

Obtención de anticuerpos contra progesterona y estradiol, estandarización del radioinmunoanálisis y validación en suero de rumiantes

María del Refugio Herrera Díaz*
Maricela Luna Muñoz**
Carlos Manuel Romero Ramírez***

Resumen

Para obtener anticuerpos específicos contra progesterona (P_4) y 17B-estradiol (E_2) y la estandarización de sus radioinmunoensayos (RIAs) correspondientes, se inmunizaron conejos Nueva Zelanda y California con 100 o 160 μg de Progesterona-CMO:BSA o 17B-Estradiol-CMO:BSA respectivamente. Las reinoculaciones se realizaron con intervalo de una semana en seis 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 fue de 4.4 y 4.4% para pregnenolona, de 4.0 y 13.3% para epipregnenolona y menos del 1.0% para alopregnenolona, testosterona, E_2 y cortisol para AcQKP5 y AcQKP6 respectivamente. La reacción cruzada del antisuero obtenido contra E_2 fue de 3.6% para estrona y menos de 0.01% para estriol, androstendiona, 17a-estradiol, P_4 Y testosterona. La sensibilidad de los ensayos permite detectar desde 6.25 pg/tubo de P_4 y 0.5 pg/tubo 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 5.0 y 10.0% respectivamente. Para validar los RIAs se determinó la concentración de P_4 y E_2 en cabras y vacas en diferentes estados reproductivos. Así, la concentración de P_4 en cabras durante el último tercio de gestación fue de 8.3 ± 0.4 ng/ml y durante el periodo preparto disminuyó a 5.4 ± 0.8 ng/ml; en esta última etapa el E_2 mostró valores de 55.1 ± 8.1 pg/ml. En la vaca, los valores de P_4 y E_2 fueron en el estro de 0.9 ± 0.08 ng/ml y 10.6 ± 2.4 pg/ml, en la fase lútea de 8.6 ± 2.7 ng/ml y 3.3 ± 0.6 pg/ml y en la gestación de 6.4 ± 0.6 ng/ml y

17.3 ± 1.6 pg/ml respectivamente. La sensibilidad de los RIAs con los anticuerpos obtenidos, es capaz de identificar diferenciar los valores característicos de P_4 y E_2 de los diferentes estados reproductivos en rumiantes domésticos,

Introducción

El conocimiento y comprensión actual de la endocrinología de la reproducción de los mamíferos y otros vertebrados, se sustenta primordialmente en el desarrollo de la metodología para cuantificar las concentraciones circulantes de las diferentes hormonas que participan en la regulación de su ciclo reproductivo.

Este avance metodológico ha sido crucial en el caso de los rumiantes domésticos, pues la baja concentración de algunas hormonas, v.g., 17B-estradiol (E_2) en los ungulados, con respecto a otros mamíferos, ha exigido en mayor medida del desarrollo de técnicas confiables y sensibles.^{2, 6, 15, 22}

En este trabajo se informa sobre la obtención de anticuerpos específicos contra progesterona (P_4) y E_2 , Y la estandarización y validación de los radioinmunoensayos (RIAs) correspondientes. El empleo de estos procedimientos permite cuantificar y diferenciar los valores característicos de estas hormonas en suero, durante los diferentes estados reproductivos de cabras, vacas y ovejas.

Material y métodos

Animales y reactivos. Se utilizaron 6 conejos Nueva Zelanda machos para P_4 (anri-Pj) y 4 conejos California castrados para E_2 (anti-Er). En ambos casos los conejos tenían tres meses de edad y se mantuvieron en un cuarto con temperatura controlada (25 ± 2.0 C), con alimento balanceado y agua *ad libitum*. Los antisueros anti- P_4 se identificaron con las siglas QKPylos números del 1 al 16 correspondientes a cada animal; los anti- E_2 se identificaron con las siglas QKE y los conejos de los que provenían con letras de la A a la D. Los haptenos de P_4 : 4-pregnén-3, 20-diona (3-{O-Carboximetil}oxina:BSA) ($P_{4-\text{CMO:BSA}}$) y de E_2 , (1,3,5, (10)-estratrien-3, 17-B-diol (6-{O-Carboximetil}oxima:BSA) ($E_{2-\text{CMO:BSA}}$) se

Recibido para su publicación el 11 de enero de 1992

* Parte de este trabajo corresponde a la tesis de Licenciatura en Biología del primer autor. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM.

** Departamento de Fisiología. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. 04510, México, D.F.

*** Departamento de Biología de la Reproducción. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Apartado Postal 55-535, 09340, México, D.F.

Estuvieron comercialmente*, al igual que el adyuvante completo e incompleto de Freund**.

Inmunización y obtención del anti-P₄ Cada conejo fue inoculado en seis ocasiones, a intervalos de una semana, con 10 µg del conjugado P₄-CMO:BSA, resuspendidos en 160 µl de solución salina al 0.9% y emulsificados con 1.0 ml de adyuvante de Freund. El inóculo se administró intradérmicamente en diversos puntos de la región dorsal; la primera inoculación se realizó con adyuvante completo y las siguientes con adyuvante incompleto.

Inmunización y obtención del anti-E₂. Cada conejo recibió en una sola ocasión 10 µg del conjugado E₂-CMO:BSA, disuelto en 100 µl de solución salina 0.9% en el ganglio poplíteo. Posteriormente, a intervalos de una semana y durante dos meses, los conejos recibieron inoculaciones intradérmicas en la región dorsal de la solución anterior del conjugado, emulsificada con adyuvante incompleto.

Titulación y caracterización de los antisueros. A partir de la segunda inoculación, se obtuvo una muestra sanguínea de la vena auricular antes de aplicar el inóculo de refuerzo. El suero de la muestra se empleó para la titulación, que se realizó por duplicado en diluciones seriadas 1:50, 1:100 ... 1:3200, con un amortiguador de fosfatos 1mM, NaCl150 mM y gelatina 1% a pH 7.0 (GPBS) en presencia de las respectivas hormonas marcadas.

Las hormonas radiactivas, 1, 2, 6, 7³H{N}:progesterona*** [3H-P4] (101.7 mCi/mmol) y 2,4,6,7,16,17-³H{N}: 17B-estradiol*** [3H-E2] (169.0 mCi/mmol), fueron primeramente diluidas en metanol (0.01 mCi/ml) y después con GPBS, hasta una concentración de 400 pg/ml para la 3H-P₄ y de 300 pg/ml para el 3H-E₂ (equivalente a 10,000 cpm/100 µl en ambos casos).

Con base en el porcentaje de unión de la hormona marcada, se seleccionaron los animales con mejor respuesta inmune. Los antisueros se cosecharon por exsanguinación a blanco de los animales, y se utilizó como dilución de trabajo aquella que unió entre el 30 y 50% de la hormona marcada.

Para evaluar la especificidad de los antisueros, se realizaron ensayos de competencia empleando la hormona marcada correspondiente, así como esteroides de importancia biológica que por su concentración plasmática, su semejanza química con las hormonas de interés, o ambas, pudieran interferir en la cuantificación de la P₄ o el E₂.

Preparación de soluciones patrón. Se prepararon soluciones madre de los diferentes esteroides de 1.0 mg en 10.0 ml de metanol (grado espectofotométrico)t. La concentración final de cada solución se corroboró y corrigió por espectroscopia de VV. A partir de estas

soluciones madre se realizaron diluciones en GPBS, para obtener las concentraciones de hormona correspondientes a los estándares empleados en los ensayos: 0.25,0.5, ... 3.2 ng/ml para P₄ y 0.5, 1.0, ... 32.0 pg/ml para E₂.

Extracción de las hormonas esteroides. Se realizó a partir de 100 µl (para P₄) 0500 µl (para E₂) del suero a cuantificar; en ambos casos se agregaron 5.0 ml de éter etílico grado reactivo[. La suspensión se agitó durante 1 min y se dejó reposar durante 30 min para permitir que se separaran las dos fases. La fase acuosa se congeló a -40 C e inmediatamente la fase orgánica se decantó y evaporó a sequedad a 37 C. Una vez evaporado el éter, el residuo se resuspendió en 2.0 ml de GPBS. Con el objeto de recuperar la mayor cantidad de hormona adsorbida a las paredes de los tubos, éstos se incubaron a 37 C y posteriormente se agitaron energéticamente durante 1 min. De esta suspensión se tomaron 500 µl por duplicado para montar el ensayo. Las pérdidas durante este procedimiento se calcularon de sueros agregados con 3H-P4 o 3H-E2 en cada ensayo. La recuperación de las hormonas marcadas fue de 87 a 90% para P₄ y de 90 a 95% para E₂.

Desarrollo del ensayo. En tubos de vidrio de 100 x 75 mm se adicionaron, por duplicado, 100 µl de una solución del anticuerpo correspondiente (QKP51:250,QKP6 1:300 YQKEC 1:1400), 100 µl de la hormona marcada a determinar equivalente a 10,000 cpm y 500 µl de las soluciones estándar o problema. Los tubos se agitaron y se incubaron por 24 horas a 4 C. Posteriormente, se agregó el sistema de separación (carbon: dext. ran 5.0: 0.5%) y se incubó de nuevo durante 20 min a 4 C. Para separar la fracción unida de la libre, se centrifugó a 100 g durante 25 min y el sobrenadante (fracción unida) se decantó en un vial. Se adicionaron 5.0 ml de líquido de centelleo y se valoraron en un contador de centelleo.

Validación del ensayo. La sensibilidad de uno y otro ensayo para distinguir los valores de P₄ y E₂ característicos de diferentes estados reproductivos, se evaluó analizando la concentración de estas hormonas en sueros de cabra, vaca y oveja.

Cabras. Se obtuvieron muestras de 12 hembras mestizas gestantes a intervalos de una semana, desde los 90 a los 140 días de gestación, determinados por la fecha de empadre y tres veces por semana desde el día 140 hasta el parto. La diferente frecuencia de muestreo se determinó por la dinámica hormonal característica de cada periodo. Al mismo tiempo, el primer periodo se consideró representativo del tercer tercio de gestación y el segundo del periodo periparto.

Vacas. Estos sueros provinieron de 9 vacas en celo (valoradas con un toro celador), 5 vacas en las que se indujo previamente superovulación y que se encontraban en fase lútea (determinada por fecha de celo y palpación rectal de cuerpos lúteos), y 15 vacas en diferentes estados de gestación (corroborada por fecha de empadre y palpación rectal de útero grávido). En

* Steraloids, Inc,

** Sigma Chemical Co.

*** New England Nuclear Co.

t J.T. Baker, S. A. de C. V.

Cuadro I
PORCENTAJES DE REACCIÓN CRUZADA DE LOS ANTICUERPOS

Ligando	QKP5	QKP6	QKEC
Progesterona	100.0	100.0	0.0
17B-estradiol	0.0	0.0	100.0
Pregnenolona	4.4	0.8	
Epipregnolona	4.0	6.2	
Alopregnolona	0.0	0.0	
Testosterona	0.0	0.0	
Cortisol	0.0	0.0	
Estrona			3.8
Estriol			0.1
Androstendiona			0.01
17o:-estradiol			0.01

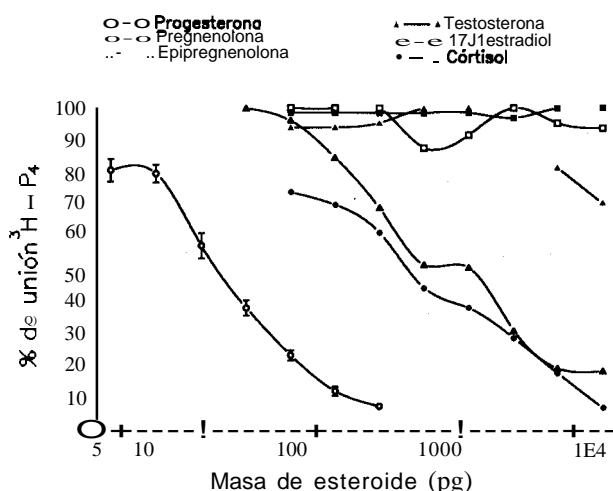


Figura 1. Inmunorreactividad cruzada del AcQKP5. Se presenta el desplazamiento de $^3\text{H}-\text{P}$ por algunos progestágenos y otros esteroides de interés biológico. Al 50% de unión, la reacción cruzada para pregnenolona y epipregnololona no excedió el 4.5%; para los otros esteroides fue menor de 1%. La curva de progesterona muestra además la media y el error estándar de siete ensayos.

algunos animales de este último grupo se realizó más de una determinación en diferentes tiempos.

Ovejas. Se estudiaron siete hembras criollas en las que se corroboró a la necropsia un folículo ovárico ($n = 3$), un cuerpolúteo ($n = 2$) y dos cuerpos lúteos con un feto en primer tercio de gestación ($n = 2$) respectivamente.

Análisis estadístico. El coeficiente de variación intra e interensayo se calculó utilizando $\text{C.V.} = \frac{\text{d.e.}}{X} \times 100$. La precisión se calculó restando al 100% de probabilidad de obtener valores iguales, la dispersión experimental del ensayo, entendida ésta como el coeficiente de variación del mismo. Las curvas de desplazamiento están expresadas como el porcentaje de unión en cada concentración de ligando frío, con respecto a la unión del cero (BIB_0). Los valores se expresan como la media \pm la desviación estándar. Las diferencias significativas entre los distintos estados reproductivos de vacas y ovejas se evaluaron a través de un análisis de varianza.³⁷

Resultados

Titulación y caracterización de los antisueros

AntiP4'. Al mes de iniciada la inmunización y por el porcentaje de unión del ligando específico ($^3\text{H}-\text{P}_4$), se seleccionaron los conejos 5 y 6. Estos animales se inocularon una vez más antes de obtener los antisueros por exsanguinación a blanco. El título final para QKP5 y QKP6 fue de 1:250 y 1:300, dilución a la cual unen 40% y 35% del ligando respectivamente. En las Figuras 1 y 2 Yen el Cuadro 1, se muestran los porcentajes de reacción cruzada a la P_4 de estos antisueros con algunos esteroides; sólo la pregnenolona presentó una competencia significativa al 50% de unión del ligando sobre la unión del cero, 4.4% en el QKP5 y 6.2% en el QKP6.

AntiE₂. En este caso, la respuesta inmune fue más lenta, y requirió ocho semanas para alcanzar uniones de 4 y 18% en dos conejos en una dilución 1:320. De estos animales, sólo se continuó inoculando al segundo (Conejo C), cuyo título se incrementó abruptamente en la semana nueve, alcanzando 45% de unión a la dilución de trabajo (1:1400). En la Figura 3 se muestra la curva de desplazamiento y en el Cuadro 1 los porcentajes de reacción cruzada del antisuero QKEC a la dilución de trabajo. Al 50% de unión del E₂, la estrona sólo compite en 3.5%, estriol 0.1% y la androstendiona y el 17a-estradiol menos del 0.01%.

Control de calidad del ensayo. En las Figuras 1, 2 y 3 se observa que las curvas de los ensayos muestran un comportamiento característico, y que su sensibilidad permite cuantificar de 0.05 a 0.4 ng de P_4 y de 2.0 a 32.0 pg de E₂. Considerando esta sensibilidad se requieren de 100 a 500 μl de suero para determinar P_4 y E₂ respectivamente. Los coeficientes de variación intraensayo,

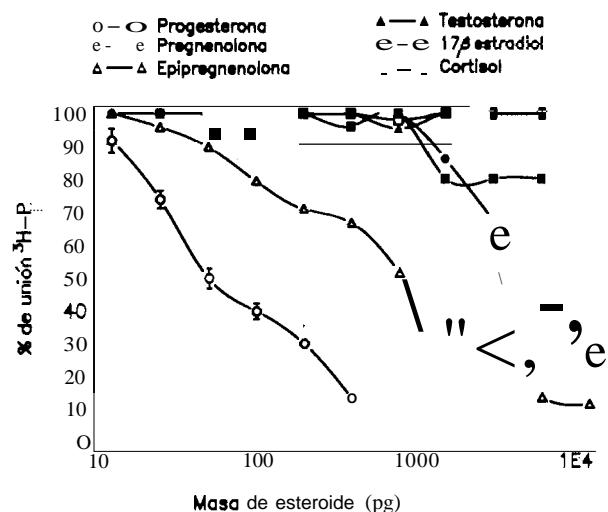


Figura 2. Inmunorreactividad cruzada del AcQKP6. Desplazamientos de $^3\text{H}-\text{P}$ por algunos progestágenos y otros esteroides de interés biológico. La reacción cruzada con epipregnolona y pregnenolona al 50% de unión fue de 6.2% y 0.8% respectivamente; para los otros esteroides fue menor de 0.1%. En la curva de progesterona se indica con barras el error estándar acumulado en ocho ensayos.

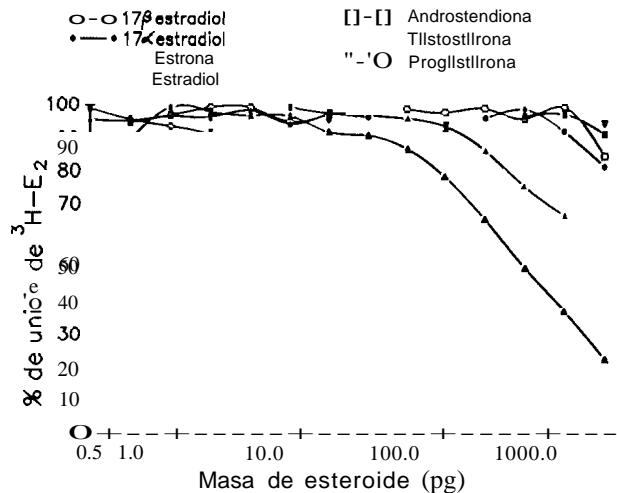


Figura 3. Inmunorreactividad cruzada del AcQKEC. Desplazamientos de $^3\text{H}-\text{E}_2$ provocados por algunos estrógenos y otros esteroides de interés biológico. Al 50% de unión del 17β -estradiol, sólo la estrona alcanzó una reacción cruzada de 3.5%; en los otros esteroides fue menor de 0.1%. En la curva de 17β -estradiol se marca con barras el error estándar acumulado en diez ensayos.

incluyendo además del procedimiento de los RIAs el de extracción, fueron de 10.9% ($n=20$) para P_4 y 5.02% ($n=20$) para E_2 . La variación interensayo, incluyendo ambos procedimientos, de muestras analizadas en 10 ocasiones diferentes en un periodo de tres meses, fue de 12.8% para P_4 y 10.4% para E_2 . La precisión intra e interensayo considerando sólo el procedimiento del

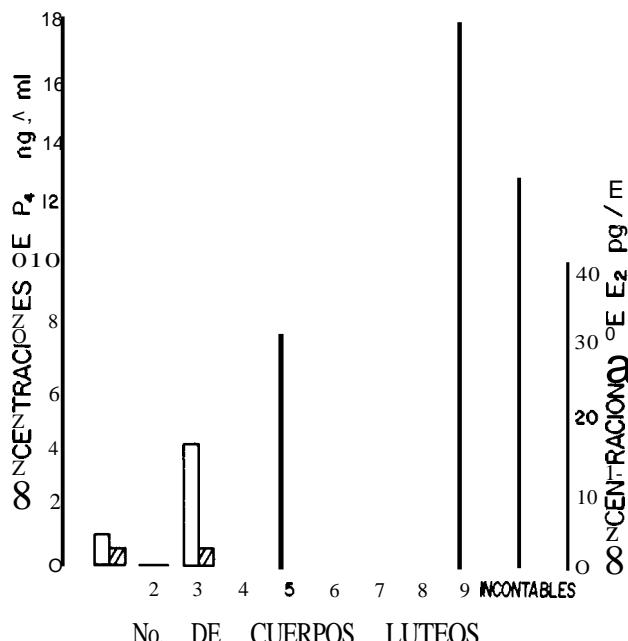


Figura 4. Concentraciones plasmáticas de progesterona y estradiol en vacas durante la fase lútea. Se observa una asociación entre el número de cuerpos lúteos y la concentración de progesterona, en tanto que la concentración de estradiol no se modifica. Cada barra representa un solo animal.

RIA fue de 96.5 y 92.4% para P_4 y de 94.6 y 97.8% para E_2 .

Validación del ensayo

Cabras. Las determinaciones en esta especie se realizaron en el último tercio de la gestación. Las concentraciones de P_4 en el grupo de cabras analizado tendieron a ser menores en el periodo periparto ($5.4 \pm 2.4 \text{ ng/ml}$), que en la etapa anterior del último tercio de la gestación ($8.3 \pm 3.7 \text{ ng/ml}$). La concentración circulante de $\text{E}_{2\text{en}}$ el periodo peripartofue de $55.1 \pm 24.6 \text{ pg/ml}$. Los resultados se resumen en el Cuadro 2.

Vacas. Como se resume en el Cuadro 2, los niveles de P_4 durante el estro fueron menores ($0.9 \pm 0.08, P < 0.05$) a los detectados en el resto de los estadios analizados; los E_2 oscilaron entre 2.1 y 27 pg/ml . En contraste (Figura 4), en la fase lútea se observó un incremento de P_4 , proporcional al número de cuerpos lúteos, que alcanzó valores de hasta 18 ng/ml en presencia de 9 cuerpos lúteos. Las concentraciones de E_2 no mostraron asociación con el número de cuerpos lúteos, manteniéndose bajas en esta etapa (2.1 a 5.2 pg/ml). El análisis de los niveles de las hormonas durante la gestación abarcó los nueve meses. La p. aumenta conforme avanza la gestación hasta el octavo mes, de donde desciende significativamente (Figura 5). En la misma figura se observa que las concentraciones de E_2 muestran un comportamiento parabólico, con niveles mínimos (10 pg/ml) en el segundo tercio de la gestación.

Ovejas. Los niveles circulantes de P_4 y E_2 de ovejas en estro oscilaron de 0.2 a 1.5 ng/ml y de 9.7 a 23.0 pg/ml respectivamente. Los sueros de ovejas en fase lútea mos-

Cuadro 2
NIVELES PLASMATICOS DE P_4 Y E_2 (media \pm d.e.) DETERMINADOS EN OVEJAS, VACAS Y CABRAS EN DIFERENTES ESTADIOS FUNCIONALES DEL CICLO REPRODUCTIVO

Especie	(n)	Estadio funcional	P_4 (ng/ml)	E_2 (pg/ml)
Oveja	(3)	Estro	1.3 ± 1.3^a	17.9 ± 14.3^a
	(2)	Fase lútea	3.3 ± 2.6^b	0.8 ± 0.16^b
	(2)	Gestación	5.8 ± 2.3^b	27.5 ± 5.4^b
Vaca	(9)	Estro	0.9 ± 0.24^a (0.5 a 1.3)	10.6 ± 7.2^a (2.1 a 27)
	(5)	Fase lútea	8.6 ± 5.5^b (1.0 a 17)	3.3 ± 1.4^b (2.1 a 5.2)
	(24)	Gestación	6.4 ± 2.9^b (1.5 a 13.1)	17.3 ± 7.8^c (0.2 a 35.3)
Cabra	(87)	Gestación 3 ^{er} tercio	8.3 ± 3.7 (1.3 a 17.0)	
	(10)	Gestación 5 días preparto	5.4 ± 2.4 (3.0 a 14)	55.1 ± 24.6 (20 a 128)

Letras distintas en supraíndice indican diferencias a $P < 0.05$. Las comparaciones sólo se hacen en ovejas y vacas dentro de hormona y especie

Cuadro 3
CONCENTRACION SANGUINEA DE PROGESTERONA
EN VARIAS ESPECIES

Técnica	Concentración de P ₄ (ng/ml)	Estro	Gestación	Referencia
	FL			
Oveja				
CGL	2.05 ± 0.65	0.23 ± 0.24		(29)
CBPA	1.7	0.12		(33)
CBPA	2.01	< 0.2		(2)
RIA	2.0	< 0.2		(3) 1
RIA	3.0	< 0.2		2
RIA	IA	< 0.2		(20)
RIA	1.6 ± 0.66	0.3		(25)
RIA			~40	(9)
Vaca				
CGL	6.6 ± 1.21	0.38 ± 0.07	4.7 a 6.1	(29)
CBPA	6.8	004	5.9	(8)
RIA	4.0	< 0.5	6.0 a 8.0	(24)
RIA	2.8 ± 004	0.1	> 4.0	(21)
RIA	4.6	< 1.0		(17) 3
	3.7	< 1.0		4
RIA	4.7 ± 2.11	< 1.0		(29)
CGL	~ 4.5	< 1.0		(28)
CBPA	8.2 ± 2.2	1.5 ± 0.8	10 a 15	(11)
RIA	6.0	1.9		(19)
Cabra				
CBPA			5.7 a 6.6	(16)
CBPA	2.5 a 3.5	0.2	4.5 a 5.5	(34)
RIA			4.0	(35) 5
Cerda				
CGL	27.0 ± 3.1	0.52 ± 0.05		(29)
Yegua				
RIA			10A ± 9.7	(1)
Rata				
RIA	4.5 ± 1.0	3.0 ± 0.5		(7)
DDIS			48 a 79	(36)
Cobayo				
RIA	2.7 ± 0.2	0.2 ± 0.2		(10)
Mono Rhesus				
CBPA	4 a 10	no detectable		(14)
CBPA	~4.0	no detectable		(23)
Mono Macaco			1.5 a 6.0	(12)
Babuino				
CBPA	5.0			(30)
Mujer				
CBPA	< 20.0		20 a 280	(22) 6

CGL, cromatografía gas-líquido; CBPA, ensayo de unión por competencia a proteínas; RIA, radioinmunoensayo; DDrS, doble dilución isotópica

¹Raza Ile-de-France

²Raza Romanov

³Estación de verano

⁴Estación de invierno

⁵Sangre de vena uterina

⁶P, +170H.P.

traron valores de P₄ casi tres veces mayores (P < 0.05) que los de animales en estro y de E₂ por debajo de la parte lineal de la curva (<2.0 pg). Los sueros de ovejas

gestantes presentaron las concentraciones de ambas hormonas incrementadas. En el Cuadro 2 se presentan en detalle las concentraciones de las hormonas en cada gmpo de animales.

Discusión

Estos resultados muestran la obtención de anticuerpos específicos contra P₄ y E₂, así como el desarrollo, estandarización y validación de dos sistemas de RIA para uno y otro esteroide. La reactividad cruzada de estos antisueños con otros esteroides potencialmente inmunorreactivos fue menor al 5%. Ello implica que se requieren intervalos de concentración 20 a 50 veces más elevados que la concentración del ligando específico para desplazarlo; los valores circulantes de estos esteroides son alrededor de cinco veces menores que los de los ligandos específicos.⁷ La sensibilidad de ambos RIAs es suficiente para cuantificar, en 100 y 500 µl de suero, concentraciones circulantes de P₄ y E₂ que abarcan el intervalo de 0.5 a 40 ng/ml para la primera y de 5 a 320 pg/ml en el segundo. La especificidad y sensibilidad de ambos RIAs, así como los parámetros de control de calidad, son semejantes^{6,11} o inclusive superiores¹⁰ a los informados por otros autores y satisfacen los criterios requeridos para este tipo de ensayos.¹

Las concentraciones de P₄ y E₂ obtenidas en el suero de cabras, vacas y ovejas, muestran que con el empleo de los sistemas de RIA aquí descritos, es posible cuantificar y distinguir las fluctuaciones fisiológicas que exhiben ambas hormonas durante diferentes estadios reproductivos de estas especies.

La información acerca de los valores de E₂ y P₄ en la cabra, es sensiblemente menor que la existente en las otras dos especies. Aun así, las concentraciones de P₄ aquí determinadas durante el último tercio de la gestación se encuentran dentro del intervalo descrito por otros autores.¹¹^{34,35} Por otra parte, los niveles de E₂ determinados en esta misma etapa, se asemejan a los descritos por Dhindsa *et al.*,⁵ aunque Umo *et al.*³⁵ comunicaron concentraciones mucho mayores de E₂. Lo anterior se puede explicar debido a que estos últimos realizaron las determinaciones en sangre de la vena uterina. Lo anterior se puede observar en los Cuadros 3 y 4.

Las concentraciones de P₄ determinadas en este estudio durante los principales estadios reproductivos de la vaca se asemejan a las comunicadas por otros autores (Cuadro 3).^{8,11,19,24,28,29,31} Además, los niveles circulantes que se determinaron se correlacionaron con el número de cuerpos lúteos detectados por palpación rectal; esta observación coincide con trabajos previos realizados en la oveja.⁶ Al igual, las concentraciones de E₂ encontradas en el estro y la fase lútea caen en el intervalo descrito por otros autores.^{6,11,18,27} En cuanto al estadio de gestación, las concentraciones de E₂ difieren de las comunicadas por otros autores (Cuadro 4). Sin embargo, ello puede deberse a la etapa en la que se realizaron las determinaciones, dado que en este estudio se realizaron los muestreos a intervalos de un mes, desde el primero hasta el noveno de gestación, mien-

NIVELES DE P_4 Y E_2 VACAS GESTANTES

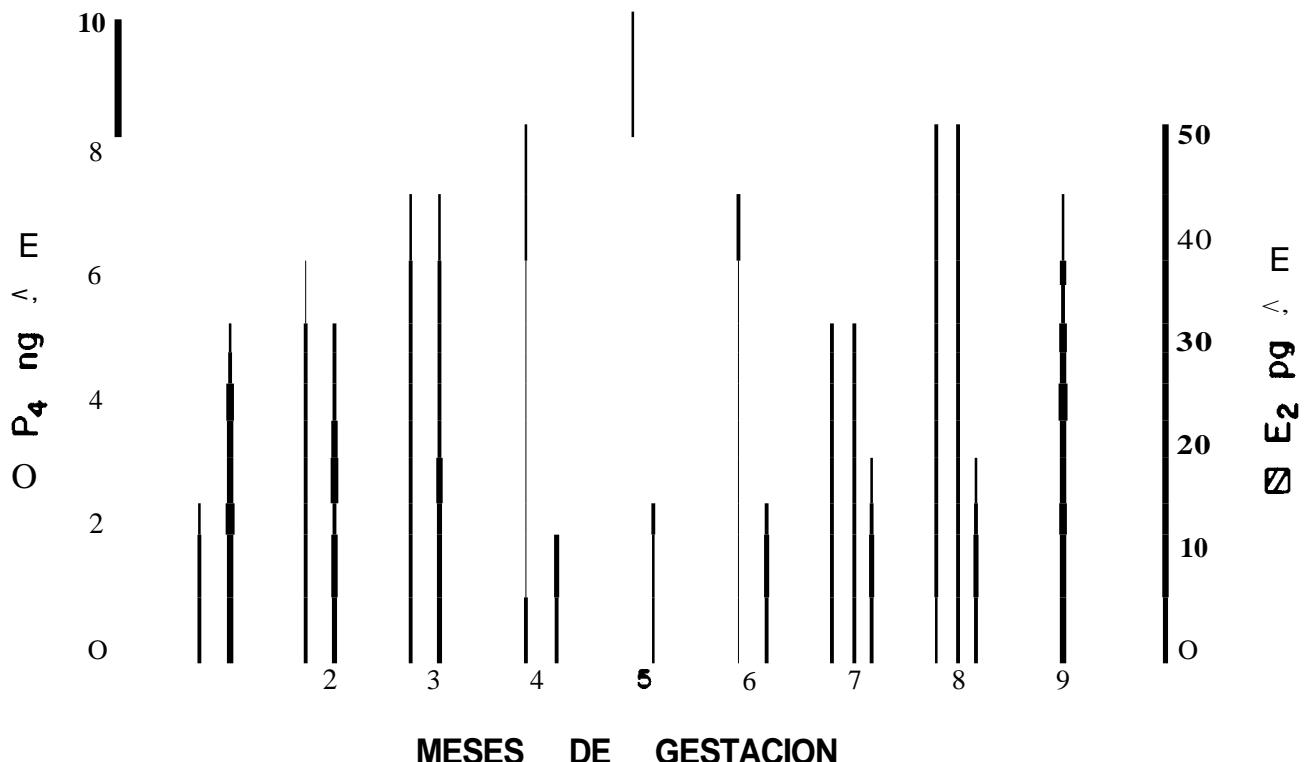


Figura 5. Niveles plasmáticos de progesterona y estradiol en vacas durante la gestación. El perfil de estrógenos y progesterona tiende a presentar un comportamiento inversamente proporcional. Cada barra representa la media \pm error estándar ($n = 3$).

tras que en los trabajos referidos, la hormona se determinó en los últimos cinco días de gestación, cuando se produce un abrupto incremento de E_2 . Otra posible fuente de variación son las características del Ac- E_2 utilizado en uno de los trabajos,²⁹ ya que tiene una reacción cruzada del 92% con estrona y 52% con estriol, lo que pudo influir en los niveles detectados.

Las concentraciones de P_4 en la oveja aquí determinadas durante el estro y la fase lútea, se encuentran dentro del intervalo comunicado por algunos autores,^{28,29} aunque son ligeramente mayores que las informadas en otros trabajos,²⁹ incluyendo uno de este mismo laboratorio.²⁹ Tal variación ya se discutió antes;²⁹ es muy probable que su principal fuente sea la cantidad de masa lútea en cada animal, a su vez asociada al número de cuerpos lúteos y la raza principalmente. La concentración de P_4 durante la gestación ha sido menos comunicada y está sujeta, además, a la variación en la producción que puede tener la placenta en cada individuo, y lo avanzado de la gestación. Luego, no debe extrañar la enorme diferencia entre los valores aquí encontrados en el primer tercio de la gestación, donde es pobre la participación de la placenta, y los informados en suero de ovejas en los últimos días de gestación.⁹ Los valores de E_2 son también escasos en la literatura, posiblemente por la sensibilidad requerida en los ensayos para poder

detenerlos en estas especies. Los valores encontrados sólo se presentan y no se comparan con ningún otro: es necesario obtener una caracterización de los niveles de E_2 durante diferentes estados reproductivos de la oveja.

En resumen, se obtuvieron anticuerpos específicos contra P_4 y E_2 . Se cuenta con los RIAs correspondientes y éstos permiten cuantificar y discernir las concentraciones sanguíneas de dichas hormonas en rumiantes domésticos.

Abstract

Male rabbits were weekly immunized six times with 100 µg of progesterone-CMO-BSA or with 160 µg of estradiol-17B in order to obtain specific antibodies against progesterone (P_4) and estradiol-17B (E_2) as well as the standardization of radioimmunoassays (RIAs). Titration was made weekly and the best titrer was chosen for cross reaction with other steroids. Results of the cross reaction for antisera against P_4 were: 4.4 and 4.4% for pregnenolone; 4.0 and 13.3% for epipregnenolone and < 1.0% for alopregnenolone, testosterone, E_2 and cortisol for AcQKP5 and AcQKP6, respectively. Results of cross reaction of antisera against E_2 were: 3.6% for estrone and < 0.01% for estriol, androsten-

Cuadro 4
CONCENTRACION SANGUINEA DE ESTRADIOL EN VARIAS
ESPECIES

Técnica	FL	Concentración de E_z (pg/ml)	Referencia
		Estro	Gestación
Vaca			
RIA	6.0 ± 4.0	25.0 ± 12.0	1,200 a 2600 (11)
CBPA	8.1 ± 3.6	17.0	(27)
RIA			900 a 1,700 (32) 1
			1a2 2
RIA	5a6	12 a 14	800 a 1,000 (6) 3
	6.4 ± 3.6	13.5 ± 2.9	(18)
Cabra			
RIA			165 a 260 (35) 4
RIA			32 (5)
Yegua			
RIA	10	50	(1)
Cerda			
RIA			2,000 a 6,000 (13) 5
Mono Rhesus			
RIA	50 a 70	340 ± 130	(15)
Mono Macaco			
		200 a 350	(12)
Cobayo			
RIA	15.5 ± 5.0	40 ± 8	(10)

RIA, radioinmunoensayo; CBPA, ensayo por competencia de unión a proteínas

1 5 días prepardo

2 2 días posparto

3 5 días prepardo

4 Sangre de vena uterina

5 Periodo prepardo

dione, estradiol-17a, P4 and testosterone. Assay sensitivity were 6.25 pg OfP4 or 0.5 pg of E_z . Intra-and inter-assay coefficients of variation were: 10.9% and 12.8% for P4, and 5.0% and 10.0% for E_z respectively. RIAs validation was achieved by determining P4 and E_z plasma concentration in goats and cows during different reproductive stages. Results obtained for P4 in goats were 8.3 ± 0.4 ng/ml during the last third of gestation. During labour period, P4 concentrations decreased to 5.4 ± 0.8 ng/ml. E values in labor period were 55.1 ± 8.1 pg/ml. Values obtained in cows for P4 and E, were: 0.9 ± 0.08 ng/ml and 10.6 ± 2.4 pg/ml during estrous; 8.6 ± 2.7 ng/ml and 3.3 ± 0.6 pg/ml during luteal phase; and 6.4 ± 0.6 ng/ml and 17.3 ± 1.6 pg/ml during gestation, respectively. These results show that RIAs sensitivity with the obtained antibodies is suitable for detecting typical values of P4 and E, in domestic ruminants during different reproductive stages.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los Doctores Carlos Aramburo y Carlos Valverde la hospitalidad y las valiosas sugerencias brindadas durante la realización de este trabajo. Este trabajo fue apoyado parcialmente por el proyecto CONACYT P219 CCOL 880224.

Literatura citada

- Baucus, K.L., Squires, E.L., Ralston, S.L., McKinnon, A.O. and Nett, T.M.: Effect of transportation on the estrous cycle and concentrations of hormones in mares. *J Anim. Sci.*, 68: 419-426 (1990).
- Bjersing, L., Hay, M.F., Kann, G., Moor, R.M., Naftolin, F., Searamizzi, R.J., Short, R.V. and Younglai, E.V.: Changes in gonadotrophins, ovarian steroids and follicular morphology in sheep at oestrus. *J Endocrinol.*, 52: 465-479 (1972).
- Cahill, L.P., Saumande, J., Ravault, J.P., Blanc, M., Thimonier, J., Mariana, J.C. and Mauleon, P.: Hormonal and follicular relationships in ewes of high and low ovulation rates. *J Reprod. Fertil.*, 62: 141-150 (1981).
- Chard, T.: Introduction to radioimmunoassay and related techniques in laboratory. In: Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Edited by: Work, T.S., Work, E., 291-534. North Holland, Amsterdam, Holland, 1978.
- Dhindosa, D.S., Metcalfe, J. and Resko, J.A.: Oestrogen concentration in systemic plasma of pregnant pygmy goats. *J Reprod. Fertil.*, 62: 99-103 (1981).
- Dobson, H. and Dean, P.D.G.: Radioimmunoassay of estrone, estradiol-17a and -17B in bovine plasma during the oestrus cycle and last stages of pregnancy. *J Endocrinol.*, 61: 479-486 (1974).
- Döhler, K.D. and Wuttke, W.: Serum LH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats. *Endocrinology*, 94: 1003-1007 (1974).
- Donaldson, L.E., Bassett, S.M. and Thorburn, G.D.: Peripheral plasma progesterone concentration of cows during puberty oestrus cycles, pregnancy and lactation and the effects of nutrition or exogenous oxytocin on progesterone concentration. *J. Endocrinol.*, 48: 599-614 (1970).
- Flint, A.P.F., Anderson, B.M.A., Patten, P.T. and Turnbull, A.C.: Control of utero-ovarian venous prostaglandin F during labour in the sheep: Acute effects of vaginal and cervical stimulation. *J Endocrinol.*, 63: f17-87 (1974).
- Garris, D.R. and Foreman, D.: Follicular growth and atresia during the last half of the luteal phase of the Guinea Pig estrous cycle: Relation to serum progesterone and estradiol levels and utero-ovarian blood flow. *Endocrinology*, 115: 73-77 (1984).
- Henriksen, O.M., Dickey, J.F., Hill, J.R. and Johnston, W.E.: Plasma estrogen and progesterone levels after mating, and during late pregnancy and postpartum in cows. *Endocrinology*, 90: 1336-1342 (1972).
- Holzgen, G.D., Stouffer, R.L., Barber, D.L. and Nixon, W.E.: Serum estradiol and progesterone during pregnancy and the status of the corpus luteum at delivery in Cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Steroids*, 30: 295-301 (1977).
- Holness, D.H. and Hunter, R.H.F.: Post-parturient oestrus in the sow in relation to the concentration of plasma oestrogens. *J Reprod. Nutr.*, 45: 15-20 (1975).
- Hopper, B. and Tullner, W.: Urinary estrone and plasma progeserone levels during the menstrual cycle of the Rhesus monkey. *Endocrinology*, 86: 1225-1230 (1970).
- Ilotehkiss, J., Atkinson, L.E. and Knobil, E.: Time course of serum estrogen and luteinizing hormone (LH) concentrations during the menstrual cycle of the Rhesus monkey. *Endocrinology*, 89: 177-183 (1971).
- Iri, Irving, C., Jones, D. and Knifton, A.: Progesterone concentration in the peripheral plasma of pregnant goats. *J Endocrinol.*, 53: 447-452 (1972).
- Johnson, H.D.: Heat stress on fertility and plasma progesterone. Réproduction des Ruminants en Zone Tropicale. Réunion Internationale, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe (French West Indies). 1983, 119-131. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France (1984).
- Kanehev, L.M., Dobson, H., Warcl, W.R. and Fitzpatrick, R.J.: Concentrations of steroids in bovine peripheral plasma during the oestrus cycle and the effect of betamethasone treatment. *J Reprod. Nutr.*, 48: 341-345 (1976).
- Kunst, R.J. and Allrich, R.D.: Influence of nutrition on serum concentration of progesterone, luteinizing hormone and estrous behavior in dairy heifers. *J. Anim. Sci.*, 66: 90-97 (1988).

20. McKay, S.A., Jenkin, G. and Thorburn, G.D.: Peripheral plasma concentrations of pregnenolone sulphate, pregnenolone, progesterone and 20a-hydroxy-4-pregnen-3-one in ewes throughout the oestrus cycle. *J Endocr.*, 113: 231-237 (1987).
21. Martínez, N.D., Lopez, S.R. and Combellás, J.: Effect of post-partum nutrition on blood level of progesterone in dairy cows. *Réproduction des Ruminants en Zone Tropicale*. Réunion Internationale. Pointe-à-Pitre, Guadeloupe (French West Indies). 1983. 367-377. *Institut National de la Recherche Agronomique*. Paris, France (1984).
22. Murphy, B.E.P.: Some studies of the protein-binding of steroids and their application to the routine micro and ultramicro measurement of various steroids in body fluids by competitive protein binding radioassay. *J Cun Endocr.*, 27: 973-990 (1967).
23. Neill, J. Dr. Johansson, E.D.B. and Knobil, E.: Patterns of circulating progesterone concentrations during the fertile menstrual cycle and the remainder of gestation in the Rhesus monkey. *Endocrinology*, 84: 45-48 (1969).
24. Prakash, B.S., Meyer, H.H.D., Schallenberger, E. and Wiel van de, D.F.M.: Development of a sensitive enzymeimmunoassay (ErA) for progesterone determination in unextracted bovine plasma using the second antibody technique. *J Steroid Biochem.*, 28: 623-627 (1987).
25. Rornero-R, C.M., Damián, M.P. y Morato, C.T.: Perfil estral de progesterona en ovejas. *Vet SU*, 20: 27-32 (1989).
26. Rotti, K., Stevens, J., Watson, D. and Longcope, C.: Estriol concentrations in plasma of normal, non-pregnant women. *Steroids*, 25: 807-816 (1975).
27. Shemesh, M., Ayalon, N. and Lindner, H.R.: Oestradiol levels in the peripheral blood of cows during the oestrus cycle. *J Endocr.*, 55: 73-78 (1972).
28. Snook, R.B., Seatman, R.R. and Hansel, W.: Serum progesterone and luteinizing hormone levels during the bovine estrous cycle. *Endocrinology*, 88: 678-686 (1971).
29. Stabenfeldt, G.H., Ewing, L.L., Patton, J.P. and McDonald, L.E.: Gas-liquid chromatography for estimation of peripheral plasma progesterone in domestic animals. *J Endocr.*, 44: 23-38 (1969).
30. Stevens, V.C., Sparks, S.J. and Powell, J.E.: Levels of estrogens, progestogens and luteinizing hormone during the menstrual cycle of the baboon. *Endocrinology*, 87: 658-666 (1970).
31. Stevenson, J.S. and Britt, J.H.: Relationships among luteinizing hormone, estradiol, progesterone, glucocorticoids, milk yield, body weight and postpartur ovarian activity in Holstein cows. *J Anim. Sci.*, 48: 570-577 (1979).
32. Symons, A.M.: Levels of oestrogen and progesterone in the plasma of the cow during the last month of pregnancy. *J Endocr.*, 56: 327-328 (1973).
33. Thorburn, D.G., Basset, M.J. and Smith, D.L.: Progesterone concentrations in the peripheral plasma of sheep during the oestrus cycle. *J Endocr.*, 45: 459-469 (1969).
34. Thorburn, D.G. and Schneider, W.: The progesterone concentration in the plasma of the goat during the oestrus cycle and pregnancy. *J Endocr.*, 52: 23-36 (1972).
35. Umo, I., Fitzpatrick, R.J. and Ward, W.R.: Parturition in the goat: Plasma concentrations of prostaglandin F and steroid hormones and uterine activity during late pregnancy and parturition. *J Endocr.*, 68: 383-389 (1976).
36. Wiest, W.G., Kidwell, W.R. and Balogh, K.: Progesterone catabolism in the rat ovary: A regulatory mechanism for pregestational potency during pregnancy. *Endocrinology*, 82: 844-859 (1968).
37. Winer, B.J.: *Statistical Principles in Experimental Design*. McGraw-Hill. New York, 1971.