con una duración de 8 a 16 horas y entre 17 a 48 horas después de iniciado el tratamiento. En este estudio sincronizando a las cabras con FGA no se obtuvo un pico preovulatorio de LH, la posible explicación a estos resultados puede deberse a que solamente se aplicó una dosis de GnRH y no dosis repetitivas del factor liberador, o también que las dosis utilizadas no son las adecuadas para la especie caprina, quizá es necesario aplicar dosis más pequeñas o mucho mayores de GnRH para inducir pico preovulatorio de LH.

CONCLUSIONES

Se observa que a pesar de que se debería obtener una mayor respuesta con aplicaciones múltiples de GnRH, en este estudio se tiene una mayor respuesta con una sola aplicación. Lo que puede sugerir es que quizá el sistema de análisis por ser homólogo detecta de manera más específica a la proteína en estudio.

El trabajo sugiere que es necesario probar dosis más pequeñas de GnRH para obtener una respuesta dependiente de la dosis.

Debe enfatizarse que este estudio no permite concluir cuál es la dosis óptima de GnRH que provoque un pico preovulatorio de LH en cabras mestizas, ya que los niveles de progesterona no cambiaron.

También los datos muestran que es posible administrar una sola dosis de GnRH y provocar picos de LH, sin embargo es fundamental señalar que quizá con estas dosis utilizadas de

manera fraccionada y repetitiva provoquen picos preovulatorios de LH. Otra alternativa es que el estudio permitio establecer que con una sola dosis se puede provocar pico de LH, estudios posteriores nos permitirá demostrar que una dosis mucho mayor a la informada aquí genere pico preovulatorio.

La determinación de los niveles hormonales de LH se realizó con un sistema homólogo para la especie caprina, siendo los valores mayores a los determinados por un RIA heterólogo.

BIBLIOGRAFIA

1. Bedolla, T., Ulloa, A.A., Landeros, V.J. y Pérez, P.G. (1984). Análisis de datos y control de calidad en el radioinmunoanálisis. I. Guía para la evaluación de los resultados. Rev. Invest. Clín., 36: 179-192.
2. Bosu, W.T.K.; Serna, J. and Barker, C.A.V. (1978) Peripheral plasma levels of progesterone in goats treated with fluorogestone acetate and prostaglandin F2- α during the estrous cycle. Theriogenology, 9: 371-390.
3. Bretzlaff, K.N.; Nuti, L.C.; Scarfe, A.D.; Elmore, R.G.; Capehart, J.; Varner, D.D. and Weston, P.G. (1991) Luteinizing hormone and progesterone concentrations and induction of estrus after use of norgestomet ear implants or constant infusion of gonadotropin-releasing hormone in anestrus, nonlactating dairy goats. J. Vet. Res. 52: 1423-1426.
4. Brown, B.W., Cognie, Y., Chemineau, P., Poulin, N. and Salama, O.A. (1988). Ovarian capillary blood flow in seasonally anoestrous ewes induced to ovulate by treatment with GnRH. J. Reprod. Fert., 84: 653-658.
5. Chemineau, P., Gauthier, D., Poirier, J.C. and Saumande, J. (1982) Plasma levels of LH, FSH, prolactin, oestradiol-17 β and progesterone during natural and induced oestrus in the dairy goat. Theriogenology 17: 313-322.

6. Chemineau, P., Martin, G.B., Saumande, J. and Normant, E. (1988). Seasonal and hormonal control of pulsatile LH secretion in the dairy goat (Capra hircus). J. Reprod. Fert. 83: 91-98.
7. Crighton, D.B., Foster, J.P., Haresign, W. and Scott, S.A. (1975). Plasma LH and progesterone levels after single or multiple injections of synthetic LH-RH in anoestrus ewes and comparison with levels during the oestrous cycle. J. Reprod. Fert. 44: 121-124.
8. Delgadillo, J.A. and Chemineau, P. (1992). Abolition of the seasonal release of luteinizing hormone and testosterone in Alpine male goats (Capra hircus) by short photoperiodic cycles. J. Reprod. Fert. 94: 44-55.
9. Drost, M. and Thatcher, W.W. (1992). Application of gonadotrophin releasing hormone as therapeutic agent in animal reproduction. Animal Reproduction Science, 28: 11-19.
10. Follett, B.K., Scanes, C.G. and Cunningham, F.J. (1972) A radioimmunoassay for avian luteinizing hormone. J. Endocrinol. 52: 359-378.
11. Fukui, Y., Kobayashi, M., Kojima, M. and Ono, H. (1985) Effects of time of PMSG and fixed-time GnRH injections on estrus incidence and fertility in physiologically different ewes pre-treated with progestogen-impregnated vaginal sponge during the nonbreeding season Theriogenology 24: 631-641.

12. Greenwood, F.C., Hunter, W.M. and Glover, J.S. (1963) The preparation of ¹³¹I labelled human GH of high specific radioactivity. Biochemical J. **82**: 114-123.

13. Hafez, E. Reproducción e inseminación artificial en animales. 5 ed. Interamericana, México 1987.

14. Haessing, W. and Lamming, G.E. (1978). Comparison of LH release and luteal function in cyclic and LH-RH-treated anoestrous ewes pretreated with PMSG or oestrogen. J. Reprod. Fert., **52**: 349-353.

15. Jones, E.E., Bain, J.B. and Odell W.D. (1976) Postcoital luteinizing hormone release in male and female rabbits as determined by radioimmunoassay. Fert. Steril. **27**: 848-852.

16. Knight, C.H.; Wilde, C.J.; Mcleod, B.J. and Haresign W. (1988) Exogenous GnRH induces ovulation in seasonally anoestrous lactating goat (*Capra hircus*). J. Reprod. Fert. **83**: 679-686.

17. Mcleod, B.J. and Haresing, W. (1984). Induction of fertile oestrus in seasonally anoestrous ewes with low doses of GnRH. Anim. Reprod. Sci. **7**: 413-420.

18. Mcleod, B. J., Haresing, W. and Lamming, G.E. (1982) Response of seasonally anoestrous ewes to small dose multiple injections of GnRH with and without progesterone pretreatment. J.Reprod. Fert. 65: 223-230.
19. Mcleod, B.J., Haresing, W. and Lamming, G.E. (1982). The induction of ovulation and luteal function in seasonally anoestrous ewes treated with small-dose multiple injections of Gn-RH. J. Reprod. Fert. 65: 215-221.
20. McNatty, K.P. Ball, K. Gibb, M. Hudson, N. and Thurley, D.C. (1982). Induction of cyclic ovarian activity in seasonally anoestrous ewes with exogenous GnRH. J.Reprod. Fert. 64: 93-96.
21. Mizinga, K.M. and Verma, O.P. (1984). LHRH induced ovulation and fertility of anoestrous goats. Theriogenology 21:435-446.
22. Mori, Y. and Kano, Y. (1984). Changes in plasma concentrations of LH, progesterone and estradiol in relation to the occurrence of luteolysis, oestrous and time of ovulation in the Shiba goat (*Capra hircus*). J. Reprod. Fert. 72: 223-230.
23. Niswender, G.D., Reichert Jr. L.E., Midgley, A.R. and Nalbandov, A.V. (1969). Radioimmunoassay for bovine and ovine luteinizing hormone. Endocrinology 84: 1166-1173.

24. Perera, M.G., Gamboa, V.J.J., Reynoso, M.W., Carranza, S.M., García, F.E. y Salas V.A. Desarrollo de un radioinmunoensayo (RIA) homólogo para la hormona luteinizante caprina (gLH). XXXV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Veracruz, Ver. 2-6 de Agosto de 1992.

25. Pulido, A. R. A.: Establecimiento de la metodología para el manejo óptimo de muestras de sangre y leche de ganado cebú (*Bos Indicus*) destinadas a la determinación de progesterona por medio de Radioinmunoanálisis. Tesis de Maestría. Facultad de Med. Veterinaria y Zootécnia. U.N.A.M. México, D.F. (1989).

26. Quispe, T. L. Estudio sobre el uso del acetato de melengestrol para la sincronización e inducción de estros en ovejas. Tesis Doctorado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. (1989).

27. Tamanini, C.; Bono, G.; Cairoli, F. and Chiesa, F. (1985). Endocrine responses induced in anestrus goats by the administration of different hormones after a fluorogestone acetate treatment. Animal Reprod. Sci. 9: 357-364.

28. Walpole, R.E. y Mmyers, R.H.: Probabilidad y Estadística para ingenieros. 3 ed. Interamericana, México, 1986.

APENDICE I.

Reactivos de la marcación: todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y las soluciones se prepararon utilizando agua desionizada.

A) Amortiguador de fosfato 0.5 M, pH 7.4 (PB 0.5 M).

1. Na_2HPO_4 , se pesaron 12.78 g y se disolvieron en 180 ml de agua.
2. NaH_2PO_4 , se pesaron 3.45 g y se disolvieron en 50 ml de agua.

Se mezcló de (1) 162 ml y de (2) 38 ml, para obtener un volumen final de 200 ml, y se checo el pH de la solución.

B) Amortiguador de fosfatos, 0.05 M, pH 7.4 (PB 0.05 M)

Se tomaron 50 ml de (A) y se agregaron 450 ml de agua.

C) Amortiguador de fosfato salino (PBS)

PB 0.05 M + NaCl 0.14 M

Para un litro de solución se pesaron 8.18 g de NaCl y se disolvieron en 1000 ml de PB 0.05 M.

D) Amortiguador de fosfato salino más EDTA.

Se pesaron 7.50 g de EDTA y se disolvieron en 1000 ml de PBS.

E) Amortiguador del ensayo (PBS-BSA 1%)

Se pesó 1 g de BSA (fracción V de Coon-Sigma) y se disolvió en 100 ml de PBS.

F) PBS-BSA 0.1%

Se pesó 0.1 g de BSA y se disolvió en 100 ml de PBS.

APENDICE II

Calculo de los resultados del Radioinmunoanálisis (RIA) (1).

- A) Unión máxima o unión de gLH marcada (gLH*) al anticuerpo (Ab) en ausencia de hormona fría (gLH)

$$\% Bo = \frac{U - UNE}{CT - UNE} \times 100$$

Donde U = unido
 UNE = unión no específica
 CT = cuentas totales
 % Bo = unión máxima

- B) Unión de la gLH fría al anticuerpo en presencia de hormona marcada (gLH*)

$$\% B/Bo = \frac{\frac{B - UNE}{CT - UNE}}{Bo} \times 100$$

Donde B = unión de la gLH fría al anticuerpo en presencia de hormona marcada.
 UNE = unión no específica.
 CT = cuentas totales.

- C) Transformación logística:

$$\text{Logit } y = \ln 100 - \frac{\% B/Bo}{\% B/Bo}$$

Donde ln = logaritmo natural