

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Fisiología



TESIS DOCTORAL

**Determinación radioinmunoanalítica de estrógenos libres y
conjugados en el plasma sanguíneo periférico de la vaca y su
relación con el desarrollo folicular**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

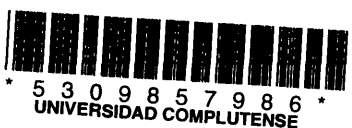
Antonio López Sebastián

Madrid, 2015

Antonio López Sebastián

TP
1982

071



8 08-03457-0

DETERMINACION RADIOINMUNOANALITICA DE ESTROGENOS LIBRES
Y CONJUGADOS EN EL PLASMA SANGUINEO PERIFERICO DE LA VACA
Y SU RELACION CON EL DESARROLLO FOLICULAR

Departamento de Fisiología
Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense de Madrid
1982



BIBLIOTECA

© Antonio López Sebastian
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografia
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1981
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-6248-1982

"DETERMINACION RADIOINMUNOANALITICA DE ESTROGENOS LIBRES Y CONJUGADOS EN EL PLASMA SANGUINEO PERIFERICO DE LA VACA, Y SU RELACION CON EL DESARROLLO FOLICULAR"

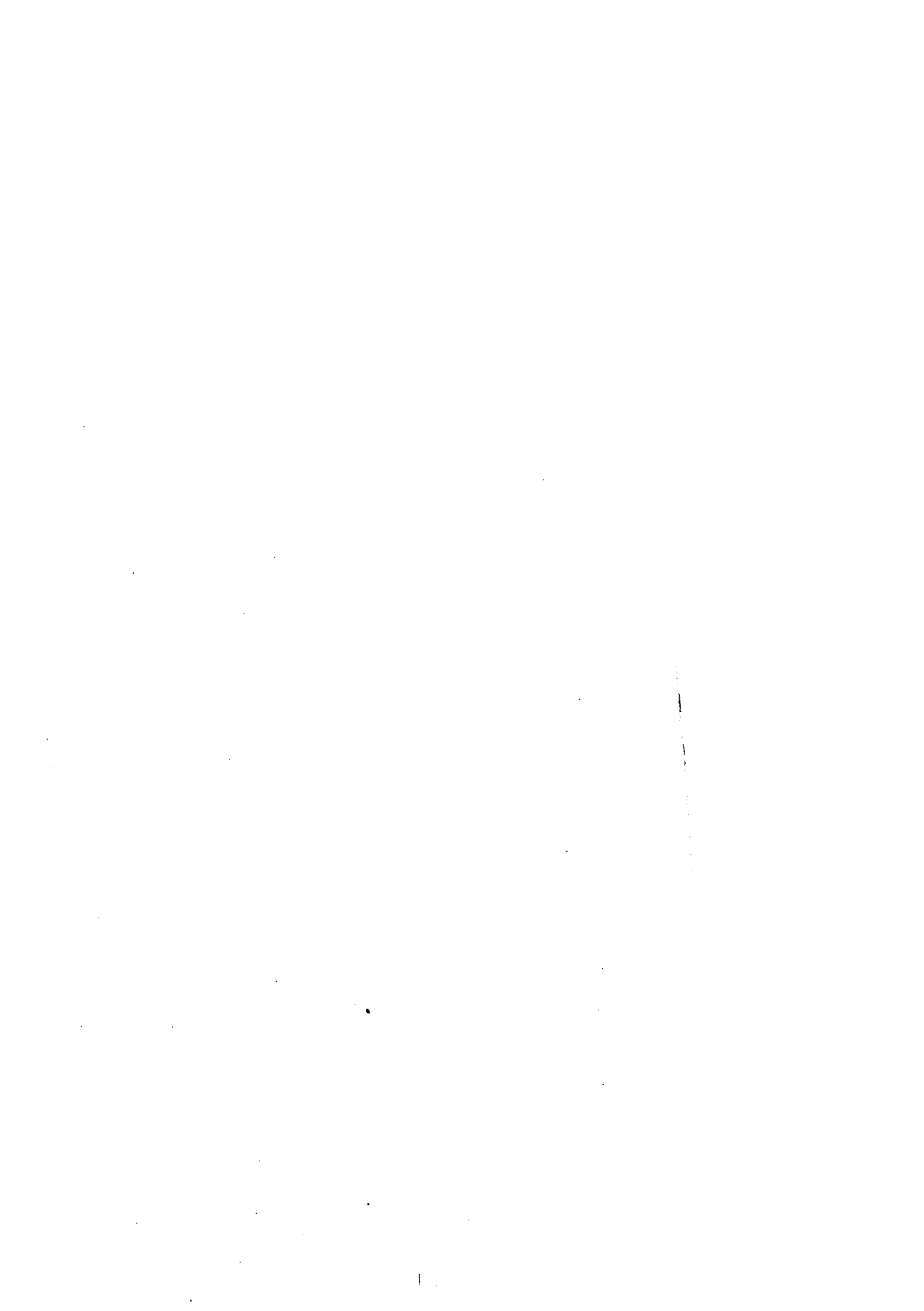
Director:

Prof. Dr. D. Tomás Pérez García

Memoria presentada para aspirar al Grado de
Doctor en Veterinaria por el Licenciado D.
Antonio Lopez Sebastián

Madrid, Febrero de 1.981

A mis padres.



Deseo expresar mi más profundo agradecimiento:

Al Prof. Dr. D. Tomás Pérez García, que me permitió iniciarme como investigador en el campo de la endocrinología de la reproducción, y cuyas enseñanzas y amistad han permitido superar tantas dificultades.

Al Dr. J. Saumande, encargado de investigación del I.N.R.A. cuyo rigor científico y dirección hicieron posible este trabajo.

Al Dr. P. Mauleon, Director de la "Station Physiologie de la Reproduction" quien puso a mi disposición el material científico necesario y cuya ayuda moral y administrativa contribuyó a la continuación de nuestra labor investigadora.

Al Prof. Dr. D. Mariano Illera, con quien di mis primeros pasos en Fisiología.

Al Prof. Dr. D. Albino García Sacristan, por su gran ayuda en la elaboración de esta memoria.

A Coral, tan eficaz como fiel colaboradora.

A Ma. Carmen Garcia Yanes por la preparación de este manuscrito y a todos los compañeros del Departamento de Reproducción Animal por su desinteresada e inestimable ayuda en la preparación de este trabajo.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

E_1 : Estrona

$E_{2\beta}$: 17β - estradiol

$E_{2\alpha}$: 17α - estradiol

E_3 : Estriol

E_1S : Sulfato de estrona

TE_1 : Estrona total: Libre + conjugada después de hidrólisis

$TE_{2\beta}$: 17β - estradiol total: Libre + conjugado después de hidrólisis

$TE_{2\alpha}$: 17α - estradiol total: Libre + conjugado después de hidrólisis

BSA : Albúmina sérica bovina

HSA : Albúmina sérica humana

DPN : Difosfopiridin nucleótido

HSD : Dehidrogenasa hidroxí esteroide

PMSC: Gonadotropina sérica de yegua gestante

HCG : Gonadotropina coriónica humana

FSH : Hormona folículo estimulante

LH : Hormona luteinizante

PG : Prostaglandina

γG : γ -globulina

cpm : cuentas por minuto

dpm : desintegraciones por minuto

I N D I C E

	<u>Pág.</u>
1.- INTRODUCCION	1
2.- REVISION BIBLIOGRAFICA	5
2.1.- Breve descripción de los estrógenos	6
2.1.1.- Definición y papel fisiológico	6
2.1.2.- Estructura química y nomenclatura	7
2.1.3.- Estrógenos en el ganado bovino	8
2.2.- Métodos clásicos de determinación de estrógenos	11
2.2.1.- Métodos biológicos	11
2.2.2.- Métodos fluorimétricos	12
2.2.3.- Métodos colorimétricos	13
2.2.4.- Cromatografía de gases	13
2.2.5.- Unión competitiva con una proteína (CPB)	14
2.3.- Radioinmunoanálisis de hormonas esteroides	15
2.3.1.- Principios de Radioinmunología	15
2.3.2.- Obtención de anticuerpos antiestrógenos	17
2.3.3.- Características de los antisueros antiesteroides ...	19
2.3.4.- Metodología del análisis radioinmunológico	22
2.3.5.- Criterios de validez para radioinmunoanálisis	29
2.4.- Niveles de estrógenos en la vaca	33
2.4.1.- Niveles de estrógenos en el ciclo sexual	33
2.4.2.- Niveles de estrógenos en la superovulación	40
3.- MATERIAL Y METODOS	45
3.1.- Material	46
3.2.- Métodos	52
3.2.1.- Preparación de anticuerpos antiestrógenos	52
3.2.2.- Puesta a punto de la técnica de determinación de TE_1 $TE_2\beta$, TE_2d	55

	<u>Pág.</u>
3.2.3.- Niveles de estrógenos en la vaca	60
4.- RESULTADOS	63
4.1.- Obtención de anticuerpos antiestrógenos	64
4.1.1.- Título	64
4.1.2.- Especificidad	64
4.2.- Puesta a punto de la técnica de determinación de TE_1 , TE_2^β , TE_2^α	66
4.2.1.- Realización del análisis	66
4.2.2.- Recuperación	76
4.2.3.- Valores blancos	80
4.2.4.- Sensibilidad	84
4.2.5.- Especificidad	84
4.2.6.- Exactitud y precisión	87
4.3.- Niveles de estrógenos en la vaca	87
4.3.1.- En el ciclo sexual	87
4.3.2.- En la superovulación	93
5.- DISCUSION	103
5.1.- Obtención de anticuerpos antiestrógenos	104
5.2.- Puesta a punto de la técnica de determinación de TE_1 , TE_2^β TE_2^α	106
5.3.- Niveles de estrógenos en la vaca	113
6.- CONCLUSIONES	121
7.- RESUMEN	124
8.- BIBLIOGRAFIA	131

1. INTRODUCCION

INTRODUCCION:

Las variaciones de la concentración de estrógenos en la sangre venosa ovárica, periférica y en la orina, han sido relacionadas desde hace tiempo con la actividad folicular del ovario. En la especie bovina, el estudio de la evolución de las concentraciones de 17β - estradiol en la sangre periférica han permitido demostrar que este parámetro podía ser un excelente reflejo cualitativo y cuantitativo del crecimiento folicular, tanto en el ciclo sexual, como después de un tratamiento de estimulación, en el animal impúber ó en el adulto. Sin embargo este estudio presenta dos dificultades que limitan su utilización:

1. Las concentraciones de 17β - estradiol son muy débiles, normalmente inferiores a 30 pg/ml, y se hace necesario el uso de técnicas de gran sensibilidad.
2. Existen variaciones rápidas de los niveles hormonales, lo que obliga a tomas frecuentes de sangre, generalmente cada 2 horas.

Para resolver el problema de las concentraciones débiles se podría considerar el uso de la vena ovárica para las tomas de sangre, pero por el momento es difícil mantener un catéter durante más de algunas horas. Las determinaciones también se podrían realizar en la orina, lo que resolvería al mismo tiempo el problema de las variaciones rápidas, pero la toma de muestras de orina es difícil y desde el punto de vista fisiológico, no es satisfactorio por las siguientes razones:

1. Existe un tiempo de latencia importante (varias horas) entre los acontecimientos a nivel plasmático y a nivel urinario.
2. Los estrógenos no son excretados en su totalidad por la orina, y la relación entre la excreción orino-fecal no es constante entre animales e incluso para un mismo animal; ésto limita las posibilidades del estudio cuantitativo y las comparaciones entre animales.

Por tanto las tomas de sangre periférica parecen las más interesantes tanto por razones técnicas como por razones de tipo fisiológico.

En la sangre periférica de la mujer las concentraciones de sulfato de estrona son respectivamente 2 y 6 veces superiores a las de 17β -estradiol y estrona no conjugados y sus variaciones relativas en el curso del ciclo son más importantes: El sulfato de estrona tiene un pico 11 veces superior al nivel de base mientras que para el 17β -estradiol libre, esta relación es de 6 veces.

Se sabe además que la vida media de los esteroides sulfatados es mucho más larga que la de los esteroides no conjugados (5 a 9 horas, frente a menos de 20 minutos respectivamente).

La medida de estrógenos conjugados podría ser por tanto la solución, no sólo de los problemas cuantitativos sino también de las variaciones rápidas.

Resultados preliminares en la vaca con un anticuerpo no específico, dirigido frente a estrona principalmente, han demostrado la presencia de cantidades importantes de estrógenos conjugados, pero no de variaciones concretas. Puede ser que el estrógeno determinado haya sido mal elegido, o bien que las vías de metabolismo no sean obligatoriamente las mismas en la vaca que en la mujer.

Por ello nosotros hemos realizado un estudio de las variaciones en la sangre periférica de la vaca de las concentraciones de estrona, 17β -estradiol y 17α -estradiol totales (libres y conjugados previa hidrólisis). Estas determinaciones se han realizado en diferentes situaciones (ciclo sexual normal y superovulación) para saber si uno ó más de entre estos esteroides pudiera ser un mejor indicador del crecimiento folicular que el 17β -estradiol libre, y de esta manera encontrar una alternativa a las dificultades técnicas del análisis de esta hormona.

No existía ninguna técnica para realizar la determinación de estas tres hormonas en una misma muestra de plasma, lo que nos obligó en primer lugar, a la puesta a punto de una técnica radioinmunológica que nos permitiera un método de análisis adecuado. Dentro de esta puesta a punto, incluimos la preparación de antisueros antiestrógenos, teniendo en cuenta que la validez y eficacia del radioinmunoanálisis está en función directa de la calidad de los anticuerpos utilizados.

La parte experimental de esta tesis, salvo la preparación de anticuerpos, ha sido realizada en la unidad de hormonas esteroides de la "Station Physiologie de la Reproduction" del I.N.R.A. (Institute National de la Recherche Agronomique. Nouzilly. Francia), gracias a una beca del "Ministère des Affaires Etrangères" en el período comprendido desde Octubre 1975 a Abril 1977.

La preparación de anticuerpos ha sido realizada en el Departamento de Reproducción Animal del INIA. CRIDA 06.

5

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS ESTROGENOS

2.1.1. Definición y papel fisiológico

Desde un punto de vista biológico JONES (1954) define los estrógenos como aquellas sustancias que independientemente de su composición química y de su origen son capaces de inducir síntomas de celo, en particular la cornificación del epitelio vaginal de la rata y la ratona castradas. El estradiol y la estrona son los principales estrógenos naturales segregados por el ovario, siendo también segregados por las células intersticiales del testículo y la corteza adrenal.

En la vida prenatal actúan sobre el hipotálamo en el sentido de sexualización femenina. HELLER y JONES (1964), demuestran que los estrógenos son necesarios para un buen desarrollo del ovario fetal.

En la vida post-natal, aseguran el desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales primarios y secundarios, regulando el comportamiento sexual de la hembra.

En el organismo adulto actúan principalmente a nivel del área genital y mamaria, siendo su acción típica sobre la mucosa vaginal donde provocan queratinización de las capas superficiales.

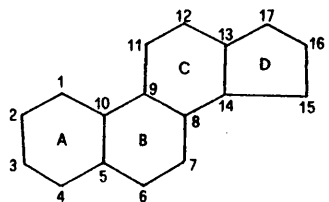
El mayor poder estrogénico corresponde al estradiol, siendo menos activos la estrona y el estriol.

Los estrógenos como la mayoría de las hormonas, regulan su actuación endocrina, según un efecto "feed-back", efecto rebote o de retroacción, - es decir acción de vuelta de un efecto dado sobre la causa que lo produce. Este es un sistema de coordinación, según el cual un mecanismo de estimulación, está controlado por el órgano que él estimula.

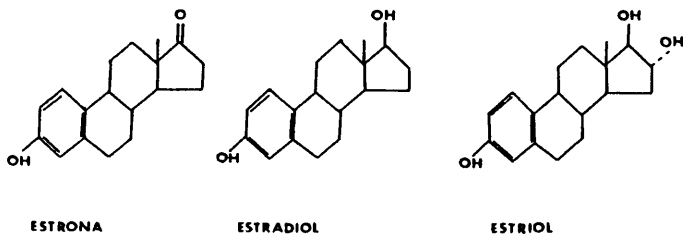
2.1.2. Estructura química y nomenclatura

Los estrógenos naturales corresponden al grupo de hormonas sexuales esteroideas, cuya estructura química deriva del núcleo esterano o ciclopentano perhidrofenantreno.

Poseen 18 átomos de carbono y dos o más átomos de oxígeno por molécula, llevando en el núcleo A, aromático, un grupo hidroxil en el carbono 3, que los diferencia de los otros esteroides sexuales.



CICLOPENTANOPERHIDROFENANTRENO



Según la nomenclatura establecida por la "International Union of Pure and Applied Chemistry" estas hormonas y sus abreviaturas se designan como sigue:

17β - estradiol = E_2^β : [$\Delta^1, 3, 5, (10)$ estratrieno-3, 17β - diol]
 17α - estradiol = E_2^α : [$\Delta^1, 3, 5, (10)$ estratrieno-3, 17α - diol]
Estrona = E_1 : [3-hidroxi- $\Delta^1, 3, 5, (10)$ estratrieno-17 ona]
Estriol = E_3 : [$\Delta^1, 3, 5, (10)$ estratrieno-3, $16\alpha, 17\beta$ -triol]

2.1.3. Estrógenos en el ganado bovino.

a) Biosíntesis.

La biosíntesis de los esteroides ováricos sigue la misma línea general que la síntesis de esteroides por otras glándulas. BOLTE et al., (1974), mostraban como el colesterol era el precursor de la progesterona plasmática, siendo éste, el sustrato de la síntesis del primer esteroide, la pregnenolona.

Según RYAN y SMITH, (1965) la vía utilizada en el folículo para la síntesis de estrógenos sería la Δ^5 , es decir Pregnenolona \rightarrow 17 - hidroxipregnenolona \rightarrow Dehidroepiandrosterona \rightarrow Androstenodiona \rightarrow Estrona \rightarrow Estradiol.

b) Secreción.

Los estrógenos pueden ser sintetizados en el ovario, la placenta y en las glándulas adrenales. A nivel ovárico FALCK (1959) describía en la rata, que las células de la teca interna del folículo maduro eran más eficientes que las de la granulosa en la producción de estrógenos. Para PEREZ Y PEREZ (1969) los estrógenos se elaboran en la teca interna y sólo en casos excepcionales en los folículos atrésicos. Los trabajos de YOUNGLAI y SHORT (1970) en la yegua también demostraban que el estradiol presente en el líquido folicular era el producto de la síntesis de la teca interna.

Sin embargo en la vaca, recientemente se ha demostrado que son las células de la granulosa las más activas en la síntesis de 17β -estradiol (LACROIX et al., 1974).

El 17β -estradiol es el esteroide de mayor concentración presente en el líquido folicular de la vaca, tanto en folículos normales como quísticos (SHORT, 1962). La estrona aparece en el líquido folicular en una débil concentración, sin estar presente el estradiol -17α .

La estrona ha sido identificada en las glándulas adrenales de los bovinos (BEALL, 1939). También la 11β -hidroxiestrone y 16α -hidroxiestrone aparecen en las incubaciones de células adrenales de la vaca (KNUPPEN y BÄUEER, 1962). Según estos autores, este último compuesto podría estar formado por la hidroxilación directa de la estrona en la posición 16α . Al contrario que en el ganado vacuno, en la mujer BAIRD et al., (1969), encuentran estrona y estradiol en el plasma venoso adrenal.

GORSKI y ERB (1959), identificaron diferentes estrógenos, en extractos placentarios de vaca. Con una técnica de fluorimetría VEENHUIZEN et al., (1960) demuestran la aparición de estrona, 17β -estradiol y 17α -estradiol en los cotiledones fetales, siendo el $E_2\alpha$, el de mayor concentración en las placentas post-parto, mientras que el $E_2\beta$ era mayor en las pre-parto.

El momento de la aparición de cantidades considerables de estrógenos, en los cotiledones, no ha podido ser demostrado, pero parece que estaría localizado alrededor del cuarto mes de gestación (MELLIN y ERB, 1965).

c) Metabolismo.

El hecho de que algunos estrógenos como el estradiol puedan ser producidos por glándulas, pero también por tejidos periféricos a partir de precursores de esteroides, hormonalmente inactivos, hace definir el nivel de producción de estas hormonas, como el conjunto de ambas (BAIRD, 1968).

El nivel de transporte de las hormonas esteroides desde el plasma a las células está influenciada por la presencia de proteínas específicas capaces de ligarlas con una gran afinidad.

La testosterona y el estradiol, aparecen ligados en el plasma bovino a la CBG (Globulina captadora de corticosteroides o trascortina) y por una proteína específica TBP (Proteína ligadora de testosterona o estradiol) de capacidad limitada y de gran afinidad (MARTIN et al., 1976).

Los receptores celulares a los estrógenos son proteínas siendo la concentración de éstas en un tejido, la que determina su capacidad de respuesta. La afinidad de ligamiento de un esteroide con su receptor es directamente proporcional a la actividad biológica. El estradiol y la estrona actúan directamente sobre la célula sin metabolismo previo, reteniéndose en el núcleo (JENSEN y JACOBSEN, 1962).

Los estrógenos una vez en el torrente circulatorio pueden actuar sobre su efector, o sufrir diversas transformaciones. VELLE (1958), demostraba la aparición en la orina de E_1 , E_2^β , y E_2^α después de la administración de E_2^β . Los estudios "in vitro" han demostrado que la sangre completa defibrinada o los eritrocitos lavados de vacuno transforman reversiblemente el E_1 a E_2^α e irreversiblemente el E_2^β a E_1 (AXELROD y WERTHESEN, 1960), (LUNAAS y VELLE, 1960).

Estos fenómenos de interconversión han sido demostrados también en otros tejidos, como cultivos celulares de riñón (VELLE y ERICHSEN, 1960), hígado y testículos y en el útero de la rata (PACK y BROOCKS, 1970).

Los estrógenos pueden estar en el organismo, constituyendo una reserva, mediante conjugación principalmente a grupos sulfuro o glucorono. La glucoronconjugación parece más efectiva durante el ciclo estral (MELLIN y ERB, 1966). Durante la gestación HOFFMAN et al. (1976), encuentran una relación de 1 a 10 entre formas libres y conjugadas.

La sulfo y glucorono-conjugación tienen lugar principalmente en el hígado (BROOKS y HORN, 1971), principalmente la sulfatación en la posición 17^β

En el organismo humano se ha demostrado que el sulfato de estrona es el mayor estrógeno circulante en el plasma durante el ciclo menstrual (BROWN y SMITH, 1971, HAWKIN y OAKLEY, 1974, RUDER et al., 1972) siendo ésta el resultado de la sulfatación de E_1 y E_2 . Este sulfato de estrona parece biológicamente inactivo con un bajo MCR (Metabolism Clearance Rate) debido a su ligamiento rápido con la albúmina (RUDER et al., 1972), (LONGCOPE, 1972).

d) Excreción.

Las dos vías más importantes de excreción de estrógenos en el vacuno son las heces y la orina.

La mayor parte de la excreción se realiza a través de las heces - (LEVIN, 1945), (HAFAZ y ATTAR, 1956), en una proporción de 3 a 4 del total de estrógenos excretados (PERKLEV, 1964).

La aparición de $E_1 - 16^{14}C$, en la orina después de una inyección intravenosa en la vaca, se establece en un pico urinario a las 3 a 5 horas después de la inyección, mientras que el pico fecal aparece entre las 8 y 10 horas (HINT et al., 1961).

MELLIN y ERB, (1966) encontraban el pico de excreción urinario a las 8 ó 10 horas, después de la administración de $E_2-17\beta - 4-^{14}C$, apareciendo el $E_2\beta$ en la orina a partir de los 30 minutos de la inyección.

En la orina aparecen E_1 , $E_2\beta$ y $E_2\alpha$, tanto durante el ciclo sexual como en la gestación, correspondiendo los niveles más elevados al $E_2\alpha$. El $E_2\alpha$ ha demostrado ser el mayor estrógeno urinario en el vacuno (NELSON y SMITH, 1963), (KUDLAC, 1970) (KLYNE y WRIGHT, 1959).

2.2. MÉTODOS CLÁSICOS DE DETERMINACIÓN DE ESTROGENOS.

2.2.1. Métodos biológicos.

Estos métodos están basados en los efectos producidos por una hormona sobre un animal reactivo, ya sea sobre el animal entero o sobre un órgano receptor aislado.

Son numerosos los test biológicos para la puesta en evidencia de la actividad estrogénica, pero el primero y más clásico es el test de Allen y Doisy basado en la queratinización del epitelio vaginal de la ratona castrada.

Otros test biológicos han sido descritos, pero tienen el inconveniente de ser largos, costosos y de baja sensibilidad, normalmente del orden de 1 ug.

Un notable incremento de la sensibilidad se ha obtenido basándose en la reducción del trifenil tetrazolium por el epitelio vaginal de la ratona, 24 horas después de la administración de estrógenos (MARTIN, 1960).

2.2.2. Métodos fluorimétricos.

Estos métodos están basados en la reacción de color amarillo naranja con fluorescencia verdosa, que dan los estrógenos cuando se hacen reaccionar con ácidos concentrados en caliente. Esta técnica cuantitativa ha sido aplicada ampliamente en la determinación de estrógenos naturales (BATES y COHEN, 1947). JAILER (1947), obtiene un sistema bastante específico, de forma que otras sustancias no estrogénicas no interfieran en el blanco de la técnica, haciendo reaccionar el ácido fosfórico con los estrógenos a determinar.

Debido a que ésta técnica conduce regularmente a la sobre-estimación de la concentración de esteroides, principalmente por sustancias parásitas, BROWN en 1955, mejora considerablemente la sensibilidad haciendo una hidrólisis ácida previa en la orina, seguida de una extracción con éter etílico y cromatografía en columna sobre alúmina, para separación de los distintos esteroides. Con éste método se obtiene una sensibilidad de 1 ng (BROWN et al, 1968) realizando las determinaciones en orina de mujer.

2.2.3. Métodos colorimétricos.

Están basados en la reacción de KOBER (1931). La solución fluorescente diluida en agua, cuando es calentada presenta un color rojo vivo, y la fluorescencia se atenúa.

Desde esta primera puesta a punto han sido numerosas las modificaciones utilizadas para aumentar la intensidad del color y por tanto la sensibilidad. Entre ellas la más importante es la reacción de ITRICH, (1958). Este autor demuestra que el pigmento rojo formado por los estrógenos en la reacción de Kober puede ser extraído con una solución al 2% de nitrofenol en cloroformo y que este complejo puede ser medido en un espectrofotómetro.

A pesar de esto la técnica colorimétrica sigue siendo de baja sensibilidad, 4 µg, y otros intentos como el uso de ácido hidroclicórico (DAKEY et al., 1967), no han podido mejorarla, dando una sobre-estimación de la tasa real de estrógenos, tanto en sangre como en orina, como sucedía con el método de fluorescencia.

2.2.4. Cromatografía de gases.

La cromatografía en fase gaseosa con detector de captura de electrón, logró un considerable incremento de la sensibilidad y especificidad en la determinación de estrógenos en líquidos biológicos.

WOTIZ et al., (1967) describieron un método que incluía purificación previa con hidrólisis y extracción, consiguiendo una sensibilidad de 2 ng.

Esta misma técnica utiliza SAUNDERS (1976) para determinación de estrógenos en la orina de oveja.

En los primeros trabajos de ATTAL (1967), se describe un método de determinación de esteroides en plasma sanguíneo. Después de la purificación, los estrógenos son transformados en derivados halogenados para obtener compuestos de electro-afinidad elevada.

Para los estrógenos la intensidad de captura de los electrones está en función del halógeno y del número de átomos de este halógeno. Con un método de preparación de derivados, 3-pentafluorobenzoato obtiene una sensibilidad para la estrona de 0,3 ng.

2.2.5. Método CPB (Unión competitiva con proteína)

Muchas sustancias en la sangre se encuentran ligadas a proteínas plasmáticas, y en algunos casos, esta unión es de una gran especificidad y de un alto grado de afinidad, como sucede con las hormonas esteroideas (MURPHY, 1964).

Este hecho dió lugar a la puesta a punto de una técnica denominada "Unión Competitiva con una Proteína" (Competitive Protein Binding o CPB). Si una sustancia marcada con un isótopo (S^*), es añadida a un plasma que contiene esa misma sustancia no marcada (S), y una cantidad limitada de su proteína específica conjugadora (P), se establecerá un equilibrio dinámico entre (S) y (P), y (S^*) se distribuirá dependiendo de la cantidad de (S) existente en el medio (MURPHY, 1964).

Este tipo de análisis ha sido denominado de manera muy diferentes, siendo las más comunes las de "Análisis de Saturación", "Análisis de Equilibrio," "Radioanálisis", "Análisis por Unión Competitiva con una Proteína" y el de "Análisis de Saturación" (ZETNER, 1973).

Principalmente son la CBG (Corticoesteroid Binding Globulin o Transcortina) que liga específicamente los esteroideas C_{21} y la SBP (Steroid Binding Protein) que liga esteroideas C_{18} y C_{19} , las proteínas más comunmente utilizadas en este tipo de análisis (MARTIN et al., 1976).

Este método fué definido por MURPHY (1970) como aquella forma de análisis de saturación en el cual la molécula reaccionante es una proteína de gran afinidad y especificidad para otras moléculas con las cuales actúa como agente conjugador.

Los primeros análisis fueron determinados en aquellos esteroides cuya proteína conjugadora específica se encuentra en la sangre, como es el caso de la determinación de corticoides con la CBG o transcortina (MURPHY, 1967).

KORENMAN (1968) demostraba que el estradiol se unía con gran afinidad y especificidad a macromoléculas solubles obtenidas del útero de coneja en el sexto día de gestación. Basándose en este método realiza las primeras determinaciones de estradiol en el plasma de mujer, por la gran especificidad de la unión de éste estrógeno a la proteína del citosol uterino de la coneja. (KORENMAN et al., 1969). Este método fué utilizado por CORKER et al., (1970) y una variación del mismo fué la utilización de la fracción molecular soluble del útero de oveja ovariectomizada o citosol uterino de la oveja (SHUTT, 1969) (SHUTT y COX, 1973).

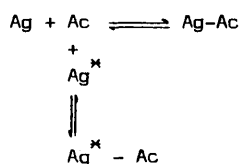
Este método es de una gran especificidad, alcanzando una sensibilidad de 10 pg y un valor blanco próximo al 0 (KORENMAN et al., 1969).

2.3. RADIOINMUNOANÁLISIS DE HORMONAS ESTEROIDES.

2.3.1. Principios de radioinmunología (RIA)

La técnica de radioinmunoanálisis o análisis radioinmunológico está basada en la observación original de BERSON y YALLOW (1959) en la cual, hormonas antigénicas marcadas (insulina) pueden ser detectadas por su capacidad de unirse a bajas concentraciones de un anticuerpo específico. Otras hormonas, no marcadas en concentración desconocida, pueden ser medidas, teniendo en cuenta, la competición físico-química que se produce en el medio, entre la hormona marcada y la hormona a determinar.

Por tanto el principio del radioinmunoanálisis se basa en la competición entre un antígeno (Ag) y el mismo antígeno marcado con un isótopo (Ag^*), frente a su anticuerpo específico. Cuando una cantidad variable de antígeno no marcado se encuentra en el medio se producen los equilibrios siguientes:



Siendo constantes las cantidades de Ag^* y Ac , todo incremento del antígeno Ag supone una reducción de Ag^* fijado a Ac , y un aumento de la cantidad de Ag^* libre (FRANCHIMONT, 1970). Dicho de otra forma la proporción de Ag^* ligado a Ac (Fracción B, bound o ligada) y la de Ag^* libre (fracción F, Free o libre) están en función directa de la cantidad de Ag presente en el medio.

Este fenómeno de competición de los antígenos con las zonas de acoplamiento del anticuerpo sigue la ley de acción de masas (SKELLEY et al, 1973).

La primera condición para realizar un análisis radioinmunológico es disponer de una hormona con capacidad antigénica (FRANCHIMONT, 1970).

Las primeras sustancias analizadas con ésta técnica fueron aquellas que son antigénicas "per se" como las hormonas polipeptídicas, mientras que el análisis de las hormonas esteroides con peso molecular menor de 1000, presenta ciertas particularidades. Estas hormonas para ser antigénicas, necesitan ser acopladas a una proteína comportandose entonces como un "hapteno" (LIEBERMAN et al., 1959).

ERLANGER et al., (1958) y ERLANGER et al., (1967), obtienen anticuerpos en el conejo mediante un antígeno obtenido conjugando los esteroides a la BSA (sero albúmina de bovino), uniendo la proteína en el carbono 3 (C_3) del anillo A del núcleo esterano, mediante enlace covalente en los grupos amida de los residuos de lisina.

FERIN et al., (1968) utilizando como antígeno el 17β -estradiol hemisuccinato-BSA, obtiene anticuerpos capaces de inhibir los efectos biológicos de la administración de estradiol a animales de experimentación.

Utilizando este anticuerpo ABRAHAM (1969), publica el primer artículo en el que se describe un radioinmunoanálisis de 17β - estradiol en el plasma de mujer.

2.3.2. Obtención de anticuerpos antiestrógenos.

El desarrollo de un radioinmunoanálisis específico para una sustancia depende de la obtención de un anticuerpo con título, afinidad y especificidad adecuadas (ODELL et al., 1971).

Una vez conseguido el complejo antigénico esteroide-proteína se pueden obtener anticuerpos mediante inmunización activa en animales de experimentación, lográndose un radioinmunoanálisis "hapténico" para la cuantificación sensible y específica de sustancias de bajo peso molecular (MIDGLEY et al., 1969 a).

La preparación de estos complejos se logra, uniendo los grupos libres carboxilos del esteroide, con los carboxilos de los grupos ξ -amino de los residuos de lisina de la sero albúmina humana o de vacuno mediante el uso de la carbodiimida en condensación (ODELL et al., 1972), (ABRAHAM 1973).

A partir del primer antisuero antiesteroide obtenido por FERIN et al. 1968), utilizando como antígeno un derivado succinil-BSA, aparecen gran cantidad de antisueros, todos ellos, derivados succinil o hemisuccinil, conjugados a la proteína transportadora (BSA) en posición C_3 ó C_{17} . Todos estos antígenos en los cuales el esteroide se une a la proteína a través de los anillos A ó D dan anticuerpos con una fuerte reacción cruzada (JEFFCOATE y SEARLE, 1972) y no llegan a ser específicos para una determinada hormona (DOERR, 1973).

NISWENDER y MIDGLEY (1970), sugieren que la inmunización con estrógenos ligados a la proteína transportadora en posiciones más remotas de sus grupos característicos, podían dar anticuerpos más específicos. Posteriormente quedó demostrado que la especificidad del antisuero depende directamente del

lugar del enlace del esteroide con la proteína (LINDNER et al., 1972 b), cuando el enlace se realiza en los residuos de lisina vía 6-carboximetiloxima-BSA los anticuerpos obtenidos son de una gran especificidad (DRAY et al., 1971) (DEAN et al., 1971, KUSS y GOEBEL 1972).

Una gran variedad de procedimientos de inmunización son empleados para la producción de anticuerpos antiestrógenos, pero el proceso general consiste en inyectar a los animales el antígeno puro diluido en suero fisiológico en emulsión con un adyuvante, generalmente completo de Freund, el cual está compuesto de una mezcla de aceites minerales, que retrasan la absorción del antígeno, y bacilos tuberculosos muertos que incrementan la reacción inmunológica (SKELLEY et al., 1973).

El animal de experimentación más comúnmente utilizado es el conejo por su facilidad de manejo, seguido de la oveja, cobaya y cabra (NIESCHLAG et al., 1975).

La vía de inyección varía desde la subcutánea, intradérmica, intramuscular e intraperitoneal, hasta la intravenosa. La intradérmica es de gran utilidad por la fuerte reacción inmunológica que produce, necesitando una mínima cantidad de antígeno (VAITUKAITIS et al., 1971).

El procedimiento de inmunización presenta en líneas generales pocas diferencias entre los autores que han descrito distintos métodos. Esencialmente se diferencian en el tipo de antígeno y pureza del mismo, cantidad de antígeno por inyección, duración de la inmunización, tipo de inyección, animal de experimentación, etc., En cualquier caso la calidad del antisero obtenido depende directamente del antígeno utilizado y por esto damos a continuación una relación de los trabajos más importantes que describen la obtención de anticuerpos anti-estrógenos, así como el tipo de antígeno utilizado.

Los primeros anticuerpos antiestrógenos fueron obtenidos con antígenos simples, como el E₂-17 β -succinil-BSA (FERIN et al., 1968, ABRAHAM 1969, MIKHAIL et al., 1970), que daban como resultado anticuerpos de baja especificidad. Este mismo antígeno fué utilizado también en experiencias posterio-

res (AOKI y ARESCHISHIN 1971, EDQUIST y JOHANSSON 1972) principalmente con derivados en los cuales la proteína está unida a la molécula de esteroide en la posición 17 (HOFFMAN 1972, POWELL y STEVENS 1973, WRIGHT et al., 1973).

Los derivados del hemisuccinato han sido también utilizados como antígenos, con unión de la proteína en distintas posiciones (WU y LUNDI 1971, ROBERTSON et al., 1972), principalmente en la posición 3 del $E_2 - 17\beta - 3$ hemisuccinato-BSA, (MIDGLEY y NISWENDER 1970, DOERR et al., 1973, EXLEY y WOODHAMS 1976) ó la posición 11, ($E_2 - 17\beta - 11$ hemisuccinato-BSA) (HOLLANDER et al., 1974).

La unión de la proteína en la posición 6, ya sea BSA (KUS y GOEBEL 1972) ó la HSA (JEFFCOATE y SEARLE 1972), fué utilizada por diversos autores, por la alta especificidad que dá este tipo de antígeno, especialmente los derivados $E_2 - 17\beta - 6-O$ -Carboximetiloxima-BSA (DRAY et al., 1971, DEAN et al., 1971, LINDNER et al., 1972a, EXLEY 1972), así como oxoestradiol (EXLEY et al. 1971) y ceto-estradiol (NIESCHLAG et al., 1975).

2.3.3. Características de los antisueros antiesteroides.

Las características de un antisuero antiesteroide vienen determinadas por su título, afinidad y especificidad.

a) Título

El título de un anticuerpo se determina mediante la incubación de varias diluciones con un esteroide marcado, en un volumen determinado de solución tampón, a una temperatura y tiempo fijados. La dilución de antisuero que liga el 50% del trazador marcado bajo esas condiciones define el título (ABRAHAM, 1974).

Para ODELL et al., (1971), el título de un anticuerpo sería la concentración óptima del mismo, cuando la relación fracción ligada/libre es aproximadamente 1. En estas condiciones la sensibilidad y precisión del análisis son óptimas.

La importancia de la tasa de anticuerpos en un antisuero radica únicamente en la posibilidad de realizar un número mayor de análisis con un mismo volumen (SKELLEY et al., 1973).

El título del anticuerpo depende de la duración de la inmunización, de la dosis de antígeno y de la vía de administración de éste (ODELL et al., 1971).

ABRAHAM (1973), obtiene el nivel más elevado de anticuerpos a los 6 u 8 meses de inmunización, con una dosis de 2 mg de antígeno por inyección, utilizando la vía subcutánea en la oveja.

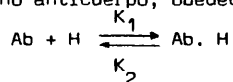
Utilizando la vía intradérmica en el conejo, con 1 mg de antígeno por inyección, NIESCHLAG et al., (1975), obtiene el título más alto de anticuerpos a las 10 semanas de inmunización.

b) Afinidad

La afinidad constante de un anticuerpo se define, como la reciprocidad entre la concentración molar del esteroide libre y la saturación media de los lugares de enlace del anticuerpo (ABRAHAM, 1974).

Los antisueros antiesteroides son heterogéneos y contienen varias inmunoglobulinas con diferente concentración, afinidad y especificidad. Por tanto, la afinidad constante es un valor influenciado por la población de inmunoglobulinas.

El enlace antígeno anticuerpo, obedece a la Ley de acción de masas:



Las inmunoglobulinas con mayor producto K.Ab no producen siempre una mayor especificidad y afinidad, y a veces es ventajoso fraccionar el antisuero y testar las características de las fracciones de las inmunoglobulinas individualmente.

c) Especificidad

La especificidad de un antisuero se define como la libertad de interferencia con otros esteroides distintos al que se quiere medir y es la característica que definitivamente determina su uso (NISWENDER et al., 1975).

Los anticuerpos no suelen ser totalmente específicos de un sólo hapteno y generalmente pueden ligar otras sustancias de estructura parecida al hapteno del que están constituidos (ABRAHAM, 1969). La especificidad se determina mediante la reacción cruzada. Para determinar ésta se incubaba el antisuero con su esteroide específico (S) y una cantidad fija de (S^{*}). Igualmente se incubaba el antisuero con otro esteroide (X) y la misma cantidad fija de (S^{*}). Tomando arbitrariamente la reacción cruzada del esteroide S como del 100% la del otro esteroide X, vendrá determinada por su capacidad de desplazamiento del esteroide marcado S^{*}.

$$\text{Reacción cruzada de un esteroide X} = \frac{\text{Masa de S necesaria para desplazar 50\% de S}^*}{\text{Masa de X necesaria para desplazar 50\% de S}^*}$$

Este método fué descrito por ABRAHAM et al. (1970)

ODELL et al. (1972) definen la especificidad, como el grado con el cual el anticuerpo, reacciona sólo con la hormona que va a ser analizada.

La especificidad varía con el tiempo de inmunización, dependiendo el incremento del lugar de enlace esteroide-proteína (ABRAHAM, 1974).

Aunque son muchos los factores que pueden afectar a la especificidad, el más importante es el lugar donde la proteína se conjuga con la molécula de esteroide (NISWENDER et al., 1975).

En los primeros anticuerpos antiestrógenos (FERIN et al., 1968) la proteína aparece conjugada en los carbonos 3 ó 17 (anillos A y D) mediante los grupos hidroxil o cetona, que son los que confieren especificidad a esa molécula. Cuando se producen alteraciones en la estructura de estos grupos, la especificidad del anticuerpo obtenido queda disminuida (ABRAHAM, 1974).

Como resultado, estos anticuerpos principalmente derivados succinil o hemisuccinato con la proteína en posición 3 ó 17 dan una fuerte reacción cruzada.

La conjugación de la proteína en los carbonos distales de los grupos activos hidroxil o cetona confiere a los anticuerpos una gran especificidad, principalmente en el anillo B, 6-D-Carboximetiloxima -BSA, (DRAY et al., 1971, KUS y GOEBELL, 1972, EXLEY et al., 1971, LINDNER et al., 1972 b).

La especificidad del antisuero depende también de la pureza del antígeno, principalmente en aquellos antígenos con conjugación de la proteína en el carbono 17. (HOLLANDER et al., 1974) (EXLEY y WOODHAMS 1976).

2.3.4. Metodología del análisis radioinmunológico.

Previamente a la reacción inmunológica entre antígeno y anticuerpo y debido a la especificidad del antisuero y la débil concentración de estrógenos en el plasma, se hacen necesarias una serie de etapas que incluyen la purificación de los esteroides.

a) Hidrólisis.

Los estrógenos aparecen en el plasma en parte conjugados grupos sulfato y glucuronato. Una manera de determinar estos estrógenos conjugados en el plasma ó en la orina es mediante antisueros antiestrógenos conjugados (KELLIE et al., 1972) con el inconveniente de que no suelen ser específicos, ni de un solo grupo ni de un solo estrógeno.

Las técnicas clásicas se basan en la hidrólisis de los conjugados, previa a la extracción.

Con la hidrólisis enzimática GOMES et al., (1965), obtienen buenos resultados utilizando β -glucuronidasa y aril sulfatasa de moluscos (*Helix pomatia*).

Estos enzimas de moluscos aparecen más efectivos que la β -glucuronidasa de mamíferos (WILLIAMSON y LAYNE 1970) (ADKY y ARESCHYSHYN, 1971)

o aquellas provenientes del *Scherichia coli* (CROWLEY y ROSSER, 1973).

Estos métodos enzimáticos se basan en la acción de las enzimas a 37°C en un medio ácido, (pH 4,8) directamente sobre el plasma o la orina.

Los métodos químicos más utilizados se basan en la acción de ácidos en caliente (clorhídrico o sulfúrico) aunque tienen el inconveniente de provocar modificaciones en la estructura de algunas sustancias.

Otros métodos, como la solvolisis, son bastante efectivos utilizando la mezcla metanolácido acético - acetato de etilo (1/9 v.v) a 45°C (LORIAUX et al., 1971). Este método tiene el inconveniente de su falta de acción sobre los glucuronos conjugados.

b) Extracción .

La extracción de los esteroides del plasma es el primer paso en la purificación. Los solventes más comunmente utilizados en la extracción de estrógenos son el éter etílico, el diclorometano y el benceno.

El éter etílico que aparece en los primeros trabajos de radioinmunoanálisis de estradiol (ABRAHAM 1969 , MIKHAIL et al., 1970) es de una gran eficacia en la extracción, y la separación de la fase orgánica y acuosa es sencilla. Tiene el inconveniente de dar un blanco elevado si no es destilado previamente a su uso (CASTANIER y SCHOLLER 1970).

El diclorometano ha sido utilizado por TERQUI et al. (1973) y (THIBIER y SAUMANDE, 1975), siendo el porcentaje de extracción tan elevado como el éter y el blanco despreciable, pero tiene el inconveniente de la dificultad en la separación de las dos fases.

Otros muchos solventes han sido utilizados siendo el más importante el benceno (ROBERTSON et al., 1972) que tiene el inconveniente de la alta toxicidad de sus vapores.

c) Cromatografía .

En el radioinmunoanálisis de esteroides la cromatografía tiene dos fines, la purificación y la separación de diferentes hormonas, cuando

no se posee un anticuerpo específico.

Los sistemas de cromatografía para la separación de estrógenos - son varios, aunque la cromatografía en columna es la más común. Sólo algunos autores han descrito cromatografía sobre capa fina para el 17β -estradiol, usando sílica-gel F₂₅₄ con cloroformo/ácido acético (10/1v.v) (BISHARA y JAKOVljeVIC, 1965, HOTCHKISS et al., 1971). Esta técnica tiene el inconveniente de que presenta valores blancos muy elevados.

Dos son los sistemas más comunmente utilizados en la cromatografía de estrógenos: La columna de celita y la columna de sephadex LH 20.

La columna de celita ha sido utilizada por ABRAHAM et al., (1970) después de una modificación del tamaño de la columna y volumen de la fase estacionaria descrito por KORENMAN et al., (1969).

Para Abraham, las columnas de celita tiene las siguientes ventajas: Son fáciles de preparar, son baratas, no hay interferencias específicas, es un material inerte y posee un gran poder de resolución (ABRAHAM, 1973).

Este sistema tiene la ventaja de que usando el etilen glicol como fase estacionaria se pueden separar la estrona del estradiol y este de la progesterona, utilizando como fase móvil una mezcla de etilacetato isooctano.

A raíz de los trabajos de BAELEN et al., (1967) con columnas de Sephadex LH 20 usando solventes orgánicos, se introdujeron notables mejoras en la cromatografía de estrógenos. Este método es rápido, no necesita tratamientos previos a su uso, los valores blancos son nulos, y con microcolumnas la calidad de separación es excelente en un mínimo de tiempo.

El Sephadex LH 20 es un dextrano hidroxipropilado, el cual tiene la capacidad de turgescencia con los solventes orgánicos. La separación puede ser llevada a cabo, según un principio de filtro molecular, interacciones reversibles del soluto y el gel o partición entre las mezclas de solventes (BULLETIN ON SEPHADEX, 1970).

Las primeras columnas de Sephadex LH 20 fueron descritas por MIK_HAIL et al., (1970). Eran grandes columnas de 300 mm de longitud con 3 grs. de Sephadex, utilizándose como solvente benceno/metanol (85/15 v.v.).

La utilización de diferentes mezclas de solventes hace variar la velocidad de elución. Con benceno/metanol (85/15) aparece en primer lugar la estrona y luego el estradiol (CARR et al., 1971). El uso de metanol o etanol es indiferente en cuanto a los resultados.

El comportamiento de la columna está influenciado por el diámetro de la misma y la cantidad de gel (CARR et al., 1971). Así EDQUIST y JOHANSSON (1972), con un diámetro de 5 mm. y 300 mm. de longitud obtienen una mayor velocidad de elución que WRIGHT et al., (1973 a.) con columnas de 25 cm/1 cm, con un solvente benceno/metanol (9/1.)

El problema de la utilización de Sephadex LH 20 en grande columnas radica en la gran cantidad de eluyente necesario para la salida de los esteroides, lo que provoca incrementos considerables de los valores blancos en los residuos secos.

Es por esta razón que sean las microcolumnas las más utilizadas (CASTANIER y SCHOLLER, 1970).

El diámetro de las microcolumnas es variable según los autores. WU y LUNDY (1971) utilizan jeringas de 2 ml. con un diámetros interno de 7 mm. y 0,4 grs de Sephadex.

MURPHY y D'AUX (1975) describen ampliamente las ventajas de este sistema por su rapidez, bajo costo, blanco nulo y aplicación a los análisis con grandes series de columnas. El solvente más idóneo en estos sistemas de partición es el benceno/metanol (85/15 para separación de E_1 y E_2) (MURPHY y D'AUX, 1975) (HOFFMANN et al., 1976). DOBSON y DEAN (1974) utilizan microcolumnas y una mezcla de solvente benceno/metano (9/1.)

La separación de isómeros de estradiol 17β y 17α , no puede realizarse mediante cromatografía ya que es precisa una oxidación previa, me

dian te enzimas específicas del $E_2 - 17\beta$ a E_1 (ROBERTSON et al., 1972).

d) Reacción inmunológica.

Los estrógenos una vez purificados y concentrados, son recuperados del extracto seco, mediante una solución tampón. Se utiliza el tampón fosfato gelatina (pH 7,0, 1 M, con 0,9% de ClNa y 1% de azida de sódio (ABRAHAM, 1969).

La adición de gelatina al 0,1% en el sistema (HOTCHKISS et al., 1971) incrementa la precisión y minimiza los valores del blanco; además incrementa la solubilidad de los esteroides menos polares y evita interferencias con otros componentes.

En la incubación entran en contacto los estrógenos purificados, el esteroide marcado y el anticuerpo correspondiente.

Normalmente se utilizan dos tipos de esteroides marcados: Unos con tritio, (3H), con una actividad específica entre 25 y 100 Ci/mM (ABRAHAM, 1973) y otros marcados con ^{125}I (NISWENDER y MIDDLEY 1970). Aunque con el segundo método se puede conseguir una mayor sensibilidad, en la práctica el tritio es más utilizado por su fácil almacenamiento, larga vida media y facilidad de manejo por emitir radiaciones β débiles.

e) Separación de fracciones.

La separación de fracciones libres y conjugadas se puede realizar según diferentes métodos.

Para RATCLIFFE (1974) el método ideal debe reunir tres condiciones: Separar completamente las fracciones con un margen mínimo de error.

Debe ser rápido, barato y usar reactivos de fácil disponibilidad.

No estar afectado por el plasma o suero

Varios son los métodos utilizados, descritos por ODELL et al., (1975): Cromatografía, filtración con gel, inmunoprecipitación, técnicas de absorción, fase sólida y anticuerpos polimerizados.

En la práctica son dos los más usados: La absorción con carbón-dextrano y la inmunoprecipitación.

El método de absorción con carbon dextrano consiste en una suspensión de carbón "Norit A" con un tamaño de partícula de $60 \mu\text{m}$ que absorbe los esteroides libres.

Para ABRAHAM (1973) éste método tiene las siguientes ventajas:

- No necesita purificación previa del anticuerpo.
- Las interferencias inespecíficas con el análisis son nulas.
- Es rápido, simple, y con pocas posibilidades de error.
- Dá una gran precisión con un coeficiente de variación en la curva standard no superior al 2%.

Tiene el inconveniente de su gran avidez por todo tipo de sustancias, y su capacidad de absorción es dependiente del tiempo de contacto. La máxima absorción se realiza a los 10 ó 15 minutos y a partir de este momento parte de los esteroides ligados comienzan a ser absorbidos (RATCLIFFE, 1974).

Se han descrito otros métodos de absorción tales como el talco, silicatos, celulosa, fluorisil, hidroxiapatita, etc. (TRAFFORD et al., 1976).

El carbón - dextrano es utilizado en suspensión en solución tampón o en discos de gelatina (SABA 1976), pudiéndose realizar el contaje de la hormona marcada en la fracción libre o en la ligada.

La técnica de inmuno-precipitación o técnica del doble anticuerpo es un método práctico para la separación de fracciones libres y conjugadas, en la cual un segundo anticuerpo es usado para precipitar el complejo primario antígeno-anticuerpo (SKELLEY et al., 1973).

Este método fué aplicado, en principio, a la separación de fracciones en el radioinmunoanálisis de hormonas proteicas. El segundo anticuerpo es un suero anti- γ -globulinas específicas del animal donde se ha obtenido el anticuerpo primario (FRANCHIMONT, 1970).

En la práctica se emplea como segundo anticuerpo generalmente un suero anti- γ -globulinas de conejo, obtenido en el morueco (ODELL et al., 1975).

denominándose con las siglas inglesas "ARGG" (a), francesas "SMAL" (b), o españolas "SMAC" (c).

ARGG (a): (Anti-rabbit gamma globulin).

SMAL (b): (Serum du mouton anti lapin).

SMAC (c): (Suero de morueco anti conejo).

Este método tiene la ventaja de su simplicidad, buena precisión, aplicabilidad a todas las hormonas y no ser dependiente del tiempo de contacto (ODELL et al., 1975). Presenta el inconveniente de que al introducir una nueva reacción inmunológica en el sistema, ésta puede ser influenciada por concentraciones de suero o plasma, presencia de anticoagulantes, etc. (RATCLIFFE, 1974).

f) Análisis de resultados.

La expresión de resultados en radioinmunoanálisis, está dificultada por la interpolación sobre curvas dosis-respuesta. Estas curvas son el resultado de llevar a unos ejes de coordenadas el porcentaje B/T o B/D, y la dosis aritmética del esteroide, siendo

B/T: cpm (cuentas por minuto) de la fracción ligada sobre cpm totales, y

B/D: cpm de la fracción ligada, sobre cpm en ausencia de hormona no marcada.

Han sido varios los métodos propuestos para la linearización de las curvas dosis-respuesta, para facilitar y dar rapidez y precisión al cálculo de resultados (RODBARD, 1970).

El método de transformación del porcentaje B/T ó B/D en "logit", y la dosis en "ln" de la dosis, permite linearizar la curva dosis respuesta. (RODBARD et al., 1969).

$$\text{logit } Y = \ln \frac{A}{1-A}$$

La curva standard una vez linearizada puede introducirse mediante la ecuación de una recta, e interpolar cada uno de los resultados problema - en un calculador programable, (ZETTNER, 1973).

Este método logra un 95% de límite de confianza, para estimación de muestras desconocidas, siempre que la curva standard se haya realizado en tampón, ya que otras sustancias como suero o plasma pueden interferir los resultados (RODBARD et al., 1969).

2.3.5. Criterios de validez para radioinmunoanálisis.

a) Recuperación

La recuperación es un criterio a introducir en una técnica, debido a las pérdidas de esteroide en cada uno de los pasos de la purificación. Como porcentaje de recuperación se considera al esteroide medido al final del análisis después de restar estas pérdidas. Para determinarla se sigue el sistema de añadir una determinada cantidad de esteroide marcado al principio del análisis, y haciendo una valoración del mismo previa a la reacción inmunológica (CASTANIER y SCHOLLER, 1970).

Las mayores pérdidas ocurren en la etapa de extracción y cromatografía. En la extracción el solvente no extrae la totalidad del esteroide contenido en el plasma, por la fuerte unión de estos con las proteínas. El porcentaje de la extracción varía con el tipo de solvente empleado y la calidad de la extracción.

Otra pérdida importante se produce en la etapa de purificación o cromatografía. Utilizando la columna de Sephadex LH20, las pérdidas quedan reducidas al mínimo (SCHANBAKER y EWING, 1975).

La tasa de recuperación puede determinar el volumen de muestra a utilizar en el análisis (MIKHAIL et al., 1970).

b) Blanco.

Todos los reactivos utilizados en la técnica pueden dar un valor blanco a tener en cuenta en los resultados.

Estos valores dependen fundamentalmente del solvente (FROLICH et al., 1974). Algunos como el éter etílico dan un valor blanco elevado si no

son previamente destilados (MIKHAIL et al., 1970); otros como el diclorometano y el benceno dan valores blancos prácticamente nulos (THIBIER y SAUMANDE 1975), (ROBERTSON et al., 1972).

La influencia del valor blanco se aprecia más en aquellas técnicas con utilización directa de un anticuerpo específico sin etapa previa de purificación. Cuando se realiza cromatografía los blancos descienden tanto con la columna de celita (ABRAHAM, 1974) como con la columna de Sephadex LH20 (MURPHY y D'AUX 1975).

La afinidad y especificidad del antisuero influyen también sobre el blanco de la técnica, el cual debe de ser menor que la sensibilidad del análisis, y depende de la afinidad del antisuero, del tampón y del método de separación de fracciones (ABRAHAM, 1974).

c) Sensibilidad.

Se pueden diferenciar dos aspectos dentro del concepto de sensibilidad: de la curva standard y sensibilidad del análisis (ABRAHAM, 1973).

La sensibilidad de la curva standard se define como la más pequeña cantidad de hormona que puede ser medida con certeza estadística (MIDGLEY et al., 1969 b) o la más pequeña cantidad de una sustancia que puede ser medida siendo significativamente diferente de cero (REEVES y CALHOUN 1970). FRANCHI-MONT (1970), da una definición más completa: Es la más pequeña cantidad de hormona no marcada que puede inducir una diferencia estadística significativa del porcentaje de hormona marcada, fijada al anticuerpo en ausencia de hormona no marcada.

En radioinmunoanálisis de hormonas esteroides, EDQUIST y JOHANSSON (1972), definen la sensibilidad como el aumento necesario en pg que hay que añadir para que sea significativamente diferente de cero. ABRAHAM (1974) la define como la más pequeña cantidad de esteroide standard que es significativamente diferente de cero, con un límite de confianza del 95%

Para este mismo autor la sensibilidad de la curva standard depende de los siguientes parámetros:

1. De la afinidad del antisuero .
2. De la masa de trazador marcado .
3. Del volumen de incubación .
4. De la precisión del análisis .

Esta serie de factores aparece también descrita por SKELLEY et al. (1973). Para FRANCHIMONT (1970) la dilución y la afinidad del antisuero son de gran importancia, es decir la sensibilidad es más elevada: cuanto mayor es la afinidad constante (K) de equilibrio

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

Para otros autores este concepto de sensibilidad está más cerca del límite de detección. EKIN y NEWMAN (1970), determinan la sensibilidad experimental, según la siguiente fórmula.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Media entre la diferencia de duplicados de B/F}}{\text{Pendiente de la curva dosis respuesta B/F}}$$

El otro aspecto es la sensibilidad del análisis. Algunos autores la definen como la mínima cantidad de estrógeno que puede ser distinguido de cero (ROBERTSON et al., 1972) y vendría determinada por la fórmula.

$$S = t \cdot s \sqrt{n} \quad , \text{ donde } t = t \text{ de Student}$$

s = desviación standard del blanco

n = número de duplicados

La sensibilidad del análisis, según ABRAHAM (1974), depende de:

1. La sensibilidad de la curva standard .
2. El valor blanco .
3. La recuperación del esteroide después de la purificación .

El límite de detección puede también ser incluido dentro de estos

factores (TSANG 1974). El cálculo de la sensibilidad según ABRAHAM (1974) quedaría reflejado con la siguiente fórmula:

$$S = \frac{2 \times SD}{R \times F} \times 100$$

Donde R es el tanto por ciento de la recuperación, F la fracción de esteroide recuperado usado en el análisis, y SD la desviación "standard" de la media de los valores blancos por cuadruplicado.

d.) Especificidad.

La especificidad ha sido definida como el grado de libertad de interferencia con otras sustancias diferentes de las que intentan ser medidas (MIDGLEY et al., 1969b). La especificidad está influenciada por:

1. La especificidad del anticuerpo.
2. La reacción cruzada con otros antígenos.
3. La influencia de ciertas sustancias de bajo peso molecular sobre la reacción antígeno/anticuerpo.

MIKHAIL et al., (1970). determinan la especificidad de la técnica, midiendo la reacción cruzada del anticuerpo y la recuperación cromatográfica. Un método con un anticuerpo de reacciones cruzadas mínimas o nulas, unido a un proceso de cromatografía, asegura una gran especificidad (LORIAUX et al., 1971).

La especificidad en radioinmunoanálisis es esencialmente dependiente de la afinidad y especificidad del antisuero y del grado de purificación de la muestra (DOERR 1976).

La especificidad del radioinmunoanálisis se puede demostrar por las dos vías siguientes según ABRAHAM (1974):

1. Los esteroides presentes en la fracción ya purificada, que se usa para medir el esteroide específico, no reaccionan de una manera específica con el antisuero utilizado.
2. Los niveles de esteroides medidos en el plasma en ciertas condiciones fisiológicas, concuerdan con los resultados obtenidos por otros métodos que pueden ser más válidos aunque menos prácticos.

8.) Exactitud y precisión:

La exactitud es el grado en el cual la media de un número infinito de medidas sobre una misma sustancia concuerda con la cantidad exacta de sustancia presente (MIKHALL et al., 1970). Se puede determinar mediante la adición al plasma de cantidades conocidas de esteroide. Esta adición ha de ser como mínimo treinta minutos antes del análisis para lograr un equilibrio con los esteroides ya presentes (ABRAHAM, 1974).

MIDGLEY et al., (1969 b) definen la precisión como el grado en el cual dando una serie de medidas de una misma muestra concuerdan con la media. SKELLEY et al., (1973) incluyen en la precisión el coeficiente de variación.

2.4. NIVELES DE ESTROGENOS EN LA VACA.

2.4.1. En el ciclo sexual:

Los niveles de estrógenos en líquidos biológicos han sido estudiados ampliamente desde hace tiempo, con el fin de conocer el papel de estas hormonas en la reproducción de la especie bovina principalmente como reflejo de la actividad folicular.

Las primeras determinaciones realizadas en el líquido folicular, de mostraban que el 17β -estradiol era el estrógeno de mayor concentración presente en este medio (SHORT 1962), principalmente en el folículo preovulatorio (ENGLAND et al., 1973).

También la estrona aparece en el líquido folicular, pero en concentraciones menores que las del 17β -estradiol (VELLE 1958). Este mismo autor describía la presencia de 17α -estradiol en el líquido folicular de quiste ovárico, pero la presencia de este isómero del E_2 - 17β en el líquido folicular, si que siendo un resultado de controversia ya que otros autores no lo han podido aislar de este medio y otros como ENGLAND et al., (1973) detectaban su presencia sólo en un 50% de los folículos estudiados.

Las variaciones en los niveles de estrógenos han sido también determinadas en la orina. MELLIN y ERB (1965) encontraban que la mayor concentración en este medio correspondía al 17α - estradiol, seguido del 17β - estradiol y de la estrona.

GARVERICK et al., (1970), encontraron variaciones en los niveles de $E_2\alpha$ y $E_2\beta$ en la orina, y apenas existían variaciones en los niveles de E_1 , durante los días -2 y -1 del ciclo (día 0 ó 00 = día del celo). En la vena cava VARMAN et al., (1964), encontraron incrementos en las concentraciones de estrógenos entre los días 6-8 y 14-16, pero con el método que este autor utiliza, es difícil probar la significación de estos resultados.

La ausencia de variaciones en los niveles de E_1 , a lo largo del ciclo, en la orina, puede explicarse por la secreción de este estrógeno en la vaca por la corteza adrenal (BEALL, 1939).

Las posibilidades de hacer un estudio de la actividad folicular, mediante las variaciones cuantitativas de los niveles de estrógenos en la orina, son muy limitadas, por la excreción urinaria de esteroides extraovéricos, porque el tiempo de latencia entre la secreción y la aparición en la orina es muy largo, porque los estrógenos no son excretados en su totalidad en la orina y porque la distribución orino-fecal es variable según los animales (LONGCOPE, 1972).

POPE et al., (1965), determinaban las concentraciones de estrógenos totales en sangre periférica por un método biológico (peso del útero de la ratona), obteniendo los valores más elevados durante el celo, con concentraciones de 10 pg/ml.

Con métodos químicos y fluorimétricos, diferentes autores determinaban estrógenos totales en sangre periférica con mayor o menor éxito.

MASON et al., (1972), con un método fluorimétrico después de una purificación cromatográfica, señalan unas variaciones en los niveles de estradiol y estrona: $E_2 (\beta+\alpha)$: 176-1175 pg/ml. y E_1 : 231-2269 pg./ml. durante los

días 6 y 7 que parece obedecer a un reflejo de ondas de crecimiento folicular.

Con la utilización de métodos como CPB y RIA, las variaciones de estrógenos durante el ciclo sexual de la vaca, aparecieron más netas y definidas, aunque en concentraciones muy variables según los autores dependiendo del grado de purificación de las hormonas antes del análisis.

Con un método de CPB, sin purificación previa, SIROIS, (1972), en resultados de E_1 equivalente, describe variaciones de estrógenos totales en el plasma los días 6 y 14 del ciclo, con concentraciones de 320-640 pg/ml.

SHEMESH et al., (1972), obtienen variaciones netas de estrógenos durante el ciclo. Realizando una purificación previa, determinan exclusivamente $E_2\beta$, apareciendo un pico 4 hrs. de 170 pg/ml., antes del principio del celo, con un incremento desde el día -3 al día 0, disminuyendo las concentraciones a 8 pg/ml 12 hrs. más tarde. En este trabajo se describen también aumentos el día 4 del ciclo (40 pg/ml) y el día 11 (81 pg/ml).

Estos autores apuntan ya la posibilidad de una relación de este pico el día -1, con el desencadenamiento del pico preovulatorio de LH mediante un efecto "feed-back". Estos mismos resultados obtienen BLOCKEY et al., (1973) con un pico el día -1 de 325 pg/ml y otro el día 6 de 320 pg/ml. A pesar de la purificación previa con la que trabajan obtienen variaciones en los niveles de E_1 el día del celo de 240-610 pg/ml, existiendo un relación entre E_1 y E_2 .

La técnica de RIA permitió alcanzar la suficiente especificidad y sensibilidad como para determinar las variaciones hormonales a pesar de su baja concentración.

El uso de anticuerpos no específicos en las primeras técnicas de RIA para determinación de estrógenos en el plasma, sin cromatografía previa, daban como resultado la determinación de niveles de estrógenos totales.

CHRISTENSEN et al., (1971) describían un pico de $176^{+31,6}$ pg./ml. 25 hrs. antes del pico de LH y otros incrementos los días 5 y 6 de $141^{+44,2}$ pg/ml.

La cromatografía permite conseguir un reflejo más exacto de las variaciones, aunque la mayoría de los autores, al no poder separar por cromatografía los isómeros $E_2\beta$ y $E_2\alpha$ dan como valor estradiol ó 17β - estradiol, lo que en realidad es $E_2\beta + E_2\alpha$ dependiendo de la reacción cruzada del anticuerpo utilizado. Según DRINAN y COX (1974), los valores de estradiol después de la cromatografía no pueden superar los 5 pg/ml.

Conforme a estas teorías de bajas concentraciones de estrógenos en la sangre periférica de la vaca HENRICKS et al., (1971) obtienen variaciones el día -3 de 0,5 a 10 pg/ml y 15 a 25 pg/ml el día -1. Este pico aparece 12-16 hrs. antes del principio del celo y 5-10 hrs. del pico preovulatorio de LH. Los niveles máximos que señala este autor son de 30 pg/ml correspondiendo la mayoría al $E_2\beta$ plasmático.

Otra serie de trabajos describen el incremento de la concentración de estrógenos los días -1 a 0 con oscilaciones del nivel de base de 0 a 15 pg/ml (SEREN et al., 1974) y picos de 10-30 pg/ml. 24 a 72 hrs. antes del celo. KATONGOLE et al., (1973) obtienen concentraciones de 15 pg/ml. en el proestro y estro y 4-9 pg/ml los días 5 y 6 del metaestro.

Con un anticuerpo no específico, de fuerte reacción cruzada frente al E_1 , LEMON y SAUMANDE (1974), determinan estrógenos totales libres (50 - 80 pg/ml) y estrógenos totales libres y conjugados (60-180 pg/ml), sin encontrar variaciones netas durante el ciclo.

A pesar de que sus resultados difieren en la concentración coinciden en el incremento del día -1 y 0.

Las variaciones de niveles durante el ciclo sexual y especialmente cerca del celo, aparecieron más netas cuando las técnicas permitieron la determinación de $E_2 - 17\beta$ libre en el plasma, único estrógeno de producción exclusivamente ovárica en la vaca y verdadero reflejo del crecimiento folicular.

La determinación de $E_2\beta$ en el plasma ha sido abordada según dos vías o sistemas de detección: Mediante anticuerpos específicos anti $E_2-17\beta$ y mediante separación cromatográfica de cada uno de los estrógenos. Con estos últimos métodos y debido a que mediante cromatografía no se pueden separar los isómeros α y β los valores de $E_2\beta$ pueden ser los de $E_2\beta+\alpha$, dependiendo de la reacción cruzada del anticuerpo utilizado.

Con este método de cromatografía WETTEMANN et al., (1972) observan unos niveles máximos desde los días -2 a -0,5 de $7,7 \pm 1,7$ pg/ml a $9,7 \pm 1,6$ pg/ml, precediendo este incremento al pico de LH.

SMITH et al., (1974) con una reacción cruzada del anticuerpo frente al $E_2\alpha$, de un 42% obtienen valores máximos de E_2 , el día -1 de 12 pg/ml, y de 8 pg/ml los días 4-9. Sin embargo para la E_1 no encuentra variaciones durante el ciclo, ni en el celo, sin variar el nivel de base de 1 a 3 pg/ml. En contraste con el trabajo de NANCARROW et al., (1973), los cuales encuentran fluctuaciones en los valores de E_1 (400-900 pg/ml.).

Para SMITH et al., (1974), el hecho de encontrar tan bajas concentraciones con un anticuerpo de reacción cruzada (42%) frente al $E_2\alpha$, le hace suponer que la aportación del $E_2\alpha$ al total de estradiol libre circulante en el ciclo es desdeñable y probablemente sólo se haya medido $E_2\beta$.

Con este mismo anticuerpo de reacción cruzada 42% con el $E_2\alpha$ PETERSON et al. (1975a), obtienen niveles de 7 a 20 pg/ml y con cromatografía previa 4 a 18 pg/ml el día -1 y 0 siendo desdeñables las concentraciones de $E_2\alpha$ en el plasma bovino. Sin embargo SAUMANDE y LOPEZ-SEBASTIAN (1977), de acuerdo con los trabajos de DOBSON y DEAN (1974), mediante cromatografía con Sephadex LH 20, y utilización de anticuerpos específicos, respectivamente, obtienen valores de $E_2\alpha$ superiores a los de $E_2\beta$, aunque sin variaciones netas durante el ciclo, de 20 a 30 pg/ml de $E_2\alpha$ frente a 5-15 pg/ml de $E_2\beta$ el día del celo.

DOBSON y DEAN (1974), no encuentran tampoco variaciones en los niveles de E_1 , con un nivel de base continua de 4 pg/ml. Estos autores en publicaciones anteriores (DOBSON et al., 1972, DOBSON et al 1973), describían para $E_2\beta$ 5 pg/ml de nivel de base y un pico poco antes del celo de 15 pg/ml previo al

pico de LH.

Igualmente utilizando un anticuerpo específico ECTORS et al., en 1975 obtienen un pico de $E_2\beta$ el día -1 de 6,5 a 12,6 pg/ml y otros tres picos accesorios los días 4 y 5, 8 y 12 a 14 del ciclo. KANCHEV et al. (1976) obtienen un nivel basal de 5-6 pg/ml. y un pico el día 0 de $13,5 \pm 1,4$ pg/ml.

GLENCROSS et al., (1973), describen un método utilizando dos anticuerpos con diferente reacción cruzada frente al $E_2\alpha$ de 20% y 0,2% respectivamente. Con estos dos anticuerpos no encuentran diferencias ostensibles en los resultados de $E_2\alpha$ y obtienen un pico de estradiol el día -1 y el día 6 de 5-7 pg/ml. Para la E_1 no encuentran variaciones a lo largo del ciclo sexual manteniéndose el nivel de base de 1-2 pg/ml.

Todas estas publicaciones coinciden en el incremento preovulatorio los días -1 y 0 (WETTEMANN et al., 1972; HENRIKS et al., 1971) y otras elevaciones de los niveles, muy variables (GLENCROSS et al., 1973), entre los días 4 al 10 según los autores, como respuesta a la secreción de los folículos de tamaño superior a los 8 mm. En todos estos trabajos las tomas de sangre se realizan diariamente.

Las posibles fluctuaciones de los niveles de $E_2\beta$ durante el celo en espacios de tiempo inferiores a 1 día provocaron experiencias en las cuales las tomas de sangre eran más frecuentes generalmente con intervalos de 2 hrs., valorando el $E_2\beta$, en la mayoría de los casos con un anticuerpo específico, principalmente obtenido a partir de antígenos derivados del $E_2-17\beta - 6$ -O-carboximetiloxima-BSA.

Todos estos trabajos concluyen con el resultado de un claro incremento de los niveles de $E_2\beta$ cerca del celo y un incremento preovulatorio pocas horas antes o coincidente con el pico preovulatorio de LH.

LEMON et al., (1975) determinan un nivel de base de $E_2\beta$ de 5 pg/ml., y una subida a 15-25 pg/ml., 2 a 4 hrs. antes del pico de LH. Estos autores señalan que la subida de $E_2\beta$, solo tiene lugar después de que la

progesterona ha alcanzado un nivel mínimo (luteolisis avanzada) menor de 2 ng/ml. Con estas tomas horarias se aprecia el aumento de $E_2\beta$, desde tres días antes del celo hasta el día del celo, pero este aumento es con fluctuaciones dentro del día y por esto concluyen que el efecto del $E_2\beta$ es más importante como duración del nivel del mismo que como un efecto de descarga, ya que la secreción es de tipo episódica continua, como lo es para la mayoría de las hormonas (LEMON y SAUMANDE, 1974).

PETERSON et al., (1975b), describen la aparición de un pico de $E_2\beta$, en los días -2 a -1, con variaciones del nivel basal de 5 pg/ml. a 25-50 pg/ml. en el nivel máximo, sólo cuando el nivel de progesterona ha descendido, y alrededor de 24 hrs. antes del pico de LH.

CHENAULT et al., (1975), señalan el pico de $E_2\beta$, coincidente con el de LH, con un nivel de 7,4 pg/ml, que desciende a 2 pg/ml a las 14 hrs. después, señalando otros incrementos los días 9 y 12.

En este artículo se señala también la relación entre descenso de la progesterona y comienzo de la elevación de $E_2\beta$, hasta el pico de LH, pero no está demostrado que la elevación de $E_2\beta$, quede reflejada en un solo pico, queda aún por determinar (THIBIER y SAUMANDE 1975). Estos autores encuentran para el $E_2\beta$, un nivel de base de 0-5 pg/ml. y un pico preovulatorio de 15-30 pg/ml, apreciándose una secreción episódica, con fluctuaciones previas al pico de LH y a los síntomas de celo, pero sólo cuando la progesterona ha descendido a menos de 2 ng/ml. en este sentido concuerdan con DOBSON (1978) el cual encuentra que las concentraciones de $E_2\beta$ son significativamente mayores de -20 a 0 horas (hora 0, pico de LH) que de + 4 a + 20 hrs. sin aparición de un pico preovulatorio claro, con fluctuaciones sin subidas ni caídas bruscas y niveles a -12 hrs. de 15 pg/ml y a + 20 hrs de 5 pg/ml.

Esta revisión bibliográfica sobre niveles de estrógenos durante el ciclo sexual de la vaca puede quedar resumida en los siguientes puntos:

- 1.- El $E_2\beta$, es el único estrógeno cuyas concentraciones en la sangre periférica reflejan la actividad folicular.
- 2.- A pesar de que en el líquido folicular algunos autores hayan determinado la existencia de E_1 y $E_2\alpha$, sus variaciones en la sangre periférica no mues-

tran relación con las diferentes fases del ciclo ovárico.

3.- Existe un claro incremento de la concentración de $E_2\beta$, durante el día anterior al celo y el día del celo, con una concentración máxima pocas horas antes del pico de LH.

4.- Los trabajos de mayor rigor técnico, con purificación cromatográfica y anticuerpos específicos reflejan unos niveles basales de $E_2\beta$ de 5 pg/ml y niveles máximos de 15-25 pg/ml, según los distintos autores.

5.- La secreción de $E_2\beta$, es episódica con fluctuaciones sin un pico neto preovulatorio.

6.- El $E_2\beta$ sólo aumenta cuando la progesterona ha descendido a niveles inferiores de 2 ng/ml. (luteólisis avanzada). Sería esta combinación de descenso brusco de la progesterona e incremento del $E_2\beta$, la que induciría la descarga del pico preovulatorio de LH, mediante un efecto "feed-back".

7.- Los incrementos de $E_2\beta$, entre los días 4 al 10 del ciclo, señalados por algunos autores, son muy variables y parecen el reflejo de ondas de crecimiento folicular, que corresponden principalmente a la secreción de los folículos de tamaño superior a los 8 mm. de diámetro.

2.4.2.- Niveles de estrógenos en la superovulación:

Desde hace tiempo la producción de óvulos fecundados es un pre-requisito para la aplicación de la transferencia de embriones en la vaca.

Las preparaciones hormonales de gonadotropinas han sido las más comúnmente utilizadas para inducir la superovulación (CASIDA et al., 1943) y en la actualidad principalmente la PMSG (gonadotropina sérica de yegua gestante) por su larga vida media, bajo coste, y disponibilidad en el mercado (SAUMAN DE 1977).

Las dosis adecuadas de esta hormona han sido ampliamente estudiadas, existiendo una correlación entre la respuesta ovárica y la dosis de PMSG empleada (HAFEZ et al., 1963), aunque la respuesta sea dependiente de un factor individual.

Estos primeros trabajos de inducción de la superovulación en ganado vacuno púber, indicaban dosis de PMSG entre 2000-2500 U.I. en los tratamientos el día 16 ó 18 del ciclo, ya sea con PMSG sólo o combinada con LH o HCG el día del celo (SCHILLING y HOLM, 1963; PÉREZ GARCIA, 1979).

Teniendo estas técnicas una gran variabilidad en la respuesta la combinación de PMSG con Prostaglandina F_2^α (PGF_2^α) ó sus análogos (cloprostenol) permitieron una mayor sincronización de la ovulación y mejora de la respuesta.

Los trabajos preliminares de ELSDEN et al., (1974) utilizando 1500-2000 U.I. de PMSG y 48 horas más tarde PGF_2^α , demostraban una respuesta superior, tanto en términos de animales ovulando, como en la tasa de ovulación de los que responden.

Con éste mismo método PHILLIPPO y ROWSON (1975) obtuvieron una mayor efectividad y grado de sincronización cuando se trataba a los animales el día 8 ó 12 del ciclo, aunque según MARIANA y NGUYEN HUY (1973), el tratamiento con PMSG no altera la proporción de los diferentes tipos de folículos en el ovario.

También la superovulación fué conseguida en la ternera pre-púber entre las 4 y 24 semanas de edad, con el uso de PMSG (3000 U.I. y LH ó HCG (JAINUUDEN et al., 1966) consiguiendo los mismos resultados que en animales púberes).

En la superovulación en la ternera son muy significativos los trabajos de TESTART et al., (1977) el cual utiliza PMSG y HCG y un tratamiento previo durante cuatro días con esponjas vaginales impregnadas con un progestágeno FGA (acetato de fluorogestona).

Con estos métodos de PMSG / HCG y PMSG / FGA / HCG, obtienen gran número de ovulaciones en terneras de tres meses de edad, con 60 mg de FGA y 1800 U.I. de PMSG (SAUMANDE y TESTART, 1974).

En cualquiera de los tratamientos en animales púberes e impúberes la respuesta ovárica es muy variable por la propia capacidad individual de respuesta del ovario a la PMSG. De un lado la relación dosis de PMSG - respuesta no es lineal, ya que no todas las razas de vacuno tienen la misma sensibilidad a la PMSG y dentro de una raza la sensibilidad individual es diferente, según el estado ovárico el día de la inyección de la gonadotropina (SAUMANDE 1977).

La variabilidad en el número de ovulaciones como respuesta al tratamiento de superovulación con PMSG, fué estudiada desde el punto de vista de las diferencias en los niveles hormonales en cada individuo.

El $E_2\beta$, había demostrado ser el mejor reflejo del crecimiento follicular en el ciclo sexual del animal adulto (HENRICKS et al, 1971) (GLEN CROSS et al 1973). Sus niveles también se intentaron relacionar después del tratamiento superovulatorio con el número y calidad de las ovulaciones.

HENRICKS et al. (1973) y LEMON y SAUMANTE (1972), demostraban que tanto los niveles de $E_2\beta$ como los de la progesterona, tenían una alta correlación con la tasa de ovulación después de un tratamiento con 1600-3200 U.I. de PMSG el día 16 del ciclo.

HENRICKS et al., (1973), determinando estrógenos totales demostraban también una alta correlación entre los niveles de estas hormonas, tasa de ovulación y dosis de PMSG. Los niveles de estrógenos eran máximos durante el celo con concentraciones de 36 pg/ml con una caída brusca 12 horas más tarde. Para este autor no existe correlación entre el número de ovulaciones y el máximo nivel de LH durante el celo.

Esta falta de influencia de la dosis de PMSG sobre la secreción endógena de LH, ha sido también descrita por HALLFORD et al., (1975). Estos autores si encuentran una relación entre niveles de $E_2\beta$ y número de cuerpos lúteos el día 12 del ciclo con valores de $17,7 \pm 4,2$ pg/ml.

SAUMANDE y PELLETIER (1975), encontraban también una correlación entre la concentración máxima de $E_2\beta$, antes del pico de LH con el número de ovulaciones ($r = 0,78$, $P < 0,01$), confirmando que la concentración en el plasma periférico de $E_2\beta$, con niveles superiores a los 40 pg/ml, antes del pico de LH, reflejaba el número de folículos en condiciones de ovular según había sugerido HENRICKS et al., (1973). Para estos autores sin embargo, el pico preovulatorio de LH está correlacionado con el número de ovulaciones después de la estimulación con PMSG, aunque los niveles basales no se encuentren afectados (SAUMANDE 1978).

En sus trabajos iniciales SAUMANDE y TESTART (1974), describían que en el animal prepúber no habían podido demostrar una estrecha relación entre el número de ovulaciones y el nivel de $E_2\beta$ como se había demostrado en el adulto. En este trabajo aparecen las concentraciones máximas de $E_2\beta$, al rededor de las 130 horas después del comienzo del tratamiento, 34 hrs. después de la aplicación de PMSG con valores de 150 a 2050 pg./ml.

Sin embargo en un trabajo posterior TESTART et al., (1977) utilizando en animales prepúberes el mismo tratamiento FGA-PMSG encontraban una relación cuantitativa entre la concentración de $E_2\beta$, en el plasma y el número de folículos que ovulan, con niveles máximos de 41-502 pg/ml., coincidiendo con los picos preovulatorios de FSH y LH.

SAUMANDE y MARIANA (1976), no encontraban ningún parámetro en la curva de $E_2\beta$, administrando PMSG sola, que tuviera una relación estricta con el número de folículos de más de 5 mm. presentes en la superficie del ovario.

Determinando los niveles de estrógenos totales no conjugados después del tratamiento con PMSG y $PGF_2\alpha$, 48 hrs. más tarde, BOOTH et al., (1975) encontraban niveles de estrógenos de 264 pg/ml, en los animales con una alta tasa de ovulación, 16 ó más ovulaciones durante los días 3 y 6 después de la ovulación, sugiriendo que esto era debido a la producción de folículos anovulares, que continuaban siendo secretores.

Con una frecuencia en las tomas de muestras de sangre de 2 hrs. a partir de la inyección de PMSG, con un método de superovulación PMSG/PGF₂ α , SAUMANDE (1980) describía como la concentración de E₂ β , se incrementaba a partir de las 24 horas de la inyección de PMSG, siendo mayor en los animales con mayor tasa de ovulación, existiendo una correlación de r = 0,90 con el nivel máximo preovulatorio, descendiendo los niveles rápidamente en 24-36 horas.

Sólo en algunos animales se observaba un incremento posterior con un máximo el día 3 después de la ovulación (226 pg/ml y 75,2 pg/ml.) (SAUMANDE 1978). Este incremento ya había sido observado por BOOTH et al., (1975) en todos los animales de su experiencia, pero para SAUMANDE (1978), más que debido a la presencia de folículos anovulares, la causa, vendría por un efecto a largo plazo de la PMSG, por su larga vida media y por su acción sobre toda la población folicular (SAUMANDE 1980).

El pico preovulatorio de LH ocurre 44,0 \pm 4,9 horas después de la inyección de PGF₂ α , con el sistema PMSG/PG de acuerdo con los trabajos de PHILLIPPO y ROWSON (1975), sin embargo en animales no tratados con PMSG, el pico preovulatorio de LH aparece 20 horas más tarde, es decir a las 64 horas después de la inyección de PGF₂ α . (DOBSON et al., 1975). Este mismo intervalo aparece entre inyección de prostaglandina y comienzo del celo (48-72 horas). (COOPER y ROWSON 1975) ó 60-72 horas (DELETANG 1975). En cualquier caso el intervalo entre el comienzo de la luteolisis y el pico preovulatorio de LH, es más corto que en el ciclo normal o después del tratamiento con PGF₂ α sólo. El significado de esto es aún desconocido.

Los sistemas de valoración de la respuesta a la PMSG siguen siendo estudiados, pero a medida que las dosis de PMSG aumentan, la variabilidad en la respuesta es mayor (SAUMANDE 1978). No han sido estudiadas otras hormonas aparte del E₂ β , que puedan tener relación con el número de ovulaciones y por tanto reflejo en la actividad folicular. Por el momento después de la inyección de PMSG no existe un método para predecir la respuesta.

45

3.1.- MATERIAL

Aparatos

El conteo de las radiaciones correspondientes al ^3H se realiza en dos contadores de centelleo líquido modelos, "Liquid scintillation system. Isocap 300. Searle Analytic Inc. y "Liquid scintillation spectrometer. Packard 3255. Tri-carb system".

Se utilizaron dos centrifugas refrigeradas para la separación de fracciones libres y ligadas modelos J-6 Beckman y RC3B Sorvall.

El cálculo de resultados, para la determinación de concentraciones en cada una de las muestras después del análisis, se efectúa en un computador programable Hewlett-Packard modelo H-P 9815 A.

Animales

Para la preparación de anticuerpos antiestrógenos se utilizaron 4 conejos de raza Neozelandesa, de seis meses de edad, alojados en jaulas individuales con una alimentación "ad libitum".

En la experiencia relativa al estudio de las concentraciones de estrógenos durante el ciclo sexual, se utilizaron 10 vacas de raza Frisona (Frisone/Pie Noire). Para la determinación de los niveles de estrógenos en hembras sometidas a superovulación se utilizaron 9 novillas de la misma raza de 18 meses de edad. Todas estas hembras presentaban una actividad ovárica cíclica, con celos regulares y sin antecedente patológico alguno.

Material fungible de laboratorio

Como material específico para la puesta a punto de la técnica radioinmunológica de determinación de estrógenos en el plasma, se emplearon:

Tubos cónicos de 60 ml con tapon esmerilado para la extracción, tubos cónicos de 30 ml para la evaporación, microcolumnas Bourseuil 6-6,5/240 para cromatografía y viales y tubos de polipropileno de un volumen de 10 ml y 3 ml. respectivamente para contaje en el contador de centelleo líquido.

Reactivos

En la reacción inmunológica se han utilizado tres anticuerpos diferentes de los cuales se describen sus características y reacción cruzada:

Anticuerpo anti- 17β estradiol no específico, obtenido por inmunización en la oveja con el antígeno Estrona-17 - Carboximetiloxima - BSA. Se utiliza a una dilución final de 1/180.000. Con la referencia B₁S₄-1. Cedido por el Dr. Adeline de la "Foundation Recherche Hormonologie" (Francia).

Presenta las siguientes reacciones cruzadas:

E ₁ [*]	E ₁	= 100%	E ₂ [*]	E ₂ β	= 100%
"	E ₂ β	= 115%	"	E ₁	= 50%
"	E ₂ α	= 44%	"	E ₃	= 7%
"	E ₃	= 10%	"	E ₄	< 0,5%
"	E ₄	< 0,5%			

Anticuerpo anti-estrona específico, obtenido por inmunización en oveja con el antígeno "Estrona-6-carboximetiloxima - BSA" y referencia 238₅S₃ a una dilución final 1/3000, cedido por el Dr. Adeline de la "Foundation Recherche Hormonologie" (Francia).

Presenta la siguiente reacción cruzada:

E ₂ β	< 0,50%
E ₃	< 0,10%
E ₄	< 0,10%

Anticuerpo anti-estradiol-17 β , específico, obtenido por inmunización en el conejo con el antígeno "Estradiol-17 β - 6 - ceto-carboximetilglicina - BSA" y referencia L4386 a una dilución final 1/240.000 cedido por el Dr. M. Terqui de la "Station de Physiologie de la Reproduction del INRA en Nouzilly (Francia).

Presenta la siguiente reacción cruzada, según Dray et al., 1971

Estradiol - 17 β	100
6-ceto-estradiol-17 β	12,3
16-ceto-estradiol-17 β	1,3
Estradiol - 17 α	0,88
2 - metoxi- estradiol-17 β	0,09
Estradiol - 17 β glucosiduronato	0,38
Estrona	0,7
16 α -hidroxi-estrona	0,42
Sulfato de estrona	0
2-metoxi-estrona	0
16-epi-estriol	5
Estriol	0,52
17-epi-estriol	0
16, 17-epi-estriol	0
Δ 16-estratetranol	0
Hexoestrol	0
Diethyl-estilboestrol	0
Dienestrol	0
3 β , 17 β , diol-androstano	0
Testosterona	0
Progesterona	0

Para la separación de fracciones libres y ligadas por el método de inmunoprecipitación se ha utilizado - globulinas de conejo y SMAL, (Serum du mouton anti lapin). Cedidas por el Dr. M. Terqui así como SMAC (Suero de -

morueco anti conejo) obtenido por nosotros.

a) Preparación de anticuerpos antiestrógenos

Se han utilizado los siguientes productos:

Antígeno, "Estrona - 17 hidrazona - BSA". Cedido por el Dr. M. Terqui.
Adyuvante completo de Freund. "Adyuvant complete Freund" de Laboratories
Difco.

Tween 80. Sigma Chemical Company.

Toxóide de vacuna tosferina Perthusis del Instituto Llorente S.A.

Clorhidrato de prometacina, Fenegan de Rodhia Iberica S.A.

Albúmina serica de buey. ("Albumin bovine. Sigma Chemical Company").

b) Técnica radioinmunológica de determinación de estrogénos.

Se han utilizado los antígenos marcados siguientes:

Oestradiol (2, 4, 6, 7 - ³H). 90-115 Ci/mmol. New England Nuclear

Oestrone (2, 4, 6, 7 - ³H). 85-105 Ci/mmol. New England Nuclear

Oestradiol - 17 α (2, 4, 6, 7 - ³H). 90-115 Ci/mmol. New England Nuclear.

Oestradiol (2, 4, 6, 7 - ³H). 85-110 Ci/mmol. Radiochemical Centre. Amersham.

Oestrone (2, 4, 6, 7 - ³H). 80-110 Ci/mmol. Radiochemical Centre. Amersham.

Esteroides utilizados como antígenos no marcados o fríos:

17 β - estradiol. Steraloids INC . Wilton N.H.

17 α - estradiol "

16 α - hidroxiestrona "

16 - ceto - estradiol "

6 - ceto - estradiol "

16 - epi - estriol "

Dienestrol "

Diethyl - estiboestrol "

Estrona. Merck
Estriol. Merck
Testosterona. Merck
Colesterol. Merck
6 - dehidroestrona. Sigma Chemical Company.
Progesterona. " "

Los disolventes orgánicos utilizados en la extracción han sido:

Diclorometano. Merck
Eter etílico. "Diéthyle oxide. R.P. Normapur". Prolabo.
Benceno. Merck
Etanol absoluto. Merck

Como enzimas se han usado:

Extracto de "Helix pomatia". Actividad glucoronidasa y sulfatasa. Industrie biologique française.

HSD. Hidroxi-steroid-dehidrogenase. Preparación enzimática de "Pseudomonas testosteroni". Type I. Sigma.

Como cofactor en la reacción de oxidación se utilizan DPN: (-Ni cotinamide adenine dinucleotide). Sigma.

En la cromatografía se utiliza Sephadex LH-20 . "Pharmacia Fine - Chemicals".

Para la separación de fracciones libres y ligadas, por el método de absorción con carbón-dextrano se han utilizado: Norit A ("Nutritional Biochemicals Corporation") y Dextrano ("Dextran T70. Pharmacia Fine Chemicals").

c) Tratamiento de superovulación.

PMSG. Gonadotropina sérica de yegua gestante. Organon. Batch nº V5
Cloprostenol. Análogo de prostaglandina - F_2^{α} . Estrumate. ICI. Imperial - Chemical Industrie.

Soluciones

TAMPON FOSTATO:

Para 1 litro de solución:

5,38 g. NaH_2PO_4 . (Merck)

16,34 g. Na_2HPO_4 "

9 g. NaCl "

1 g. Azida de Na "

1 g. Gelatina "

Es preciso disolver la gelatina en caliente antes de añadirla a la mezcla, ajustando el pH a 7 con NaOH concentrada y conservarla a +4°C.

TAMPON ACETATO:

Tampón - Acido acético / Acetato sódico.

120 ml. de ácido acético, se agrega agua destilada hasta completar 1 l. (solución 2 M).

272 g de acetato sódico, se agrega agua destilada hasta completar 1 l. (solución 2 M).

Mezclar volúmen a volúmen y ajustar el pH a 4,8 con sosa concentrada (10 M).

TAMPON CARBONATO

Se prepara con 4,2 g. $\text{CO}_3\text{H Na}$, 5,3 g. CO_3Na_2 completando hasta 1000 ml de solución. Seguidamente se hace pasar CO_2 en la solución para ajustarlo a un pH 9,1.

LIQUIDO DE CENTELLEO:

- 4 g PPO (2,5 - difeniloxazol) Packard

- 40 mg Dimetil POPOP. Packard

Diluir en 1 l. de tolueno

3.2. METODOS

3.2.1.- Preparación de anticuerpos antiestrógenos

El antígeno es diluido en suero salino a una concentración de 1 mg/ml., preparándose suficiente cantidad de antígeno para todo el período de inmunización.

A 4 ml de la solución de antígeno se añaden 4 ml. de adyuvante completo de Freund y 0,4 ml de Tween 80 como emulgente. Vertiendo con energía cada uno de los componentes con dos jeringuillas en un vial varias veces se obtiene una emulsión permanente, que será inyectada a los conejos.

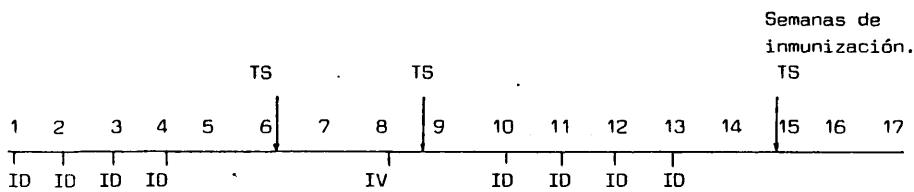
A cada conejo se inyectan 2 ml. de la emulsión, correspondiente a 1 mg. de antígeno, en la región costal y escapular, después de depilar y desinfectar con una solución alcohólica de yodo.

Las inyecciones se realizan con jeringas de insulina de un sólo uso por vía intradérmica, repartidas en 30 ó 40 puntos diferentes. A continuación se inyecta por vía subcutánea, 1 ml. de toxoide de vacuna tosferina para estimular la reacción inmunológica.

Para conseguir una subida más rápida del nivel de anticuerpos, se administra por vía intravenosa, transcurridos dos meses de la inmunización, 1 mg de antígeno diluido en solución salina.

La inyección se hace en la vena marginal de la oreja, previo tratamiento con 5 mg de clorhidrato de prometacina para evitar posibles shocks anafilácticos.

Como esquema de inmunización se sigue el siguiente:



I.D. Inyección intradérmica

I.V. Inyección intravenosa

T.S. Toma de sangre

A cada conejo se le inyecta 1 mg. de antígeno semanalmente durante 4 semanas por vía intradérmica. A los 28 días de la última inyección se le inyecta 1 mg. de antígeno por vía intravenosa. A los 14 días se vuelve a administrar una inyección intradérmica semanal durante 4 semanas. Pasado un mes se pueden realizar inyecciones mensuales de recuerdo en el caso de querer mantener o elevar el título del antisuero en los animales.

Las tomas de sangre se realizan a los 15 días de cada inyección - salvo en el caso de la inyección intravenosa que se hace a los 5 días.

La sangre se recoge de la vena marginal de la oreja, mediante punción de la misma y acoplamiento posterior en la oreja de un sistema de vacío con lo cual la sangre se puede recoger en un tubo. De un conejo se pueden recoger hasta 50 cc. La sangre obtenida se deja a temperatura ambiente una noche y el suero obtenido se centrifuga.

Este suero se diluye con tampón fosfato al 1/10 y se procede a su saturación con BSA, para evitar posibles interacciones entre al antisuero y las proteínas plasmáticas. Para saturar el antisuero se añaden 5 mg de BSA por cada ml. de solución, y se deja incubar 24 horas a 4°C; a continuación se añade 1 mg. de BSA para cada ml. y se deja reposar media hora a temperatura ambiente.

La conservación del antisuero puede realizarse en congelador a -15°C

o mediante liofilización.

En cada muestra de sangre se determina el título y especificidad para apreciar su evolución. Se realizaron 6 tomas de sangre en las semanas 3, 6, 8, 9 y 11, 13 y 15 del cuadro de inmunización.

El título del anticuerpo se determinaba incubando diferentes concentraciones de antisuero desde 1/100 a 1/16000 ($\frac{1}{100}$, $\frac{1}{500}$, $\frac{1}{1000}$, $\frac{1}{2000}$, $\frac{1}{4000}$, $\frac{1}{8000}$, $\frac{1}{10000}$), con una cantidad fija de estrona marcada (E_1^* , 5000 cpm), durante 24 horas a 4° C.

La separación de fracciones libre y conjugada se hacía mediante adición de 1 ml. de una suspensión de NORIT A - dextrano que contenía 125 mg de NORIT A y 5 mg de dextrano en 200 c.c. de tampón fosfato.

Después de la centrifugación se cuenta con el contador de centelleo, el estrógeno marcado que se ha ligado al anticuerpo, definiéndose el título del mismo como aquella concentración que es capaz de captar el 50% de la radiactividad total presente en el medio.

La especificidad se ha determinado por la reacción cruzada (R.C) del anticuerpo con distintos esteroides, y utilizando en todos los casos como esteroide marcado la estrona.

Para determinar la reacción cruzada se hacía reaccionar el anticuerpo a valorar con un esteroide (x) problema y una cantidad conocida del esteroide específico marcado (S^*) en este caso la E_1^* .

Tomando arbitrariamente la reacción cruzada del esteroide (S) como del 100%, el tanto por ciento de reacción cruzada con un esteroide (x), vendrá determinado por la fórmula:

$$R.C. = \frac{\text{Masa de esteroide (S) que se necesita para desplazar el 50\% de } S^*}{\text{Masa de esteroide (x) que se necesita para desplazar el 50\% de } (S^*)}$$

3.2.2. Puesta a punto de la técnica de determinación de TE_1 , TE_2^β , TE_2^α

Hidrólisis de estrógenos conjugados: Para realizar la hidrólisis de los estrógenos conjugados a grupos, glucurono y sulfato, se sigue un método enzimático, utilizando una preparación a base de extracto de moluscos (*Helix pomatia*) con actividad glucuronidasa y sulfatasa.

La hidrólisis se realiza en medio ácido, diluyendo el extracto en tampón acetato (pH 4,8,) a distintas concentraciones (5%, 10% y 20%).

A 5 ml. de plasma se añaden 0,5 ml. de esta solución, dejando incubar una noche a 37°C.

Extracción: Para la extracción de los esteroides libres, presentes en el plasma, se utiliza el éter etílico, previamente destilado, con un volumen 6 veces superior al de la fase acuosa. Se agita en un agitador vibrador durante 30 segundos, recuperándose la fase orgánica por decantación después de congelar la fase acuosa.

Cromatografía: La cromatografía para separación de los diferentes estrógenos, se realiza en microcolumnas de Sephadex LH 20 de 4 mm. de diámetro, y tres longitudes diferentes: 5 mm, 6 mm. y 8 mm.

Se utilizan dos sistemas de solventes: benceno/ etanol 85/15 (v. v) y 95/5 (v.v).

El Sephadex se dejaba durante 24 horas en contacto con el solvente y a continuación era depositado en la columna la cual había sido previamente taponada con algodón de vidrio.

El extracto que contenía los esteroides era depositado en la columna en dos mitades con un volumen de 50 μ l cada vez.

A continuación se pasa el eluyente por la columna y se recogen las fracciones correspondientes de cada uno de los estrógenos a determinar. El pico de estrona aparecía entre los 700 y 1200 μ l, y el de estradiol entre los 1400 y 2000 μ l.

Oxidación enzimática: Al no poder separar mediante la cromatografía los isómeros $E_2\beta$ y $E_2\alpha$, realizamos una oxidación enzimática, que permite la transformación del 17β - estradiol en estrona.

Se utiliza un enzima preparado a partir de bacterias que oxidan específicamente la función 17β (HSD: Hidroxi-steroid-dehydrogenase) en presencia de un cofactor (DPN: Difosfopiridin-nucleótido).

Se probaron diferentes concentraciones de enzima y de cofactor partiendo de las obtenidas por ATTAL (1970).

Solución de cofactor, (Sol. A): 34 mg. de DPN en 10 ml. de tampón carbonato.

Solución de enzima, (Sol. B): 50 mg de HSD en 10 ml de tamponcarbonato.

Al residuo seco que contiene la fracción de $E_2\beta$ + $E_2\alpha$ se añaden 0,6 ml. de la solución A (2,04 mg de DPN) y 0,5 ml de la solución B (2,5 mg de HSD), y se deja incubar 2 horas a 37°C.

La efectividad de la transformación enzimática se comprobó, variando el tiempo de incubación así como las concentraciones de enzima y cofactor

Mediante una segunda cromatografía en las mismas condiciones que la primera, se pueden separar las nuevas fracciones E_1 que corresponden al $E_2\beta$ oxidado, y la fracción estradiol que corresponde al $E_2\alpha$ que ha quedado sin transformar.

Reacción inmunológica: A cada tubo de análisis se añaden 100 μ l del antígeno no marcado o frío, sea perteneciente a la curva standard o a las muestras problema, 100 μ l con el anticuerpo a su dilución correspondiente y 100 μ l con el antígeno marcado. El volumen final de incubación queda por tanto en 300 μ l, realizándose esta toda la noche a 4°C.

Separación de fracciones libres y ligadas: La separación de las fracciones libres, correspondiente al antígeno que no ha quedado unido al anticuerpo, de las conjugadas, se realiza mediante la adición de una suspensión de carbón-dextrano.

Se utilizan dos concentraciones diferentes de carbón: 125 mg y 62,5 mg con 5 mg de dextrano en 200 ml. de tampón y de esta suspensión se añade a cada tubo 1 ml.

Después de un tiempo de contacto de 10 minutos los tubos son centrifugados a 4000 r.p.m. durante 20 minutos.

Cualquiera de las fracciones libres o ligadas pueden ser medidas. La fracción libre queda en el fondo del tubo, habiendo sido absorbida por el carbón y la fracción ligada queda en el sobrenadante, pudiendo ser recuperada por decantación o por pipetaje de una fracción alicuota; esta fracción es pasada a un vial de polipropileno, se añade el líquido de centelleo y se valora en cpm, mediante el contador de centelleo líquido.

Análisis de resultados:

Los cálculos son efectuados con la ayuda de una máquina de calcular programable.

Para una mayor facilidad de cálculo, la curva "standard" es linealizada mediante un sistema logit/ln, como se muestra en la figura 7. De esta forma la curva puede ser introducida en el programa de la calculadora definida como ecuación de una recta. El cálculo es efectuado en B/T, donde B es la radiactividad ligada al anticuerpo y T la radiactividad total ("standard" del análisis más "standard" de la recuperación).

Y_1, Y_2 : cpm en los tubos de análisis

Bd : ruido de fondo del análisis

Bc : Ruido de fondo del contaje

T : "Standard" de radiactividad del análisis

C : "Standard" de radiactividad de la recuperación

X : cpm de la recuperación

β : Volúmen a analizar

α : Volumen contado en la recuperación

W : Volúmen recogido en el tampón

- d_i : Dosis en el tubo de análisis
 E : Masa de estrógeno correspondiente al "standard" de recuperación
 V : Volúmen de plasma extraído

El esquema de los datos introducidos en el programa y los cálculos es el siguiente:

$$A = \frac{\text{Radiactividad ligada}}{\text{Radiactividad total}} = \frac{\frac{(Y_1 - Bd) + (Y_2 - Bd)}{2}}{(T - Bd) + \left[(x - Bc) \times \frac{B}{\alpha} \right]}$$

$$\text{Logit } A = \ln \frac{A}{1-A}$$

Podemos calcular la dosis " d_i " del esteroide en el tubo de análisis gracias a la recta patrón: $\text{logit } B/T = f(\ln \text{ dosis})$.

Luego la dosis x en el volúmen de plasma extraído será:

$$x = \left[\left[d_i \times \frac{W}{\beta} \times \frac{(C - Bc)}{(x - Bc) \times \frac{W}{C}} \right] - E \right] \times \frac{1}{V}$$

Porcentaje de recuperación:

Este porcentaje viene determinado por las pérdidas habidas a lo largo de la manipulación, en cada una de las etapas de la técnica.

Previamente a la extracción se añade a cada muestra problema de plasma, 100 μ l de una solución de hormona marcada que contiene alrededor de 1000 cpm.

Para estudiar las pérdidas vamos midiendo la radiactividad que queda en cada uno de los tubos, después de pasar por cada una de las etapas.

Valor blanco.

El valor blanco, viene determinado por la influencia de los reactivos y sustancias que intervienen en la técnica, los cuales incrementan el valor real de la hormona a determinar.

Para hacer un estudio de él se parte de cada uno de los reactivos el cual es analizado como una muestra problema. Se realizó un análisis sistemático de cada uno de ellos, especialmente los solventes para la extracción, la preparación enzimática para la hidrólisis, y la preparación de enzima y cofactor para la oxidación del 17β - estradiol.

Sensibilidad.

Dentro de la sensibilidad, distinguimos la sensibilidad de la curva "standard" y la sensibilidad del análisis.

La sensibilidad de la curva "standard" se define, como la variación mínima que hay que añadir a una cantidad G_0 , para conseguir resultados estadísticamente diferentes.

Dado el valor conocido G_1 , el valor a determinar G_2 deberá cumplir la siguiente ecuación:

$$\left| G_2 - G_1 \right| > \frac{2 t s \sqrt{2}}{\mu \sqrt{n}}$$

En el que:

t = Valor de la tabla de "student"

s = Desviación standard

μ = pendiente de la curva standard

n = número de medidas por punto

Este cálculo $G_2 - G_1$ se realizó para cada uno de los puntos de la curva standard desde 0,78 a 200 pg.

La sensibilidad del análisis es definible como la más pequeña diferencia cuantitativa entre dos muestras, que dan resultados estadísticamente diferentes. Esto también ha sido para cada una de las concentraciones posibles en las muestras desde 0,78 a 200 pg.

Especificidad.

Mediante el estudio de la especificidad, se determina si en el análisis se mide otro esteroide distinto del que nos interesa.

Se han utilizado dos criterios para verificar la calidad del análisis:

- a) Estudio de las reacciones cruzadas. El método empleado ha sido descrito precedentemente para cada uno de los antisueños utilizados.
- b) Estudio de los valores encontrados en volúmenes crecientes de plasma. Este test permite asegurar que ningún producto presente en el plasma (esteroide u otro) interfiere en el análisis.

Exactitud y precisión:

Para apreciar estos dos valores seguimos dos métodos:

Medidas de cantidades conocidas de esteroides añadidos al plasma y medida de volúmenes crecientes de plasma.

El primer valor se determina añadiendo a un plasma exento cantidades conocidas de los tres estrógenos, siendo la cantidad de plasma constante para todos los análisis (4 ml). La cantidad de esteroide medido en el análisis debe de tener un coeficiente de correlación teórico de 1, con la cantidad añadida.

El segundo método de medida de cantidades creciente de plasma ha sido descrito para la especificidad.

3.2.3. Niveles de estrógenos en la vaca.

A.- Niveles de estrógenos en el ciclo sexual

Se utilizan diez vacas de raza "Frisona", observadas normalmente cíclicas, con celos regulares y sin antecedente patológico alguno.

La detección del celo ha sido realizada con un toro vasectomizado que se situaba en presencia de las vacas dos veces por día. El primer día que la hembra aceptaba la monta era definido como día 0 (D_0).

Se han realizado tomas de sangre diarias a partir del día del celo (D_1) y hasta el día 6(D_6) del ciclo siguiente.

La sangre era obtenida de la vena yugular en tubos heparinizados (Vacutainer) centrifugándose inmediatamente y el plasma recogido era conservado a -15°C hasta el momento del análisis.

En todas las muestras se determinaban ($E_2\beta$), (TE_1), ($TE_2\beta$) y ($TE_2\alpha$).

La determinación de $E_2\beta$, se realizaba mediante la técnica descrita por TERQUI et al., (1973), y según la técnica modificada por THIBIER y SAUMANDE (1975) y SAUMANDE y ANDRE (1975).

En la técnica de $E_2\beta$, la sensibilidad es de 2 pg., el valor del blanco está por debajo del límite de detección, y los coeficientes de variación intra e inter análisis son respectivamente de 9% y 10,6%.

B.- Niveles de estrógenos en la superovulación.

Se emplearon nueve novillas de raza frisona de 18 a 26 meses de edad, normalmente cíclicas, con actividad ovárica sin antecedente patológico alguno.

Estos animales recibían un tratamiento para provocar la superovulación con la siguiente metodología: Una inyección intramuscular de PMSG el día 16 del ciclo (D_0 , día del celo), de una dosis de 1200 U.I. a tres animales; 2000 U.I. a cuatro y 2400 a dos animales, con el fin de provocar diferente número de ovulaciones.

Cuarenta y ocho horas más tarde, las novillas recibían una inyección intramuscular de 500 μg de un análogo de prostaglandina $F_2\alpha$ (Cloprostenol) para provocar la luteolisis.

La detección del celo era llevada a cabo mediante un toro vasectomizado. Se consideraba día 0, ó D_0 , el primer día que la hembra aceptaba la monta.

Se tomaron muestras de sangre cada 2 horas desde la inyección de PMSG hasta 24 horas después de los primeros síntomas de celo.

Las muestras de sangre eran recogidas de la vena yugular, en tubos heparinizados, la sangre era centrifugada inmediatamente, y el plasma recogido se conservó a -15°C hasta el momento del análisis.

El número de ovulaciones de cada animal era determinado, mediante endoscopia, según la técnica descrita por MARIANA (1969). La endoscopia era realizada a los 9 días de la inyección de PMSG contándose el número de cuerpos lúteos.

En cada muestra era analizada la hormona luteinizante (LH) siguiendo una técnica de radioinmunoanálisis con un antisuero anti LH-bovino y los valores obtenidos se expresaron en ng de LH./NIAMDD nº 2 según el método de PELLETIER (1972).

En la novilla nº 52, eran determinados en todas las muestras los niveles de $\text{E}_2\beta$, $\text{TE}_2\beta$, TE_1 y $\text{TE}_2\alpha$. En las 8 novillas restantes estas hormonas se medían únicamente en las diez muestras que enmarcaban el pico preovulatorio de LH, teniendo en cuenta que es en este momento cuando existen las concentraciones máximas de estrógenos.

63

4. RESULTADOS

4.1.- OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTIESTROGENOS.

4.1.1.- Título.

Según la metodología empleada el título vendría definido por la concentración de anticuerpo en la cual 0,1 ml. liga el 50% de 5000 cpm. (9000 dpm) de E_1^* / (\approx 3 pg) de esteroide tritiado en un volumen total de 0,3 ml. con un tiempo de incubación de 24 horas a 4° C, separando las fracciones libres y ligadas por un método de absorción mediante carbón-dextrano.

En los cuatro conejos de la experiencia el título más elevado corresponde a la muestra de sangre obtenida a los 5 días de la inyección intravenosa. Sólo el conejo nº 2 responde con títulos aceptables; por esto las determinaciones de especificidad mediante la reacción cruzada eran realizadas únicamente en este animal.

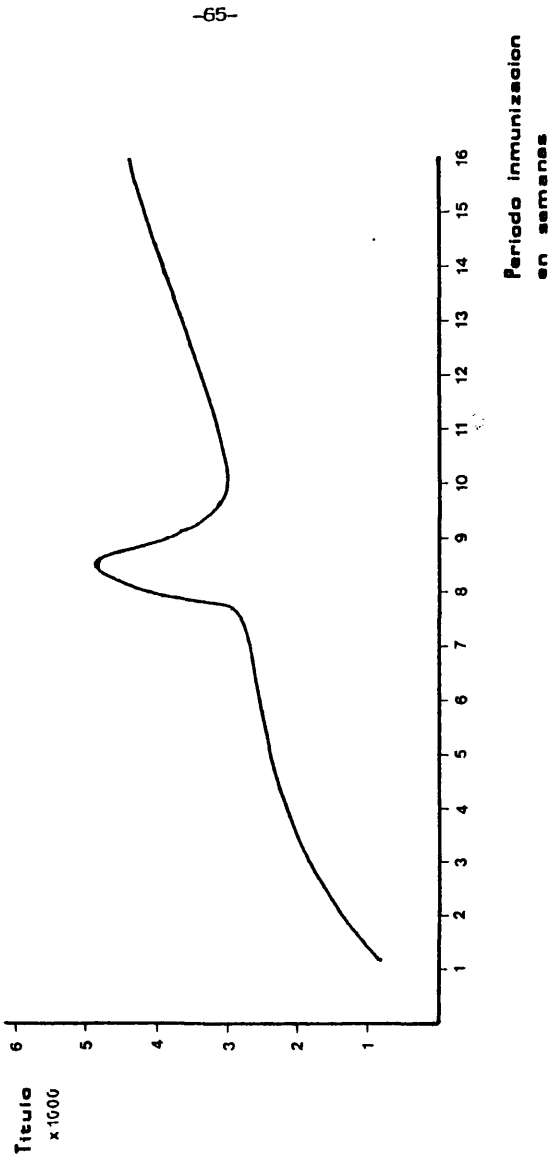
La evolución del título del anticuerpo a lo largo del período de inmunización aparece reflejado en la figura 1.

Como se puede apreciar en la figura el título más elevado, 1/5000, corresponde a la muestra obtenida a los 5 días después de la inyección intravenosa, descendiendo a los valores anteriores dos semanas más tarde. Continuando con el sistema de inmunización descrito se puede conseguir la misma tasa de anticuerpos, siguiendo las inyecciones intradérmicas. En la última muestra tomada en la semana 15ª, el título del anticuerpo 1/4200 se acerca al límite de la obtenida después de la inyección intravenosa, teniendo en cuenta que la curva de la evolución es ascendente.

4.1.2.- Especificidad .

La especificidad de los antiseros era determinada por la reacción cruzada (R.C.), definiéndola como el grado de interferencia con otras sustancias diferentes del esteroide o esteroides que se quieren valorar.

FIGURA 1: Evolución del título del anticuerpo durante el período de inmunización en el conejo nº 2.



En la figura 2 aparecen los resultados de las curvas "standard" (B/Bo) obtenidas para cada uno de los esteroides, en los que se ha determinado la reacción cruzada.

El logit 0 (B/Bo = 50%) corresponde al punto donde la masa de esteroide frío desplaza el 50% del esteroide marcado (E_1^*).

La gama de esteroide frío utilizada era de 3,12 pg hasta 3200 pg.; la dilución del anticuerpo era de 1/5000, 1/15000 dilución final. (Según el volumen de incubación de 0,3 ml) y la hormona marcada de 5000 cpm de E_1^* (9000 dpm).

Los resultados de la reacción cruzada del antisuero con distintos esteroides aparecen reflejados en el Cuadro I.

Se puede apreciar que la reacción cruzada más elevada corresponde al 16-ceto-estradiol y la 16 α -hidroxiestrona, y reacciones cruzadas bastante inferiores con los estrógenos más importantes: 17 β -estradiol y 17 α - estradiol, 27,04% y 20,7% respectivamente.

4.2. PUESTA A PUNTO DE LA TECNICA DE DETERMINACION DE TE_1 , $TE_2\beta$ y $TE_2\alpha$

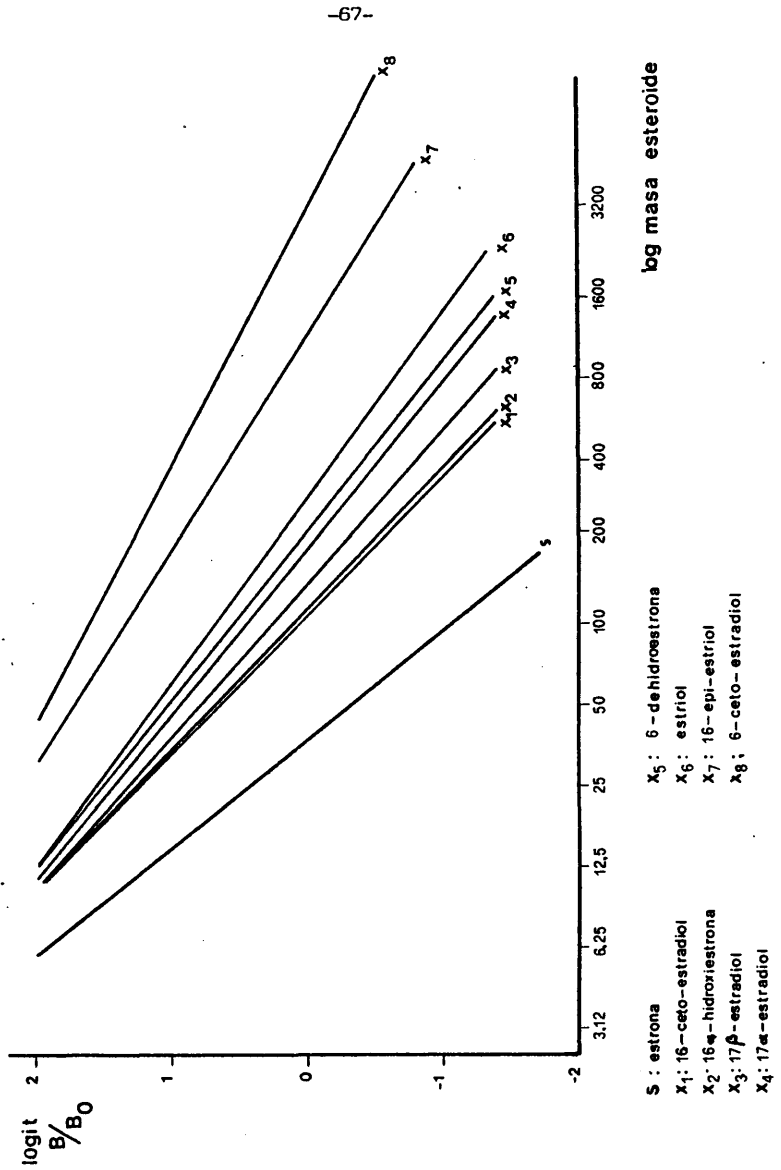
4.2.1. Realización del análisis.

- Hidrólisis.

Buscamos la concentración enzimática mínima necesaria para conseguir una hidrólisis completa (Cuadro II), entre 20%, 10% y 5%. Según los resultados vemos que la concentración del 5% es suficiente teniendo en cuenta que el porcentaje de hidrólisis es, de hecho, superior a los valores del cuadro, ya que el porcentaje de no transformación, es en parte debido a la ineficacia relativa de la extracción.

También en el Cuadro II, se aprecia que la concentración es eficaz para las cantidades de producto a hidrolizar a pesar de las sustancias inhibitoras que eventualmente pueden estar presentes en el plasma.

FIGURA 2: Reacción cruzada de diversos esteroides con el antisuero E₁-17-hidrazona BSA.



CUADRO I

RESULTADOS DE LA REACCION CRUZADA CON DIFERENTES ESTEROIDES OBTENIDA
PARA EL ANTICUERPO E₁ - 17 HIDRAZONA-BSA.

Esteroides	Suero del conejo n° 2 Dilución final 1/15000 (%)
Estrona.	100
17 β - estradiol.	27,04
17 α - estradiol.	20,7
Estriol.	13
6 - Dehidroestrona .	17,3
16 α - Hidroxiestrona.	65,14
16 - Ceto - estradiol.	71,4
6 - Ceto - estradiol.	1,13
16 - epi - estriol.	3,21
Dienestrol.	< 0,01
Dietil-estilbcestrol.	< 0,01
Testosterona .	< 0,01
Progesterona .	< 0,01
Colesterol .	< 0,01

CUADRO II

PORCENTAJE DE E.S. HIDROLIZADA EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE EXTRACTO DE "HELIX POMATIA"

Medio en el cual se ha añadido E. S.	Concentración del extracto de Helix pomatia.	Extracción con Diclórometano			Extracción con éter		
		20%	10%	5%	20%	10%	5%
5 cc. de agua destilada.		85	96	100			97
		100	100	100			99
		86	100	100			96
		86	97	95			100
		85					
1 cc. de plasma + 4 cc. de agua destilada		75	86	80			
		80	80	80			
		76	85	86			
		78	76	86			
		76	77	85			
5 cc. de plasma		70	72	66			88
		70	70	70			89
		69	70	70			88
		69	70	72			89
		66	73	70			87

- . Todas las preparaciones de "Helix pomatia" han sido tratadas con carbón .
- . La variabilidad de los resultados con el diclorometano se debe a la producción de emulsiones .
- . Se han verificado los resultados por extracción con éter ya que el diclorometano extrae parte de E. S.

Se realiza por tanto, la hidrólisis de estrógenos conjugados con 0,5 ml de una solución de extracto de "Helix pomatia" al 5% en tampón acetato pH 4,8. El tratamiento con carbón activo permite reducir pero no anular, el valor del blanco de la preparación enzimática.

El plasma sobre el que va a ser realizado el análisis con un volumen de 2 a 5 ml, se añade en tubos cónicos de 60 ml. A continuación se agrega E_1^* , $E_2^*\beta$ y $E_2^*\alpha$ (alrededor de 1800 dpm en 100 μ l de tampón para cada tubo) que servirán a la medida de la recuperación final. Después se añaden 0,5 ml de la solución de Helix pomatia al 5% en tampón acetato. Los tubos se tapan, se agitan y se dejan en incubación a 37°C.

- Cromatografía.

Los resultados de la separación de los diferentes estrógenos con cada tipo de columna y solvente, aparecen en la figura 3.

Se aprecia que la columna de 5 cm. (a) separa de una manera insuficiente los dos estrógenos y que la segunda de 8 cm. (b), da una buena calidad de separación pero necesita mayores volúmenes de solvente lo que provoca una mayor duración de la cromatografía que es incompatible con los análisis en serie.

Ha sido pues necesario, buscar una solución entre las dos: Elegimos columnas de 6 cm. de longitud y ensayamos los dos sistemas de solventes. En la figura 3 (c) se aprecia que con la mezcla benceno/etanol 85/15 (v/v), la separación es suficiente siendo bajos los volúmenes de solvente y con una separación rápida (30-40 m) por lo que conservamos estas condiciones, ya que la mezcla 95/5 figura 3 (d), no es satisfactoria, por la larga duración de la elución.

Después de la extracción con éter aparecen numerosos lípidos en particular pigmentos carotinoides. Hemos estudiado este punto para asegurar que aquellos no tenían efecto sobre la calidad de la separación (figura 4 (a)).

FIGURA 3: Comparación de diferentes sistemas de cromatografía con columnas de Sephadex LH 20.

E_1 : E_2 : - - - - $E_1 + E_2$: —

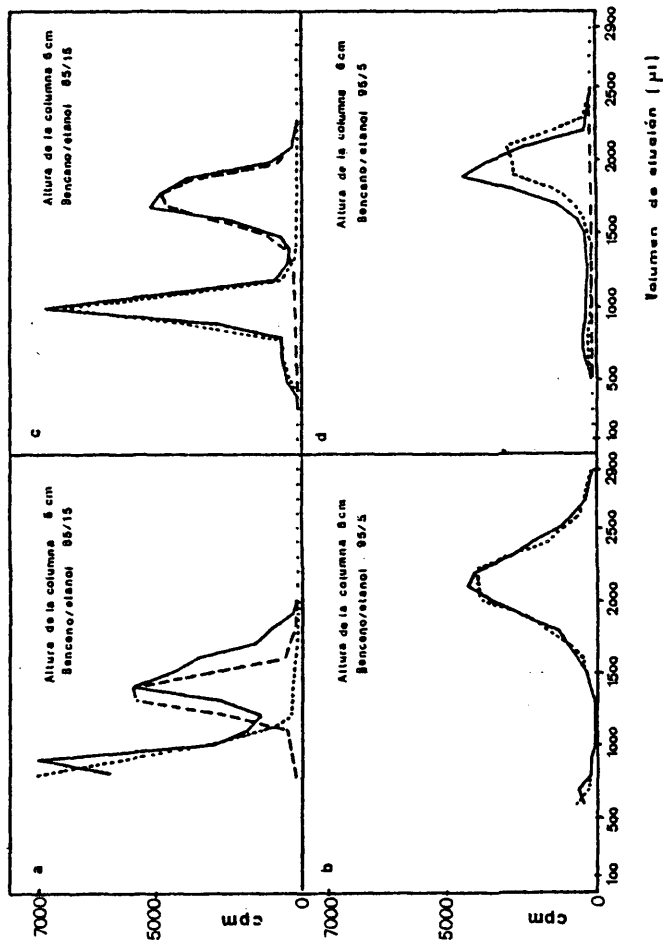
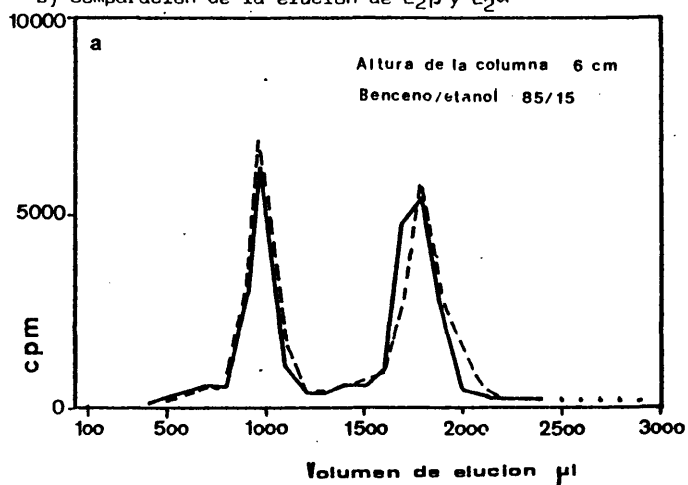
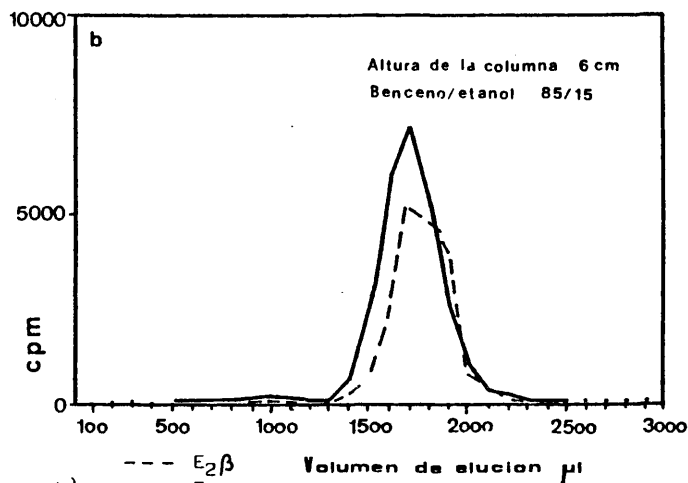


FIGURA 4: a) Efecto de un extracto plasmático sobre la separación de E_1 y E_2 .

b) Comparación de la elución de $E_{2\beta}$ y $E_{2\alpha}$



a): --- muestra sin extracto plasmático
— muestra con extracto plasmático



b): --- $E_{2\beta}$
— $E_{2\alpha}$

Por otro lado también verificamos que el E_2^α , necesita un volumen de elución igual al del E_2^β , en este sistema de cromatografía. A pesar de que la separación es la misma, el E_2^α , comienza a salir un poco antes que el E_2^β , figura 4 (b). Para recoger las dos fracciones hemos ampliado ligeramente el volumen recogido.

Por todo ello, la separación de las fracciones E_1 y E_2 , se realiza sobre microcolumnas de Sephadex LH 20 de 6 cm de altura y 4 mm. de diámetro. El solvente utilizado es una mezcla benceno/etanol 85/15 v.v.

- Oxidación enzimática.

En el Cuadro III se desarrollan los resultados del estudio llevado a cabo variando la duración de la reacción y la concentración de enzima y cofactor, hasta lograr una transformación completa de E_2^β a E_1 permaneciendo invariable el E_2^α .

Las condiciones utilizadas finalmente son:

Temperatura 37°C, duración de la incubación 30 minutos, concentración de DPN = 0,1 mg/tubo y concentración HSD = 0,25 mg/tubo.

- Separación de fracciones libres y ligadas..

En la figura 5 se reflejan los efectos que tiene sobre la curva standard la variación en la concentración de carbon, como método de absorción.

Intentamos reducir esta concentración, pero el porcentaje de radiactividad libre, no absorbida, se incrementa. Es el 2% para las condiciones descritas y 4% y 9% cuando la concentración es de 1/2 y 1/10 respectivamente. Se produce además una disminución de la pendiente de la curva standard lo que se traduce en una pérdida de sensibilidad (figura 5).

Como en todos los métodos, se puede medir la fracción libre o la ligada. Después de la centrifugación, hemos intentado medir la radiacti-

CUADRO III

OXIDACION ENZIMATICA DE $E_2\beta$ Y DE $E_2\alpha$ EN DIFERENTES CONDICIONES DE DURACION DE INCUBACION Y DE CONCENTRACION DE ENZIMA (HSD) Y COFACTOR (DPN).

a) Efecto de la duración de incubación.

Tiempo (mn)	120	60	30
% de $E_2\beta$ oxidado	91,0	94,3	93,8
	92,0	91,2	94,7
	93,0	93,0	93,2
% de $E_2\alpha$ oxidado	69,0	52,6	41,2
	71,0	53,4	46,6
	70,3	53,0	45,0

. Concentración HSD 1*
 . Concentración DPN 1*

b) Efecto de la concentración de DPN.

Concentración DPN	1	1/2	1/10	1/20
% de $E_2\beta$ oxidado	92,8	93,5	93,8	93,6
	94,7	95,0	94,0	94,2
	93,2	94,8	94,5	94,5
% de $E_2\alpha$ oxidado	41,2	34,5	15,4	11,3'
	46,6	34,6	16,0	11,2
	45,0	33,0	15,3	11,6

. Duración de la incubación 30 mn.
 . Concentración HSD: 1.

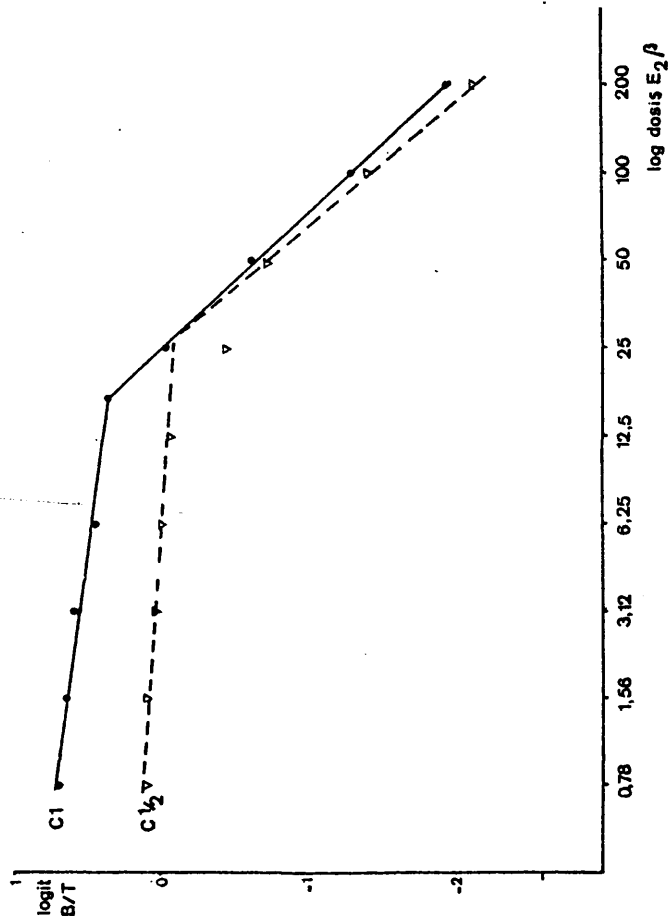
c) Efecto de la concentración de HSD.

Concentración HSD	1	1/2	1/5	1/10
% de E_2 oxidado	93,8	94,6	95,0	94,2
	94,0	94,0	96,0	96,0
	93,0	95,3	94,5	96,2
% de E_2 oxidado	11,5	9,2	4,4	3,1
	12,6	8,3	4,7	3,2
	11,7	8,1	4,6	3,2

. Duración de la incubación 30 mn.
 . Concentración de DPN 1/20.

* La concentración 1 es la dada por ATTAL (1970)
 La temperatura de incubación es siempre a 37°C.

FIGURA 5: Comparación de curvas "standard" obtenidas con concentraciones de carbón:
1 (62,5 mg/100ml.) y 1/2 (31,25 mg/100 ml.).



vidad depositada en el fondo, absorbida por el carbón, pero ni el tratamiento con un ácido concentrado ni el metanol permiten una buena recuperación. En consecuencia la curva "standard" obtenida era de mala calidad, esencialmente porque la pendiente de las curvas estaba disminuida, ($-0,127$ y $-0,928$ frente a $-0,033$ y $0,319$) (figura 6).

Por ello hemos decidido medir la fracción ligada en el sobrenadante que puede ser recuperada por decantación o por pipetaje de una fracción alícuota. La decantación es más rápida pero los valores obtenidos para cada punto de la gama están muy dispersos, porque parte del carbón se desprende del fondo.

En definitiva después de la centrifugación, recuperamos 0,8 ml. de sobrenadante que son llevados a un vial para medir en un contador de centelleo líquido, añadiendo previamente el líquido de centelleo.

El análisis de resultados para la determinación de cada una de las concentraciones de estrógenos en las muestras problema, se realiza mediante una curva "standard", comprendida entre 0,78 y 200 pg.

El porcentaje de "binding" para cada punto de la gama aparece descrito en la figura 7.

En esta misma figura se refleja la linearización de la curva en el sistema logit/log., con el fin de poder introducir las características de ésta en el calculador programable.

4.2 .2.- Tasa de recuperación.

La tasa de recuperación al final del análisis viene determinada por las pérdidas habidas a lo largo de la manipulación en cada una de las etapas de la técnica.

Para estudiar las pérdidas hemos medido la radiactividad que quedaba en los tubos después de cada etapa (Cuadro IV).

FIGURA 6: Comparación de curvas "standard" obtenidas cuando se mide la radiactividad del sobrenadante o la del fondo.

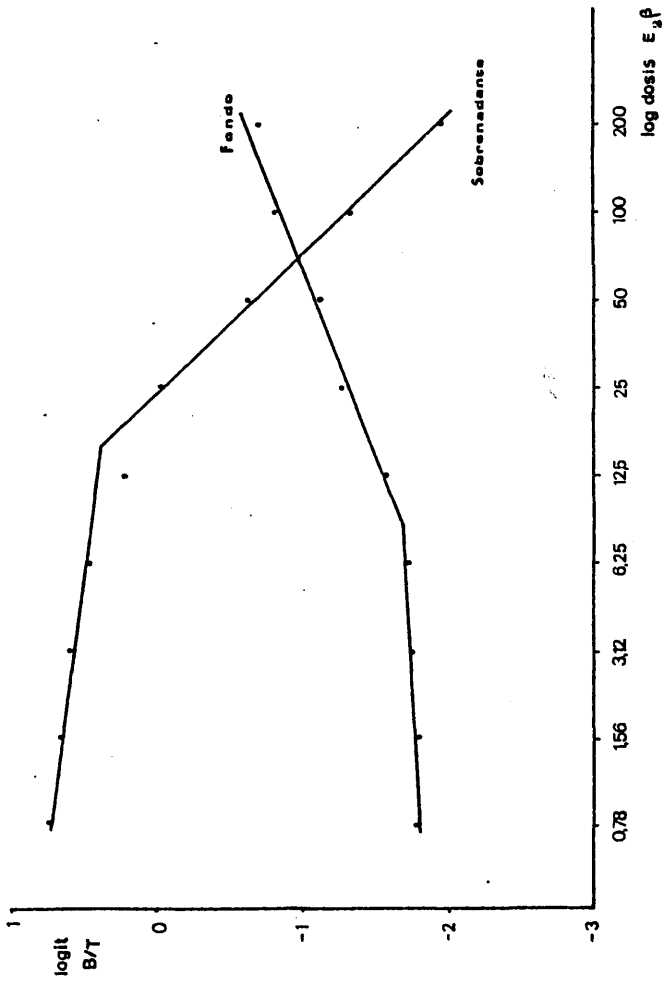
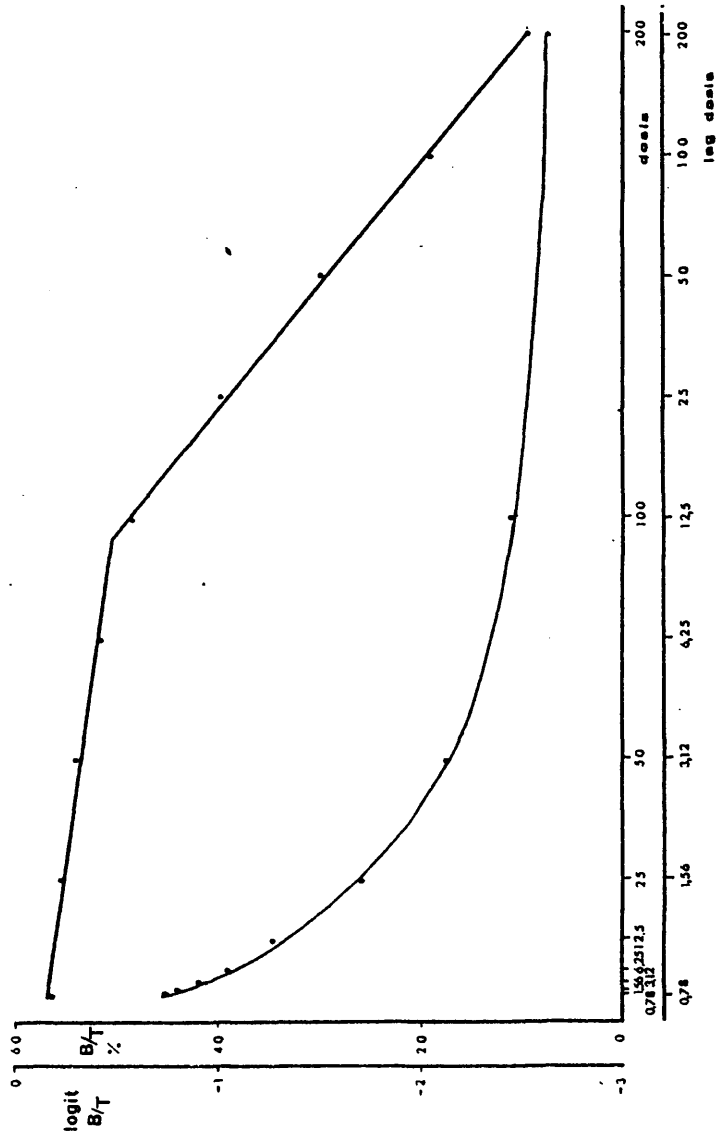


FIGURA 7: Comparación de curvas "standard" según dos métodos de representación.



CUADRO IV

PORCENTAJE DE LA MUESTRA DE PARTIDA DEJADA EN EL TUBO EN EL TRANSCURSO DE LAS DIFERENTES MANIPULACIONES.

Muestras.	Después de extracción del plasma.	Después de depositar en la columna de LH ₂ O.	Después de oxidación enzimática y extracción.	Después del segundo paso en columna de LH ₂ O.	Después de recoger la muestra en tampón.
1	3	1,30	2,40	2,30	4
2	4,70	1,50	2,80	1,90	6,40
3	3	1,90	3,40	1,90	4
4	2,70	1,90	3,20	2,30	5,2
5	3	2,40	2,80	1,70	7,6
Media	3,30	1,80	2,90	2	5,44

Estas cantidades de esteroides, que quedan en el tubo después de recogido el extracto con tampón, alcanzan un 15%, aunque de hecho, lo esencial de las pérdidas se produce en la etapa de cromatografía. Para cada uno de los esteroides estudiados se recupera en la fracción seleccionada de un 80% a un 85% de la muestra colocada en la columna. Hay que significar que cuando la E_1 , es pasada por la columna y ésta proviene de una solución acuosa, la recuperación es sólo del 70%. La diferencia con los resultados obtenidos cuando ésta se añade con un extracto plasmático parece debido al efecto protector de los esteroides y/o a los lípidos presentes en el extracto, ya que si hacemos pasar el blanco de agua sobre la columna, habiendo previamente añadido un extracto plasmático, la recuperación vuelve a la tasa normal.

Después de las etapas de purificación, se recupera el 79% de TE_1 presente al comienzo, 66% de $TE_2\beta$ y 66% de $TE_2\alpha$. Estos resultados aparecen descritos en el Cuadro V.

4.2.3.- Valores blancos.

Para reflejar las sustancias que tenían más influencia hemos hecho un estudio sistemático de todos los elementos que podían afectar a la calidad de la técnica (Cuadro VI).

Como se puede ver los dos principales responsables son la preparación de "Helix pomatia" y el éter etílico cuya importancia ha podido ser disminuida pero no anulada.

En estas condiciones se tenía que conseguir que el valor blanco no afectara la calidad del análisis, para lo cual comparamos una curva "standard" con otra, en la cual, cada una de las concentraciones de la misma contenía el residuo de todos los productos que intervienen en la técnica. Como se aprecia en la figura 8 el blanco afecta directamente a la curva "standard" y de una manera significativa a los resultados.

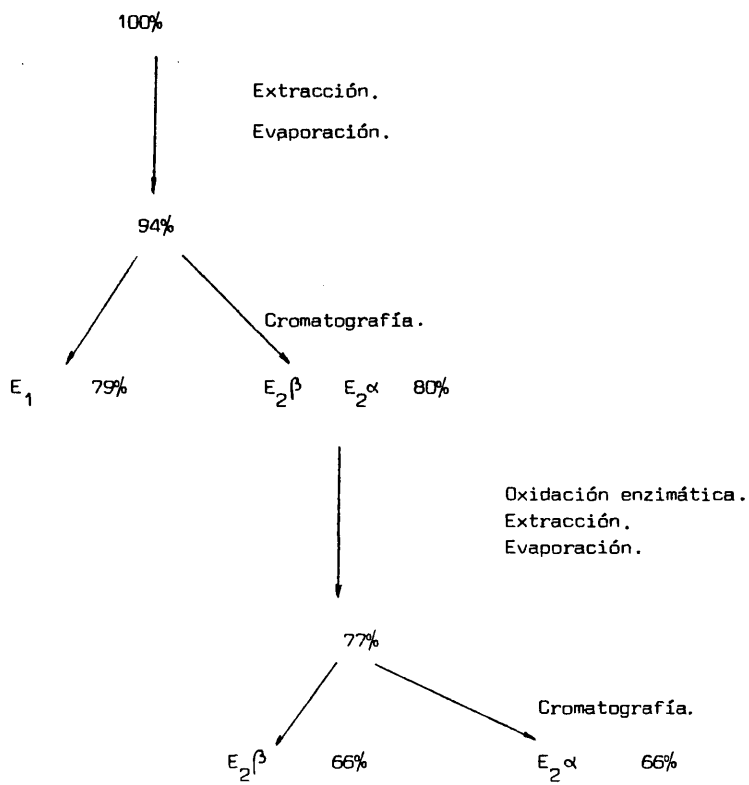
Para el $E_2\beta$, analizado con un anticuerpo no específico las rectas son paralelas pero no confundidas, mientras que sí lo son para

CUADRO V

RECUPERACION EN EL ANALISIS.

Recuperación total.

Muestra de partida.



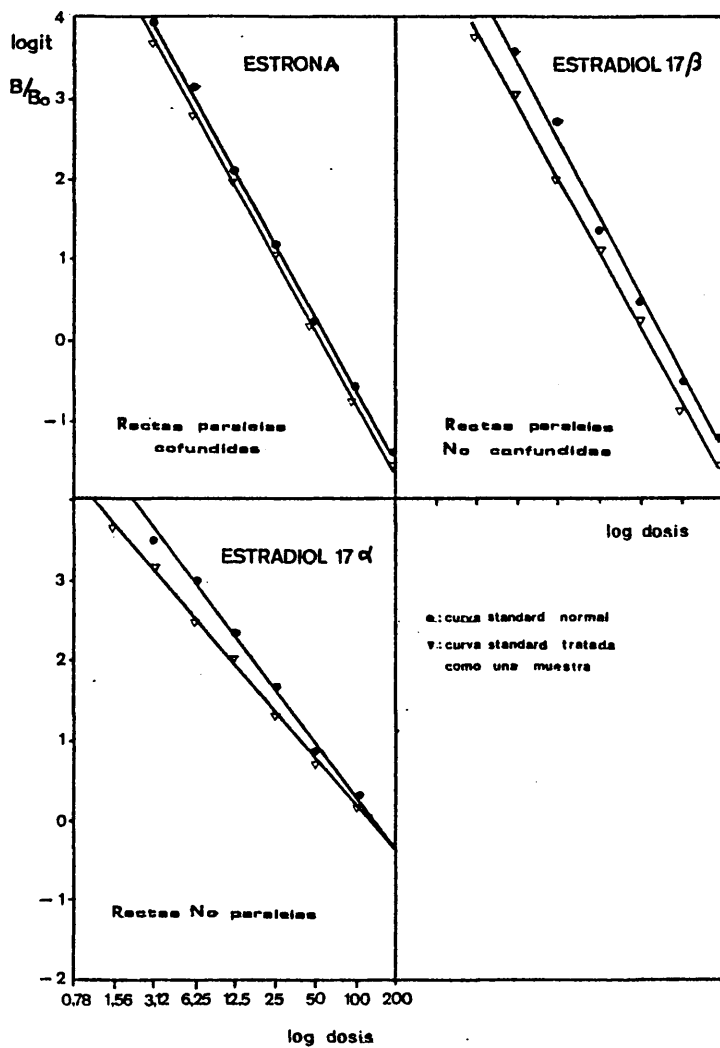
CUADRO VI

VALOR BLANCO PARA LOS PRODUCTOS UTILIZADOS (En equivalente E₁).

SOLVENTES.	Ciclohexano / Acetato de etilo 1/1 (5 ml)	1,1 pg.
	Diclorometano (5 ml)	n.d.*
	Eter etílico (30 ml)	17 pg.
	Eter etílico después de destilación	4 pg.
	Benceno / Etanol 85/15 (v.v.) (2 ml.)	n.d.*
HELIX POMATIA.	0,5 c.c. de solución al 5% en tampón acetato	15-20 pg.
	0,5 c.c. después de tratamiento con carbón 3 veces	12 pg.
	0,5 p.c. después de tratamiento con carbón 5 veces	11,5 pg.*
	Tampón acetato	n.d.*
HSD + OPN.	Después del paso por columna	
	: fracción E ₁	8-10 pg.
	: fracción E ₂	15 pg.

* n.d. : no detectable

FIGURA 8: Efecto del valor blanco sobre las curvas "standard" *



la E_1 . Para el E_2 las rectas no son paralelas.

A pesar de que utilizando un anticuerpo específico para la determinación de E_2 el efecto del blanco no sería sensible, las curvas "standard" han sido realizadas de la misma forma que para el resto.

La gama "standard" ha sido siempre tratada como una muestra a fin de que la comparación de los valores desconocidos con los de referencia estén justificados. En estas condiciones, los resultados del blanco son despreciables.

4.2.4.- Sensibilidad.

Se ha determinado la sensibilidad para cada punto de la curva "standard" desde 0,78 pg a 200 pg realizándose el cálculo $(G_2 - G_1)$. Los resultados aparecen en el Cuadro VII.

Como se puede ver para el E_2 , la sensibilidad es buena a lo largo de toda la curva "standard"; sin embargo para E_1 , no lo es más que a partir de los 12,5 pg. La sensibilidad siendo constante en valor absoluto, es mejor en valor relativo a medida que las dosis son más importantes.

La sensibilidad del análisis depende de la sensibilidad de la curva "standard", de la recuperación y del blanco. Para nuestro análisis, los valores aparecen reflejados en el Cuadro VIII.

Se puede apreciar que las diferencias entre muestras inferiores a 5 ó 10 pg deben ser consideradas como consecuencia de límites de sensibilidad del método. Teniendo en cuenta los volúmenes de plasma utilizados (2 a 5 ml), ello quiere decir, que no debemos dar significación fisiológica a las variaciones en concentraciones inferiores a 2-5 pg/ml.

4.2.5.- Especificidad.

Dos criterios son utilizados para verificar la calidad del análisis:

CUADRO VII

SENSIBILIDAD DE LA CURVA "STANDARD".

Punto de la gama (G_1)	Cantidad necesaria para tener un efecto significativo ($G_2 - G_1$)		
	E_1	E_2^β	E_2^α
0,78	7,15	1,32	2,58
1,56	7,27	1,90	2,33
3,12	7,23	1,46	2,18
6,25	6,99	1,86	2,57
12,5	1,42	1,59	1,48
25	1,37	1,27	1,12
50	1,28	1,09	1,17
100	1,10	1,27	1,24
200	1,12	1,31	1,26

CUADRO VIII

SENSIBILIDAD DEL ANALISIS: CANTIDAD NECESARIA EN LA MUESTRA PARA OBTENER UN EFECTO SIGNIFICATIVO DURANTE EL ANALISIS

Punto de la gama (pg)	E_1 (pg)	$E_2\beta$ (pg)	$E_2\alpha$ (pg)
0,78	*	9,9	*
1,56	*	14,25	*
3,12	*	10,58	*
6,25	*	14	23,36
12,5	5,38	10,7	13,45
25	5,20	9,52	10,18
50	4,85	8,17	10,63
100	4,17	9,52	11,27
200	4,24	9,82	11,45

* Los cálculos no han sido hechos para aquellos puntos que son inferiores al límite de detección.

a) Estudio de las reacciones cruzadas: Estos resultados han sido dados precedentemente para cada uno de los antisueros utilizados. Ninguno de los esteroides "clásicos" es susceptible de interferir en el análisis, bien sea por la especificidad propia de los anticuerpos o por que previamente han sido separados por la cromatografía.

b) Estudio de las concentraciones en volúmenes crecientes de plasma: Esta determinación permite asegurar que ningún producto presente en el plasma (esteroide u otro) interfiere en el análisis. Los resultados se exponen en el cuadro IX.

4.2.6.- Exactitud y precisión.

Para apreciar estos dos criterios seguimos dos métodos: Medida de cantidades conocidas de esteroides añadidos al plasma y medida de volúmenes creciente de plasma.

En el primer método, para determinación de la exactitud, la cantidad de esteroides medidos en el análisis debe de tener un coeficiente de correlación teórico de 1, con la cantidad añadida.

Esta prueba ha sido realizada añadiendo, a un plasma "exento", cantidades conocidas de los tres estrógenos. La cantidad de plasma es constante para todos los análisis (4 ml). Los resultados se muestran en el cuadro X.

El segundo método de medida de cantidades crecientes de plasma es el mismo que el de la especificidad. Ver cuadro IX.

4.3.- NIVELES DE ESTROGENOS EN LA VACA.

4.3.1.- En el ciclo sexual.

Los resultados de las concentraciones de $E_2\beta$, TE_1 , $TE_2\beta$ y $TE_2\alpha$, a lo largo de los 27 días de tomas de muestras, aparecen reflejados en el cuadro XI, y en la figura 9, donde se reflejan las curvas con los valores medios y la desviación "standard" de los niveles de

CUADRO IX

MEDIDA DE TE_1 , TE_2^β y TE_2^α EN DIFERENTES VOLUMENES DE PLASMA .

Volumen de plasma (ml)	Cantidad de estrógenos (pg)(*)	Desviación "standard"		Concen tración pg./ml.	
		pg	%		
TE_1 : 2	43	2,27	7,1	16	
	4	4,33	6,1	17,8	
	6	101	6,46	6,4	16,8
TE_2^β : 2	42	2,22	5,3	21	
	4	92	6,44	7,0	23
	6	123	17,3	14,1	20,5
TE_2^α : 2	74	19,46	26,3	37	
	4	138	29,8	21,6	34,5
	6	217	24,3	11,2	36,2

(*) Media de 4 muestras: n = 4.

CUADRO X

MEDIDA DE CANTIDADES CONOCIDAS DE ESTROGENOS AÑADIDOS AL PLASMA.

Esteroides	Masa de esteroide añadida (pg)	Masa determi nada en pg (1)	Desviación "standard"	
			pg	%
TE ₁	25	26,2	1,78	6,8
	50	47,2	2,26	4,8
	100	95,4	6,10	6,4
	200	191,4	17,03	8,9
TE ₂ ^β	25	23,7	1,58	6,7
	50	52,8	3,22	6,1
	100	96	10,65	11,1
	200	197	26,9	13,7
TE ₂ ^α	25	27,6	4,91	17,8
	50	51,6	8,41	16,3
	100	97,3	22,47	23,1
	200	189,4	27,37	14,4

(1) Media de 4 muestras: n = 4.

las diez vacas en experiencia.

Los ciclos estudiados no tenían todos la misma duración, oscilando entre 21-23 días, pero han sido standardizados considerándose los días 1 al 10 después del celo y días -10 a 0 del celo próximo (D_0 , día del celo).

Desde un punto de vista cuantitativo, las concentraciones más elevadas corresponden al TE_2^α , con variaciones de 15 a 70 pg/ml a continuación las de TE_1 , con valores de 15 a 37 pg/ml, más débiles las de TE_2^β , con una variación de 2 a 32 pg/ml y las más inferiores las de E_2^β , que alcanzaban unas cifras de 2 a 18 pg/ml.

Las modificaciones de la concentración plasmática en el curso del ciclo, sólo aparecen netas para el TE_2^β ,. Aparece un pico con una duración aproximada de tres días presentando un máximo el día anterior al celo (D_{-1}). Estos resultados son comparables a los obtenidos con el E_2^β , sólo, incluso el comienzo del incremento de los niveles basales hasta el máximo preovulatorio comienza 48 horas antes del celo. El día después del celo (D_1) los valores declinan rápidamente a niveles basales.

Aparte del incremento neto preovulatorio, aparecen dos periodos de elevación para el E_2^β , y TE_2^β , alrededor de los días 6 y 7 y los días 10 y 12, incrementos, que en ningún caso llegan a alcanzar los del día -1 (D_{-1}).

Para la TE_1 , no existen variaciones representativas a lo largo del ciclo sexual y sólo aparecen pequeñas fluctuaciones. El día anterior al celo no se aprecia ningún incremento notable de la concentración de esta hormona, así como tampoco de aquellos días del ciclo que se producen ligeros incrementos del TE_2^β .

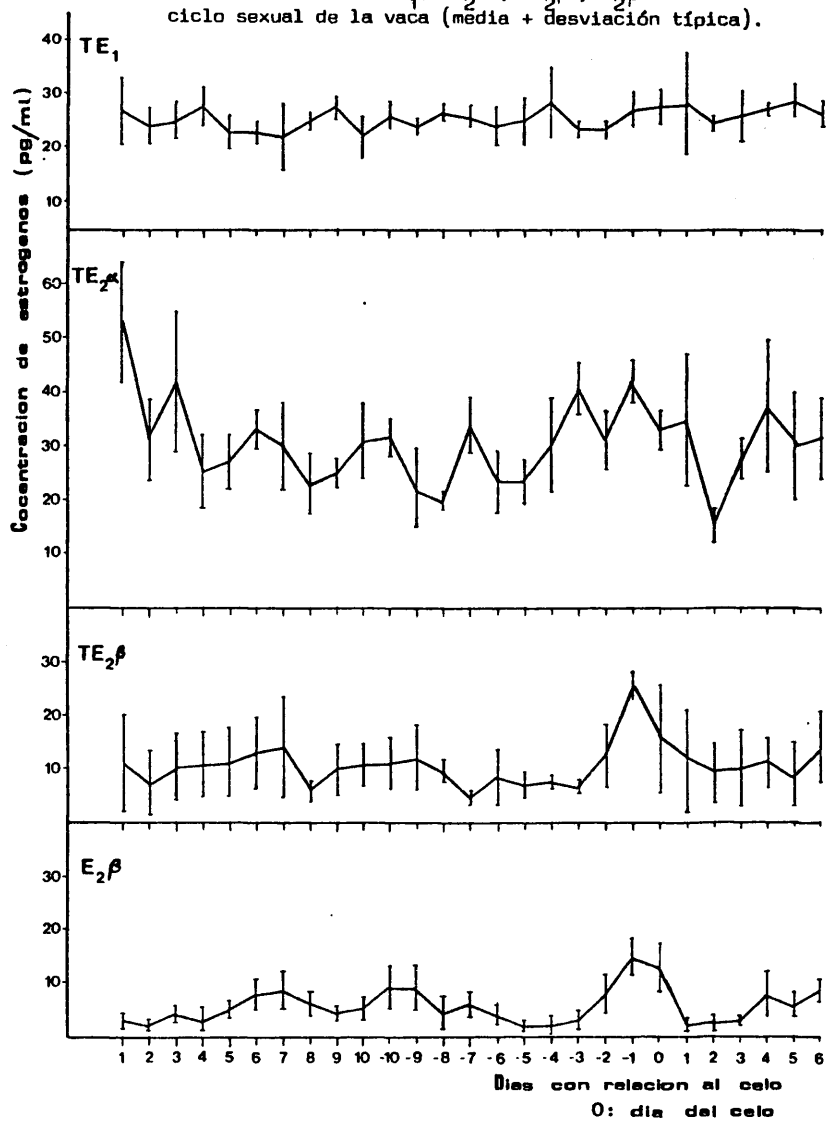
Tampoco el TE_2^α , presenta ningún tipo de variación neta de los niveles, en un momento determinado del ciclo, principalmente los días anteriores al celo.

CUADRO XI

CONCENTRACIONES DE TE_1 , TE_2^{β} , TE_2^{α} y E_2^{β} EN EL CICLO SEXUAL DE LA VACA, MEDIA Y DESVIACION "STANDARD" (0 DIA DEL CELO).

Días	TE_1	TE_2^{β}	TE_2^{α}	E_2^{β}
1	26,7 ⁺ _{-6,1}	11,3 ⁺ _{-9,1}	53 ⁺ _{-11,3}	3 ⁺ _{-1,5}
2	24,3 ⁺ ₋₃	7 ⁺ ₋₆	31,5 ⁺ _{-6,9}	2,2 ⁺ _{-1,2}
3	25,2 ⁺ _{-3,6}	10 ⁺ _{-5,8}	42 ⁺ _{-13,2}	4,4 ⁺ _{-1,4}
4	27,5 ⁺ _{-3,5}	10,7 ⁺ _{-6,1}	25,3 ⁺ _{-6,5}	2,8 ⁺ ₋₂
5	23,3 ⁺ ₋₃	11 ⁺ ₋₆	26,8 ⁺ _{-5,1}	5,4 ⁺ _{-1,6}
6	22,5 ⁺ _{-2,5}	13 ⁺ _{-6,4}	32,7 ⁺ _{-3,9}	8 ⁺ _{-3,8}
7	22 ⁺ _{-6,3}	14,3 ⁺ _{-8,8}	29,6 ⁺ ₋₈	8,6 ⁺ _{-3,6}
8	25,2 ⁺ _{-1,4}	5,8 ⁺ _{-1,4}	22,8 ⁺ _{-5,6}	6 ⁺ ₋₂
9	27,3 ⁺ _{-2,1}	10,6 ⁺ _{-3,8}	25 ⁺ _{-2,2}	4,7 ⁺ _{-1,4}
10	22,5 ⁺ _{-3,3}	10,6 ⁺ ₋₄	31 ⁺ _{-6,8}	5,3 ⁺ ₋₂
-10	25,6 ⁺ _{-3,1}	11,1 ⁺ _{-4,6}	31,7 ⁺ _{-3,3}	9 ⁺ _{-3,9}
-9	23,7 ⁺ _{-1,8}	12,2 ⁺ _{-6,1}	21,6 ⁺ _{-8,3}	9,2 ⁺ ₋₄
-8	26,5 ⁺ _{-1,5}	9,4 ⁺ _{-2,5}	19,9 ⁺ _{-1,8}	4,3 ⁺ _{-3,8}
-7	25,5 ⁺ _{-2,6}	4,7 ⁺ _{-1,2}	33,4 ⁺ _{-5,6}	6,1 ⁺ ₋₃
-6	24 ⁺ _{-4,2}	8,2 ⁺ _{-5,1}	22,8 ⁺ _{-5,1}	3,8 ⁺ _{-2,2}
-5	25,7 ⁺ ₋₄	7 ⁺ ₋₃	23 ⁺ _{-4,2}	2 ⁺ ₋₁
-4	28,6 ⁺ _{-5,9}	7,1 ⁺ _{-0,8}	30,7 ⁺ ₋₉	2,2 ⁺ _{-1,5}
-3	23 ⁺ _{-1,4}	6,5 ⁺ _{-1,1}	40,2 ⁺ _{-5,2}	3,2 ⁺ _{-1,8}
-2	23,3 ⁺ _{-2,2}	12,4 ⁺ _{-5,2}	31 ⁺ _{-4,2}	8,1 ⁺ _{-3,2}
-1	27,1 ⁺ _{-3,6}	25,3 ⁺ _{-3,1}	42,2 ⁺ _{-3,9}	14,8 ⁺ _{-3,5}
0	27,4 ⁺ _{-3,4}	15,8 ⁺ _{-9,9}	33,3 ⁺ _{-3,1}	12,6 ⁺ _{-4,5}
1	28,3 ⁺ _{-9,1}	11,9 ⁺ _{-8,1}	34,3 ⁺ _{-11,8}	2 ⁺ _{-1,1}
2	25,2 ⁺ _{-1,5}	9,8 ⁺ ₋₅	15 ⁺ _{-2,3}	2,5 ⁺ _{-1,4}
3	25,9 ⁺ _{-4,5}	10,5 ⁺ _{-6,8}	27,8 ⁺ ₋₃	3 ⁺ ₋₁
4	26,8 ⁺ _{-1,5}	11,6 ⁺ _{-4,3}	31,8 ⁺ _{-11,8}	7,7 ⁺ _{-4,2}
5	29,1 ⁺ ₋₃	8,5 ⁺ _{-6,2}	30,2 ⁺ _{-8,8}	5,8 ⁺ _{-2,3}
6	26 ⁺ _{-2,5}	13 ⁺ _{-7,6}	31,3 ⁺ _{-7,1}	8,6 ⁺ _{-2,1}

FIGURA 9: Concentraciones de TE_1 , TE_2^α , TE_2^β y E_2^β durante el ciclo sexual de la vaca (media + desviación típica).



En los valores medios para TE_2^α , de la figura 9, se aprecia una cierta tendencia a niveles más elevados en la proximidad del celo, pero cuando se observan las concentraciones para cada uno de los animales estudiados, no aparecen picos sincrónicos.

4.3.2. Superovulación.

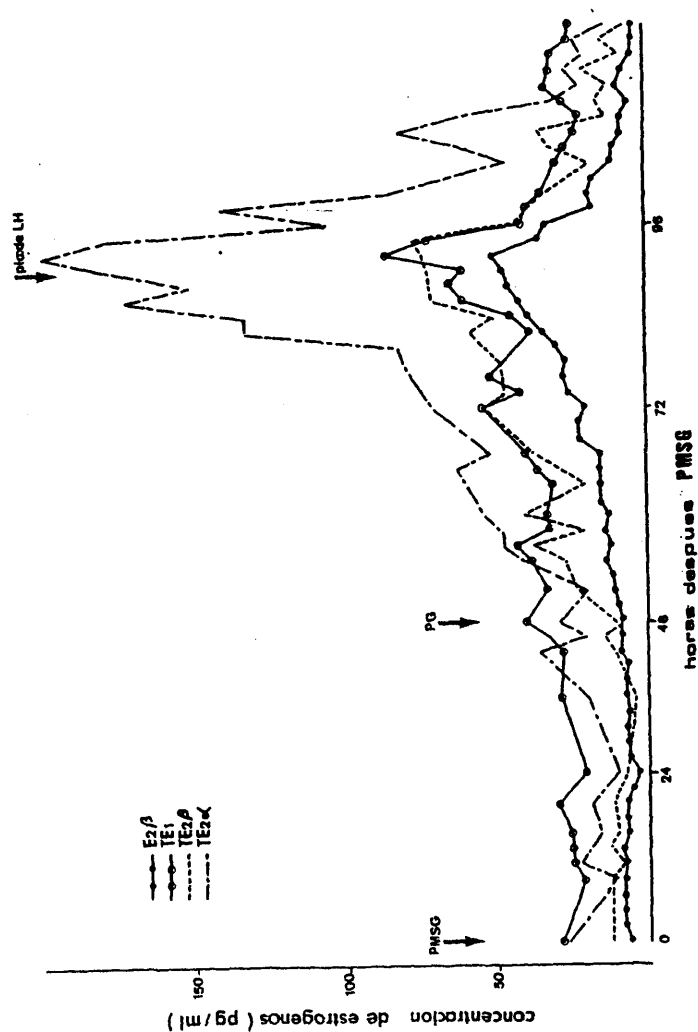
La novilla nº 52 que había recibido un tratamiento de 2000 U.I. de PMSG, responde a la estimulación con 9 ovulaciones. La evolución de los niveles de E_2^β , TE_2^β , TE_1 y TE_2^α , aparecen reflejados en la figura 10, con las concentraciones correspondientes, de cada una de las 61 muestras recogidas a intervalos de 2 horas.

En esta novilla la aparición del celo y el pico de LH, son respectivamente a las 48 y 40 horas, después de la inyección de prostaglandina F_2^α .

A partir de las 24 horas de la inyección de PMSG, las concentraciones de los diferentes estrógenos conjugados y el E_2^β , ponen en evidencia, una evolución sincrónica, alcanzando un máximo, en el caso de este animal, 2 horas más tarde del pico de LH, salvo para la TE_1 , que aparece 4 horas después del mismo. A partir de este momento los niveles descienden bruscamente y a las 24-26 horas alcanzan su nivel basal, que corresponde a la concentración existente antes del tratamiento.

Desde un punto de vista cuantitativo, hay que hacer notar que en todo el período estudiado, la relación de los diferentes estrógenos, en función de las concentraciones medidas, es constante, siendo por orden decreciente: $TE_2^\beta, TE_1, TE_2^\beta, E_2^\beta$. Por otro lado hay que añadir que para el TE_2^α , además de ser el de mayor elevación en el pico preovulatorio, también se observa el mayor aumento relativo (concentración máxima/concentración media durante las primeras 24 horas), siendo de 10,6, mientras que es de 6,9, 3,4 y 7,0 respectivamente para E_2^β , TE_1 y TE_2^β . Estos resultados aparecen reflejados

FIGURA 10: Niveles de $E_2\beta$, TE_1 , $TE_2\beta$, $TE_2\alpha$ en el plasma periférico de una novilla que había recibido un tratamiento PMSG-PG.



CUADRO XII

AUMENTO RELATIVO DE DIFERENTES ESTROGENOS DEPUES DE LA ESTIMULACION
POR PMSG.

Esteroides	Media (pg/ml)	Pico (pg/ml)	Aumento relativo
$E_2\beta$	7,4	51	6,89
TE_1	25,6	86	3,36
$TE_2\beta$	11,04	77	6,97
$TE_2\alpha$	18,75	199	10,61

en el cuadro XII.

Estas dos observaciones se confirman respectivamente por el valor del coeficiente de correlación entre el $E_2\beta$, no conjugado y los diferentes estrógenos medidos después de la hidrólisis y por la pendiente de la recta de regresión correspondiente. (Cuadro XIII)

Los resultados de la superovulación en las 9 novillas de la experiencia, así como, el intervalo entre la inyección de $PGF_2\alpha$ y aparición del celo, aparecen reflejados en el cuadro XIV. El número de ovulaciones oscila entre 1 y 27 sin existir ninguna correlación entre dosis de PMSG administrada y número de cuerpos luteos a los 9 días de la inyección. El intervalo entre la administración de $PGF_2\alpha$ y la aparición del celo es en todas las novillas de 48 horas, excepto en una de ellas en la cual aparece a las 72 horas.

De las diez muestras analizadas antes y después del pico de LH, se ha tomado la concentración máxima de $E_2\beta$, $TE_2\beta$, TE_1 y $TE_2\alpha$. En todos los animales aparecen picospreovulatorios sincrónicos de estrógenos, excepto para la TE_1 , en la cual aparecen más o menos distanciados, o no aparecen como sucede en algunas de las novillas.

La aparición e intervalo de estos picos de estrógenos y su relación con el pico preovulatorio de LH, aparece reflejado en el cuadro XV.

Los niveles basales de LH oscilan entre 0,4 y 1 ng/ml y el pico preovulatorio aparecía a las $44,0 \pm 4,9$ horas después de la inyección de $PGF_2\alpha$ (valores medios y desviación "standard" con una concentración entre 8 y 38 ng/ml). El valor de la desviación "standard" muestra que con este criterio más preciso para detectar el comienzo del celo (observaciones cada 2 horas frente a dos veces por día), se aprecia que la sincronización con este método de estimulación, es bastante buena.

CUADRO XIII

CORRELACION ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE $E_2\beta$ Y LOS DIFERENTES ESTROGENOS ESTUDIADOS .

	$E_2\beta / TE_1$	$E_2\beta / TE_2\beta$	$E_2\beta / TE_2\beta$	$E_2\beta / TE_2\beta + TE_2\alpha$	$E_2\beta / TE_2\beta + TE_2\alpha$	$E_2\beta / TE_2\beta + TE_2\alpha$
<u>Correlación</u>	0,871	0,914	0,918	0,935	0,936	0,936
<u>Pendiente</u>	0,923	1,508	3,633	5,130	6,123	6,123
<u>Recta de regresión</u>						
<u>Ordenada en el origen</u>	20,861	4,898	0,567	5,640	25,946	25,946

CUADRO XIV

APARICION DEL CELO, DOSIS DE PMSG Y NUMERO DE OVULACIONES EN LAS NOVILLAS TRATADAS .

Número del animal.	Dosis PMSG (U.I.)	Intervalo PGF _{2α} -celo (horas)	Número de ovulaciones.
48	2.400	48	12
44	2.000	48	1
51	1.200	72	1
41	1.200	48	14
47	2.000	48	17
45	2.400	48	20
55	2.000	48	27
50	1.200	48	9
52	2.000	48	9

CUADRO XV

CONCENTRACIONES MAXIMAS (PICOS) DE LH Y ESTRADIOL ($E_2\beta$, $TE_2\beta$ Y $TE_2\alpha$ SINCRONOS).

Número animal.	Intervalo PGF $_{2\alpha}$ -LH (horas)	Intervalo PGF $_{2\alpha}$ - E_2 (horas)	Relación E_2 - LH (horas)	Número de ovulaciones.
46	50	46	- 4	12
44	46	44	- 2	1
51	72	72	0	1
41	48	50	+ 2	14
47	52	52	0	17
45	40	38	- 2	20
55	38	36	- 2	27
50	48	48	0	9
52	42	44	+ 2	9

El pico de estrógenos también aparece sincronizado cerca del pico de LH, entre las 84 y 100 horas de la inyección de PMSG, apareciendo indistintamente -2, 0 ó +2 horas, en relación con la LH.

Se aprecia también una relación entre el intervalo $PGF_2\alpha$ -LH y el número de ovulaciones. En aquellas novillas con mayor número de ovulaciones (números 45 y 55) que alcanzaron 20 y 27 ovulaciones respectivamente este intervalo es el más corto con 38 y 36 horas.

Los resultados del estudio de las correlaciones entre el número de ovulaciones y las concentraciones máximas de estrógenos aparecen indicadas en el cuadro XVI. Las correlaciones son siempre positivas y significativas, siendo para el $E_2\beta$, más precisa. Al comprobar las pendientes de las curvas correspondientes (figura 11), se aprecia que es para el $TE_2\alpha$, donde el incremento de las concentraciones máximas relacionadas con el número de ovulaciones es más importante, cerca de dos veces la de $E_2\beta$.

Hay que hacer también notar que el valor de la ordenada en el origen de las rectas de regresión puede ser clasificado por el mismo orden de importancia, según el mismo rango que habíamos puesto en evidencia a propósito en la figura 10.

A partir de estos resultados, un método de determinación del número de ovulaciones se podría realizar sobre la medida de concentraciones máximas de estrógenos. La medida simultánea de $TE_2\beta$ y $TE_2\alpha$ tendría un poder discriminativo mayor que la medida de $TE_2\beta$ sólo; los coeficientes de correlación son comparables y la pendiente de la recta de regresión es casi dos veces más importante.

CUADRO XVI

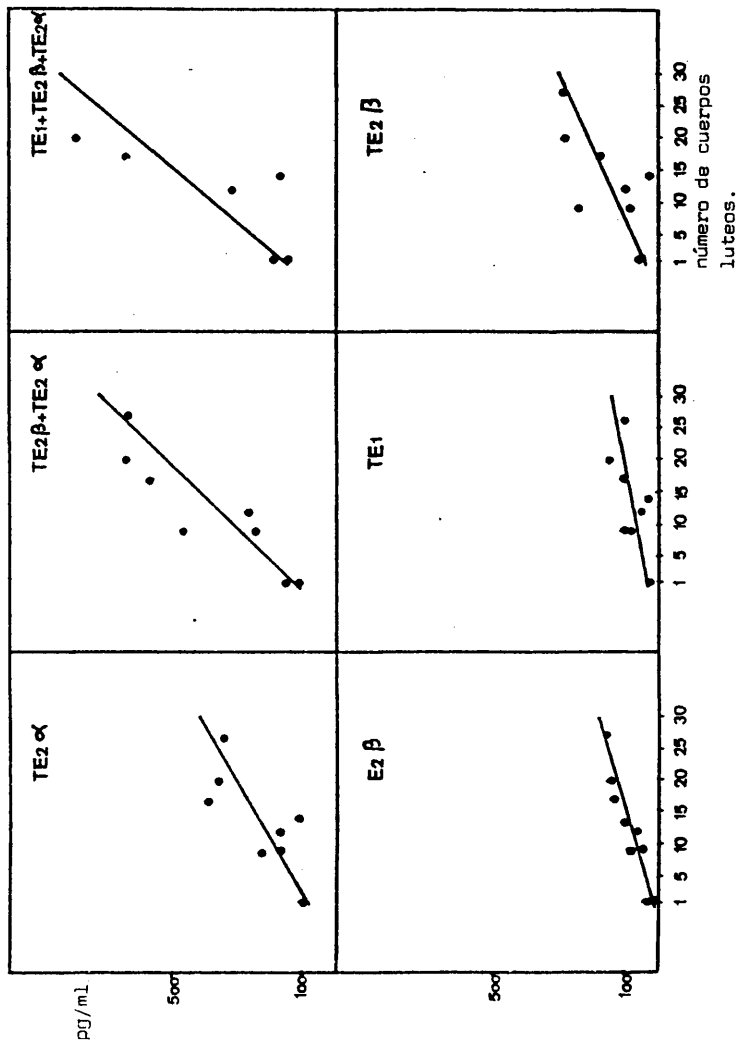
CONCENTRACIONES MAXIMAS DE ESTROGENOS Y NUMERO DE CUERPOS LUTEOS (RESULTADOS EN pg/ml)

Número animal.	Número C.L.	$E_2\beta$	TE_1	$TE_2\beta$	$TE_2\alpha$	$TE_2\beta + TE_2\alpha$	$TE_1 + TE_2\beta + TE_2\alpha$
48	12	62,3	49	98	170	263	312
44	1	23,2	34	59	87	146	180
51	1	14,8	31	39	97	114	141
41	14	92	37	19	107	126	159
47	17	138,6	107	185	390	573	647
45	20	146,9	152	289	353	642	794
55	27	158,8	105	289	343	632	730
50	9	80,5	82	244	221	465	521
52	9	51	90	77	165	242	332

-101-

Correlación	X	Y	R
Número C.L.	$E_2\beta$	$Y = 5,975 X + 12,31$	$R = 0,95$
	TE_1	$Y = 3,491 X + 33,66$	$R = 0,71$
	$TE_2\beta$	$Y = 9,142 X + 32,59$	$R = 0,71$
	$TE_2\alpha$	$Y = 11,408 X + 74,68$	$R = 0,81$
	$TE_2\beta + TE_2\alpha$	$Y = 20,846 X + 107,09$	$R = 0,80$
	$TE_1 + TE_2\beta + TE_2\alpha$	$Y = 24,096 X + 129,48$	$R = 0,80$

FIGURA 11: Correlación entre el número de cuerpos lúteos y los niveles de estrógenos.



5. DISCUSSION

5.1.- OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTIESTROGENOS.

El conejo utilizado como animal de experimentación para la obtención de anticuerpos en radioinmunoanálisis, aparece como animal de elección en la mayoría de los artículos publicados al respecto (NIESCHLAG et al., 1975).

El proceso de inmunización ha sido realizado con algunas variaciones del descrito por VAITUKAITIS et al., (1971) con la característica de administrar inyecciones intradérmicas de 1 mg. de antígeno, en emulsión con una cantidad igual de adyuvante completo de Freund durante todo el período. Este método permite un gran ahorro de antígeno, por la fuerte respuesta inmunológica a la inyección intradérmica (WRIGHT et al., 1973b) sobre todo si se combina con inyecciones subcutáneas o intramusculares de vacuna Perthussis.

La elección del tipo de antígeno, corresponde a la necesidad de obtención de un anticuerpo no específico.

LINDNER et al., (1972a) señalaban que el lugar de unión de los haptenos con el péptido transportador (BSA ó HSA) afecta de una manera importante a la especificidad de los antisueros obtenidos.

La unión de la proteína al hapteno en los grupos funcionales de los anillos A ó D, dá como resultado anticuerpos de baja especificidad, con altos porcentajes de reacción cruzada frente a otros esteroides (DOERR et al., 1973) (JEFFCOATE y SEARLE, 1972), principalmente cuando la unión se realiza en los carbonos 3 y 17 (C_3 y C_{17}) (EXLEY et al., 1971).

Los anticuerpos específicos son de gran utilidad cuando se pretende determinar un solo esteroide en una muestra, pudiéndose evitar la cromatografía. El acoplamiento de la proteína a los carbonos más distales de los grupos funcionales, como el carbono 6 del anillo B

(C₆), permite la obtención de anticuerpos de gran especificidad, principalmente los derivados C-6-O-Carboximetiloxima-BSA (DRAY et al., 1971 y EXLEY, 1972).

La gran especificidad de los derivados 6-O-CMO-BSA se debe, como sugieren EXLEY y WOODHAMS (1976) no sólo a la posición distal de la conjugación, si no al factor representado por la gran rigidez de la conjugación "oxima", que puede jugar un papel importante en la especificidad.

ABRAHAM (1974), señalaba que la especificidad de cualquier derivado C₃, C₆, C₇, C₁₁, era siempre superior a la de los derivados C₁₇.

Ahora bien, si el factor determinante de la especificidad de un antisuero viene dado por el lugar donde la proteína se une al esteroide (MIDGLEY y NISWENDER 1970), los anticuerpos no específicos obtenidos de derivados C₁₇, son ventajosos cuando se desean cuantificar esteroides, en una misma muestra siguiendo el previo paso de la cromatografía (NISWENDER et al., 1975).

Por esto, estaba justificado en nuestra experiencia la utilización de un derivado C₁₇, como antígeno. Los resultados obtenidos han demostrado la reacción cruzada del anticuerpo con diferentes esteroides pudiéndose apreciar una clara especificidad frente a los estrógenos libres.

TERQUI (1978), describe la reacción cruzada de un antisuero obtenido en el conejo con el mismo antígeno E₁-17 hidrazona-BSA. Esta misma reacción cruzada aparece descrita por LEMON y SAUMANDE (1974). Sus resultados coinciden basicamente con los nuestros aunque para el E₂^β y el E₂^α la reacción cruzada sea inferior (39% y 28% frente a 27% y 20% respectivamente).

En cuanto al título, la concentración de trabajo descrita por

este autor (TERQUI, 1978) con proceso lento de inmunización, es idéntica a la obtenida en nuestra experiencia, si bien la utilización de la inyección intravenosa a los dos meses de la inmunización, permite acortar el período de tratamiento, para conseguir un mismo título.

El título de anticuerpo varía con el tiempo de inmunización (ABRAHAM 1974), alcanzando una meseta a los 6 u 8 meses. Para ODELL et al., (1971) y HOLLANDER et al., (1974) este intervalo de tiempo es dependiente de la dosis y frecuencia de las inyecciones, pudiéndose lograr, con variaciones en el método tasas considerables a los 5 meses de la inmunización (WRIGHT et al, 1973b).

Según WALKER et al., (1973); la especificidad de los antisueros frente a estrógenos puede disminuir durante el período de inmunización, obteniéndose los mejores resultados entre los 3 y 6 meses a partir de la inyección inicial.

Esta teoría no es compartida por otros autores como HOLLANDER et al. (1974), según los cuales lo único que puede variar es el título. El uso de la inyección intravenosa puede evitar éste fenómeno si así sucediera, pudiéndose conseguir una elevada tasa de anticuerpos en un momento preciso de la inmunización.

5.2.- PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA DE DETERMINACION DE TE_1 , TE_2^{β} y TE_2^d

La puesta a punto de esta técnica, obedece al hecho de buscar una alternativa a la determinación del 17β - estradiol para seguir el crecimiento folicular, y no existir en la bibliografía consultada ninguna técnica disponible, que determinara varios estrógenos libres y conjugados en una misma muestra de plasma.

Cada una de las etapas previas al análisis radioinmunológico han sido minuciosamente comprobada, intentando perfeccionar o sustituir modelos descritos en la bibliografía.

La determinación de estrógenos conjugados ha sido abordada según distintos puntos de vista. El uso en radioinmunología de anticuerpos frente a estrógenos conjugados (KELLIE et al., 1972) ha dado resultados discutibles y la mayoría de los autores prefieren una hidrólisis previa y analizar los estrógenos libres y conjugados en su forma libre.

Las técnicas químicas, principalmente la solvolisis (LORIAUX et al., 1971) basados en la acción de ácidos en caliente tienen el inconveniente de actuar sólo sobre los sulfatos y a veces provocan modificaciones en la estructura de esteroides como el $E_2\alpha$ (GOMES et al., 1965). Nosotros realizamos un test siguiendo la técnica de solvolisis de LORIAUX, comprobando que ésta únicamente era eficaz para la E_1S , con un rendimiento del 75%. Cuando la hidrólisis era realizada en plasma los rendimientos no superaban el 3% ó 4%.

Con los métodos enzimáticos se consiguen mejores resultados utilizando la sulfatasa para los sulfoconjugados (TSANG 1974) y la β -glucuronidasa para los glucuronoconjugados obtenida de distintas fuentes como puede ser la β -glucuronidasa de mamíferos (WILLIAMSON y LAYNE 1970) (AQKI y ARESHCHYSHYN 1971) ó de *Escherichia coli* (CROWLEY y ROSSER 1973).

Sin embargo los productos más efectivos son aquellos que contienen la doble actividad enzimática, como los extractos de "Helix pomatia" con el cual se pueden obtener rendimientos del 86,7% (HOFFMAN et al., 1976). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este trabajo cuando los estrógenos están diluidos en tampón. El hecho de que el rendimiento sea más bajo en plasma parece debido a una interferencia de las proteínas y a deficiencias de la extracción.

El uso de la cromatografía y purificación previa de los estrógenos antes del análisis es un proceso obligado cuando no se poseen anticuerpos específicos para la determinación de cada una de las hormonas (ABRAHAN, 1973) (WU y LUNDY, 1971).

A pesar de la gran utilización de la columna de celita, (ABRAHAM 1974) por su bajo valor blanco, bajo precio y gran poder de resolución, para el radioinmunoanálisis de estrógenos y sobre todo cuando se realizan grandes series, está más indicada la columna de Sephadex LH 20, por la facilidad y rapidez de preparación así como por la calidad de la separación principalmente cuando se utilizan solventes orgánicos (Van BAELEN et al., 1967).

No existe en la actualidad ninguna cromatografía en columna capaz de separar los isómeros $E_2\beta$ y $E_2\alpha$. ATTAL, (1970) describe una técnica de oxidación del $E_2\beta$ a E_1 mediante una enzima HSD y DPN, pero según las concentraciones citadas por este autor hemos comprobado que una gran parte del $E_2\alpha$, también es transformado en E_1 . Reduciendo estas concentraciones conseguimos una transformación de $E_2\beta$ del 96%, sin apenas alteración del $E_2\alpha$ que alcanza el 3%. ROBERTSON et al., (1972), obtienen valores de no transformación de $E_2\alpha$, del 98%, utilizando HSD pero con una preparación enzimática más purificada y demuestra que la estereoespecificidad está modificada por las condiciones de la reacción.

Los anticuerpos utilizados en el análisis han dado una gran especificidad al mismo si bien, la especificidad del análisis está conseguida con la fase de cromatografía, aún cuando los anticuerpos no sean específicos (DOERR 1976).

DOBSON y DEAN (1974), utilizan después de la cromatografía anticuerpos específicos para cada uno de los estrógenos, derivados todos ellos de la 6-O-carboximetiloxima, pero en este caso sin cromatografía previa se pueden conseguir idénticos resultados (KORENMAN et al, 1974).

Los métodos de separación de fracciones libres y ligadas por carbón activo e inmunoprecipitación, reúnen las condiciones idóneas ya que no interfieren la unión antígeno-anticuerpo (COLLIN 1975); solamente no está recomendado el carbón activo para aquellos esteroides que -

presentan gran polaridad (ABRAHAM 1974). Siguiendo las condiciones de recubrir el carbón con dextrano, y manteniendo el tiempo de contacto - durante 10 minutos, a temperatura constante de 4°C, obtenemos unos coeficientes de variación en la curva "standard" del 2%, próximos a los valores de captación del 98% obtenidos por ABRAHAM (1974) y (RATCLIFFE, 1974).

El método de inmunoprecipitación es utilizado principalmente en el radioinmunoanálisis de hormonas proteicas. En hormonas esteroideas la mayoría de los autores recoge para el contaje la fracción libre que se encuentra en el sobrenadante (ODELL et al., 1975). Sin embargo, nosotros siguiendo la técnica de SAUMANDE y ANDRE (1975) obtenemos incremento de la sensibilidad y precisión contando la fracción ligada - del fondo del tubo, siendo además este metodo más rápido y económico.

La adición a las muestras de plasma, antes del análisis, de 1000 cpm de soluciones radiactivas de E_1^* , $E_2^*\beta$ y $E_2^*\alpha$ permite al final del análisis calcular las pérdidas de esteroides que se han - ido produciendo en cada uno de los pasos.

Estas pérdidas se producen fundamentalmente durante la extracción y la purificación en las columnas, pero han sido reducidas al mínimo en cada una de las etapas. En la extracción con éter etílico una sola vez se obtiene un 96% de rendimiento, comparable al obtenido por ABRAHAM et al., (1970) con tres extracciones. DOBSON y DEAN (1974) obtienen con el éter un rendimiento del 87%, quizá por la reducción en el volumen del solvente.

A pesar de que el diclorometano presenta algunas ventajas sobre el éter en la extracción, (THIBIER y SAUMANDE, 1975) en esta técnica no fué utilizado por su capacidad de extracción de algunos esteroides conjugados, lo que le hace sólo recomendable cuando se utilizan anticuerpos específicos.

Sin duda las mayores pérdidas acontecen en la etapa cromatográfica donde solo se recupera el 80%- 85% del esteroide depositado - en las fracciones seleccionadas. Con las grandes columnas de Sephadex LH 20 de 300 mm de longitud y 10 mm de diámetro (MIKHALL et al., 1970) (POWEL y STEVENS 1973) y (CARR et al., 1971) obtienen rendimientos mayores en la recuperación que se aproximan al 90%. Estas columnas tienen el inconveniente de la gran cantidad de eluyente necesario para la salida de los esteroides, con un notable incremento del valor blanco.

De ahí el uso de las microcolumnas de 5-8 mm. de diámetro - con sistema de solvente benceno/metanol 85/15 (v./v.) y menos de 1 gr. de Sephadex con las que se pueden conseguir rendimientos máximos en la recuperación del 85% (MURPHY y D'AUX 1975 , CASTANIER y SCHOLLER, 1970 y CARR et al., 1971).

Las pérdidas de la masa de esteroide en cada uno de los tubos después de extraer el contenido, alcanzan el 15% por lo que podemos decir que estos resultados son difíciles de mejorar, en una técnica como la que hemos descrito, con gran cantidad de etapas previas al análisis radioinmunológico.

El valor del blanco en una técnica está provocado por las impurezas de todos los reactivos que se utilizan a lo largo del análisis.

A la vista de los resultados obtenidos un primer valor blanco aparece en la solución de "Helix pomatia". Ninguno de los trabajos que hemos revisado revela su importancia y sin embargo en nuestro caso, aún tratándolo con carbón activo, alcanza valores de 12 pg en 0,5 ml - de solución.

El blanco depende también del solvente utilizado (FROLICH et al., 1974). El éter etílico da valores elevados que pueden alcanzar los 17 pg y sólo con la redestilación previa se pueden disminuir hasta los 4 pg. (CASTANIER y SCHOLLER 1970) y (EXLEY y MOORE 1973). Para ROBERTSON et al., (1972) estos valores ascienden a 50 pg mientras que

para MIKHAIL et al., (1970) las cifras estarían próximas a 11 pg.

La fase cromatográfica significa también un incremento de los valores blanco. Por esto desechamos las columnas grandes, ya que con las microcolumnas el volumen de solvente no supera los 2 ml. y en esta cantidad el valor blanco es despreciable.

Otros valores corresponden al enzima HSD y al cofactor DPN, estos alcanzan 10-15 pg. Parece ser que quedan reducidos gracias al paso por la columna de cromatografía (MURPHY y D'AUX 1975), pero no anulados.

Todos estos valores sumados, sin duda infuyen sobre la calidad del análisis. Cuando son iguales o inferiores a 5 pg., concuerdan con el límite de detección y pueden descontarse del valor obtenido para cada muestra (ROBERTSON et al., 1972); pero valores superiores tienen gran influencia sobre cada punto de la curva "standard", y la adición de estos valores a cada uno de los puntos de la curva "standard" se hace necesaria (MIKHAIL et al., 1970).

Esto ha sido llevado a cabo, y hemos podido comprobar la variación en la pendiente de la curva standard obtenida, principalmente para el $E_2\alpha$ donde aparecen rectas no paralelas. Por tanto cada punto de la curva "standard" ha sido tratado como una muestra, consiguiéndose una influencia despreciable del blanco.

La sensibilidad de la curva "standard" ha sido definida por algunos autores como la más pequeña cantidad de una sustancia que puede ser medida siendo significativamente distinta de cero (REEVES y CALHOUM, 1970), (EDQUIST y JOHANSSON, 1972), con un límite de confianza del 95% (ABRAHAM, 1974). En realidad esta definición correspondería al límite de detección de la técnica, que en nuestra curva "standard" corresponde a 12,5 pg., 6,25 pg y 1 pg respectivamente para E_1 , $E_2\alpha$ y $E_2\beta$. Considerando los valores obtenidos por otros autores como



son 50 pg para E_1 (MIKHAIL et al., 1970) y 20 pg para $E_2\beta$ (ABRAHAM - et al., 1970), se puede buscar la causa de la disminución en la sensibilidad por la afinidad del antisuero, por el trazador o por el volúmen de incubación.

Usando la misma fórmula que en este trabajo para determinación de la sensibilidad HAWKINS y OAKLEY (1974) obtienen valores de 12 pg., 9,5 pg y 10 pg para E_1^S , $E_2\beta$ y E_1 respectivamente.

La sensibilidad del análisis es otro aspecto de la sensibilidad y depende de la sensibilidad de la curva standard de la recuperación y del blanco.

Al incorporar los valores del blanco a la curva "standard" la influencia de éste en los resultados del análisis es mínima, y no hay sobreestimación (ABRAHAM, 1973). No han sido considerados aquellos resultados de la sensibilidad del análisis que quedan por debajo del límite de detección por esto no damos como significativas las diferencias en niveles hormonales inferiores a los 2-5 pg.

La especificidad de un radioinmunoanálisis para esteroides se puede demostrar por dos vías: 1) Los esteroides conocidos que puedan - estar presentes en la fracción cromatográfica no deben reaccionar de una manera significativa con el antisuero usado (ABRAHAM, 1973). 2) La especificidad viene determinada por el estudio de las reacciones cruzadas del anticuerpo y por cromatografía.

Los valores de la reacción cruzada han sido descritos en el apartado correspondiente. Según WRIGHT et al., (1973), utilizando Sephadex LH 20 y solvente benceno/metanol 9:1 (v./v) pueden aparecer en la fracción estradiol derivados 16-ceto y posteriormente 6-ceto que pueden interferir el análisis cuando no se utilizan anticuerpos de alta especificidad. El anticuerpo anti- $E_2\beta$ utilizado por nosotros presenta una reacción cruzada del 12,3% y 1,3% para los derivados 6-ceto y 16-ceto, respectivamente, pero esto no parece tener una gran impor-

tancia ya que hasta ahora estos derivados solo han sido puestos en evidencia en la mujer gestante y en concentraciones que sólo representan el 1% de las de $E_2\beta$, (BOLTON y RUTHERFORD 1976).

Otra vía de determinación de la especificidad del análisis viene definida por la ausencia en el plasma de cualquier sustancia que pueda interferir los resultados (MIDGLEY et al., 1969 b). Este test realizado con volúmenes crecientes de plasma, puede asegurar este punto. Los resultados muestran una estimación normal de las concentraciones.

La correlación entre las cantidades conocidas de esteroide en el plasma y los resultados obtenidos, puede estar alterada por fallos de tipo humano, principalmente por deficiencias en el tiempo de estabilización de los trazadores añadidos al plasma: previamente a la extracción. Cuando se realiza la extracción en estas condiciones, los trazadores marcados son más fácilmente extraídos, ya que los esteroides plasmáticos, aparecen en gran parte ligados a las proteínas, y esto tiene como consecuencia una subestimación de los valores reales.

La precisión determinada por el estudio de las concentraciones en volúmenes crecientes de plasma aparece como razonable. Hay que hacer notar que la precisión en valor relativo disminuye cuando el análisis se hace en una fracción cada vez más pequeña de la muestra de partida. La precisión mayor ha sido para la estrona y la menor para el $E_2\alpha$.

5.3.- NIVELES DE ESTROGENOS EN LA VACA

a) En el ciclo sexual

La técnica que hemos descrito, nos ha permitido hacer un estudio de la concentración de diferentes estrógenos en una misma muestra de plasma. Este estudio corresponde a nuestra preocupación de en-

contrar una alternativa a la determinación de $E_2\beta$, para el estudio del crecimiento folicular.

Desde el punto de vista cuantitativo las concentraciones de estrógenos en el ciclo sexual de la vaca en nuestro trabajo aparecen dentro del siguiente rango entre concentraciones basales y máximos preovulatorios:

$E_2\beta$: 2-18 pg/ml; $TE_2\beta$: 2-32 pg/ml; TE_1 : 15-37 pg/ml; $TE_2\alpha$: 15-70pg/ml.

Sin embargo en la bibliografía consultada, aparecen grandes variaciones en cuanto a las concentraciones descritas por diferentes autores. Estos resultados quedan reflejados a continuación, citándose la referencia bibliográfica, el método de análisis, así como los niveles del estrógeno o estrógenos determinados.

Esta gran variación en los niveles, parece que se debe principalmente al uso de una determinada técnica, y sobre todo al grado de purificación de la muestra antes del análisis. PETERSON et al., (1975a) sugieren que existen en el plasma determinados factores que alteran los resultados finales, cuando no se trabaja con un alto grado de purificación.

En este cuadro aparecen algunas referencias, que usando una técnica de RIA, expresan sus resultados como estradiol, cuando realmente corresponden al $E_2\beta$ más una parte de $E_2\alpha$, dependiendo de la reacción cruzada del anticuerpo que utilizan con este estrógeno.

Estos autores se basan en la teoría de GLENCROSS et al., (1973) los cuales utilizando un anticuerpo con el 20% de reacción cruzada frente al $E_2\alpha$, y otro con el 0,2%, obtienen los mismos resultados para el estradiol. Según esto, aseguran que los niveles de $E_2\alpha$, en la sangre periférica de la vaca son despreciables. Igualmente para HENRICKS et al., (1971) la mayoría de estrógenos plasmáticos corresponden al $E_2\beta$.

Niveles de estrógenos en el plasma sanguíneo periférico de la vaca
(Concentración basal y nivel máximo preovulatorio).

Referencia	Método	Esteroides	Rango (pg/ml)
POPE et al., 1965	Biológico	Estrógenos	1-10
CHRISTENSEN et al., 1971	RIA	Estrógenos	98-176
HENRICKS et al., 1971	RIA	Estrógenos	0,5-25
MASON et al., 1972	Fluorimetría	$E_2\beta + E_2\alpha$	176-1175
		E_1	231-2269
SHEMESH et al., 1972	CPB	$E_2\beta + E_2\alpha$	10-170
WETTEMANN et al., 1972	RIA	$E_2\beta + E_2\alpha$	3-10
BATSON et al., 1972	RIA	Estrógenos	2-15
BLOCKEY et al., 1973	RIA	E_1	170-610
GLENCROSS et al., 1973	RIA	$E_2\beta$	1-10
		E_1	1-2
KATONGOLE et al., 1973	RIA	Estrógenos	5-25
CHRISTENSEN et al., 1974	RIA	Estrógenos	50-160
DOBSON y DEAN, 1974	RIA	$E_2\beta$	5-15
		$E_2\alpha$	15-45
		E_1	3-5
LEMON y SAUMANDE, 1974	RIA	$E_2\beta$	5-25
PETERSON et al., 1975(a)	RIA	$E_2\beta + E_2\alpha$	5-12
SEREN et al., 1974	RIA	Estrógenos	3-30
SMITH et al., 1974	RIA	$E_2\beta + E_2\alpha$	2-18
CHENAULT et al., 1975	RIA	$E_2\beta + E_2\alpha$	2-12
ECTORS et al., 1975	RIA	$E_2\beta$	2-13
LEMON et al., 1975	RIA	$E_2\beta$	5-25
PETERSON et al., 1975 (b)	RIA	$E_2\beta$	5-50
THIBIER y SAUMANDE, 1975	RIA	$E_2\beta$	3-30
KANCHEV et al., 1976	RIA	$E_2\beta$	5-15
DOBSON, 1978	RIA	$E_2\beta$	5-15
LOPEZ SEBASTIAN, 1981	RIA	$E_2\beta$	2-18
		$TE_2\beta$	2-32
		TE_1	15-34
		$TE_2\alpha$	15-70

Esta misma teoría mantienen SMITH et al., (1974), CHENAULT et al., (1975) y PETERSON et al., (1975a) que con anticuerpos de reacción cruzada frente al $E_2\alpha$ de 42%, 17% y 42% respectivamente obtienen los mismos resultados para $E_2\beta + E_2\alpha$ que otros autores para el $E_2\beta$ solo. Sin embargo LEMON y SAUMANDE (1974) con un anticuerpo de alta reacción cruzada frente al $E_2\alpha$ y E_1 obtienen valores con un rango de 50-80 pg/ml.

En nuestro trabajo aparece el $TE_2\alpha$, como el mayor estrógeno circulante en la sangre periférica de la vaca de acuerdo con DOBSON y DEAN (1974) que determinan los estrógenos sólo en su forma libre. Comparando las concentraciones de los diferentes estrógenos en ambos trabajos se puede apreciar que la mayoría del $E_2\beta$ y $E_2\alpha$ se encuentran en el plasma en forma no conjugada, ya que las diferencias que se pueden apreciar entre los dos niveles son muy débiles, mientras que por el contrario las concentraciones de TE_1 , son del orden de 8 a 10 veces superiores a las de E_1 , lo que demuestra que este estrógeno en la vaca circula principalmente en forma conjugada. Sin embargo, ni nosotros en forma conjugada ni otros autores en forma libre (DOBSON y DEAN 1974; SMITH et al., 1974), encontramos fluctuaciones claras a lo largo del ciclo, o en el período preovulatorio.

Por otro lado MASON et al., (1972) utilizando una técnica fluorimétrica detectan un pico de E_1 , el día antes del celo y HANSEL y ECTERNKAMP (1972), determinan incrementos en la concentración de E_1 los días 14 y 16 del ciclo. NANCARROW et al., (1973) observan fluctuaciones de E_1 , durante el celo pero sólo cuanto ésta es medida en la vena útero-ovárica. Teniendo en cuenta el origen de la E_1 que puede ser en parte extra-ovárico (BEALL 1939) y la posibilidad de que la E_1 sea un metabolito de otros estrógenos (VELLE, 1958), hace difícil pensar en alguna relación de fluctuaciones de E_1 con la actividad folicular; en cualquier caso las variaciones netas de este estrógeno que aparecen durante el ciclo menstrual en la mujer (BROWN y SMITH, 1971; HAWKINS y OAKLEY 1974; LORIAUX et al., 1971) no aparecen en el ciclo estral de la vaca.

Desde el punto de vista cualitativo, solamente el $TE_2\beta$, presenta un incremento preovulatorio bien definido, el cual es de la misma importancia en amplitud y duración que el obtenido para el $E_2\beta$ en los mismos animales y en otras experiencias precedentes (HENRICKS et al., 1971; WETTEMAN et al., 1972; BATSON et al., 1973; GLENCROSS et al., 1973; SMITH et al., 1974; DOBSON y DEAN 1974; ECRTORS et al., 1975 y KANCHEV et al., 1976).

El mismo incremento preovulatorio se señala en otras publicaciones con tomas de sangre cada 2 horas y en este caso existen amplias fluctuaciones de $E_2\beta$ el día anterior al celo, lo que revela una secreción episódica del mismo por el folículo antes de la ovulación (LEMON y SAUMANDE, 1974; THIBIER y SAUMANDE, 1975; CHENAULT et al., 1975 y DOBSON, 1978).

Este incremento preovulatorio desencadena los síntomas del celo (GLENCROSS et al., 1973) y mediante un efecto "feed-back" positivo provoca la descarga preovulatoria de LH (SMITH et al., 1974 y WETTEMANN et al., 1972), si bien esto sólo ocurre cuando las concentraciones de progesterona han descendido previamente a su nivel basal (LEMON et al., 1975 y CHENAULT et al., 1975).

A lo largo del ciclo aparecen otras elevaciones del nivel basal de $E_2\beta$ y $TE_2\beta$, sin bien sin alcanzar las del pico preovulatorio los días 6 y 7 del ciclo y 10 a 12. La mayoría de los autores describen también estos incrementos con ligeras variaciones, que parecen reflejar aceleraciones del crecimiento folicular por oleadas, con el paso de folículos pequeños a folículos antrales. MARIANA y N'GUYEN HUY 1973, señalan que estas aceleraciones estarían localizadas al principio del ciclo y alrededor del día 12 del mismo.

En lo que concierne al $TE_2\alpha$ existe una tendencia a que los valores más elevados aparezcan en la proximidad del celo, tendencia -

que no es muy evidente sobre la curva media, pues los puntos máximos para cada vaca no son sincrónicos entre sí. DOBSON y DEAN (1974) tampoco encuentran fluctuaciones netas para el $E_2\alpha$, durante el período preovulatorio. Las vías metabólicas del $E_2\alpha$, la conversión de E_1 a $E_2\alpha$ por los eritrocitos de vacuno (MELLIN y ERB 1965) y el hecho de que el $E_2\alpha$ no aparezca en el líquido folicular (SHORT 1962), hace pensar en un enmascaramiento de los niveles de esta hormona en el plasma.

b) Superovulación

El muestreo cada dos horas permite el seguimiento de la evolución de los niveles hormonales en la superovulación y las fluctuaciones de la secreción episódica de los estrógenos.

Este tipo de muestreo permite también la determinación del pico preovulatorio de LH, el cual define de una manera más exacta el comienzo del celo, que utilizando machos vasectomizados.

Con el tratamiento PMSG - Prostaglandina, el pico de LH aparece a las 45,5 (valor medio, $n = 8$) horas después de la inyección de prostaglandina excepto en un animal que aparece a las 72 horas, resultados análogos a los trabajos de PHILLIPPO y ROWSON (1975) y SAUMANDE (1980). Sin embargo en novillas no tratadas con PMSG, es decir, con $PGF_2\alpha$ sola, este pico de LH aparece alrededor de 20 horas más tarde, es decir a las 64 horas de la inyección de prostaglandina (DOBSON et al., 1975, COOPER y ROWSON, 1975). En ambos casos el intervalo entre el comienzo de la luteolisis y el pico preovulatorio de LH es más corto. La razón y el significado de esta diferencia, no ha sido aclarado hasta el momento.

Las concentraciones de estrógenos se incrementan a partir de las 24 horas de la inyección de PMSG, hasta alcanzar un máximo coincidente con el pico de LH, ó con ligeras diferencias de -4 a +2 horas, de acuerdo con lo descrito por BOTH et al., (1975) y SAUMANDE (1980),

siendo mayor el intervalo PMSG-pico de estrógenos, cuanto mayor es la tasa de ovulación.

La relación de los niveles de $E_2\beta$ con la tasa de ovulación ha sido descrita ampliamente por LEMON y SAUMANDE (1972) y TESTART et al., (1977). Nosotros encontramos también el mayor índice de correlación entre el $E_2\beta$ y la tasa de ovulación ($r = 0,95$, $P < 0,01$).

Esta relación aparece ampliamente descrita en la bibliografía (HENRICKS et al., 1973; HALLFORD et al., 1975; SAUMANDE y PELLETIER, 1975 y SAUMANDE, 1978). Ahora bien, si para el $E_2\beta$ la correlación entre el número de ovulaciones y el nivel máximo es la más alta, para el $TE_2\alpha$ esta misma correlación es de suficiente validez ($r = 0,81$), con la ventaja de que la pendiente de la recta de regresión es prácticamente el doble. Esta correlación y pendiente de la recta son de gran interés a la hora de buscar parámetros que reflejen la actividad folicular.

En el apartado precedente, sobre niveles hormonales durante el ciclo, habíamos concluido que ninguno de los tres estrógenos (libres + conjugados) aportaba alguna mejora a la calidad de las informaciones obtenidas por el $E_2\beta$, sin embargo en este caso en el que ha sido estimulado el crecimiento folicular mediante la PMSG, la medida de $TE_2\alpha$ ó eventualmente de $TE_2\beta + TE_2\alpha$ parece interesante, pues el aumento de los niveles hormonales durante el período preovulatorio es de una amplitud dos veces más importante que el que ha sido observado para el $E_2\beta$. Si los coeficientes de correlación entre el número de ovulaciones y las concentraciones máximas de $TE_2\alpha$ ó de $TE_2\beta + TE_2\alpha$ son menos elevados que los encontrados para el $E_2\beta$, puede ser simplemente por una diferencia en la precisión del método de análisis.

Hemos llegado por tanto a un punto en el cual, los resultados aparecen diferentes dependiendo de que los animales hayan recibido o no, un tratamiento de superovulación.

Las razones por las cuales en los animales tratados con PMSG - el aumento de los estrógenos conjugados, es más importante que el de $E_2\beta$, a diferencia de lo que es observado en el ciclo sexual normal, no son demasiado claras. Si como en la mujer, los estrógenos conjugados, no son segregados, si no que simplemente representan un producto del metabolismo (LONGCOPE 1972 y RUDER et al., 1972) puede explicarse este fenómeno observado, como consecuencia de la vida media más larga de los esteroides para las formas conjugadas en relación con su forma libre (SANDBERG et al., 1964; LONGCOPE 1972 y RUDER et al., 1972).

A propósito de las diferencias observadas entre los tres estrógenos hay que recordar que el $E_2\alpha$, no es sintetizado por las células foliculares (SHORT 1962) pero es el resultado de una transformación de $E_2\beta$, particularmente a nivel de los hematíes (AXELROD y WERTHESSEN, 1960, LUNAAS y VELLE, 1960, VELLE, 1963), y que durante el ciclo sexual, no ha sido observada ninguna modificación de las concentraciones, ligada a fenómenos de crecimiento folicular (DOBSON y DEAN 1974).

Teniendo en cuenta los conocimientos actuales de la síntesis y metabolismo de los estrógenos en la especie bovina es difícil dar una explicación a la diferencia entre los resultados entre el ciclo sexual normal y la estimulación ovárica, si bien desde un punto de vista práctico, los estrógenos conjugados permiten hacer un estudio más directo y más simple del crecimiento folicular en el periodo preovulatorio en los animales en los que se provoca la superovulación, que la determinación única de $E_2\beta$.

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- Utilizando como antígeno un derivado de la estrona con conjugación de la BSA en el carbono 17 del anillo (estrona 17 - hidrazona-BSA) se pueden obtener en el conejo, anticuerpos no específicos, que presentan una fuerte reacción cruzada frente a diferentes estrógenos.
- 2.- La utilización de anticuerpos no específicos, es más interesante, que la de anticuerpos específicos, cuando se quieren determinar varios estrógenos en una misma muestra, manteniéndose la especificidad utilizando cromatografía previamente.
- 3.- Se pueden determinar en una misma muestra de plasma, estrona, 17β -estradiol y 17α -estradiol, libres y conjugados, mediante el uso continuado de hidrólisis, oxidación enzimática y doble cromatografía, previamente al análisis radioinmunológico.
- 4.- Los criterios de validez de esta técnica son lo suficientemente buenos como para dar como significativos los resultados de las variaciones relativas de los niveles de estas hormonas esteroides en diferentes situaciones fisiológicas.
- 5.- En el ciclo sexual de la vaca sólo el $E_2\beta$ ó el $TE_2\beta$ reflejan el crecimiento folicular, con un incremento de las concentraciones los días -1 y 0, responsables de los síntomas de celo y de la descarga preovulatoria de LH.
- 6.- Los tres estrógenos estudiados, no ofrecen ninguna ventaja sobre la calidad de información, que se obtiene con los niveles de 17β -estradiol libre, cuando se quieren relacionar con la actividad folicular.

7.- Desde un punto de vista cuantitativo el 17α -estradiol libre y conjugado es el mayor estrógeno circulante en el plasma periférico de la vaca y sus concentraciones tienen tendencia a un incremento - los días próximo al celo, a pesar de que esto no sea evidente en la curva media, debido a que los niveles máximos no están sincronizados.

8.- En el animal que ha sido sometido a un tratamiento de superovulación, la determinación de $TE_2\alpha$ debe de sustituir a la de $E_2\beta$, ya que el primero refleja de una forma más sensible y lo suficientemente precisa el crecimiento folicular, con un incremento y un pico preovulatorio sincronizado con el $E_2\beta$.

9.- Las concentraciones de $TE_2\alpha$ son más sensibles que las de $E_2\beta$ y su correlación más precisa con la variabilidad en la respuesta ovárica, y el número de ovulaciones, después de la estimulación con PMSG.

10.- El incremento preovulatorio de estrógenos conjugados en el plasma, después de la inyección de PMSG, es más importante y en concentraciones muy superiores a las de 17β -estradiol libre lo que puede aportar facilidades a nivel del método de análisis y a la frecuencia de la toma de muestras.

12h

7. RESUMEN

RESUMEN

Se ha llevado a cabo la puesta a punto de una técnica que permite de terminar en una misma muestra de plasma sanguíneo estrona, 17β - estradiol y 17α - estradiol, libres y conjugados, con el fin de conocer si alguno o algunos de estos estrógenos era un indicador mejor de la actividad folicular que lo es el 17β - estradiol libre.

Para poder determinar por separado estos tres estrógenos se han combinado diferentes técnicas previas a la reacción radioinmunológica: Hidrólisis de estrógenos conjugados, oxidación enzimática del $E_2\beta$ a E_1 y cromatografía en microcolumnas de Sephadex LH 20, con las que se ha conseguido dar una gran especificidad al método.

Se han empleado anticuerpos no específicos, que al presentar reacción cruzada con diferentes esteroides, permiten la determinación simultánea de varios estrógenos. Uno de estos anticuerpos ha sido preparado en el conejo, utilizando como antígeno "Estrona-17-hidrazona-BSA", con el que se ha conseguido un anticuerpo que reacciona fuertemente con el 17β y el 17α -estradiol.

Utilizando este método radioinmunoanalítico se han determinado los niveles de TE_1 , $TE_2\beta$ y $TE_2\alpha$ en la sangre periférica de la vaca, durante el ciclo sexual, y en novillas después de un tratamiento para inducir a la superovulación con PMSG y $PGF_2\alpha$ (análogo).

Durante el ciclo sexual las concentraciones de estrógenos conjugados en el plasma periférico son superiores a las de estrógenos libres, siendo el $TE_2\alpha$ el que aparece en concentraciones más altas.

Solamente el $TE_2\beta$, presenta un claro incremento preovulatorio, cuya duración y aumento relativo no son significativamente diferentes de los resultados obtenidos para $E_2\beta$.

En los animales en los que se ha provocado la superovulación, la evolución de los diferentes estrógenos es semejante, después de la inyección de PMSG, con un incremento preovulatorio próximo al de la LH.

Las concentraciones más altas corresponden al $TE_2\alpha$ con niveles muy superiores a los de $E_2\beta$, estando significativamente correlacionados el máximo preovulatorio y el número de ovulaciones, siendo la pendiente de la recta de regresión dos veces mayor que la obtenida para $E_2\beta$.

En animales en los que se ha inducido la superovulación, los niveles de $TE_2\alpha$ son un indicador mejor de la respuesta a la estimulación de la foliculogénesis que los de $E_2\beta$ que hasta el momento han sido los utilizados más comúnmente.

SUMMARY

A technique has been developed with whom free and conjugated oestrone, oestradiol-17 β and oestradiol-17 α can be measured in the same plasma sample, in order to know whether any of these oestrogens was a better reflection of follicular activity than it is free oestradiol-17 β .

For the separate assay of the three oestrogens the following techniques were combined: after enzymatic hydrolysis E₂ β was specifically oxidized to E₁, next applying chromatography on a micro-column of Sephadex LH 20, thus conferring great specificity to the method, thereafter, the 3 oestrogens were quantified by radioimmunoassay:

By means of non-specific antibodies, showing cross reaction with different steroids, several oestrogens were simultaneously determined, Utilizing "Estrone-17-hydrazone-NSA" as antigen, an antiserum, with strong cross reaction with oestradiol-17 β and 17 α was obtained in rabbits.

By using this radioimmunoassay method, TE₁, TE₂ β , and TE₂ α levels were measured in peripheral plasma during sexual cycle of cows, and heifers treated to induce superovulation with PMSG/PGF₂ α (analogue).

Conjugated oestrogens in peripheral plasma during the bovine oestrus cycle were higher than the corresponding non conjugated oestrogens, TE₂ α showing the highest level.

A preovulatory increase was evident only for TE₂ β but neither its duration nor its relative increase were significantly larger than that of E₂ β .

In heifers treated to induce superovulation, the evolution of different oestrogens was synchronous after PMSG, with preovulatory increase near LH peak.

The highest concentrations were measured for TE₂ α with much higher levels than those for E₂ β , being the preovulatory maximum significantly correlated with the number of ovulation, the slope of the corresponding regre-

sion line was twice higher for $TE_2\alpha$ than for $E_2\beta$.

So it appears that in animals treated to induce superovulation the assay of $TE_2\alpha$ gives better indications on the stimulation of folliculogenesis than $E_2\beta$ which is usually measured.

RESUME

Au cours de ce travail, nous avons réussi la mise au point d'une technique qui permet le dosage dans un même échantillon de plasma de l'oestrone, oestradiol-17 β , oestradiol-17 α libres et conjugués, pour savoir si l'un ou plusieurs d'entre eux ne seraient pas un indicateur de l'activité folliculaire plus accessible que l'E₂ β non conjugué.

Pour pouvoir doser séparément ces trois oestrogènes, nous avons établi la combinaison des différentes étapes avant de procéder au dosage radioimmunologique: hydrolise des oestrogènes conjugués, oxydation enzymatique du E₂ β à E₁ et chromatographie sur microcolonnes de SEPHADEX LH 20 avec laquelle nous avons obtenu une grande spécificité de la méthode.

L'utilisation des anticorps non spécifiques permet le dosage simultané de plusieurs oestrogènes, étant donné qu'ils présentent une réaction croisée contre différents stéroïdes.

On a pu obtenir un de ces anticorps par immunisation chez le lapin avec l'antigène oestrone - 17 hydrazone - BSA; cet anticorps présente une forte réaction croisée avec l'oestradiol-17 β et 17 α .

La méthode radioimmunologique que nous proposons, permet donc la mesure des niveaux de TE₁, TE₂ β et TE₂ α dans le sang périphérique de la vache au cours du cycle oestral, et des génisses qui avaient reçu un traitement de superovulation avec PMSG/PGF₂ α (analogue).

Au cours du cycle, les concentrations des oestrogènes conjugués dans le plasma périphérique sont supérieures à celles des oestrogènes libres, les plus élevées sont mesurées pour TE₂ α .

On observe un accroissement préovulatoire bien défini seulement pour TE₂ β , mais la durée et l'augmentation relative ne sont pas significativement différentes lorsqu'elles sont comparées à celles obtenues pour E₂ β .

Chez les animaux qui ont reçu un traitement de superovulation, l'évolution de la concentration des différents oestrogènes est synchronisée après PMSG, et l'augmentation préovulatoire est proche du pic de LH.

Les plus fortes concentrations sont mesurées pour TE_2^α . Les résultats de l'étude des corrélations entre le nombre d'ovulations et les concentrations maximales préovulatoires de TE_2^α sont toujours significatifs, et la pente de la droite de régression est plus importante, près de deux fois, celle de E_2^β .

Chez les animaux dont la croissance folliculaire a été stimulée, les niveaux de TE_2^α sont un meilleur reflet de la réponse à la stimulation que ceux de E_2^β , telles qu'ils sont utilisés traditionnellement.

1. ABRAHAM G.E., 1969. Solid-phase Radioimmunoassay of Estradiol-17 β . J. Clin. End. Met. 29. 866.
2. ABRAHAM G.E., ODELL W.D., EDWARDS R., 1970. Solid-phase radioimmunoassay of estrogens in biological fluids. Acta Endocrinologica. Copenh. (Suppl.) 147.332.
3. ABRAHAM G.E., 1973. Radioimmunoassay of plasma steroid hormones. In : Heftmann E., Ed., Modern Methods in Steroid Analysis. Ac. Press. New York. 451.
4. ABRAHAM G.E., 1974. Radioimmunoassay of steroids in Biological Materials. Acta Endocrinologica. (Suppl.) 183. 7.
5. AOKI T., ARESCHYSHYN M.M., 1971. Radioimmunoassay of urinary estrogens. Am. J. Obstet. Gynec. 111. 382.
6. ATTAL J., HENDELES S.M., EIK-NES K.B., 1967. Determination of free oestrone in blood plasma by gas phase chromatography with electron capture detection. Anal. Biochem. 20, 394.
7. ATTAL J., 1970. Mesure des oestrogènes et des androgènes testiculaires et plasmatiques dans l'espece ovine par des microméthodes de chromatographie en phase gazeuse. Influence de l'âge de la saison et du cycle diurne. Thèse Doct. d'Etat C.N.R.S. : A04145.
8. AXELROD L.R., WERTHESEN N.T., 1960. The metabolism of Estrone 16-¹⁴C in bovine blood. Arch. Biochem. Biophys. 86. 53.
9. BAELEN H., HEYNS W., DE MOOR P., 1967. The separation of estrogens on Sephadex J. Chromatog. 30. 226.
10. BAIRD D.T., 1968. A method for the measurement of Estrone and Estradiol 17- β in peripheral human blood and other Biological fluids using ³⁵S Pipsyl chloride. J. Clin. End. 28. 244.
11. BAIRD D.T., UNO A., MELBY J.C., 1969. Adrenal secretion of androgens and oestrogens. J. Endocr. 45 (1). 135.

12. BATES R.W., COHEN H., 1947. Quantitative fluorescent micromethod for the determination of natural estrogens. Fed. Proc. 6 : 636.
13. BATSON D.B., RICHARDSON D.O., MURPHREE R.L., 1973. Progesterone and estrogen in plasma of nonbred, nonpregnant and pregnant cows. J. Dairy Sci. 56 (2)309 .
14. BEALL D., 1939. Isolation of oestrone from the adrenal gland. Nature. 144. 76.
15. BERSON S.A., YALOW R.S., 1959. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. Nature. London. 184. 1648.
16. BISHARA R.H., JAKOVljeVIC I.M., 1969. The separation of some estrogens by thin layer chromatography. J. Chromatog. 41. 136.
17. BLOCKEY M.A., CHAMLEY W.A., CUMMINS L., PERRY.M., GODING J.R., 1973. Steroid plasma levels about oestrus in the beef cow. J.Reprod. Fert. 32. 342.
18. BOLTE E.S., COUDERT S., LEPEBOSE Y., 1974. Steroid production from plasma cholesterol. II. In vivo conversion of plasma cholesterol to ovarian progesterone and adrenal C₁₉ y C₂₁ steroids in humans. J. Clin. Endocr. Met. 38. 394.
19. BOLTON A.E., RUTHERFORD F.J., 1976. Evidence for the presence of 6-Keto-oestradiol-17 β in human plasma, implications for oestradiol - 17 β radioimmunoassay. J. Ster. Bioch. 7. 71.
20. BOOTH W.D., NEWCOMB R., STRANGE H., ROWSON L., SACHER H.B., 1975. Plasma estrogen and progesterone in relation to superovulation and egg recovery in the cow. Vet. Rec. 97. 366.
21. BROOKS S.C., HORN. L., 1971. Hepatic sulfation of estrogen metabolites. Biochim. Biophys. Acta. 231. 233.
22. BROWN J.B., 1955. A chemical method for the determination of oestriol, oestrogen and oestradiol in human urine. Biochem. J. 60. 185.
23. BROWN J.R., Mc LEOD S.C., Mc NAUGHTON C., SMITH M.A., SMYTH B., 1968. A rapid method for estimating oestrogens in urine using a semi- automatic extractor. J. Endocr. 42. 5.

24. BROWN J.B., SMYTH B.J., 1971. Oestrone sulphate.- The major circulating oestrogen in the normal menstrual cycle. *J. Reprod. Fert.* 24. 142.
25. BULLETIN ON SEPHADEX LH20., 1970. Chromatography in organic solvents. Issued by Pharmacia Fine Chemicals.
26. CARR B.R., MIKHAIL G., FLINCHINGER G.L., 1971. Column chromatography of steroids on Sephadex LH20. *J. Clin. Endocr.* 33. 358
27. CASIDA L.E., MEYER R.K., Mc SHAN W.H., WISNICKY W., 1943. Effects of pituitary gonadotropins on the ovaries and the induction of superfecundity in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 4. 76.
28. CASTANIER M., SCHOLLER R., 1970. Dosage radio-immunologique de l'estrone et de l'estradiol-17 β plasmatique. *C.R. Acad. Sci. Paris.* 271. 1787.
29. COOPER M.J., ROWSON L.E.A., 1975. Control of the oestrus cycle in friesian heifers with ICI 80.996. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 15 (2). 427.
30. CORKER, C.S., EXLEY D., NAFTOLIN, F., 1970. Assay of 17 β -oestradiol by competitive protein binding methods. *Karolinska Symposia II*. 305.
31. CROWLEY M.F., ROSSER A., 1973. Oestrogen determination in pregnancy urine using enzymatic hydrolysis of estrogen conjugates. *Clin. Chim. Acta. (Pays Bas)* 49 (1). 115.
32. CHENAULT J.R., THATCHER W.W., KALRA P.S., ABRAMS R.M., WILCOX C.J., 1975. Transitory changes in plasma, progestins, estradiol, and luteinizing hormone approaching ovulation in the bovine. *J. Dairy Sci.* 58. 709.
33. CHRISTENSEN D.S., WILTBANK J.N., HOPWOOD M.L., 1971. Blood hormone levels during the bovine estrous cycle. *J. Anim. Sci.* 33. 251.
34. CHRISTENSEN D.S., HOPWOOD M.L., WILTBANK J.N., 1974. Levels of hormones in the serum of cycling beef cows. *J. Anim.Sci.* 38. 3.

35. DEAN P.D.G., EXLEY D., JOHNSON M.W., 1971. Preparation of 17β - estradiol -6- (O-carboxymethyl) oxine - bovine serum albumin conjugate. *Steroids* 18 (5) 593.
36. DELETANG F., 1975. Synchronisation of oestrus in cattle using a progestagen (SC 21009) and a synthetic analogue of prostaglandin F_2^α (cloprostenol). *Vet. Rec.* 97. 453.
37. DOBSON H., HOPKINS C., WARD W.R., 1972. Progesterone, 17β - estradiol and luteinizing hormone in bovine peripheral plasma in relation to ovulation. *J. Endocr.* 55 (2) XV.
38. DOBSON H., HOPKINSON C.R.N., WARD W.R., 1973. Progesterone, 17β - estradiol and LH in relation to ovulation in cows. *Vet. Rec.* 93. 76.
39. DOBSON H., DEAN P.D.G., 1974. Radioimmunoassay of oestrone, oestradiol- 17α and 17β in bovine plasma during the oestrus cycle and last stages of pregnancy. *J. Endocr.* 61 . 479.
40. DOBSON H., COOPER M.J., FURR B.J.A., 1975. Synchronization of oestrus with ICI 79939 an analogue of PGF_2^α and associated changes in plasma progesterone, oestradiol - 17β and LH in heifers. *J.Reprod. Fert.* 42. 141.
41. DOBSON H., 1978. Plasma gonadotrophins and oestradiol during oestrus in the cow. *J. Reprod. Fert.* 52. 51.
42. DOERR P., 1973. Hapten - radioimmunoassay of plasma estradiol. *Acta Endocrinologica.* 72. 330
43. DOERR P., GOEBEL R., KUSS E., 1973. Specific radioimmunological determination without chromatography of plasma estradiol in males. *Acta Endocrinologica.* 73. 314.
44. DOERR P., 1976. Radioimmunoanalysis of oestrone in plasma. *Acta Endocrinologica.* 81. 655.
45. DRAY F., TERQUI M., DESFOSSÉS B, CHAUFFOURNIER J.M., MOWSZOWICZ I., KAHN D., ROMBAUTS P., HAYLE M.F., 1971. Propriétés d'immunoserum anti 17β -oestradiol obtenus chez différentes espèces animales avec l'antigène 17β -oestradiol - 6 - O-carboxy-méthoxine serum albumine de boeuf. *C.R. Acad.Sci.Paris.* 273. 2380.

46. DRINAN J.P., COX R.I., 1974. Oestrogens in bovine peripheral plasma. *J.Reprod. Fert.* 36. 489.
47. ECTORS F., BECKERS J.F., BALLAMN P. DERIVAUX J., 1975. Plasma levels of Estradiol 17β during the oestrus cycle. *C.R. Acad. Sci. Paris.* 281. 1257.
48. EDQUIST L.E., JOHANSSON E.D.B., 1972. Radioimmunoassay of estrone and estradiol in human and bovine peripheral plasma. *Acta Endocrinologica.* 71. 716.
49. EKINS R., NEWMAN B., 1970. Theoretical aspects of saturation analysis. *Acta Endocrinologica.* 64 (Suppl.) 147.
50. ELSDEN R.P., LEWIS S., CUMMING I.A., LAWSON R.A.S., 1974. Superovulation in the cow following treatment with PMSG and prostaglandin $F_2\alpha$. *J.Reprod. Fert.* 36. 455.
51. ENGLAND B.G., KARAVOLAS H.J., HAUSER E.R., CASIDA L.E., 1973. Ovarian follicular estrogens in Angus heifers. *J. Anim. Sci.* 37. 1176.
52. ERLANGER B.F., BOREK F., BEISER S.M., LIEBERMAN S., 1958. Steroid protein conjugates. I. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone. *J. Biol. Chem.* 228. 713.
53. ERLANGER B.F., BEISER S.M., BOREK F., EDEL F., LIEBERMAN, S., 1967. The preparation of steroid-protein conjugates to elicit antihormonal antibodies. In: Williams C.A. and Chase M.C. Eds. *Methods in Immunology and Immunochemistry.* Ac. Press. Inc. New York (144 p) 180.
54. EXLEY D., JOHNSON M.W., DEAN P.D.G., 1971. Antisera highly specific for 17β -estradiol. *Steroids* 18 (5). 605.
55. EXLEY D., 1972. Specificities of antibodies to estrogens. *J. Ster. Biochem.* 3. 497.
56. EXLEY D., MOORE B., 1973. Rapid radioimmunoassay of oestradiol - 17β using computer calculation. *J. Ster. Biochem.* 4. 257.

57. EXLEY D., WOODHAMS B., 1976. Specificity of antisera raised by oestradiol-17 β -3- hemisuccinyl - bovine serum albumin. *Steroids*. 27. 813.
58. FALCK B., 1959. Site of production of oestrogen in rat ovary as studied in Micro-transplants. *Acta Physiol. Scand. (Suppl.)* 163. 1.
59. FERIN M., ZIMMERING P.E., LIEBERMAN S., VANDE WIELE R.L., 1968. Inactivation of the biological effects of exogenous and endogenous estrogens by antibodies to 17 β - estradiol. *Endocrinology*. 83. 565.
60. FRANCHIMONT P., 1970. Les principes generaux des dosages radioimmunologiques. *Ann. Biol. Clin.* 28. 3.
61. FROLICH M., THERMORSHUIZEN W., KENTER E., MOOLENAR A.J., 1974. Steroid Radioimmunoassay contribution of standards to blank values. *Steroids* 24. 1.
62. GARVERICK H.A., ERB R.E., CALLAHAM C.J., 1970. Hormone levels during the bovine estrus cycle. *J. Anim. Sci.* 31. 222.
63. GLENCROSS R.G., MUNRO I.B., SENIOR B.E., POPE, G.S., 1973. Concentration of oestradiol -17 β , oestrone and progesterone in jugular venous plasma of cows during the oestrus cycle and early pregnancy. *Acta Endocrinologica*. 73. 374.
64. GOMES W.R., MELLIN T.N., ERB R.E., 1965. Comparison of methods for hydrolysis of bovine urinary estrogen conjugates. *J. Dairy. Sci.* 48. 993.
65. GORSKY J., ERB R.E., 1959. Characterisation of estrogens in the bovine. *Endocrinology*. 64. 707.
66. HAFÉZ S., ATTAR T., 1956. Excretion of urinary estrogens in the pregnant buffalo. *Acta Physiol. Lat. Amer.* 6. 27.
67. HAFEZ E.S.E., SUGIE T., GORDON I., 1963. Superovulation and related phenomena in the beef cow. I. Superovulatory responses following PMSG and HCG injections *J.Reprod. Fert.* 5. 359.
68. HALLFORD D.M., TURMAN E.J., WETTEMANN R.P., POPE C.E., 1975. Plasma LH and estradiol in the bovine after PMSG. *J. Anim. Sci.* 41. 356.

69. HANSEL W., ECHTERKAMP S.E., 1972. Control of ovarian function in domestic animals. *Amer. Zool.* 12. 225.
70. HAWKINS R.A., OAKLEY R.E., 1974. Estimation of oestrone sulphate, oestradiol-17 β and oestrone in peripheral plasma: concentrations during the menstrual cycle and in men. *J. Endocr.* 60. 3.
71. HELLER R.H., JONES H.W., 1964. The production of ovarian dysgenesis in the rat by ethamoxotriphetol (MER.25). *Amer. J. Obst. Gynec.* 90. 264.
72. HENRICKS D.M., DICKEY J.F., HILL J.R., 1971. Plasma estrogen and progesterone levels in cows prior to and during oestrus. *Endocrinology.* 89. 1350.
73. HENRICKS D.M., HILL J.R., DICKEY J.F., LAMOND D.R., 1973. Plasma hormone levels in beef cows with induced multiple ovulations. *J. Reprod. Fert.* 35. 225.
74. HOFFMAN B., 1972. Determination of oestrogens in bovine peripheral plasma by radioimmunoassay. *J. Endocr.* 52 (1). XVI.
75. HOFFMAN B., WAGNER W.C., GIMENEZ T., 1976. Free and conjugated steroids in maternal and fetal plasma in the cow near term. *Biol. Reprod.* 15. 126.
76. HOLLANDER F.C., VAN WEEMEN B.K., WOODS G.F., 1974. Specificities of antisera against estrogens linked to albumin at different positions C₆, C₁₁, C₁₆, C₁₇. *Steroids* 23 (4). 549.
77. HOTCHKISS J., ATKINSON L.E., KNOBIL E., 1971. Time Course of serum estrogen and Luteinizing hormone (LH). Concentrations during the menstrual cycle of the Rhesus Monkey. *Endocrinology.* 89. 177.
78. HUNT M.L., LEGAULT R.R., HERRICK H., 1961. Metabolism of estrone 16-¹⁴C in the luteal phase bovine. Vth Biennial Sympos. Animal Reprod. Knoxville. Tennessee.
79. ICHII S., FORCHIELLI E., PERLOFF W.H., DORFMAN R.I., 1963. Determination of plasma estrone and estradiol - 17 β . *Anal. Biochem.* 5. 422.
80. ITTRICH G., 1958. Eine neue methode zur chemischen bestimmung der oestrogenen hormone im harn. *Z. Phys. Chem.* 312. 1.

81. JAILER J.W., 1947. A fluorimetric method for the determination of estrogens. *Endocrinology*. 41. 198.
82. JAINUDEEN M.R., HAFEZ E.S.E., LINEWEAVER J.A., 1966. Superovulation in the calf. *J.Reprod. Fert.* 12. 149.
83. JEFFCOATE S.L., SEARLE J.E., 1972. Preparation of a specific antiserum to estradiol -17 β coupled to protein through the B-ring. *Steroids* 19(2). 181.
84. JENSEN E.V., JACOBSEN H.I., 1962. Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent. Prog. Horm. Res.* 18. 387.
85. JONES J.E.S., 1954. The management of endocrine disorders of menstruation and fertility. Ed. Charles C. Thomas Springfield III.
86. KANCHEV L.N., DOBSON H., WARD W.R., FITZPATRICK P., 1976. Concentrations of steroids in bovine peripheral plasma during the oestrus cycles and the effect of betamethasone treatment. *J. Reprod. Fert.* 48. 341.
87. KATONGOLE C.B., NAFTOLIN F., YOUNGLAI E.V., 1973. Diurnal variations in ovarian steroids and luteinizing hormone in cows at oestrus. *Steroids Lipids Res.* 4.1.
88. KELLIE H.E., SAMUEL V.K., RILEY W.J., ROBERTSON D.M., 1972. Steroid glucuronoside. BSA complexes as antigens : Radioimmunoassay of steroid conjugates. *J. Ster. Biochem.* 3. 275.
89. KLYNE W., WRIGHT A.A., 1959. Steroids and other lipids of pregnant cow's urine. *J. Endocr.* 18. 32.
90. KNUPPEN R., BREVER H., 1962. Biogenesis of 11 β - hydroxy-oestrone and 16 α - hydroxy-oestrone by adrenal tissue. *Biochim. et Biophys. Acta* 58. 147.
91. KOBER S., 1931. Eine kolorimetrische bestimmung des brunsthormons. *Biochem. Z.* 239. 209.
92. KORENMAN S.G., 1968. Radio-ligand binding assay of specific estrogens using a soluble uterine macromolecule. *J. Clin. End. Met.* 28. 127.

93. KORENMAN S.G., PERRIN L.E., Mc CALLUM T.P., 1969. A radio-ligand binding assay system for estradiol measurement in human plasma. *J.Clin. Endocr.* 29. 879.
94. KORENMAN S.G., STEVENS R.H., CARPENTER L.A., ROBB M., NISWENDER G.D., SHERMAN B.M., 1974. Estradiol Radioimmunoassay without chromatography : procedure validation and normal values. *J. Clin. End. Met.* 38. (4). 718.
95. KUDLAC E., 1970. The urinary excretion of gonadotrophins and estrogens in cows during normal and synchronized cycles. *Acta Vet. Brno.* 39. 53.
96. KUSS E., GOEBEL R., 1972. Determination of estrogens by radioimmunoassay with antibodies to estrogen - C₆ - conjugates. 1: Synthesis of estradiol-17 β , estrone and estriol - 6 - albumin conjugates. *Steroids* 19. 509.
97. LACROIX E., ECHAUTE W., LEUSEN, I., 1974. The biosynthesis of estrogens by cow follicles. *Steroids* 23. 337.
98. LEMON M., SAUMANDE J., 1972. Oestradiol-17 β and progesterone after induction of superovulation by PMSG in cattle. *J. Reprod. Fert.* 31, 501.
99. LEMON M., SAUMANDE J., 1974. The evolution of ovarian steroids hormones during luteolysis and folliculogenesis in the cow. *Europ. J. Obstet. Gynec. Rep. Biol* 4/1. Suppl. S.69.
100. LEMON M., PELLETIER J., SAUMANDE J., SIGNORET J.P., 1975. Peripheral plasma concentrations of progesterone oestradiol-17 β and luteinizing hormone around oestrus in the cow. *J. Reprod. Fert.* 42. 137.
101. LEVIN L., 1945. The fecal excretion of estrogens by pregnant cows. *J. Biol. Chem.* 157. 407.
102. LIEBERMAN S., ERLANGER B.F., BEISSER S.M., AGATE F.J. (Jr.), 1959. Steroid - protein conjugates: Their chemical, immunochemical, and endocrinological properties. *Rec. Prog. Horm. Res.* 15. 165.
103. LINDNER H.R., PEREL E., FRIEDLANDER A., ZEITLIN A., 1972a Antibodies to steroids coupled to protein through ring B and their use in the radioimmunoassay of gonadal hormones. *J. Endocr.* 52 (1), XVII.

104. LINDNER H.R., PEREL E., FRIEDLANDNER S., ZEITLIN A., 1972b. Specificity of anti-bodies to ovarian hormones in relation to the site of attachment of the steroids haptens to the peptide carrier. Steroids 19. 357.
105. LONGCOPE C., 1972. The metabolism of estrone sulfate in normal males. J. Clin. End. Met. 34. 113.
106. LORIAUX D.L., RUDER H.J., LIPSETT M.B., 1971. The measurement of estrone sulfate in plasma. Steroids., 18, 463.
107. LUNAAS T., VELLE W., 1960. Estrogen metabolism in vitro in the presence of mammalian erythrocytes. A comparative study. Acta Physiol. Scand (Suppl.) 175.95.
108. MARIANA J.C., 1969. Technique d'examen in vivo des ovaires chez la vache. Ann Biol. Anim. Bioch. Biophys. 9. 657.
109. MARIANA J.C., NGUYEN HUY N., 1973. Folliculogenèse chez la vache. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 13. 211.
110. MARTIN L., 1960. The use of 2-3-5 triphenyltetrazolium chloride in the biological assay of oestrogens. J. Endocr. 20: 187.
111. MARTIN B., FOSCHETIC C., THIBIER M., 1976. Steroid protein interactions in bovine plasma. J. Reprod. Fert. 46. 143.
112. MASON B.D., KRISHNAMURTI C.R., KITTS W.D., 1972. Destrone and oestradiol in jugular vein plasma during the oestrus cycle of the cow. J. Endocr. 55. 141.
113. MELLIN T.N., ERB R.E., 1965. Estrogens in the bovine. A Review J. Dairy Science. 48. 687.
114. MELLIN T.N., ERB R.E., 1966. Estrogen metabolism and excretion during the bovine estrous cycle. Steroids 7/6. 589.
115. MIDDLEY A.R., NISWENDER G.D., RAM J.S., 1969 a. Hapten-Radioimmunoassay : A general procedure for the estimation of steroidal and other haptenic substances. Steroids 13. 731.

116. MIDGLEY A.R., NISWENDER G.D., REBART R.W., 1969 b. Principles for the assessment of the reliability of Radioimmunoassay methods (precision, accuracy, sensitivity, and specificity). Karolinska Symposia. I. 163.
117. MIDGLAY A.R., NISWENDER G.D., 1970. Radioimmunoassay of steroids. Karolinska Symposia II. 320.
118. MIKHAIL G., WU C.H., FERIN M., VAN DE WIELE R.L., 1970. Radioimmunoassay of estrone and estradiol. Karolinska Symposia. II. 347.
119. MURPHY B.E.P., 1964. Application of the property of protein - binding to the assay of minute quantities of hormones and other substances. Nature. London. 201. 679.
120. MURPHY B.E.P., 1967. 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 bioassay. J. Clin. End. Met. 27.973.
121. MURPHY B.E.P., 1970. Methodological problems in competitive protein binding techniques; the use of Sephadex column chromatography to separate steroids. Karolinska Symposia II. 37.
122. MURPHY B.E.P., D'AUX R.C.D., 1975. Use of Sephadex LH-20 column chromatography to separate unconjugated steroids. J. Ster. Biochem. 6. 233.
123. NANCARROW C.D., BUCKMASTER J.M., CHAMLEY W., COX R.I., CUMMIN I.A., CUMMINS L., DRINAN J.P., FINDLAY J.K., GODING J.R., RESTALL B.J., SCHNEIDER W., THORBURN G. D., 1973. Hormonal changes around oestrus in the cow. J.Reprod. Fert. 32.320
124. NELSON D.W., SMITH E.P., 1963. Urinary excretion of estrogenic compounds during estrus and gestation by the bovine as determined by three assay methods. J. Dairy Sci. XLVI/2. 135.
125. NIESCHLAG E., KLEY A.K., USADEL K.H., 1975. Production of steroid antisera in rabbits. In. Steroid Immunoassay. CARDIF 1975. Ed. E.H.D. Cameron, S.G. Hillier and K. Griffiths.

126. NISWENDER G.D., MIDGLEY A.R., 1970. Immunologic methods in steroid determination. F.G. Peron and B.V. Caldwell Eds. Appleton - Century Crofts. New York.
127. NISWENDER G.D., NETT T.M., MEYER D.L., HAGERMAN D.D., 1975. Factors influencing the specificity of antibodies to steroid hormones. In. Steroid Immunoassay.
128. CARDIF, 1975. Ed. E.H.D. Cameron. S.G. Hillier and K. Griffiths.
129. OAKLEY R.E., BRADSHAW L.R.A., ECCLES S., STTICH S.R., HEYS R.F., 1967. The rapid estimation of oestrogens in pregnancy to monitor foetal risk. Clin. Chim. Acta 15. 35.
130. ODELL W.D., ABRAHAM G.E., SKOWSKY W.R., HESCOX M.A., FISHER D.A., 1971. Production of antisera radioimmunoassays. W.D. Odell and W. Daughaday eds. J.B. Lippincott. Co. Philadelphia.
131. ODELL W., SKOWSKY R., ABRAHAM G.E., HESCOX M., FISHER D., GROVER P.K., 1972. Production of antisera for polypeptide and steroid radioimmunoassay. Biol. Reprod. 6. 427.
132. ODELL W.D., SILVER C., GROVER P.K., 1975. Competitive protein binding assays methods of separation of bound from free. In. Steroid Immunoassay. CARDIF 1975 Ed. by E.H.D. Cameron, S.G. Hillier and K. Griffiths.
133. PACK B.A., BROOKS, C., 1970. Metabolism of estrogens and their sulphates in rat uterine minces. Endocrinology 87. 924.
134. PELLETIER J., 1972. Dosages radioimmunologiques de la LH plasmatique ovine et bovine. In Séminaire sur les techniques radioimmunologiques, pp. 237-295. Ed. INSERM., Paris.
135. PEREZ GARCIA T., 1979. Contribución a las técnicas de trasplante ovular. Comité Técnico Internacional de la "Federation Internationales des Associations d'Eleveurs de la Race Bovine Charolaise" Vichy.
136. PEREZ Y PEREZ F., 1969. Fisiopatología de la Reproducción Animal. Madrid. Librería Editorial Científico Médica Española. 785 p.

137. PERKLEV T., 1964. Distribution and excretion of radioactivity after parental ad ministration of radioactive Polydiethylstilbestrol phosphate to rats and cows. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 117. 394.
138. PETERSON A.J., FAIRCLOUGH R.J., SMITH J.F., 1975 a. Radioimmunoassay of estradiol- 17β in bovine peripheral plasma with and without chromatography. Steroids 25 (4). 487.
139. PETERSON A.J., FAIRCLOUGH R.J., PAYNE E., SMITH J.F., 1975 b. Hormonal changes around bovine luteolysis. Prostaglandins. 10 (4). 675.
140. PHILLIPPO M., ROWSON L.E.A., 1975. Prostaglandins and superovulation in the bovine. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 15. (2) 233.
141. POPE G.S., JONES H.E.H., WAYNFORTH H.B., 1965. Oestrogens in the blood of the cow. J. Endocr. 33. 385.
142. POWEL J.E., STEVENS V.C., 1973. Simple Radioimmunoassay of 5 unconjugated ovarian steroids in a single sample of serum or plasma. Clin. Chem. 19. 210.
143. RATCLIFFE J.G., 1974. Separation techniques in saturation analysis. Br. Med. Bull. 30 (1). 32.
144. REEVES B.D., CALHOUN D.W., 1970. Reliability criteria for saturation analysis of steroids by competitive protein binding. Karolinska Symposia II. 61.
145. ROBERTSON H.A., SMEATON T.C., DURNFORD R., 1972. A method for the extraction, separation and estimation of unconjugated estrone, estradiol - 17α and estradiol 17β in plasma. Steroids 20. 651.
146. RODDARD D., BRIDSON W., RAYFORD P.L., 1969. Rapid calculation of radioimmunoassay results. J. Lab. Clin. Med. 74. 770.
147. RODDARD D., 1970. Computer analysis of radioimmunoassay and competitive protein binding assay data. Acta Endocrinologica (Suppl.) 47. 79.
148. RUDER H.J., LORIAUX L., LIPSETT M.B., 1972. Estrone sulphate. Production and - metabolism in man. J. Clin. Invest. 51. 1020.
149. RYAN K.J., SMITH O.W., 1965. Biogenesis of steroid hormones in the human ovary. Rec. Prog. Horm. Res. 21. 367.

150. SABA N., 1976. Absorption of free steroids with charcoal gelatin disks in radioimmunoassay. *J. Endocr.* 70, 141.
151. SANDBERG E., GURPIDE E., LIEBERMAN S., 1964. Quantitative studies on the metabolism of dehydroisoandrosterone sulfate. *Biochemistry* 3. 1256.
152. SAUMANDE J., TESTART J., 1974. Plasma levels of estradiol-17 β in the peripheral heifer treated to induce superovulation. *Theriogenology* 2 (5). 121.
153. SAUMANDE J., PELLETIER J., 1975. Relationship of plasma levels of oestradiol-17 β and luteinizing hormone with ovulation rate in superovulated cattle. *J. Endocr.* 64. 189.
154. SAUMANDE J., ANDRE D., 1975. Dosage radioimmunologique de l'estradiol-17 β : améliorations techniques et diminution du prix de revient de la méthode, *Pathol. Biol.* 23. 924.
155. SAUMANDE J., MARIANA J.C., 1976. Ovarian follicles and plasma oestradiol in peripheral calves after PMSG injection. *Int. Cong. Anim. Reprod. and Art. Insem. Krakow*.
156. SAUMANDE J., 1977. Induction d'une superovulation dans l'espèce bovine. Caractéristiques de l'agent stimulant. Effect sur la croissance folliculaire. Traitements utilisés. Consequences hormonales. *Ann. Med. Vet.* 121. 449.
157. SAUMANDE J., LOPEZ SEBASTIAN A., 1977. The validity of conjugated oestrogen - measurement as a reflection of folliculogenesis in the cow. *Society for the Study of Fertility. University of Nottingham. Sutton Bonigton*.
158. SAUMANDE J., 1978. Relationships between ovarian stimulation by PMSG and steroid secretion. In. SREENAN J.M. "Control of Reproduction in the cow". p.p. 169-194. M. Nijhoff. The Hague. Boston. London.
159. SAUMANDE J., 1980. Concentration of luteinizing hormone oestradiol - 17 β and progesterone in the plasma of heifers treated to induced superovulation. *J. Endocr.* 84. 425.

160. SAUNDERS E.M., 1976. Bioestrogenesis placentaria. Niveles de excreción de estrógenos., electrolitos y nitrógeno, durante los distintos períodos del ciclo reproductor de la oveja. Tesis doctoral. Universidad Complutense. Madrid.
161. SCHANBACHER B.D., EWING L.L., 1975. Simultaneous determination of testosterone 5α - androstan - 17β -ol - 3 one, 5α - androstane - 3α - 17β - diol and 5α - androstane - 3β - 17β - diol in plasma of adult male rabbits by radioimmunoassay. *Endocrinology* 97, 787.
162. SCHILLING E., HOLM W., 1963. Investigation on induction of limited multiple ovulations in cattle. *J. Reprod. Fert.* 5. 283.
163. SEREN E., LEOPOLD A., BOLELLI G., 1974. Peripheral plasma levels of oestrogens and progesterone during the bovine oestrus cycle. *Arch. Vet. Ital.* 25 (1-2) 1
164. SHEMESH M., AYALON N.; LINDNER H.R., 1972. Oestradiol levels in the peripheral blood of cows during the oestrus cycle. *J. Endocr.* 55. 73.
165. SHORT R.V., 1962. Steroid concentrations in normal follicular fluid and ovarian cyst fluid from cows. *J. Reprod. Fert.* 4. 27.
166. SHUTT D.A., 1969. Measurement of oestradiol - 17β in plasma by competitive protein binding radioassay. *Steroids*. 13. 69.
167. SHUTT D.A., COX R.I., 1973. Competitive protein binding assay of oestrone, oestradiol - 17β , oestradiol - 17α in human or ruminant plasma. *Steroids* 21 (4) 565.
168. SIROIS S.S., PHANEUF L.P., NOEL M., 1972. Variation des oestrogenes totaux du serum au cours du cycle oestral de la vache. *Can. Vet. J.* 13. 198.
169. SKELLEY D.S., BROWN L.P., BESCH P.K., 1973. Radioimmunoassay. *Clin. Chem.* 19. (2). 146.
170. SMITH J.F., FAIRCLOUGH R.J., PAYNE E., PETERSON A.J., 1974. Plasma hormone levels in the cow. I. Changes in progesterone and oestrogen during the normal oestrus cycle. *N.Z. J. Agric. Res.* 18. 123.
171. TERQUI M., DRAY F., COTTA J., 1973. Variations de la concentration de l'oestradiol - 17β dans le sang peripherique de la brebis au cours dy cycle oestral. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 277. 1795.

172. TERQUI M., 1978. Contribution a l'etude des oestrogenes chez la brebis et la truie. These de doctorat d'etat ès-Sciences naturelles. Université Paris VI.
173. TESTART J., KANN G., SAUMANDE J., THIBIER M., 1977. Oestradiol-17 β , progesterone, FSH, and LH in prepubertal calves induced to superovulate. J. Reprod. Fert. 51. 329.
174. THIBIER M., SAUMANDE J., 1975. Oestradiol-17 β , progesterone and 17 α - hydroxy progesterone concentrations in jugular venous plasma in cows prior to and during oestrus. J. Steroid. Bioch. 6. 1433.
175. TRAFFORD D.J.A., WARD P.R., FOD A.Y., MARTIN., 1976. Hydroxyapatite a reagent for the separation of free and antibody bound steroid during radioimmunoassay. Steroids 27. 405.
176. TSANG Ch., P.W., 1974. Changes in plasma levels of estrone sulfate and estrone in the pregnant ewe around parturition. Steroids. 23 (6). 855.
177. VAITUKAITIS J., ROBBINS J.B., NIESCHLAG E., ROSS G.T., 1971. A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. J. Clin. End. Met. 33. 988.
178. VARMAN P.N., SMITH E.P., HULL M.W., 1964. Estrogen secretion and excretion during estrus in dairy cows. J. Dairy. Sci. 47. 687.
179. VEENHUIZEN E.L., ERB R.E., GORSKI J., 1960. Quantitative determination of free estrone, estradiol - 17 β and estradiol - 17 α in bovine fetal cotyledons. J. Dairy Sci. 43. 270.
180. VELLE W., 1958. Studies on oestrogens in cattle. Acta Endocrinologica (KBH) 28. 186.
181. VELLE W., ERISCHSEN S., 1960. Studies on estrogens in cattle. Conversion of - estrogens by bovine kidney cells in vitro. Acta Endocrinologica. 33. 277.
182. VELLE W., 1963. Metabolism of oestrogenic hormones in domestic animals. Gen. Comp. Endocr. 3. 621.
183. WETTEMANN R.P., HAFS.H.O., EDGERTON L.A., SWANSON L.V., 1972. Estradiol and - progesterone in blood serum during the bovine estrous cycle. J. Anim. Sci. 34. 1020.

184. WILLIAMSON D.G., LAYNE D.S., 1970. The hydrolysis of estrogen glucosides by various enzyme preparations. *Steroids*. 15 (3). 327.
185. WOTIS H.H., CHARRANSOL G., SMITH I.N., 1967. Gas chromatographic measurement of plasma estrogens using an electron capture detector. *Steroids*. 10. 127.
186. WRIGHT K., ROBINSON H., COLLINS D.C., PREEDY J.R.K., 1973 a. Investigation of a radioimmunoassay for plasma estrone and estradiol - 17β in males and non-pregnant females. Comparison with an independent method using fluorimetry. *J. Clin. End. Met.* 35. 165.
187. WRIGHT K., COLLINS D.C., PREEDY J.R., 1973 b. Comparative specificity of antisera raised against estrone, estradiol - 17β and estriol using 6-O-carboxy methyloxime bovine serum albumin derivatives. *Steroids* 21. 755.
188. WU C.H., LUNDY L.E., 1971. Radioimmunoassay of plasma estrogens. *Steroids*. 18. 91.
189. YOUNGLAI E.V., SHORT R.V., 1970. Pathways of steroid biosynthesis in the intact graafian follicle of mares in estrus. *J. Endocr.* 47. 321.
190. ZETTNER A., 1973. Principles of competitive binding assays (Saturation Analysis). I. Equilibrium techniques. *Clin. Chem.* 19. (7). 699.

