

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

/CBS

074837

✓ DESCRIPCION DEL COMPORTAMIENTO HORMONAL.
(PROGESTERONA Y TESTOSTERONA) EN UN - -
GRUPO DE OVINOS DURANTE UNA EPOCA DEL -
AÑO. ✓

Tesis para optar al Grado en

✓ MAESTRIA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION
ANIMAL.

presentan

✓ M.V.Z. JOSE / CORTES ZORRILLA ,
Q.F.B. BERTHA MARGARITA RAMIREZ ANDRADE
M.V.Z. HILDA ROA HERESMANN

✓ JUNIO 1984.
—

074837

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (PCAFNAL--800596) y por la Universidad Autónoma Metropolitana - Izta palapa. Los autores agradecen al Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" las facilidades brindadas para el uso de instalaciones de laboratorios para la realización de este trabajo, lo mismo agradecen al Fideicomiso -- Lanero el préstamo de animales experimentales y la donación de material para el acondicionamiento de las instalaciones de los mismos en los terrenos de la UAM-I, así como al M.C. Nicolás Becerra por sus gestiones para este apoyo.

Agradecemos a los Drs. Gregorio Pérez Palacios y Saúl Fernández Baca la asesoría prestada al presente trabajo durante sus diferentes fases; lo mismo al Ing. José -- Landeros Valdepiña por su asesoría en el análisis de los -- datos.

Agradecemos además a todas las personas que de -- una u otra forma con su aporte desinteresado, contribuyeron a la realización de este trabajo.

I N D I C E	Página
RESUMEN	II
INTRODUCCION	1
Machos	5
Hembras	12
Técnica	19
Justificación y Objetivos	23
HIPOTESIS	26
MATERIAL Y METODOS	26
Machos	26
Análisis Estadístico	32
Hembras	35
Técnica para determinaciones hormonales	36
Condiciones de Incubación	39
Detección de la radioactividad unida al antisuero.	40
RESULTADOS	42
Machos	43
Hembras	54
DISCUSION	60
Machos	60
Hembras	65
CONCLUSIONES	68
Machos	68
Hembras	70
BIBLIOGRAFIA	71
ANEXOS	77
Anexo 1	78
Anexo 2	80
Anexo 3	82
Anexo 4	107
Anexo 5	109

R E S U M E N

El trabajo se realizó en primavera y principios de verano, con siete machos e igual número de hembras ovinos criollos de aproximadamente dos años de edad, localizados en el Distrito Federal, Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa. A los machos se les desvió el pene con el objeto de utilizarlos como detectores de celo. Se agruparon al azar en grupo I (animales 41, 42, 45 y 47) y grupo II (animales 43, 44 y 46). Estos grupos se alternaron en convivencia - (DH) y aislados de las hembras (Dsh). Los machos Nos. 43- y 47 fueron seleccionados al azar para determinar las variaciones de testosterona (T) circulante en el transcurso de las 24 horas, tomándoles una muestra cada hora. Este tipo de muestreo (M.C.) se repitió en cuatro oportunidades a lo largo del experimento.

Los otros machos fueron sangrados tres veces por semana, durante todo el experimento (M.R.). Igual muestreo se les practicó a las hembras (M.R.), además se les hizo un muestreo periestral (P.E.) alrededor del tercer estro manifestado. Este muestreo consistió en extraer una muestra de sangre cada cuatro horas durante las 48 horas previas a la fecha estimada de estro y a partir de la detección del estro, una muestra cada dos horas durante 24 horas.

Las muestras se obtuvieron por punción yugular extrayendo

20 ml. de sangre. Los sueros se conservaron en congelación hasta su procesamiento. La cuantificación de testosterona y progesterona (P_4) se realizó por radioinmunoanálisis. Se desarrolló un modelo matemático de tipo sinoidal para el análisis de los datos obtenidos en los muestreos rutinario (M.R.) y de 24 horas (M.C.), el cual mostró el comportamiento periódico de las fluctuaciones de testosterona. Este modelo permitirá que el diseño experimental de estudios sucesivos, se basen en el comportamiento periódico descrito para la testosterona, lo que disminuirá el costo, por el menor número de muestras a extraer y procesar y aumentará la sensibilidad estadística.

Los resultados de los muestreos rutinarios y de 24 horas, durante los tratamientos, indicaron que las hembras no influyeron en los niveles de testosterona de los machos.

En cinco de los siete carneros analizados hubo un aumento de las concentraciones promedio de testosterona debido al transcurso del tiempo.

En las hembras se pudo describir dos etapas: En primavera no hubo conducta manifiesta de estró, sin embargo, hubo funcionamiento ovárico ya que los niveles de progesterona en suero mostraron fluctuaciones episódicas que se elevaron por sobre los niveles basales.

La época reproductivamente activa se caracterizó por la presentación de conducta de estro a intervalos regulares y los perfiles de progesterona coincidieron con los descritos por la literatura en este estado fisiológico.

En el mes de mayo el 16.6% de las hembras presentó estro, mientras que en julio se manifestó en celo el 100%.

I N T R O D U C C I O N

Los satisfactores que la ovinocultura proporciona al hombre (carne, leche, pieles, lana, cueros, etc), además de constituir una fuente importante de trabajo, describen - por sí mismos la trascendencia que esta actividad tiene en la economía de un país. (Owen, 1976).

En México, la demanda de lana y carne ha sido superior - en las últimas décadas, a la producción interna (Cuadros 1 y 2), lo que ha provocado la necesidad de importacio-- nes constantes (Cuadros 3 y 4) (Moreno-Chang, 1976).

CUADRO No. 1

PRODUCCION NACIONAL DE LANA (Tons)

AÑO	LANA SUCIA	LANA LIMPIA
1965	6 800	2 992
1969	4 286	1 800
1975	3 802	1 546

CUADRO No. 2
PRODUCCION NACIONAL DE CARNE

AÑO	ANIMALES SACRIFICADOS (a)	CARNE EN CANAL (b)
1970	1 393 805	
1972	985 650	11 331 271
1974	1 086 647	12 496 344

(a) No incluye ovinos sacrificados en pequeñas -
rancherías para consumo local.

(b) Rendimiento de 11.5 Kg/cabeza.

CUADRO No. 3
IMPORTACION NACIONAL DE LANA

AÑO	TONS	VALOR EN PESOS (000)
1965	14 126	
1970	13 549	222.2
1975	4 379	132.0

CUADRO No. 4
IMPORTACION NACIONAL DE CARNE

AÑO	TONS	VALOR EN PESOS (000)
1970	160.3	1 622.0
1972	634.0	5 095.0
1974 (a)	379.0	3 874.0
1974 (b) 3 600.0 (c)		65 000.0 (d)

- (a) Tabulador de importaciones (Enero-Diciembre - DGE; SIC 1974)
- (b) Ganado importado para el abasto de los Estados Unidos.
- (c) Resultado del sacrificio de 180 000 cabezas, - con rendimiento de 20 Kg/cabeza.
- (d) A un precio de compra de \$7.00 en pié.

Teniendo en consideración que gran parte del país sería susceptible de ser aprovechada con ganado ovino, se hace evidente la necesidad de promover el desarrollo de esta especie.

La productividad de la especie esta determinada por una multiplicidad de factores, que influyen en mayor o menor grado en su rendimiento. Entre los más relevantes se -- pueden mencionar los de tipo genético, nutritivo, sanitario, de manejo y reproductivo. Los de tipo reproductivo son de gran importancia ya que inciden con mayor vigor - en la eficiencia productiva.

La explotación ovina se realiza, en general en dos sistemas: el extensivo y el intensivo. El extensivo, que es el más difundido, surgió como una consecuencia de relegar la producción ovina a las pasturas más pobres. En este sistema el nacimiento y el crecimiento de la cría están íntimamente asociados con las condiciones climáticas y nutricionales. La temporada de cría está predominantemente regulada por los cambios estacionales de la duración del día. Los nacimientos se producen una vez al año y generalmente coinciden con la presentación de los pastos de primavera. Por las condiciones nutricionales subóptimas, como sucede frecuentemente en estas pasturas pobres, la fecundidad está disminuida por una reducción directa en la tasa de ovulación o por la selección natural que actúa en contra de la prolificidad a través de la incapacidad de la hembra para proveer de leche a más de un cordero.

El sistema intensivo se desarrolla en praderas de calidad, lo que implica una alta inversión de capital. Los corderos se producen a intervalos más frecuentes y tan prematuramente como sea posible en la vida reproductiva de la hembra. Este sistema requiere de una perfecta sincronización en los eventos reproductivos del hato, por lo cual se hace necesario el conocimiento de las características básicas de la reproducción ovina y el control

de los mecanismos exógenos y endógenos que regulan el -- proceso reproductivo (Robertson, 1977).

Machos.

Los carneros son animales domésticos que sufren cambios estacionales por el efecto de la duración del fotoperíodo. Aunque permanecen fértiles durante todo el año, -- cuando se inicia la época en que se acorta la duración -- del día, se observan un aumento en la síntesis y liberación de gonadotrofinas hipofisiarias, que se refleja en el crecimiento y actividad endócrina de los testículos, -- glándulas accesorias y comportamiento sexual (Lincoln, y Col., 1977).

Los cambios graduales en la duración del fotoperíodo diario durante el año, constituyen el factor más importante sobre el control de la estacionalidad reproductiva del -- borrego. Se propone a la glándula pineal como un posible mediador en la información de la duración del día, -- regulando el sistema endócrino a través de la melatonina. Aunque es claro el papel que juega el fotoperíodo en la estacionalidad del borrego, actualmente no se conoce completamente el mecanismo por el cual ejerce su acción (Reiter, 1974, Barrel, y Lapwood, 1979b).

El carnero puede responder más rápidamente que la hembra a los cambios del fotoperíodo, lo que le hace un sujeto

más apropiado para el estudio de estacionalidad. Además, el macho presenta la ventaja de poseer un sistema endocrino más simple ya que carece de la retroalimentación positiva ejercida por estradiol en la hembra y naturalmente no hay ciclos estrales que hagan más complejo el estudio del ciclo estacional. En el macho se observan índices morfológicos externos útiles y fácilmente cuantificables que nos indican su estado sexual, tales como tamaño testicular, grado de coloración cutánea de la región inguinal, desarrollo de los músculos del cuello, crecimiento y muda de lana, cambio en el crecimiento de los cuernos y levantamiento del labio superior en respuesta al estímulo olfatorio. Otros parámetros que pueden ser evaluados en el macho son: volumen de eyaculado, calidad del semen concentración de fructosa seminal y niveles en plasma de hormona luteinizante (LH), hormona folículo estimulante (FSH), prolactina (Prl) y testosterona (T). -- (Lincoln y Short, 1980).

Durante el ciclo anual, se distinguen tres etapas de desarrollo del testículo: en la primera se encuentra completamente en regresión, en la segunda se encuentra en desarrollo, y en la tercera está completamente desarrollado y activo.

En el borrego LH, FSH y T presentan patrones de secreción

episódica, en la etapa de regresión del testículo los niveles en plasma de LH, FSH y T se mantienen bajos, y los picos de LH se pueden presentar con una frecuencia mayor de 8 Hrs. En la fase de desarrollo testicular, aumenta la frecuencia y amplitud de los picos, cada aumento transitorio de LH, se asocia con un aumento relativamente pequeño en los niveles circulantes de T; en esta etapa los niveles de FSH son consistentemente altos y no ocurren - aumentos episódicos como en el caso de LH. Cuando los - testículos están totalmente desarrollados, aumenta la -- frecuencia de los picos episódicos de LH; éstos picos -- son más pequeños que en la fase de desarrollo, pero los niveles de la hormona entre ellos son más altos que en - otras etapas. Cada pequeño pico episódico de LH se asocia con un pronunciado aumento de las concentraciones de T en plasma. La concentración de FSH en esta etapa es - baja y las fluctuaciones episódicas en término corto son pequeñas. (Lincoln, 1976).

Los niveles de LH, FSH, Prl y T presentan patrones estacionales. En verano y otoño cuando la duración del día disminuye, aumenta la frecuencia episódica de liberación y los niveles de LH, FSH y T; durante la primavera (cuando la duración del día aumenta) disminuye la frecuencia episódica y los niveles de LH, FSH y T.

Los cambios en la concentración de Prl están esencialmente invertidos, y así Prl aumenta en su concentración durante la primavera y verano disminuyendo en otoño e invierno.

Durante verano y otoño, el volumen de eyaculado, tamaño testicular y actividad de apareamiento aumentan considerablemente, mientras que durante la primavera estos parámetros disminuyen.

La muda y crecimiento de lana y cuernos es máxima durante la inactividad sexual. El levantamiento del labio superior en respuesta al estímulo olfatorio, la agresividad entre machos y el máximo desarrollo de los músculos del cuello, se observan sólo cuando la concentración de T es alta. (Lincoln y Col. 1977).

La hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), es secretada en pulsos por las terminales nerviosas de las neuronas de eminencia media en hipotálamo y es transportada a hipófisis anterior por el sistema porta-hipofisiaria, para ejercer su acción sobre los gonadotropos de esta región estimulando la liberación de LH y FSH en forma diferente, LH es secretada rápidamente después del estímulo de GnRH, en tanto que la respuesta de FSH es tardía. La actividad hipotálamo-hipofisiaria sufre cambios por - -

efectos de la duración del fotoperíodo durante el ciclo sexual del macho, posiblemente por cambios en la síntesis de los gonadotropos hipofisiarios ó bien por modificaciones de la secreción endógena de GnRH del hipotálamo.

Durante la exposición a días cortos el hipotálamo aumenta su actividad secretora y frecuencia episódica en la liberación de GnRH. (Pelletier y Ortavant, 1975; Lincoln, 1979).

En este mismo período LH actúa a nivel testicular sobre las células de Leydig para provocar síntesis y liberación de T; los testículos alcanzan su tamaño máximo tornándose completamente activos, aumenta la concentración circulante de T, se restaura la espermatogénesis aumenta la libido, coincidiendo con el tiempo en que las hembras inician la manifestación del estro conductual. (Lincoln, y Short, 1980).

El cambio de exposición a días largos, aumenta la sensibilidad hipotalámica del efecto retro-alimentador negativo, que la T tiene sobre la secreción de GnRH, a través de la inhibición parcial de la síntesis GnRH. (Lincoln, y Short, 1980; Pelletier y Ortavant, 1975).

La mayoría de los autores reportan niveles elevados de LH, y T durante el verano y otoño y niveles bajos durante invierno y primavera. Las concentraciones de estas hormonas, varían de un rebaño a otro; probablemente ello se deba a diferencias raciales y ubicación geográfica. Con respecto a T, Schanbacher y Lunstra (1976), reportan los niveles más bajos en marzo, (2.06 ng/nl) en la raza Finish Landrace y 1.01 para la Suffolk. La concentración más alta (mayor de 6 ng/nl) la encuentra en el mes de octubre. Gómes y Joyce (1975) en las razas Southdown, Shropshires y Targinees, describen las concentraciones más bajas en diciembre (0.76 ng/ml) con un aumento en los niveles de T en abril (3.8 ng/ml). En mayo los niveles son de 7.42 ng/nl; hay una disminución en junio a 4.15 ng/nl y en el mes de julio el nivel es de 8.31 ng/nl, para luego disminuir la concentración de agosto a septiembre. Barrel y Lapwood (1979 a) en la raza Romney reporta niveles de 1.39 ± 0.32 de septiembre a diciembre, 1.39 ± 0.32 de septiembre a diciembre, 3.12 ± 0.82 ng/nl de enero a marzo y 4.28 ± 0.99 de abril a mayo. Katangole y Col. (1974) en borregos suffolk reporta niveles de 0.3 a 10 ng/nl de enero a septiembre y de 3 a 28 ng/nl de octubre a diciembre.

Por otro lado, se ha estudiado la relación existente entre la liberación de diferentes hormonas (LH y T), bajo condiciones de iluminación natural y el período del día;

así como los factores luminosos involucrados en este lapso sobre la regulación de éstas secreciones. Las hormonas se han cuantificado a través de determinaciones realizadas en muestras sanguíneas durante períodos de 24 Hrs., en diferentes épocas del año (Ortovant y Col. 1982). En otros estudios bajo condiciones controladas (Lincoln y Col., 1977) se han observado los cambios de patrones de secreción diaria de las hormonas LH y FSH en respuesta a los cambios de duración del día, correlacionando éstos - cambios endócrinos con la actividad testicular.

Illius y Col (1976 a) han determinado en carneros los perfiles plasmáticos de T, desde el nacimiento hasta la pubertad. Detectando niveles bajos al nacimiento observan un aumento entre las semanas 10 a 16 de edad el que se incrementa paulatinamente hasta presentar un pico en la semana 26, que coincide con la aparición de la pubertad. Otro hallazgo fue el observar que el efecto depresor estacional se presenta sólo hasta el segundo año de vida. Estos mismos autores (1976 b) estudian el efecto de diferentes ambientes sociales durante el desarrollo ontogénico, sobre el comportamiento social posterior de los machos, así como el efecto del estímulo social intenso, provocado por hembras en actividad reproductiva, en los cambios de los plasmáticos de T; también han tratado de demostrar el efecto postcopulatorio en la

T circulante.

Hembras.

En la hembra el ciclo estral es de 16 a 17 días aproximadamente. Sus eventos más importantes se pueden dividir en aquéllos asociados al crecimiento del folículo y los asociados al crecimiento del cuerpo lúteo. Los primeros se pueden clasificar en dos períodos proestro y estro, los segundos en metaestro y diestro. El ciclo se describe a partir del primer día del estro.

Proestro: Su duración es de dos días y se caracteriza por el crecimiento del folículo y por la producción de estradiol (E₂).

Estro: El estro conductual es el resultado de la acción del E₂ sobre el Sistema Nervioso Central. La duración de la receptividad sexual es variable, pero en general el calor o celo dura 30 a 40 horas. Existen ovulaciones sin estro (calores silenciosos), que ocurren con frecuencia al inicio y al final de la estación de actividad sexual. En estas mismas épocas los estros son más cortos.

La primera ovulación de la estación reproductiva o del inicio de la pubertad, no está asociada frecuentemente con estro conductual. Parece que es necesario una pequeña cantidad de progesterona (P₄) para provocarlo.

En ovejas ciclando, ésta proviene del cuerpo lúteo del anterior ciclo, pero en la primera ovulación, esto no es posible. La ovulación ocurre durante la segunda mitad del celo.

Metaestro: Se inicia después de la ovulación. El cuerpo lúteo se organiza y comienza a funcionar aumentando rápidamente los niveles de P4. Su duración es de dos días.

Diestro: Tiene una duración de once a doce días. Durante este período el cuerpo lúteo se hace funcional, produciendo gran cantidad de P4.

Sin un cigoto se implanta, el cuerpo lúteo continúa funcionando durante la preñez, si el óvulo no es fecundado, el cuerpo lúteo permanece sólo hasta el día 12 o 13. El descenso de P permite un pico de FSH y el crecimiento de otro folículo.

En resumen, los estrógenos dominan durante tres o cuatro días del ciclo, mientras que la P4 domina alrededor de trece días. La primera fase se denomina folicular o estrogénica y la segunda del cuerpo lúteo o progestacional (McDonald, 1975).

Cada ciclo está regulado por un conjunto característico de hormonas reproductivas de las cuales las más estudiadas son LH, P4 y E2; sin embargo se reconoce la participación de otras tales como la Gn-RH producida por las -- neuronas endócrinas en el hipotálamo; la FSH producida -- por la hipófisis y la melatonina producida por la pineal. La contribución específica de éstas hormonas al fenómeno reproductivo, de la oveja, aún no está suficientemente es clarecida (Kaesche, 1980).

El perfil de P4 circulante refleja los cambios de la actividad secretora del cuerpo lúteo, que a su vez está re gulada por factores estimulantes provenientes de la hipó fisis, e inhibitorios cuyo origen es el útero (Legan y Karsch, 1979).

El E2 circulante deriva casi exclusivamente de varios fo lículos ováricos que se desarrollan y luego atresian du rante el curso de cada ciclo (Baird y Scaramuzzi., 1976). LH es secretada por la hipófisis en dos formas funcional mente diferentes. El pico de LH, que es una descarga ma siva producida en el estro y que produce ovulación, es consecuencia de la acción positiva de retroalimentación de los esteroides ováricos. La forma tónica de secre ción, que se produce entre ciclos sucesivos es necesario para el desarrollo normal de los ovarios y para la

secreción de LH es regulada por el efecto inhibitorio de los esteroides ováricos (Baird y Col., 1976).

Durante el ciclo estral los valores séricos de P4 varían de 0.8 ng/nl (durante la ovulación) a 4.0 ng/nl (en el día 7). Tanto en animales ovariectomizados como intactos en anestro, la concentración plasmática fluctúa alrededor de 0.2 ng/nl proveniente de la producción cortico-adrenal (Robertson, 1977).

Los niveles basales de LH, en borregos ciclando, oscilan entre 2 y 3 ng/nl, y en el pico ovulatorio entre 30 y -- 200 ng/nl (Geschwind y Dewey, 1962; Goding y Col., 1973; Scaramuzzi y Col., 1970; Pant y Col., 1977).

Los valores de estradiol plasmático descritos varían de un autor a otro (Bindon y Col., 1975; Yuthasastrakosol y Col., 1975; Pant y Col., 1977). Se sabe que el E2 fluctúa junto con las descargas pulsátiles de LH endógena - (Baird y Col., 1976; Scaramuzzi y Baird, 1977) y que -- éstas variaciones ocurren con una frecuencia de un pico cada dos horas (Baird y Col., 1976). Scaramuzzi y Land (1978) obtuvieron, en el día noveno del ciclo estral -- una concentración media de E2 de 72.2 ± 10.2 pg/nl en -- hembras Scottish Blackface y en Finish Landrace de --

66.8 ± 10.2 pg/nl y los valores preovulatorios más altos fueron de 3.4 ± 0.5 y 3.9 ± 0.5 pg/nl respectivamente. Las primeras concentraciones corresponden a sangre de la vena ovárica y las dos últimas a sangre periférica.

El período preovulatorio comienza con la destrucción del cuerpo lúteo, produciéndose una caída brusca de progesterona circulante. Previo a esto, en la fase lútea, la P4 elevada ejerce una potente retroalimentación negativa, manteniendo la secreción tónica de LH (Karsch y Col., 1979). Este control sobre LH desaparece a medida que la P4 declina, y se refleja por un gradual pero sostenido aumento de la concentración de LH sérica dos ó tres días antes del pico (Hauger y Col., 1977). El aumento de LH estimula la secreción folicular de E2 y las dos hormonas aumentan paralelamente cuatro a ocho horas. El E2 alcanza niveles suficientes como para desencadenar dos eventos, conducta de estro y el pico de LH. Este provoca la ovulación y formación de un cuerpo lúteo, el siguiente ciclo estral se inicia.

La especie ovina presenta una gran variación en la duración de la actividad sexual anual, desde la condición monoéstrica hasta el estado poliéstrico estacional en la mayoría de las razas domésticas (Thibault y Levasseur, 1974).

En cualquier raza ovina, la duración de la estación reproductiva puede ser considerablemente modificada por la localización geográfica, las características climáticas y su estado nutritivo.

La estación activa se inicia al final del verano ó principios de otoño y continúa durante el invierno. En primavera, coincidentemente con el aumento del fotoperíodo, los ciclos reproductivos cesan y la oveja entra en anestro.

Aunque existen numerosas hipótesis y un buen caudal de investigaciones al respecto, las bases endócrinas del anestro estacional no son conocidas con precisión (Korsch y Col., 1980); el conocimiento de estos mecanismos es fragmentario.

La morfología del ovario en anestro se caracteriza por ausencia de cuerpo lúteo (Thimonier y Mauleón., 1969). A pesar de que se ha comprobado la presencia de folículos de más de cinco milímetros de diámetro, su capacidad secretora se desconoce. Estos folículos pueden ovular en respuesta a un pretratamiento con esteroides y un régimen apropiado de gonadotrofinas.

Durante el ciclo estral, folículos de similar tamaño -

secretan androstendiona y 17 β estradiol (Moor - - - 1973). También la adenohipófisis tiene un contenido de gonadotrofinas que sería capaz de liberar si es adecuadamente estimulada.

Por otra parte el hecho de que a la ovariectomía, realizada durante el anestro, siga un rápido aumento de la -- concentración de LH, indica que algún producto de secreción del ovario suprime la liberación de gonadotrofinas, aún en el período de inactividad sexual. Sin embargo el conocimiento que existe al respecto no es completo ni hay un total acuerdo respecto a la interpretación de éstos mecanismos.

Se ha expuesto que la estacionalidad reproductiva estaría causada por variaciones en la actividad de la hipófisis. Los estudios de niveles de gonadotrofinas en la hipófisis de oveja durante anestro son contradictorios. Algunos -- trabajos informan que el potencial total de gonadotrofinas es más alto en anestro que durante la estación reproductiva, mientras otros no han encontrado diferencias.

Esta contradicción podría deberse en parte a que las técnicas de determinación hormonal que se han usado son variadas y a la heterogeneidad del material biológico utilizado en los diferentes experimentos. ad

El estudio de las fuentes de variación en la capacidad reproductiva de la oveja se complica por la dificultad para separar las causas de los efectos. Esto es particularmente efectivo en el caso del papel que desempeña la secreción de gonadotrofinas en la mediación de la variación estacional, en la presencia o ausencia de ciclicidad y en la variación de la tasa de ovulación dentro de ciclos.

Las diferencias en la secreción de gonadotrofinas entre ovejas cíclicas y no cíclicas, puede ser una consecuencia de la presencia o ausencia de ciclicidad más que una causa (Land y Col., 1976) Thimonier y Pelletier (1971) y Land y Col., (1973) han observado relaciones genotípicas entre el número de cuerpos lúteos formados y las características de la descarga preovulatoria de LH. Estas relaciones pueden tener origen a partir del desarrollo y ovulación de diferente número de folículos más que ser la expresión de una diferencia básica en las características de la liberación de LH, la cual puede estar asociada con las diferencias en la tasa de ovulación.

Técnica.

En los últimos 15 años se han desarrollado técnicas microanalíticas para medir concentraciones de hormonas; el radioinmunoanálisis (RIA) ha sido la técnica predominantemente usada en Endocrinología.

El método de RIA fue desarrollado en 1959 por Yallow y Berson (1959), para medir concentraciones de insulina en plasma basándose en la observación de la competencia que se establece entre un antígeno marcado y uno no marcado, por los sitios de unión de un anticuerpo específico presente en concentración limitada.

Un requisito indispensable para que el RIA sea aplicable en la medición de compuestos orgánicos, es que éstos tengan capacidad antigénica. Las hormonas esteroides son sustancias con bajo peso molecular (menor de 1000), que requieren acoplarse covalentemente a proteínas (albúmina sérica bovina ó humana). La unión covalente entre la proteína y el esteroide, se da entre los grupos amino o carboxilo de la proteína y los grupos cetónicos ó hidroxilo de la hormona esteroide, usando diversas reacciones (Lieberman y Col., 1959; Torneycroft y Col, 1970).

Abraham (1968), demuestra que los reactivos necesarios para el desarrollo de éste método estaban disponibles desde hacía una década. Sin embargo no eran aplicables para cuantificar niveles hormonales en líquidos biológicos (en el rango de 10^8 lt/mol).

La baja afinidad del antisuero constituía la principal

limitante, dado que la sensibilidad del RIA es directamente proporcional a la constante de afinidad del antisuero que se utiliza; la constante de afinidad aceptable para que un antisuero pueda usarse en RIA es de 10^9 a 10^{10} lt/mol.

No fue sino hasta 1969 cuando Abraham, produjo un antisuero con constante de afinidad de 2.8×10^{10} lt/mol, este antisuero para el desarrollo del RIA en fase sólida, de 17μ -estradiol.

A través de los años el RIA ha sufrido modificaciones esencialmente en:

- Tipos de isótopos usados para marcar las hormonas.
- Fase de separación del antígeno libre después del período de incubación.
- En RIA para hormonas esteroides se usan dos tipos de marcadores, yodo 125 (^{125}I) y tritio (H^3). El marcaje con ^{125}I logra un mayor título del antisuero y aumenta la sensibilidad de la técnica, sólo cuando se usa un antisuero con alta afinidad. Las ventajas que presenta este isótopo son su corta vida media (60 días) y el alto poder de emisión de rayos gamma. Se prefiere el uso del tritio por las siguientes razones:

El bajo poder de emisión de rayos beta; una vida media más prolongada (12 años) y consecuentemente, la actividad específica de los esteroides -- marcados con este isótopo no cambia apreciablemente durante el período de su uso y los esteroides marcados con tritio pueden usarse como marcadores para corrección de recuperación (Abraham y Manlimos, 1977).

Al final del período de incubación es necesario separar el antígeno marcado unido al anticuerpo, del antígeno marcado libre; esta fase de separación puede hacerse por varios métodos:

Por precipitación, usando sales (sulfato de amonio) ó solventes orgánicos (etanol, metanol, acetona); por adsorción del antígeno marcado (carbón cubierto con dextran, sílica, talco, intercambio de resinas); por inmovilización del antígeno (fijando el antisuero a las paredes internas del tubo ó por el uso de proteína A del *Staphilococcus aureus*) ó por inmunoprecipitación usando un segundo anticuerpo (producido contra la gamma globulina, de la especie en la que se generó el primer anticuerpo).

El método de RIA en la actualidad es altamente sensible,

específico y confiable y ofrece la posibilidad de procesar gran número de muestras en forma simultánea.

La cuantificación de hormonas esteroides (T y P4) en líquidos biológicos por la técnica de RIA, ha permitido -- profundizar el estudio de aspectos reproductivos (del macho y de la hembra) en diferentes especies en general y en el ovino en particular.

La valoración de T en suero ha facilitado el estudio de las variaciones estacionales que presenta esta hormona y la correlación que existe con la conducta sexual, producción, cantidad y calidad del semen y evaluación de la -- función testicular. En la oveja, la P4 se ha cuantificado en suero, plasma y leche para el estudio de: ciclo -- estral, preñez normal, diagnóstico temprano de preñez, -- detección de estro no manifiesto, evaluación de la fun-- ción ovárica de hembras infértiles ó anormales y diagnós-- tico de mortalidad embrionaria entre otros (Perera y -- Abeyratne 1979).

Justificación y Objetivos.

Como se puede observar, el estudio de la reproducción de la especie ovina, es un campo ampliamente abordado a nivel mundial. Sin embargo, teniendo presente que este fenómeno está fuertemente influido por factores ambientales, tales como nutrición y características del fotoperío

do, determinadas principalmente por la localización geográfica, se hace evidente la necesidad de estudiarlo localmente.

En México, esta línea de investigación se está desarrollando a través de la actividad de diferentes grupos.

El presente trabajo tiene como finalidad contribuir, en alguna forma, al conocimiento de este fenómeno a nivel regional.

Actualmente las diferentes regiones de producción ovina en México, utilizan criterios reproductivos que en la mayoría de los casos, son resultado de la simple observación (Valencia y Col. 1982; Hernández y Col. 1983; - - - Barron y Col. 1981; Valencia y Col. 1978).

La caracterización del comportamiento reproductivo desde el punto de vista hormonal, permitirá el conocimiento -- más preciso de los mecanismos involucrados en la reproducción, posibilitando la programación más adecuada y racional de la actividad reproductiva de la especie, con todos los beneficios que esto implica.

Los objetivos generales de este trabajo son:

• Caracterizar el comportamiento reproductivo de los --

ovinos en las diferentes regiones del país.

- Identificar las épocas de empadre más adecuadas.
- Formular recomendaciones para un manejo reproductivo más eficiente de la especie.

Los objetivos particulares propuestos para la etapa que cubre este informe son:

- Obtener capacitación en la metodología para la determinación cuantitativa de algunas hormonas reproductivas del ovino.
- Establecer la metodología para la cuantificación de estas hormonas (T y P4).
- Describir el comportamiento hormonal en una época del período reproductivo del macho y del ciclo reproductivo de la hembra en ovinos criollos.

H I P O T E S I S

- Hay diferencias en los niveles hormonales de los machos en presencia de hembras y de los machos sin hembras.
- La estación del año es un factor importante en los niveles hormonales de los machos, sin importar la presencia o ausencia de las hembras.
- El patrón del perfil endócrino de las hembras, puede variar en el transcurso del año.
- Estas variaciones tienen como consecuencia la manifestación de estacionalidad.

MATERIAL Y METODOS

Machos.

Se trabajó con un hato de siete machos e igual número de hembras ovinos criollos, de aproximadamente dos años de edad.

Los machos provenían del Estado de México. Se identificaron con arete numerándolos del 41 al 47. Se pesaron,-

se obtuvieron muestras de sangre y heces para análisis clínico, se les administró un antiparasitario interno; se esquilieron y bañaron con un antiparasitario externo. Las hembras provenientes del Estado de Querétaro, se identificaron por medio de un arete numerándolas del 1 al 7, y se les sometió a igual manejo que el descrito para los machos.

Durante el experimento se administró a la totalidad de los animales, una dieta de mantención de heno de alfafa y rastrojo de maíz en proporción de 11.9 gr. y 15.87 gr. respectivamente por kilo de peso vivo, y sal mineralizada "ad libitum". Se controló el peso individual (Cuadro No. 5 y 6).

CUADRO No. 5
CONTROLES DE PESO CORPORAL DE MACHOS (Kg)

ANIM. No / MES	MAR.	ABR.	MAY.	JUN.	JUL.	AGO.	OCT.	DIC.	$\bar{x}$
41	33.0	30.0	34.0	34.5	35.0	36.5	39.0	39.0	35.1
42	32.5	30.5	34.5	35.5	36.0	38.0	41.5	42.0	36.3
43	35.0	32.0	36.5	37.5	36.5	35.5	37.5	39.0	36.2
44	30.0	26.5	30.5	32.0	33.0	34.5	37.5	40.0	33.0
45	21.1	19.5	21.5	23.0	23.0	23.0	27.0	24.0	22.8
46	33.5	29.5	32.5	34.5	37.0	36.5	40.0	42.0	35.7
47	36.5	33.0	34.0	34.0	34.0	33.0	38.5	37.0	35.0

CUADRO No. 6

CONTROLES DE PESO CORPORAL DE HEMBRAS (Kg)

ANIM. No. MES	MAR.	ABR.	MAY.	JUN.	JUL.	AGO.	OCT.	DIC.	$\bar{x}$
1	28.3	26.0	29.0	29.0	30.0	29.0	30.0	29.5	28.9
2	39.0	38.5	40.5	38.0	40.0	37.0	35.0	32.5	37.6
3	32.3	33.5	35.5	33.5	34.0	34.5	36.5	36.5	34.5
4	44.8	43.5	47.5	47.0	48.5	47.5	51.0	38.5	46.0
5	34.8	35.0	37.0	37.0	37.5	38.0	39.5	38.5	37.2
6	36.5	35.0	41.0	40.0	41.5	40.5	42.0	38.5	39.4

A todos los machos del experimento se les practicó desviación de pene con el objeto de utilizarlos como detectores de celo. Después de diez días, de transcurrida la operación, se procedió a observar la presentación de celos. Diariamente, en la mañana después de dar de comer a machos y hembras por separado en sus corrales, se sacaron a un potrillo y se observaron durante media hora. En el día permanecieron en el mismo potrillo y en la tarde, después de darles de comer separadamente se observaron por el mismo período que en la mañana y se estabularon en corrales separados.

Se agruparon al azar en grupo I (animales 41, 42, 45 y 47) y grupo II (animales 43, 44 y 46). Estos grupos se alternaron en convivencia (DH) y aislados de las hembras (DsH) en una primera etapa de aproximadamente 35 días de duración y al cambio de tratamiento, una segunda etapa de 60 días (cuadro No. 7).

CUADRO No. 7

DISTRIBUCION DE MACHOS POR TRATAMIENTO

ETAPAS	GRUPO	TRATAMIENTO	PERIODO DE MUESTREC	DURACION DEL TRATAMIENTO (DIAS)
1a.	I (41, 42, 45, 47*)	DsH <u>1/</u>	27-IV al 25-V	33
	II (43*, 44, 46)	DH <u>2/</u>	20-IV al 25-V	38
2a.	I	DH	28-V al 24-VIII	60
	II	DsH	28-V al 24-VII	60

1/ DsH Machos sin hembras

2/ DH Machos en presencia de hembras.

* Animales con muestreo cada hora durante un día.

El muestreo se realizó en primavera y principios de verano. Los animales 43 y 47 se utilizaron para determinar las variaciones de T circulante en el transcurso de las 24 horas (MC), tomándoles una muestra cada hora. (Cuadro No. 7). Este tipo de muestreo se repitió en cuatro oportunidades a lo largo del experimento. El muestreo rutinario (MR), se realizó tres veces por semana, los días lunes, miércoles y viernes, extrayendo la muestra en la mañana antes de dar de comer a los animales (Cuadro No. 8).

Análisis Estadístico.

Se aplicó un análisis estadístico a través de una prueba de hipótesis para observar si existían diferencias significativas en las concentraciones de T de los machos bajo tratamiento DH y DsH.

Se utilizó un análisis de regresión para determinar si existía un comportamiento periódico. Se seleccionó la curva sinoidal como base para realizar el ajuste de los datos observados. Este ajuste no lineal se hizo por mínimos cuadrados. Al análisis de regresión y correlación se les calculó la F de Fisher del análisis de varianza respectivo para conocer si el ajuste era estadísticamente significativo.

El modelo matemático para ajuste sinoidal parte de los --

siguientes parámetros:

- T Período: longitud del más pequeño intervalo de tiempo en el cual el evento periódico produce un ciclo completo.
- ϕ Acrofase: tiempo en el cual la curva sinoidal tiene su valor más alto.
- C Valor intermedio de la curva sinoidal
- a Distancia entre el valor intermedio (C) y el valor más alto ó más bajo de la curva sinoidal.
- W Frecuencia angular: $\frac{2\pi}{T}$

CUADRO No. 8

TIPOS DE MUESTREO Y CANTIDAD DE MUESTRAS

OBTENIDAS EN MACHOS

TRATAMIENTO	TIPO DE MUESTREO	GRUPO I ANIMAL No.				GRUPO II ANIMAL No.				TOTAL GRUPOS		
		41	42	45	47	43	44	46	I	II	I-II	
Dsh 1/	MR 3/	13	13	13	-	-	25	25	39	50	89	
	MC 4/	-	-	-	48	47	-	-	48	47	95	
DH 2/	MR	25	25	25	-	-	16	16	75	32	107	
	MC	-	-	-	47	48	-	-	47	48	95	
TOTAL	—	38	38	38	95	95	41	41	209	177	386	

1/ Tratamiento sin hembras

2/ Tratamiento con hembras

3/ Muestreo Rutinario (3 veces/semana)

4/ Muestreo Circádico (cada hora/24 horas)

Hembras.

A las hembras se les practicó dos tipos de muestreo: el rutinario (MR), con igual frecuencia y siguiendo las mismas normas que en los machos y el muestreo periestral (PE) -- efectuado en cada hembra alrededor del tercer estro manifestado. Teniendo como referencia los dos estros anteriores, se estimó la fecha del tercero y se inició el muestreo periestral 48 horas antes, extrayendo una muestra cada cuatro horas. A partir de la detección del celo, el muestreo se hizo más frecuente, cada dos horas, y se prolongó por 24 horas más, (Cuadro No. 9).

CUADRO No. 9

TIPOS DE MUESTREO Y CANTIDAD DE MUESTRAS OBTENIDAS EN HEMBRAS

TIPO DE MUESTREO	A N I M A L N o							TOTAL
	1	2	3	4	5	6	7	
MR <u>1/</u> A <u>3/</u> ER <u>4/</u>	47	38	38	-	33	38	29	223
	6	14	14	27	18	14	6	99
PE <u>2/</u>	23	23	11	42	33	22	23	177
T O T A L	76	75	63	69	84	74	58	499

- 1/ Muestreo rutinario
- 2/ Muestreo periestral
- 3/ Epoca sin estro manifestado
- 4/ Epoca reproductiva

Las muestras se obtuvieron por punción yugular con aguja estéril, recibiendo la sangre (20 ml) en vacutainer. Los sueros divididos en cuatro alícuotas, se conservaron en congelación hasta su procesamiento.

El método seleccionado para cuantificar T y P4 en suero de ovinos fue el RIA de fase líquida por ser altamente sensible y específico además de requerir pequeños volúmenes de suero, (Abraham y Col., 1977).

La validación del RIA para T y P4 en suero de ovejas, se hizo a través de curvas de paralelismo (Reimers y Col., 1981). (Anexo No. 5).

Previo al RIA las muestras de suero, fueron sometidas a un proceso parcial de purificación. (Anexo 3).

Técnica para Determinaciones Hormonales.

Secuencia de trabajo para el RIA.

La secuencia de trabajo establecida para procesar las muestras problema por RIA fue como sigue: Debido a que la capacidad máxima del cabezal de la centrifuga refrigerada fue de sólo 96 tubos, cada RIA tuvo como máximo ese número de tubos.

Los tubos 1 y 2, 41 y 42, 95 y 96 siempre correspondieron a

uniones máximas entre la hormona marcada (progesterona 1, 2,6,7-³H) con el antisuero (anti-P4 ó anti-T), en ausencia de la hormona no marcada (estandar o problemas). A este grupo de tubos se le agregó 0.5 ml de buffer de fosfatos pH 7.2.

Los tubos 21 y 22, 61 y 62, y 93 y 94 fueron uniones no específicas que permitieron observar que tanta radioactividad u hormona marcada se adhirió a cualquier compuesto que no sea el antisuero (anti-P4 ó anti-T). Este grupo de tubos recibió un volumen de 0.6 ml del mismo buffer.

Los tubos 15 y 16, 55 y 56 y, 87 y 88 contuvieron el control de calidad con concentración alta; permitieron evaluar el comportamiento de la curva estandar en su parte baja.

Los tubos 17 y 18, 57 y 58 y, 89 y 90, fueron controles de calidad con concentración media; permitieron ver el comportamiento de la curva estandar en su parte media.

Los tubos 19 y 20, 59 y 60 y 91 y 92 fueron controles de calidad con concentración baja que permitieron evaluar el comportamiento de la curva estandar en la parte alta.

Todos los tubos correspondientes a control de calidad recibieron una alícuota de 0.5 ml del extracto resuspendido en solución buffer de fosfatos antes mencionada.

El objetivo de colocar al inicio, a la mitad y al final - del RIA uniones máximas, uniones no específicas y controles de calidad de concentración alta, media y baja es el determinar variación intra-análisis y en el caso específico de los controles de calidad, la evaluación de la variación interanálisis del método. (Rodbard, 1974).

Los tubos 3 al 14 contuvieron el estandar en dosis que van de 11.77 a 376.8 pg/0.5ml para la curva estandar de P4; y de 11.52 a 368.64 pg/0.5 ml para la curva estandar de T. - Cada dosis aumentó progresivamente al doble y se procesó por duplicado.

Este grupo de estándares permitió construir la curva dosis respuesta que sirvió como referencia para conocer la concentración de los sueros problema.

Los tubos restantes, es decir del 23 al 40, del 43 al 54 y del 63 al 86 contuvieron alícuotas de 0.5 ml del extracto resuspendido de los sueros problema, procesadas por duplicado lo que permitió analizar 27 muestras por RIA.

Después de alicuotar el buffer, estándares y extractos resuspendidos de los sueros problema y controles de calidad, los 96 tubos recibieron un volumen de 0.1 ml de P4 1, 2, 6, 7-³H ó T 1, 2, 6, 7-³H con aproximadamente 20 000 dpm. Luego

se agrega un volúmen de 0,1 ml de antisueros anti-T - - -
(1:45 000) o anti-P4 (1:70 00), Al grupo de tubos de - -
unión no específica (UNE) no se les adicionó antisuero.

Condiciones de Incubación.

Una vez que se hubo agregado estos reactivos, se agitaron en vortex por aproximadamente 3 segundos, colocando, luego la gradilla con los tubos a 4°C durante 18 a 24 horas para que la reacción antígeno-antisuero alcanzara el equilibrio. La incubación se desarrolló a 4°C para permitir la interacción antígeno-antisuero y evitar el crecimiento bacteriano.

Separación del esteroide libre del unido al antisuero.

Después del período de incubación, el esteroide marcado libre se separó del unido al antisuero con la suspensión de carbón cubierto con dextran (0.625g%) en solución de buffer de fosfatos agregado en un tiempo máximo de 2 minutos; permaneciendo en contacto con éste reactivo durante 15 minutos, contados a partir de la adición del carbón-dextrán al tubo No. 1 y todo ello a una temperatura de 4°C.

Después de los 15 minutos de incubación, los tubos fueron centrifugados a 4°C durante 10 minutos, a 3 000 rpm. Al final de este período, los tubos fueron regresados a la gradilla sobre baño de hielo con agua para mantener sedimentado el carbón y evitar que la hormona marcada unida al

antisuero se desuniera,

Se seleccionó al carbón-dextrán para separar el esteroide marcado unido al antisuero del marcado libre, porque:

El carbón-dextrán minimiza la interferencia no específica (blanco) en el análisis, la adsorción de esteroides libres es de 95 a 98% y ocurre en sólo 20 minutos y porque proporciona una alta precisión al análisis con un coeficiente de variación de la curva estándar de sólo 2%.

Detección de la radioactividad unida al antisuero.

El sobrenadante de cada uno de éstos tubos, se decantó en viales de vidrio con bajo contenido de potasio 40. Luego, cada frasco recibió un volumen de 5 ml de solución de conteo BBS, (Anexo 3), tapando e identificando cada uno de ellos, se agitaron en vortex y se limpió la superficie externa con alcohol etílico para quitar grasas que pudieran interferir en la transmisión de la luz. Los viales se colocaron en un espectómetro de centelleo líquido y se contó - - cada tubo durante un minuto.

Para el cálculo de la concentración de la P4 y T en suero de concentración desconocida se utilizó la transformación Logit-Log de la relación U^*/U_0^{**} vs. Log decimal de la dosis, introducida por (Rodbard, y Col., 1969), porque su prime la posibilidad de prejuicios personales en el trazo

de la curva dosis-respuesta, y en el cálculo de las muestras desconocidas.

*U = Antígeno marcado unido al antisuero en presencia de antígeno no marcado (desconocido ó estándar).

**U₀ = Antígeno marcado unido al antisuero en ausencia de antígeno no marcado.

074837

RESULTADOS

Machos

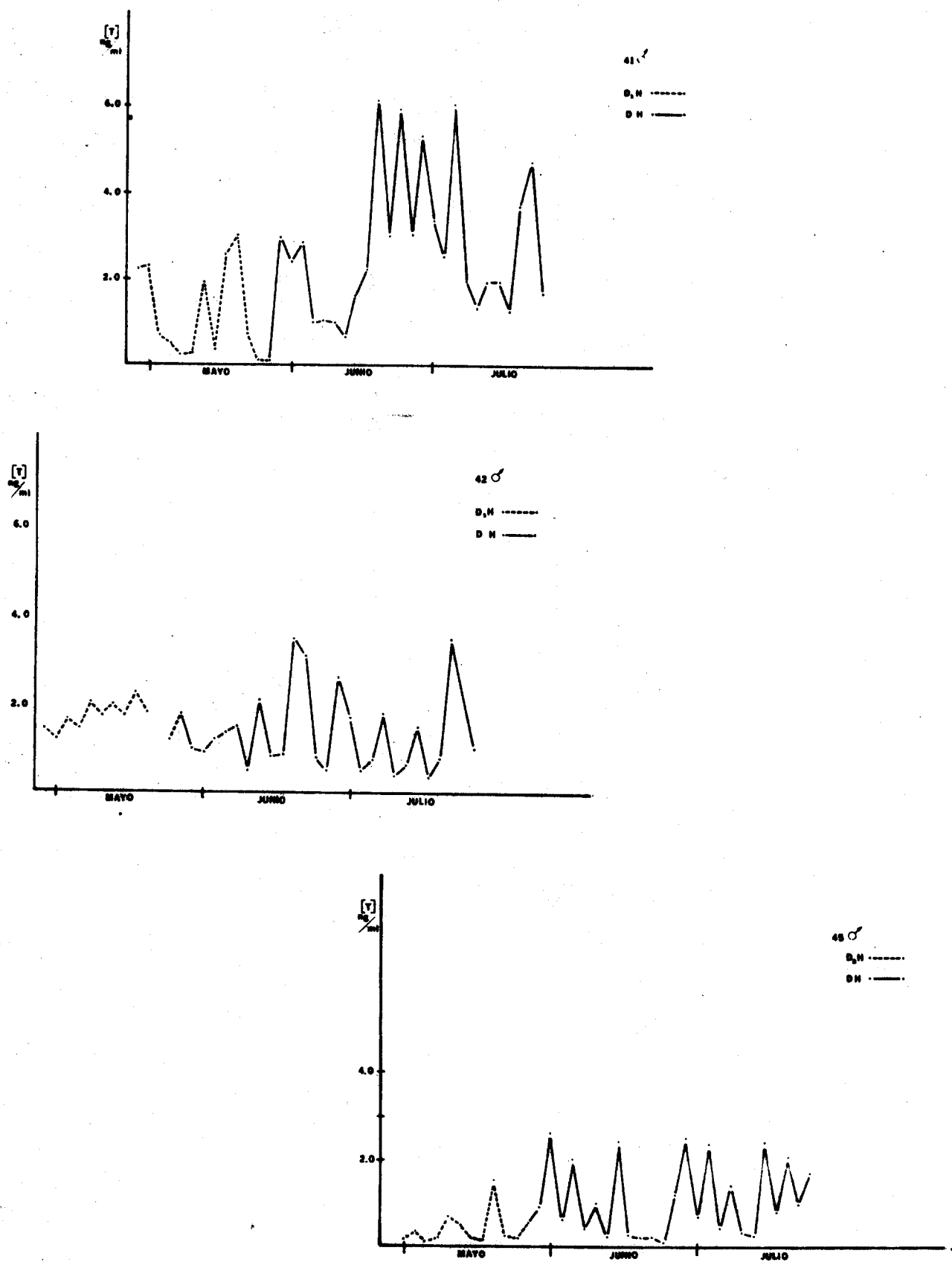


FIGURA No. 1

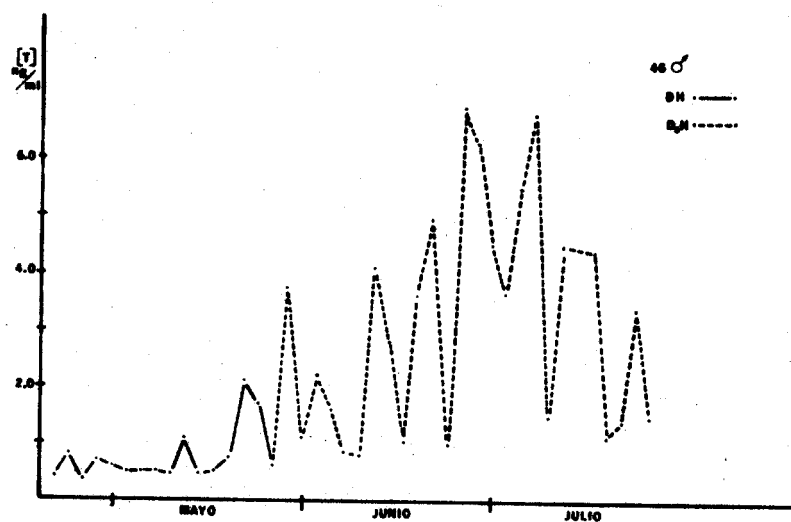
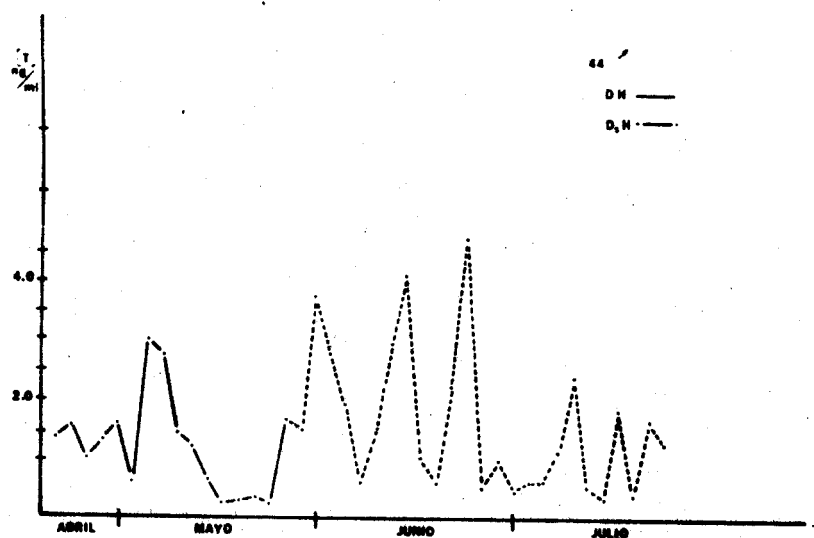


FIGURA No. 1

Perfiles de testosterona sérica de los carneros GRUPO I (41, 42 y 43) y GRUPO II (44 y 45) durante los tratamientos con hembras (DH) y sin hembras (DH-).

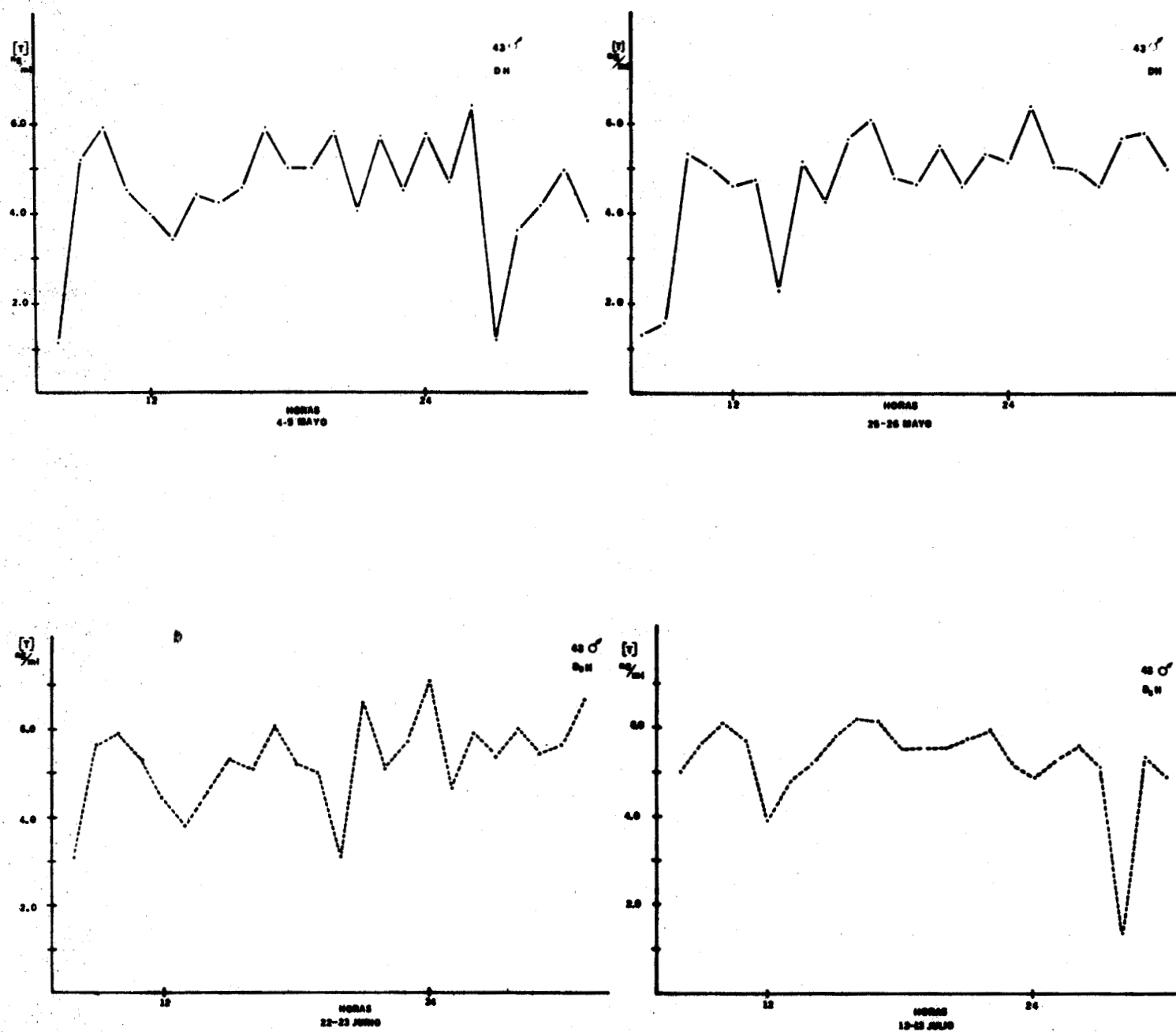


FIGURA No. 2

Perfiles de testosterona sérica, del carnero 43 (GRUPO I) en cuatro muestras de 24 h, durante los tratamientos con hombres (DH) y sin hombres (Dh).

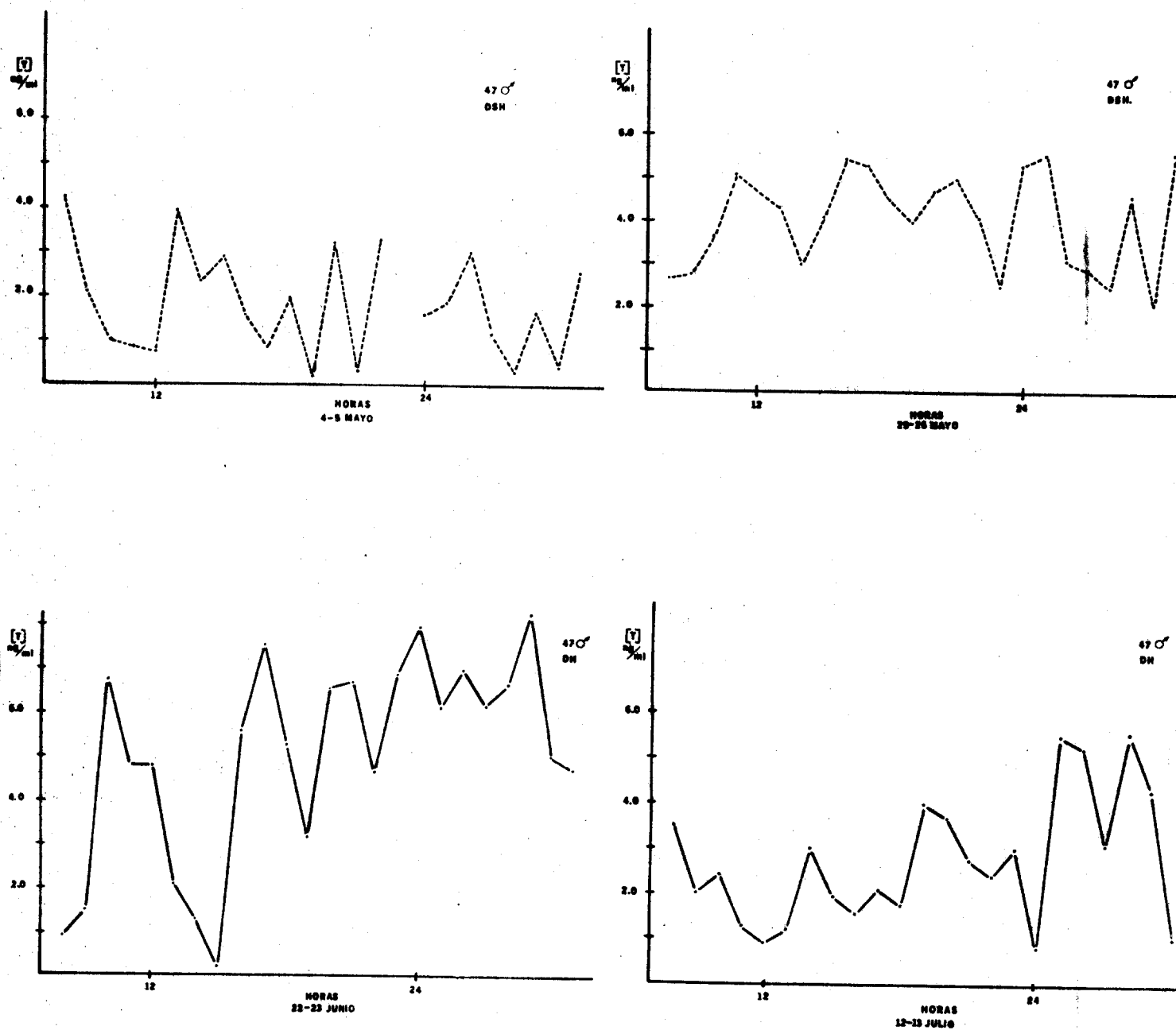


FIGURA No. 3

Perfiles de testosterona sérica del carnero 47 (GRUPO II) de cuatro muestreos de 24 h, durante los tratamientos sin hembras (DSH) y con hembras (DH).

CUADRO No. 10
VALORES PROMEDIO DE TESTOSTERONA EN SUEROS DE MACHOS CRIOLLOS
(ANÁLISIS DEL MUESTREO RUTINARIO)

MACHO No.	n	$\bar{x}$ (ng/ml)	s	GRUPO	n	$\bar{x}$ (ng/ml)	s	t.
GRUPO I	41	13	1.18	1.06	25	2.80	1.68	-3.16*
	42	12	1.68	0.33	25	1.35	0.95	118 (ns)
(Dsh)	45	12	0.42	0.40	25	1.12	0.88	-2.62*
GRUPO II	44	16	1.20	0.82	25	1.61	1.24	-1.16 (ns)
(DH)	46	16	0.76	0.49	25	3.21	1.96	-4.89*

DH Tratamiento machos en presencia de hembras

Dsh Tratamiento machos sin hembras

* significativo ($p < 0.05$)

ns no significativo

CUADRO No. 11
VALORES PROMEDIO DE TESTOSTERONA SERICA EN MACHOS CRIOLLOS
(ANALISIS DE LOS CUATRO MUESTREOS DE 24 h)

MUES- Treo No.	TRATAMIENTO CON HEMBRAS				t DENTRO DE TRATAMIENTOS		t ENTRE TRATAMIENTOS
	1	2	3	4			
Macho No. 43	n 24 $\bar{x}$ 4.46 1.28	24 4.73 1.28	24 5.29 0.10	23 5.26 0.98	$t_{1,2} = -0.73$ ns $t_{3,4} = 0.09$ ns		-2.89*
TRATAMIENTO SIN HEMBRAS							
Macho No. 47	n 24 $\bar{x}$ 1.85 1.18	24 4.08 1.11	23 4.89 2.28	23 2.28 1.46	$t_{1,2} = -6.73$ * $t_{3,4} = 3.81$ *		-2.69*

* Significativo ($p < 0.05$)
ns No significativo

CUADRO No. 12
VALORES PROMEDIO DE TESTOSTERONA SERICA
DE MACHOS CRIOLLOS

(Primera y segunda etapas de los muestreos rutinario y de 24 h).

MACHO No.	PRIMERA ETAPA $\bar{x}$ (ng/ml)	SEGUNDA ETAPA $\bar{x}$ (ng/ml)	t
41	1.18 <u>b/</u>	2.80 <u>c/</u>	-3.16*
42	1.68 <u>b/</u>	1.36 <u>c/</u>	118 (ns)
43 <u>a/</u>	4.46 <u>c/</u> 4.73	5.29 <u>b/</u> 5.26	-2.89*
44	1.20 <u>c/</u>	1.61 <u>b/</u>	-1.16 (ns)
45	0.42 <u>b/</u>	1.12 <u>c/</u>	-2.62*
46	0.76 <u>c/</u>	3.21 <u>b/</u>	-4.89*
47	1.85 <u>b/</u> 4.08	4.89 <u>c/</u> 2.28	-2.69*

a/ Machos con muestreo de 24 Hrs.

b/ Tratamiento machos sin hembras

c/ Tratamiento machos en presencia de hembras

* significativo

ns no significativo

074837

CUADRO No. 13

ANALISIS DE REGRESION SINOIDAL DEL RITMO DE LA SECRECION
EPISODICA DE TESTOSTERONA SERICA EN BORREGOS CRIOLLOS.

Macho No.	Y	=	a	Sen ($\frac{2\pi}{T}t + \phi$)	+	C	T	CORRE LACION	ANOVA F	P <
43+	(I)		0.76	Sen($\frac{2\pi}{7} - 1.51$)	+	4.44	7	0.42	2.30	.10
	(II)		0.75	Sen(" + 1.05)	+	4.75	7	0.42	2.25	.10
	(III)		0.62	Sen(" - 0.89)	+	5.24	7	0.45	2.59	.10
	(IV)		0.53	Sen(" - 1.06)	+	5.25	7	0.33	1.65	.20
47+	(I)		0.65	Sen($\frac{2\pi}{6} - 0.71$)	+	1.18	6	0.40	1.85	.20
	(II)		0.62	Sen(" - 0.19)	+	4.09	6	0.41	2.14	.10
	(III)		1.50	Sen(" + 0.46)	+	4.96	6	0.46	2.74	.10
	(IV)		0.74	Sen(" + 0.14)	+	2.75	6	0.37	1.60	.20
41	(I)		0.95	Sen($\frac{2\pi}{3} + 1.13$)	+	1.24	3	0.67	4.12	.05
	(II)		0.87	Sen($\frac{2\pi}{4} - 0.92$)	+	2.83	4	0.38	1.80	.20
45	(I)		0.22	Sen($\frac{2\pi}{5} + 0.17$)	+	0.45	5	0.41	0.91	ns
	(II)		0.53	Sen($\frac{2\pi}{4} - 0.40$)	+	1.10	5	0.43	2.47	.10
44	(I)		0.35	Sen($\frac{2\pi}{12} - 0.26$)	+	1.20	12	0.30	0.65	ns
	(II)		0.50	Sen(" - 1.06)	+	1.59	12	0.51	3.94	.05
46	(I)		0.38	Sen($\frac{2\pi}{11} - 0.92$)	+	0.77	11	0.56	2.96	.10
	(II)		1.46	Sen(" - 1.52)	+	3.21	11	0.06	0.03	ns

T Período

a Amplitud

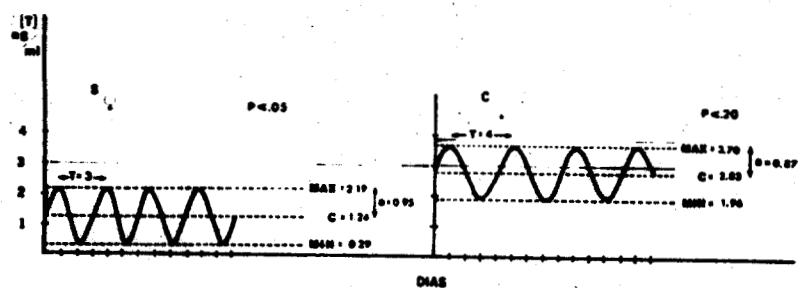
 ϕ Acrofase

C Valor intermedio de la curva sinoidal

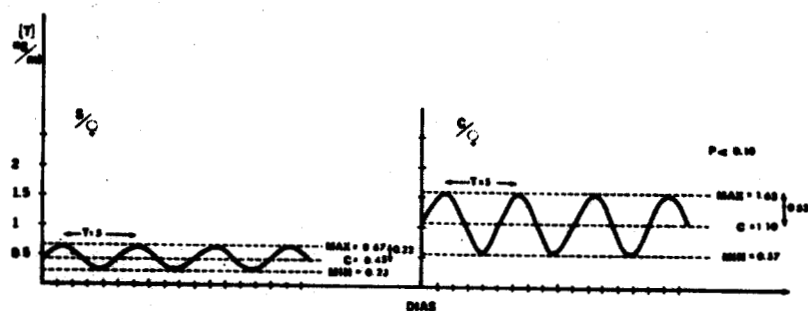
W $\frac{2\pi}{T}$

+ Muestreo de 24 h

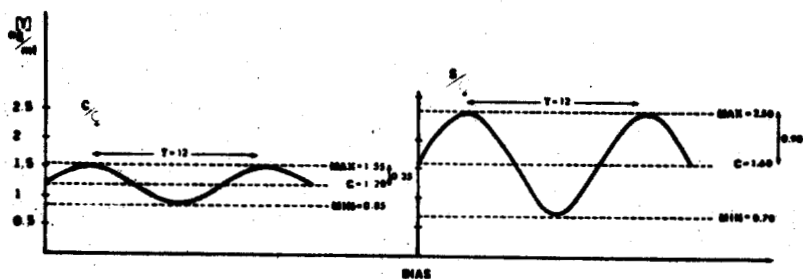
ns No significativo



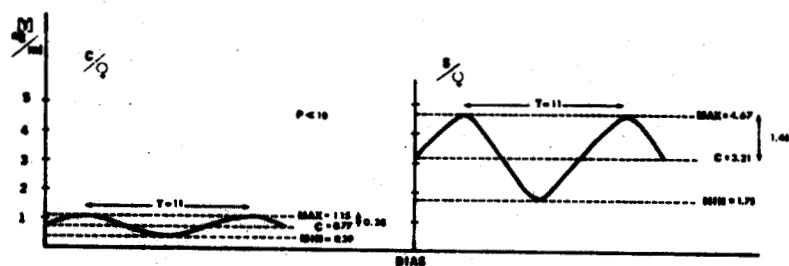
MACHO 41



MACHO 43



MACHO 44



MACHO 45

FIGURA No. 4

Análisis del ritmo de la secreción epidídica de testosterona sérica de los carneros del GRUPO I (41 y 43) y del GRUPO II (44 y 45), durante los tratamientos con hembra (a/q) y sin hembra (s/q).

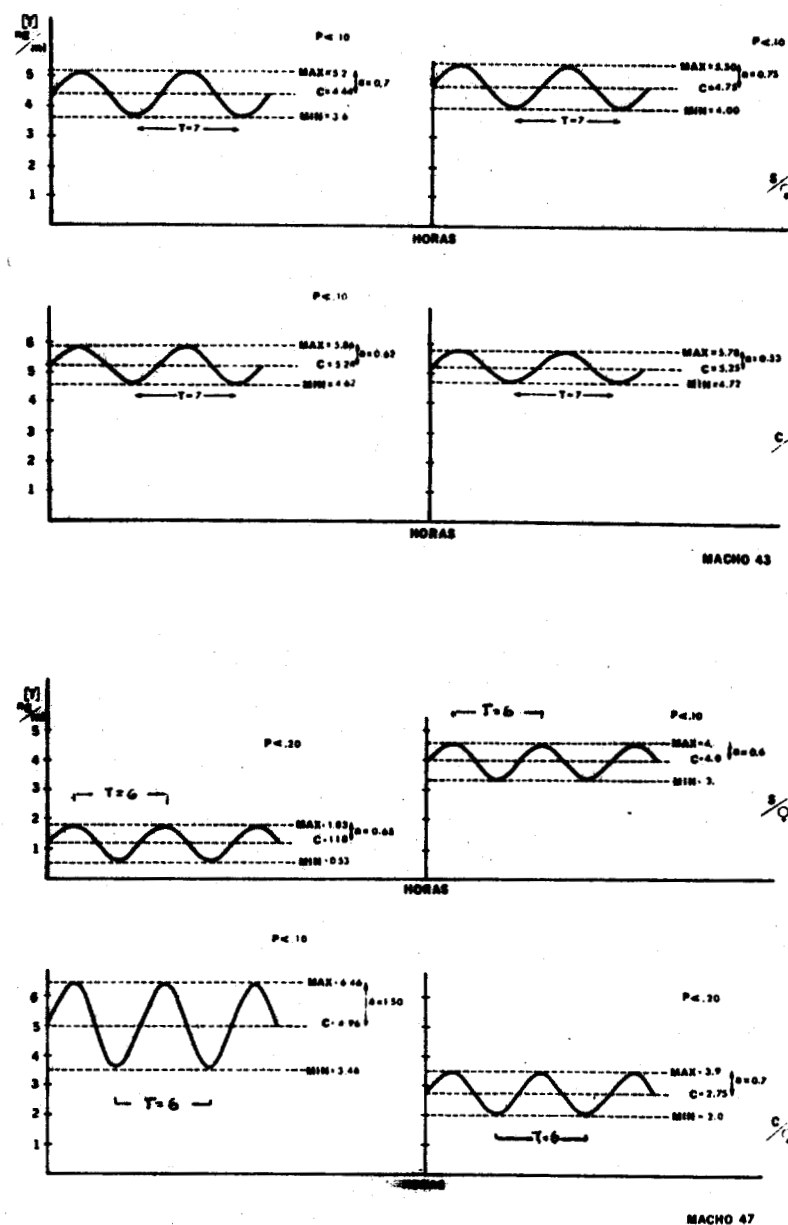


FIGURA No. 5

Análisis del ritmo de la secreción episódica de testosterona sérica de los carneros 43 (GRUPO I) y 47 (GRUPO II) en cuatro muestras de 24 h, durante los tratamientos con hembras (c/q.) y sin hembras (s/q.).

Hembras

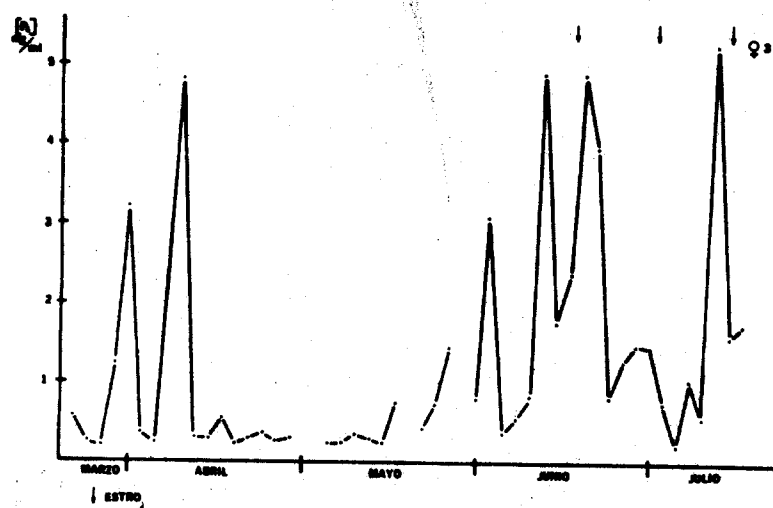
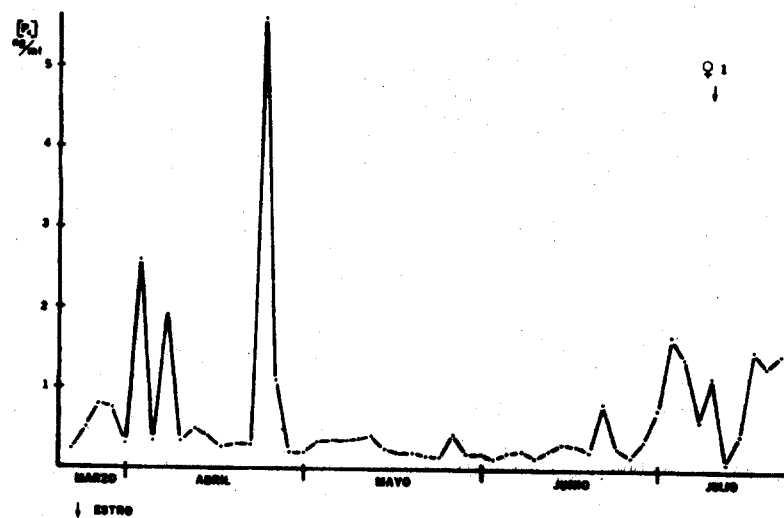


FIGURA NO. 6

Perfiles de progesterona sérica de las
ovjas 1 y 3. Muestreo rutinario.

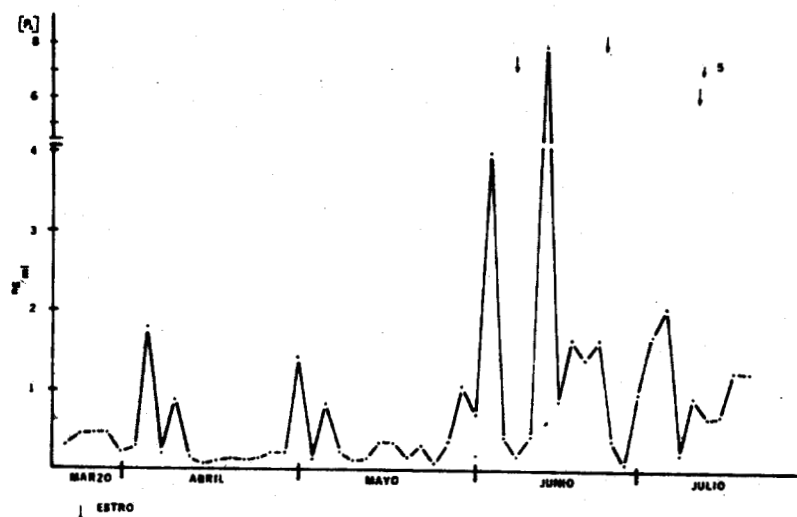
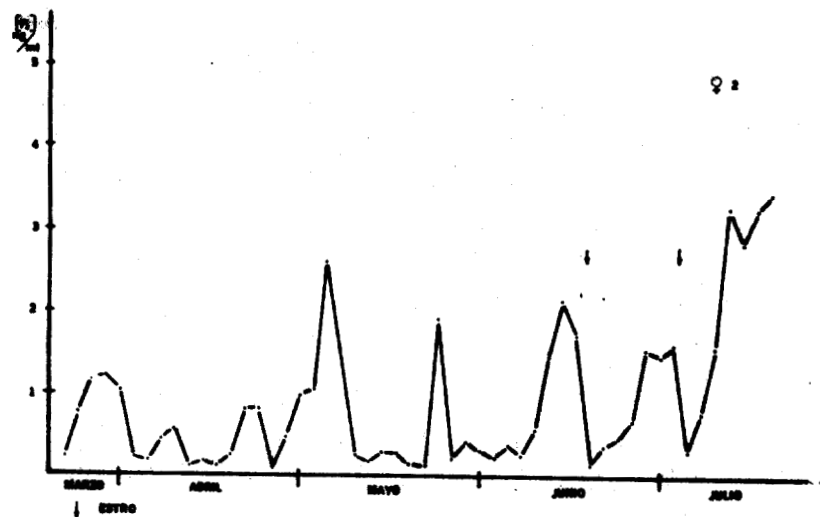


FIGURA No. 7

**Perfiles de progesterona sérica de las
ovjas 2 y 5. Muestreo rutinario.**

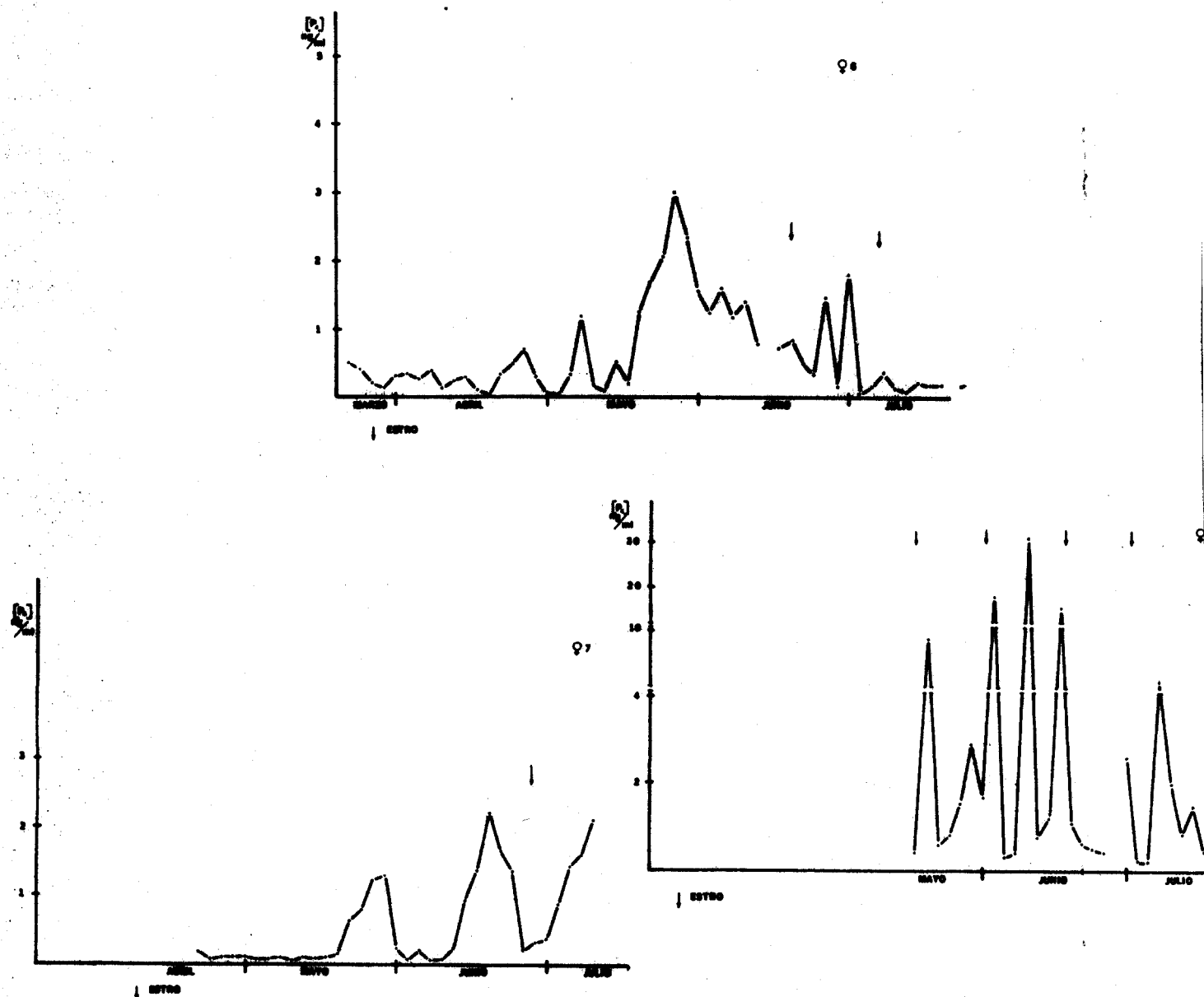


FIGURA No. 8

Perfiles de preñez en años de las
vacas 4, 6 y 7. Sistema rotacional.

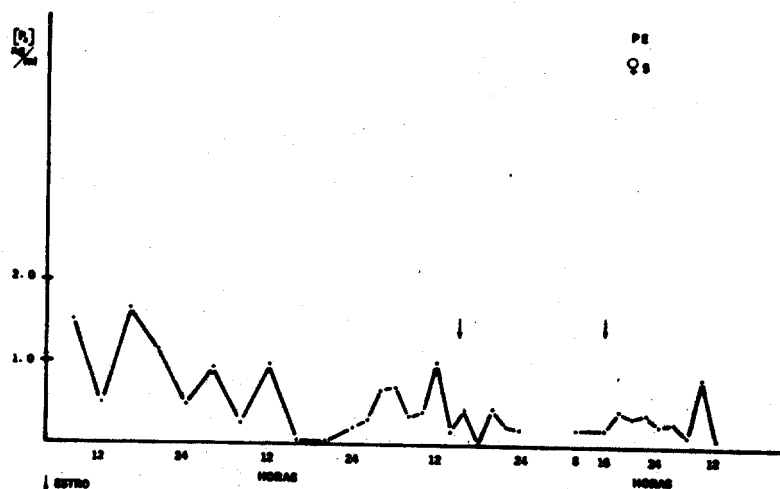
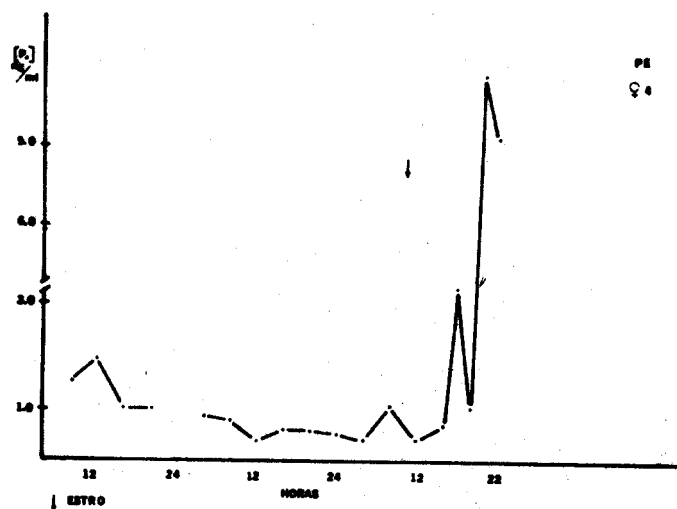


FIGURA No. 9

Perfiles de progesterona s3rica de
ovejas ori3llas. Muestras peri3strales.

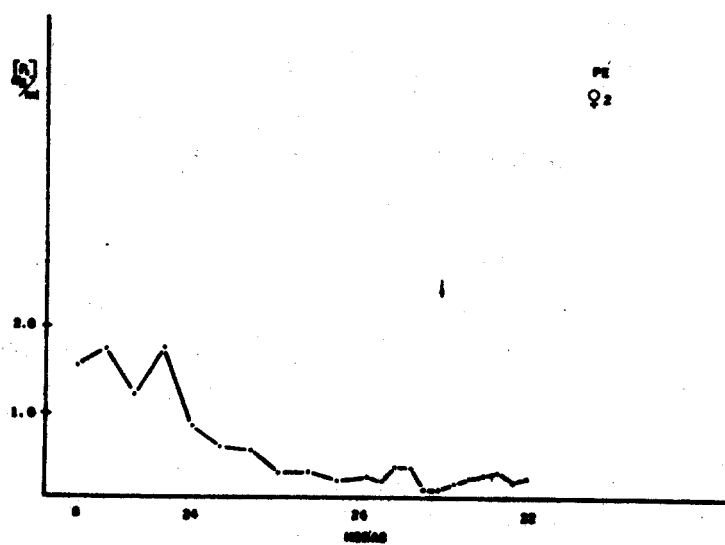
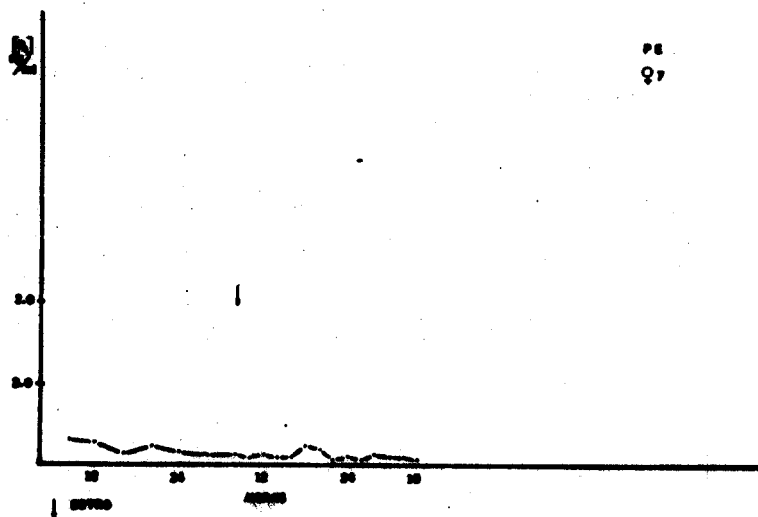
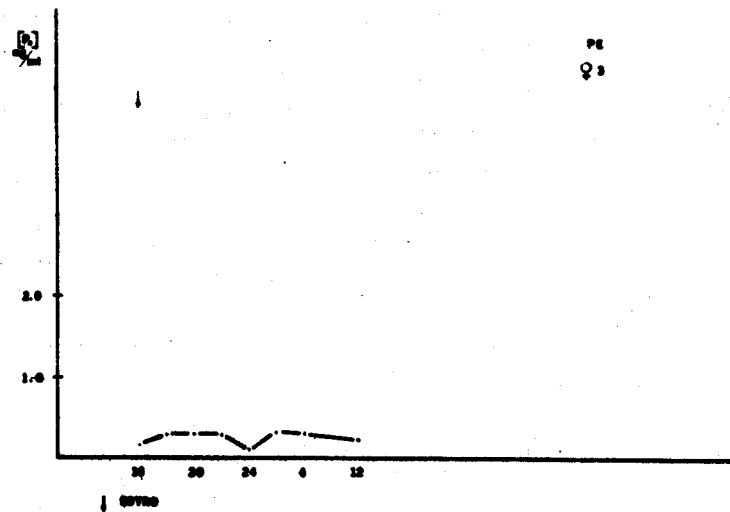


FIGURA No. 9

D I S C U S I O N

Machos:

En la Figura No. 1, se observa el perfil de testosterona sérica de los carneros sometidos a muestreo rutinario durante primavera y principios de verano. Se puede destacar que los valores aquí obtenidos son muy coincidentes con los descritos en la literatura así como también la tendencia que siguen los niveles de una estación a otra (Gómes, y M.C. Joyce., 1975; Schanbacher, y D. D. Lunstra, 1976; Kennaway, y Col. 1981). En el grupo I se destacan las diferencias entre los niveles de uno y otro tratamiento, particularmente en los animales Nos. 41 y 45. En el grupo II, los niveles también son notoriamente diferentes, aunque estos animales estuvieron sometidos a los mismos tratamientos pero con una secuencia inversa.

La Figura No. 2 muestra los perfiles hormonales del macho No. 43 correspondientes a los cuatro muestreos de 24 h. En la parte superior se encuentran las fluctuaciones experimentadas bajo el tratamiento con hembras, y en la inferior las variaciones de la testosterona sérica durante el tratamiento sin hembras. En ambos tratamientos es posible observar un comportamiento semejante, tanto en los niveles como en sus fluctuaciones.

Los perfiles graficados en la Figura No. 3, representan -

074837

los cuatro muestreos de 24 h realizados al macho No. 47. Se observa que en general los niveles alcanzados en el - segundo muestreo son superiores a los del primero, ambos dentro del tratamiento sin hembras. Contrariamente los - dos últimos presentan una relación inversa a la anteriormente descrita, ellos corresponden a los muestreos realizados bajo el tratamiento con hembras.

En los machos Nos. 43 y 47, se establecieron comparaciones de medias dentro y entre tratamientos (Cuadro No. 11). El análisis entre tratamientos sugiere que el factor de - influencia preponderante en el cambio de las concentraciones hormonales en el transcurso del tiempo.

Podría ser interesante comprobar, con una muestra y diseño adecuados, el efecto de la convivencia con hembras sobre los niveles de testosterona circulante, ya que ha sido descrita la influencia de los machos en los niveles -- hormonales y comportamiento reproductivo de la hembras - (Signoret, 1975; Oldham y Col., 1979).

En el Cuadro No. 13, se pueden observar los resultados -- del análisis de regresión sinoidal al cual se sometieron los datos experimentales de los carneros. Uno de los aspectos más relevantes de éstos resultados es el hecho de que se puede establecer un comportamiento periódico de --

las fluctuaciones de testosterona. Otra característica importante es que estas fluctuaciones se presentan con un periodo (T) que varía de 3 a 12 días en las observaciones de todo el periodo experimental (MR), (Figura No. 4), y en las observaciones realizadas durante 24 h (MC) el evento periódico se presenta cada 6 ó 7 h. (Figura No. 5).

En el cuadro No. 10 se pueden observar los valores promedio de las concentraciones de testosterona sérica (ng/ml), en los animales muestreados tres veces por semana (MR), así como también la aplicación de la prueba de t de Student.

En el grupo I, sometido en la primera etapa al tratamiento sin hembras (Dsh) y en la segunda al tratamiento con hembras (DH), hay una ligera disminución de los valores promedios de un tratamiento (1.68) a otro (1.35), en los datos del macho No. 42; aunque la prueba de t de Student no es significativa. En cambio en el macho No. 41 se observa un incremento notorio y significativo en el valor de la media del primer tratamiento aplicado (1.18) y del segundo tratamiento (2.80). Lo mismo se aprecia en los datos del macho No. 45, en donde la media varía significativamente de 0.42 a 1.12.

En el grupo II, sometido inicialmente al tratamiento DH y en la segunda etapa al DsH; en el macho No. 44 hay un incremento en la media por tratamiento (de 1.20 a 1.61), aunque este no es significativo. En el macho No. 46, la media del tratamiento DsH (3.21) es significativamente superior a la del tratamiento DH (0.76).

Se observa que en cinco de los siete carneros analizados hay un aumento significativo de las concentraciones promedio de testosterona, independientemente del tratamiento al cual hayan estado sometidos. Esto permitiría inferir que el transcurso del tiempo sería el factor que más influiría en este cambio hormonal. (Cuadro No. 12).

Los resultados obtenidos en trabajos cuyos diseños parecen más sofisticados y que han sido realizados con grupos experimentales de tamaño semejante a este, coinciden en la conclusión de que las hembras no influyen en los niveles hormonales de los machos (Illius, y Col., 1976b).

Es importante hacer notar que estadísticamente se probó un comportamiento de tipo sinoidal en los datos observados. Esto implica que, para posteriores experimentos se contaría con un modelo matemático estadístico, el cual daría información entre otros, sobre los siguientes puntos:

- Periodicidad con que se debe de tomar la muestra
- Una adecuación del modelo estadístico hecho en este estudio.
- Estudios en otras épocas del año y sus diferencias respecto a este modelo estadístico.

Aprovechando la información que ha dado la aplicación del modelo estadístico, se podría realizar un muestreo en las otras estaciones del año en el que, al ser analizado, permitiría confirmar si la periodicidad del muestreo es adecuada y a la vez efectuar una adecuación del modelo estadístico.

Esto sugiere que en el diseño de experimentos de este tipo, se busque que el período de duración experimental sea de una estación.

Toda esta información redundaría en ventajas sustanciales tales como un menor costo, (por el menor número de muestras a coleccionar y procesar] y una mayor sensibilidad estadística, (por la reducción del error estandar de las muestras tomadas).

Hembras:

El período de muestreo analizado, del 21 de Marzo al 20 de Julio, puede dividirse en 2 etapas. En la primera etapa, - que va desde el inicio del muestreo hasta aproximadamente mediados del mes de Junio; no hay manifestación de conducta en la mayoría de las hembras. En la segunda etapa, que se caracteriza por el inicio de la presentación de esta -- conducta, su manifestación es en forma cíclica. Los perfi les hormonales de esta última etapa pueden ser agrupados - en intervalos regulares limitados por la manifestación de celos observados. Así se puede notar, que las hembras No. 2, 3, 5 y 6 presentan su primer estro manifiesto aproximadamente a mediados del mes de Junio y de ahí en adelante - se mantienen en actividad reproductiva constante, presen-- tando conducta estral cada 19, 17.5 y 18 días en promedio respectivamente.

La hembra No. 1 inicia su actividad sexual aproximadamente tres semanas después, con un promedio de duración del ci-- clo de 17.3 días. La hembra No. 4 inició precozmente su actividad en relación a las otras hembras, presentando su primer celo el 4 de Mayo, con un intervalo promedio de - - 17.3 días. La hembra No. 7 llegó preñada y presenta inactividad postparto de 3 meses. Su primer estro se observó el 26 de Junio.

Con respecto a las fluctuaciones cíclicas de P4 se observa que no se alejan notoriamente de los niveles descritos en la literatura (Ammar-Khodja, F. y R. Brudieux, 1982; - Martínez A. y Col. 1980), en los casos en que se evidencia la presencia de un cuerpo lúteo funcional.

La primera etapa, la analizaremos tomando en consideración que los perfiles hormonales muestran, en todos los casos, fluctuaciones episódicas que se elevan por sobre los niveles basales. Estas se presentan, durante todo este período, en forma cíclica y constante en las hembras Nos. 2 y 5 (Figura No. 7), en las hembras Nos. 1 y 3 (Figura No. 6), los ciclos estarían localizados al inicio y al final, con un período intermedio que se mantiene en niveles basales - (menores de 0.5 ng/ml. En la hembra No. 6 (Figura No. 8), se presenta una sola fluctuación marcada que alcanza aproximadamente el valor de 3 ng/ml situada inmediatamente antes del inicio del período de actividad sexual. Las características de estas curvas (niveles y amplitud) sugieran la posibilidad de un funcionamiento ovárico relativo, que por alguna razón no alcanza a incorporarse a los mecanismos clásicos que integran un ciclo activo sexualmente.

Las fluctuaciones de los niveles de P4 en esta etapa, tienen una característica común en todas las hembras; previo a la presentación del primer estro conductual hay un aumento importante en las concentraciones de la hormona. Este

podría ser el aumento requerido para la sensibilización -
necesaria en la manifestación de la conducta del estro. -
(Legan, y F.J. Karsch, 1979).

En las gráficas del muestreo periestral se observa un descenso paulatino de los niveles de P4 desde el inicio del muestreo hasta el día 0, en el cual estos llegan a ser los valores más bajos (menores a 1 ng/ml) y se mantienen así hasta el término del muestreo.

CONCLUSIONES

Machos:

- Los valores y tendencias de los perfiles de testosterona en el muestreo rutinario coinciden con lo descrito en la literatura.
- En cinco de los siete carneros analizados hay un aumento de las concentraciones promedio de testosterona (MR); este se debe al transcurso del tiempo.
- Los resultados de los muestreos rutinario y de 24 h durante los dos tratamientos, indican que la presencia de hembras no es un factor determinante en los niveles de testosterona de los machos.
- Se desarrolló un modelo matemático de tipo sinoidal para los datos obtenidos en los muestreos rutinario y de 24 h, el cual muestra el comportamiento periódico de las fluctuaciones de testosterona.
- El modelo matemático de tipo sinoidal desarrollado, permitirá que los estudios sucesivos cuenten con un diseño experimental basado en el comportamiento periódico descrito para la testosterona, lo que redundará en menor costo (menor número de muestras a

extraer y procesar] y mayor sensibilidad estadística.

- Debido al aumento de las concentraciones hormonales promedio, que se infiere es causado por el transcurso del tiempo, se recomienda: - Observar el comportamiento hormonal en las cuatro estaciones del año. --
 - Observar el comportamiento hormonal en la misma estación, en años sucesivos.
- Este trabajo aporta un modelo matemático estadístico que sirve para estudiar las fluctuaciones hormonales en las distintas estaciones del año y en una misma - estación en años diferentes.

Hembras:

- En la mayoría de la hembras, durante la primera etapa del muestreo no hubo manifestación de conducta de celo.
- Durante la etapa en que no hubo manifestación del estro, los niveles de progesterona en suero circulante muestran fluctuaciones episódicas, que se elevan por sobre los niveles basales.
- Hay funcionamiento ovárico, durante la época en que no hubo conducta manifiesta de estro.
- Previo a la presentación del primer estro conductual, hay un aumento importante en la concentración de progesterona circulante en suero.
- La época reproductivamente activa se caracteriza por la presentación de conducta de estro a intervalos regulares.
- En el mes de Mayo, el 16.6% de las hembras presentó estro, mientras que en Julio se manifestó el 100% en celo.

B I B L I O G R A F I A

Abraham, G.E., F.S. Manlimes, y R. Garza. 1977. Radioimmunoassay of Steroids. En: Handbook of Radioimmunoassay. G.E. Abraham. Marcel Dekker Inc. Editores New York.

Abraham, G.E. 1969. Solid-phase radioimmunoassay of estradiol - 17. J. Clin Endocrinol. Metab. 29:866

Ammar - Khodja, F. y R. Brudieux. 1982. Seasonal variations in the cyclic luteal ovarian activity in the Tadmit ewe in Algeria. J. Reprod. Fert. 65:305-311.

Baird, D.T. y R.J. Scaramuzzi. 1976. The source of ovarian estradiol and androstenedione in the sheep during the luteal phase. Acta Endocrinol. 83:402-409.

Baird, D.T., I. Swanston. y R.J. Scaramuzzi. 1976. Pulsatile release of LH and secretion of ovarian steroids in sheep during the luteal phase of the estrous cycle. Endocrinology 98:1490-1496.

Barrel, G.K. y K.R. Lapwood. 1979a. Effects of pinealectomy on the secretion of Luteinizing Hormone, Testosterone and Prolactin in Rams exposed to various lighting Regimes. J. Endocr. 80:397-405.

Barrel, G.K. y K.R. Lapwood. 1979b. Effects of Modifying olfactory and Pineal function on the Seasonality of semen production and plasma luteinizing hormone, testosterone and prolactin levels in rams. Anim. Reprod. Sci 1(3):229-243.

Barrón, C., J. Valencia y P. Ochoa. 1981. Comportamiento reproductivo de ovejas Suffolk con empadres en diferentes épocas del año. XV Reunión Anual del Instituto Nal. de Inv. Pec.

Bindon, B.M., M.R. Blane., J. Pelletier., M. Terqui., J. Thimonier. 1975. Preovulatory gonadotrophin and ovarian steroid changes in French sheep breeds different in fecundity. Does FSH stimulate follicles. Proc. Aust. Endocr. Soc. 18:64, Abstr.

Cumming, I.A., J.M. Buckmaster., M.A. de B. Blockey. J.R. Goding., C.G. Winfield. y R.W. Baxter. 1973. Constancy of interval between luteinizing hormone release and ovulation in the ewe. Biol. Reprod. 9:24 - 29.

Ferin, M., F. Halberg., R.M. Richart. y R.L. Vande Wiele. -

Editores. 1974. Biorhythms and Human and Human Reproduction. John Wiley and Sons, New York.

Geschwind, I.I., R. Dewey. 1968. Dynamics of Luteinizing Hormone (LH) Secretion in the Cycling Ewe: A Radioimmunoassay Study. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 129: 901-904.

Goding, J.R., J.M. Buckmaster, J.C. Cerini., M.E.D. Cerini, W.A. Chamley., I.A. Cumming, L.R. Fell., J.K. Findlay., H. Jonas. 1973. Gonadotrophins in the ovine oestrous cycle. J. Reprod. Fert., Suppl. 18:31-37.

Gomes, W.R., M.C. Joyce. 1975. Seasonal Changes in Serum Testosterone in adultrams. J. Anim. Sci. 41(5): 1373-1375.

Hauger, R.L., F.J. Karsch., D.T. Foster. 1977. A new concept for control of the estrous cycle of the ewe based on the temporal relationships between luteinizing hormone, estradiol and progesterone in peripheral serum and evidence that progesterone inhibits tonic LH Secretion. Endocrinology 101: 807-817.

Hernández, J.J., P. Martínez, F. Lozano, H. Roman y H. -- Castillo. 1981. Variación estacional de las características seminales de borregos Tabasco ó Pelybuey bajo condiciones tropicales. XV Reunión Anual del Instituto Nal. de Inv. Pec.

Illius A.W., N.B. Haynes, K. Purvis y G.E. Lamming. 1976 a. Plasma concentrations of testosterone in the developing ram in different social environments. J. Reprod. Fert. - 48: 17-24.

Illius A.W., N.B. Haynes, G.E. Lamming. 1976 b. Effects of ewe proximity on peripheral plasma testosterone levels and behaviour in the ram. J. Reprod. Fert. 48: 25-32.

Karsch, F.J., 1980. Seasonal Reproduction: A saga of Reversible Fertility. The Physiologist 23: 29-38.

Karsch, F.J., D.L. Foster., S.J. Legan., K.D. Ryan. y G.K. Peter. 1979. Control of the preovulatory endocrine events in the ewe: interrelationship of estradiol, progesterone and luteinizing hormone. Endocrinology 105: 421-426.

Karsch, F.J., R.L. Goodman. y S.J. Legan. 1980. Feedback basis of seasonal breeding: test of an hypothesis. J. -- Reprod. Fert. 58: 521-535.

Katangole, C.B., F. Naftolin, y R.V. Short, 1974. Seasonal variations in Blood Luteinizing Hormone and Testosterone Levels in Rams. *J. Endocr.* 60: 101-106.

Kennaway, J., J.M. Obst, E.A. Dunstan, H.G. Friesen, 1981. Ultradian and Seasonal Rhythms in Plasma Gonadotrophins, Prolactin, Cortisol and Testosterone in Pinealectomized Rams *Endocrinology* 108(2): 639-645.

Land R.B., J. Pelletier, J. Thimonier, P. Mauléon, 1973. A quantitative study of genetic differences in the incidence of oestrus, ovulation and plasma luteinizing hormone concentration in the sheep. *J. Endocr.* 58: 305-317.

Land, R.B., A.G. Wheeler, y W.R. Carr, 1976. Seasonal Variations in the Oestrogen Induced LH Discharge of Ovariectomized Finnish Landrace and Scottish Blackface Ewes. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 16:521-528.

Legan, S.J. y F.J. Karsch, 1979. Neuroendocrine Regulation of the Estrous Cycle and Seasonal Breeding in the Ewe. *Biol. Reprod.* 20: 74-85.

Lieberman, S., B.F. Erlanger, S.M. Beiser, F.J. Agate Jr. 1959. Steroid-protein conjugates: Their chemical, immunochemical, and endocrinological properties *Recent Prog. Horm. Res.* 15:165.

Lincoln, G.A., 1976. Seasonal variation in the episodic secretion of Luteinizing Hormone and Testosterone in the Ram. *J. Endocr.* 69:213-226.

Lincoln, G.A. 1979. Use of a pulsed infusion of Luteinizing Hormone Releasing Hormone to mimic seasonally induced endocrine changes in the ram. *J. Endocr.* 83: 251-260.

Lincoln, G.A. y W. Davidson, 1977. The relationship between sexual and aggressive behaviour and pituitary and testicular activity during the seasonal sexual cycle of rams, and the influence of photoperiod. *J. Reprod. Fert.* 49: 267-276.

Lincoln, G.A. y M.J. Peet., R.A. Cunningham, 1977. Seasonal and Circadian changes in the Episodic Release of Follicle Stimulating Hormone, Luteinizing Hormone and Testosterone in Rams exposed to Artificial Photoperiods. *J. Endocr.* 72: 337-349.

Lincoln, G.A. y R.V. Short, 1980. Seasonal breeding: nature's contraceptive. *Recent Prog. Horm. Res.* 36: 1-43.

Martínez A., J. Herrera, y J. Valencia, y S. Fernández-Baca, 1980. Estudio de la actividad posparto mediante la determinación de progesterona en ovejas Dorset, Suffolk y Tabasco. *Veterinaria Mex.* 11: 127-131.

Mc, Donald, L.E. 1975. *Veterinary Endocrinology and Reproduction*, 2nd Edition. Lea y Febiger Philadelphia.

Medina Martha., H.E. Scaglia., G. Vázquez., S. Alatorre, y G. Perez-Palacios. 1976. Rapid Oscillation of Circulating Gonadotropins in Postmenopausal Women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 43: 1015-1019.

Midgley, A.R., Jr., G.D., Niswender, y R.W. Regar. 1969. Principles for the assessment of the reliability of radioimmunoassay methods (precision, accuracy, sensitivity, specificity). *Acta Endocrinal.* 63: 163.

Moor, R.M. 1973. Oestrogen production by individual follicles explanted from ovaries of sheep. *J. Endocrinal.* 32: 545-548.

Moreno-Chang, R. 1976. Estado actual y perspectivas de la Ovinocultura. *Veterinaria* 7 (4): 136-141.

Niswender, G.A. y T.M., Nett. 1977. Biological and immunological assay of gonadotropic and gonadal hormones. En *Reproduction in Domestic Animals*. Cole H.H. Cupps P.T. Editores, New York Academic Press Inc.

Oldham, C.M., G.B. Martin y T.W. Knight. 1979. Stimulation of seasonally anovular Merino ewes by rams. I. Time from introduction of the rams to the preovulatory LH surge and ovulation. *Anim. Reprod. Sci.* 1: 283-290.

Ortavant, R., A. Daveau., D.H. Garnier., J. Pelletier., M.M. de Reviers., M. Terqui. 1982. Diurnal variation in release of LH and testosterone in the ram. *J. Reprod. Fert.* 64: 347-353.

Owen, J.B. 1976. *Systems of Sheep Production*. En: *Sheep Production*. Editores A. Bailliere Tindall.

Pant, H.C., C.R.N. Hopkinson, y R.J. Fritzpatrick. 1977. Concentration of Oestradiol, Progesterone, Luteinizing Hormone and Follicle Stimulating Hormone in the Jugular vein Plasma of Ewe During the Oestrus Cycle. *J. Endocr.* 73: 247-255.

Pelletier, J. y R. Ortavant. 1975. Photoperiodic Control of LH Release in the ram. *Acta Endocr.* 78: 435-441.

Pelletier, J., D.H. Garnier., M.M. de Reviers., M. Terqui, R. Ortavant. 1982. Seasonal variation in LH and testosterone release in rams of two breeds, J. Reprod. Fert. 64:341-346

Perera, B.M.A.O. y A.S. Abeyratne. 1979. El empleo de técnicas nucleares para mejorar la aptitud reproductora del ganado doméstico. Zootecnia, 32: 2.

Reimers, J.T., R.G. Cowsan, H.P. Davidson y E.D. Colby. -- 1981. Validation of Radioimmunoassays for triiodothyronine, thyroxine, and hydrocortisone (cortisol) in Canine, Feline, and Equine Sera. Am. J. Vet Res 42: 2016-2021.

Reiter, R.J., 1974. Circannual Reproductive Rhythms in mammals related to photoperiod and pineal Function. Chronobiologia 1(4): 364-395.

Robertson, H.A., 1977. Reproduction in the Ewe and the Goat En: Reproduction in Domestic Animals. Cole, H.H. y P.T. Cupps, Editores. Academic Press, New York.

Rodbard, D., W.Budson, y P.L. Rayford. 1969. Rapid calculation of radioimmunoassay results. J. Lab. and Clin. Med. 74: 770.

Rodbard, D. 1974. Statistical Quality Control and Routine Data Processing for Radioimmunoassays and Immunoradiometric Assays. Clin. Chem. 20: 1255.

Scaramuzzi, R.J y D.T. Baird. 1977. Pulsatile release of luteinizing hormone and secretion of ovarian steroids in sheep during anestrus. Endocrinology 101: 1801-1806.

Scaramuzzi, R.J y R.B. Land. 1978. Oestradiol levels in sheep plasma during the oestrous cycle. J. Reprod. Fert. 53: 167-171.

Scaramuzzi, R.J., B.V. Caldwell, y R.M. Moor. 1970. Radioimmunoassay of LH and Estrogen during the Estrous Cycle of the Ewe. Biol. Reprod, 3: 110-119.

Schanbacher, B.D. y D.D. Lunstra. 1976. Seasonal Changes in Sexual activity and serum levels of LH and testosterone in Finnish Landrace and Suffolk Rams. J. Anim. Sci. -- 43 (3): 644-650.

Signoret, J.P. 1975. Influence of the presence of rams on the luteinizing hormone surge after oestradiol benate injection in ovariectomized ewes. J. Endocr. 64: 589-590.

Thibault, C y M.C. Levasseur. 1974. Reproductive life cycle. En: Reproduction in Farm Animals. Hafez, E.S.E., - Editor. Lea y Febiger, Philadelphia.

Thimonier, J., P. Mauleón. 1969. Variations saisonnières du comportement d'oestrus et des activités ovariennes et hypophysaires chez les ovins. Ann. Biol. Anim. Biochim. - Biophys. 9: 233-250.

Thimonier, J y J. Pelletier. 1971. Différences génétique dans la décharge ovulante (LH) chez les brebis de race -- Ile-de-France; relations avec le nombre d'ovulations. -- Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 11: 559-567.

Torneycroft, I.H., S.A. Tillson., G.E. Abraham., R.J. - - Scaramuzzi, y B.V. Caldwell. 1970. Preparation and purification of antibodies to steroids. En: Immunologic Methods in Steroid Determination. Peron, F.G. y B.V. Caldwell, Editores. Appleton Century Crofts, New York.

Valencia, J., C. Barrón, y S. Fernández-Baca, 1978. Variaciones estacionales de la presentación de Estros en ovejass Dorset y Criollas en México. Veterinaria Mex. 9: 45.

Valencia, M., M. Heredia. y E. González. 1981. Estacionalidad reproductiva en la oveja Pelibuey. XV Reunión anual del Instituto Nal. de Inv. Pec.

Yallow, R.S. y S.A. Berson. 1959. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. Nature 184: 1648.

Yuthasastrakosol, P., W.M. Palmer. y B.E. Howland. 1975. - Luteinizing hormone, oestrogen and progesterone levels in peripheral serum of anoestrous nad cyclic ewes as determined by radioimmunoassay. J. Reprod. Fert. 43: 57-65.

ANEXOS

ANEXO 1. DESCRIPCION DE REACTIVOS NECESARIOS PARA EL
DESARROLLO DEL RIA DE PROGESTERONA Y TESTOSTERONA.

M A T E R I A L

Reactivos:

Fosfato de sodio monobásico monohidratado Baker No. catá-
logo 3818.

Fosfato de sodio dibásico Baker No. catálogo 3828.

Cloruro de sodio Baker No. catálogo 3624.

Thiomersal (merthiolate) Sigma Chemical Company No. catálo-
go T-5125.

Gelatina Merck No. catálogo 4070.

Carbón activado Sigma No. catálogo C-5260.

Dextrán Sigma No. catálogo D-4751.

Sephadex LH 20-100 polvo Sigma Chemical Co. Lote No. - - -
108-C-0131.

Progesterona estándar de Sigma catálogo No. D-013.

Progesterona 1,2,6,7-tritiada actividad específica - - -
87 Ci/mMol New England Nuclear.

Antisuero anti-progesterona de Radioassay System Laboratories
No. catálogo 1690.

Antisuero anti-testosterona de Radioassay System Laboratories
No. catálogo 1720.

Testosterona estándar de la Organización Mundial de la Sa-
lud Lote-77-1.

Liquid fluor de New England Nuclear catálogo No. NEF-903

Bio-Solv. BBS-3 de Beckman catálogo No. 92634.

Solución buffer pH 7.0 Beckman catálogo No. 3501.

Etanol absoluto Gadir.

Eter etílico Gadir.

Acetona impura.

Tolueno Baker analyzed catálogo No. 9460.

Metanol absoluto grado espectral catálogo No. 6009.

Testosterona 1,2,6,7-³H actividad específica 85 a 105 - -

Ci/m Mol New England Nuclear.

ANEXO 2. DESCRIPCION DEL MATERIAL NECESARIO PARA EL
DESARROLLO DEL RIA DE PROGESTERONA Y TESTOSTERONA.

Hielo seco

Agua deionizada

Gradillas de acrílico de 27 cm de largo x 13.7 cm de ancho y 5 cm de alto con 96 agujeros de 1.3 cm de diámetro

Tinas de plástico de 33 cm de largo por 21 cm de ancho y 9 cm de alto

Viales de vidrio con bajo contenido de potasio 40 de Packard Instruments catálogo No. 6001009.

Tapones de polipropileno con rosca No. 22 con cubierta de aluminio

Tubos para centrífuga Pyrex fondo cónico para trabajo pesado de 15 ml catálogo No. 053-587

Tubos de vidrio de 18 X 150 mm

Tubos de vidrio de 10 X 130 mm

Tubos de vidrio de 7.5 X 100 mm

Vortex Thermolyne de Laboratory Equipment 720 S

Baño de agua con termostato

Contador de centelleo líquido Packard TRICARB Mod. 2660

Centrífuga refrigerada Damon IEC División IEC PR-6000

Columna cromatográfica con depósito de 20 ml de 34 cm de largo X 1.5 cm de ancho

Pipeta oxford con rango de 50 a 200 μ l

Pipeta oxford con rango de 200 a 1000 μ l

Pistola automática no eléctrica para dosificar 0.1 y 0.2 ml de Beckton Dickenson catálogo No. 23060422

Dispensador repetitivo marca Hamilton PB-600-10

Jeringa Hamilton 1010 TLL de 5 ml catálogo Q-Q30-940.

ANEXO 3. PREPARACION DE REACTIVOS PARA EL DESARROLLO
DEL RIA DE PROGESTERONA Y TESTOSTERONA.

1. Buffer de fosfatos pH 7.2, 0.1 molar
2. Solución de centelleo líquido
3. Suspensión de carbón-dextrán
4. Repurificación de progesterona 1,2,6,7-³H ó testoste-
rona 1,2,6,7-³H
5. Curva estandar de progesterona
6. Curva estandar de testosterona
7. Preparación de controles de calidad para testostero-
na y progesterona
8. Titulación del antisuero anti-progesterona
9. Titulación del antisuero anti-testosterona

1. Buffer de fosfatos pH 7.2, 0.1 molar
 - 0.0195 Mol. de fosfato de sodio monobásico monohi-
dratado
 - 0.081 Mol. de fosfato de sodio dibásico anhidro
 - 0.88% cloruro de sodio
 - 0.01% azida de sodio
 - agua deionizada c.b.p. 1lt.

2. Solución de centelleo líquido B.B.S.

Liquid fluor	42 ml
Etanol	21 ml

BBS-3 12.5 ml.
Tolueno c.b.p. 1 lt

3. Suspensión de carbón-dextrán

Carbón activado 0.625 g

Dextrán 0.0625 g

Buffer de fosfatos

pH 7.2, 0.1 Molar 100 ml

4. Repurificación de progesterona 1,2,6,7-H³

Antes de usar éste reactivo en el radioinmunoanálisis, la hormona marcada se purificó en columna cromatográfica.

Para preparar el soporte o cama de la columna cromatográfica, se pesaron 7 g de Sephadex LH-20 y se agregaron 100 ml de tolueno: metanol en proporción de -- 85:15 quedando en contacto con esta mezcla durante -- 24 hr a temperatura ambiente para permitir que se hinche el Sephadex LH-20. Después de éste tiempo el Sephadex LH-20 se transfirió completamente a la columna cromatográfica, dejando que se empacara con la llave cerrada por un mínimo de 1 hr, y después abriendo la llave de salida hasta que el sistema tolueno:metanol llegó a la superficie de la cama y cerrando entonces la llave.

35 μ Ci de progesterona ó testosterona 1,2,6,7- H^3 se concentro en la punta de 1 tubo cónico con capacidad para 15 ml, evaporando el solvente en baño de agua a 37°C y con corriente de nitrógeno para asegurar que la progesterona tritiada quede concentrada en la punta de tubo, se lavaron las paredes internas del tubo con 8 gotas del sistema de elución tolueno: metanol evaporando el solvente con corriente de nitrógeno en baño de agua a 37°C. Este proceso se repitió 2 veces más.

Después de esto, se tomó 0.2 ml del sistema de elución y se agregó al tubo con los 35 μ Ci de hormona tritiada después de agitar durante 1 min manualmente para disolver la hormona contenida en la punta del tubo se transfirió con pipeta Pasteur a la superficie de la columna cromatográfica. Se lavó 4 veces más el tubo con la misma alícuota del sistema de elución para asegurar su completa transferencia a la columna y se colectaron alícuotas de la elución de la columna de aproximadamente 1 ml, en tubos cónicos de 15 ml (el sistema de elución fue toluena:metanol, 85:15).

Para T se colectaron 25 fracciones, mientras que para P4 se colectaron sólo 20 fracciones.

De cada una de estas fracciones se tomó una alícuota de 10 μ l con pipeta Oxford intercambiable (rango 10 a 50 μ l) transfiriendo cada alícuota a viales de vidrio con bajo contenido de potasio 40, y agregando 5 ml de solución de conteo BBS. Cada vial se tapó e identificó. La detección de radioactividad se hizo en el espectómetro de centelleo líquido Mod. 2660 de Packard, con una eficiencia de conteo de 54.43% bajo nuestras condiciones de conteo. Aquéllas fracciones que presentaron mayor radioactividad se pasaron a un vial de vidrio con capacidad de 20 ml con la siguiente información: actividad específica de la hormona, fecha de purificación, radioactividad total contenida. La hormona marcada así purificada (progesterona ó testosterona tritiada), se almacenó a 4°C por un período máximo de 3 meses desde su purificación.

5. Curva estándar de progesterona.

Los estándares para P4, fueron preparados a partir de P4 recristalizada de Sigma No. D-013, Solución I: Se pesaron 1.141 mg de ésta hormona en una balanza Cahn eléctrica. Esta cantidad se puso en un matraz volumétrico de 100 ml agregando metanol absoluto grado espectral Baker hasta la marca dando una solución de 11.41 μ g/ml.

Solución II. De la solución I se tomaron 0.1 ml, -- transfiriendo este volumen a otro matraz volumétrico de 100 ml aforando hasta la marca con metanol, resultando una concentración de 11.41 ng/ml.

De la solución II se tomaron 1.32 ml, pasando este volumen a un frasco de vidrio con capacidad para 20 ml, poniendo el frasco en baño de agua a 37°C con corriente de nitrógeno para evaporar el solvente hasta sequedad, agregando después a este vial 20 ml de buffer de fosfatos pH 7.2, agitando el frasco en vortex durante 1 minuto, se paso el vial a un baño de agua a 37°C durante 20 min agitando después de este tiempo el vial durante min y quedando a temperatura ambiente durante 15 min. Todo esto con el fin de asegurarnos que toda la hormona estándar, se desprendiera de las paredes internas del vial y lograr una solución homogénea. La solución resultante con una concentración de 376.8 pg/0.5 ml, permitió la preparación de los 5 estándares restantes reduciendo su concentración, progresivamente a la mitad hasta llegar a 11.77 pg/0.5 ml

Solución estándar (1) 376.8 pg/0.5 ml

Solución estándar (2) 188.4 pg/0.5 ml Sol (1)+5ml de buffer

Solución estándar (3) 94.2 pg/0.5 ml; 2.5 ml - - -

Sol(1)+7.5 ml de buffer

Solución estándar (4) 47.1 pg/0.5 ml; 1.25 ml - - -

Sol(1)+8.75 ml de buffer

Solución estándar (5) 23.55 pg/0.5 ml; 0.625 ml - -

Sol(1)+9.38 ml de buffer

Solución estándar (6) 11.77 pg/0.5 ml; 0.31 ml - - -

Sol(1)+9.69 ml de buffer

La serie de estándares se almacenó a 4°C por un tiempo máximo de un mes.

6. Curva estándar de testosterona

La curva fue preparada a partir de testosterona estándar de la Organización Mundial de la Salud Lote 77-1 con concentración de 10 ng/ml. De esta solución se tomó un volumen de 1.47 ml, transfiriéndole a un frasco de vidrio de 20 ml y ahí se agregaron 18.53 ml de buffer de fosfatos pH 7.2, 0.1 Molar. El frasco se agitó durante un minuto en vortex, permaneciendo a temperatura ambiente durante 20 minutos para la estabilización de la solución; a partir de esta solución (368.64 pg/0.5 ml) se prepararon 5 más, reduciendo cada una de ellas su concentración progresivamente a la mitad hasta llegar a 11.32 pg/0.5 ml.

Solución estándar (1) 368.64 pg/0.5 ml Sol (1)

Solución estándar (2) 184.32 pg/0.5 ml; 5 ml - - - -

Sol (1)+5 ml de buffer.

Solución estandar (3) 92.16 pg/0.5 ml; 2.5 ml - - -

Sol(1)+7.5 ml de buffer.

Solución estandar (4) 46.08 pg/0.5 ml; 1.25 ml - - -

Sol(1)+8.75 ml de buffer.

Solución estandar (5) 23.04 pg/0.5 ml; 0.625 ml - - -

Sol(1)+9.38 ml de buffer.

Solución estandar (6) 11.52 pg/0.5 ml; 0.31 ml - - -

Sol(1)+9.69 ml de buffer.

Este grupo de estándares fue almacenado a 4°C durante un mes como máximo.

7. Preparación de controles de calidad de P4.

De los animales experimentales, 5 ovejas durante la fase folicular fueron sangradas por punción en la yugular para obtener un volumen aproximado de 100 ml - por animal. La sangre quedó a temperatura ambiente por una hora y a temperatura de refrigeración durante 2 horas para permitir la retracción del coágulo. La separación del suero se logró por centrifugación a -- 3000 rpm., durante 20 min a 4°C en centrífuga Damon IEC División PR-6000. El suero de los 5 animales se pasó a un matraz Erlenmayer de 300 ml, agregando 50 mg/ml de suero de carbón lavado, que dando en contacto con el carbón durante siete días a 4°C, agitando manualmente por rotación, para facili-

tar la adsorción de los esteroides por el carbón.

Después de este período, el suero se filtró en un kitasato conectado a un sistema de vacío Buchner con papel filtro. El suero filtrado, fue centrifugado a 3000 rpm durante 60 min por 2 veces para eliminar el carbón presente; este suero se almacenó a - 4°C durante 12 h para sedimentar el carbón que pudiera haber quedado en el suero.

Se tomaron 3 matraces volumétricos de 250 ml marcados cada uno de ellos con 6 ng/ml, 3ng/ml y 0.5ng/ml agregando solución de P4 en metanol Sigma No. D-013 con concentración de 11.41 ug/ml (Sol. A). Para el matraz de 6 ng/ml se agregaron 0.031 ml de la solución A; para el de 3 ng/ml 0.015 ml de la Solución (A) y 2.62 ml de la solución de 11.41 ng/ml para el matraz marcado con 0.5 ng/ml. El metanol fue evaporado con corriente de nitrógeno en baño de agua a - 37°C hasta sequedad agregando después a cada uno de estos matraces un volumen de 60 ml de suero libre de esteroides.

Cada matraz se agitó en vortex durante un minuto reposando primero una hora a temperatura ambiente y -- después durante toda la noche a 40°C para lograr - -

incorporar uniformemente la hormona estándar al suero.

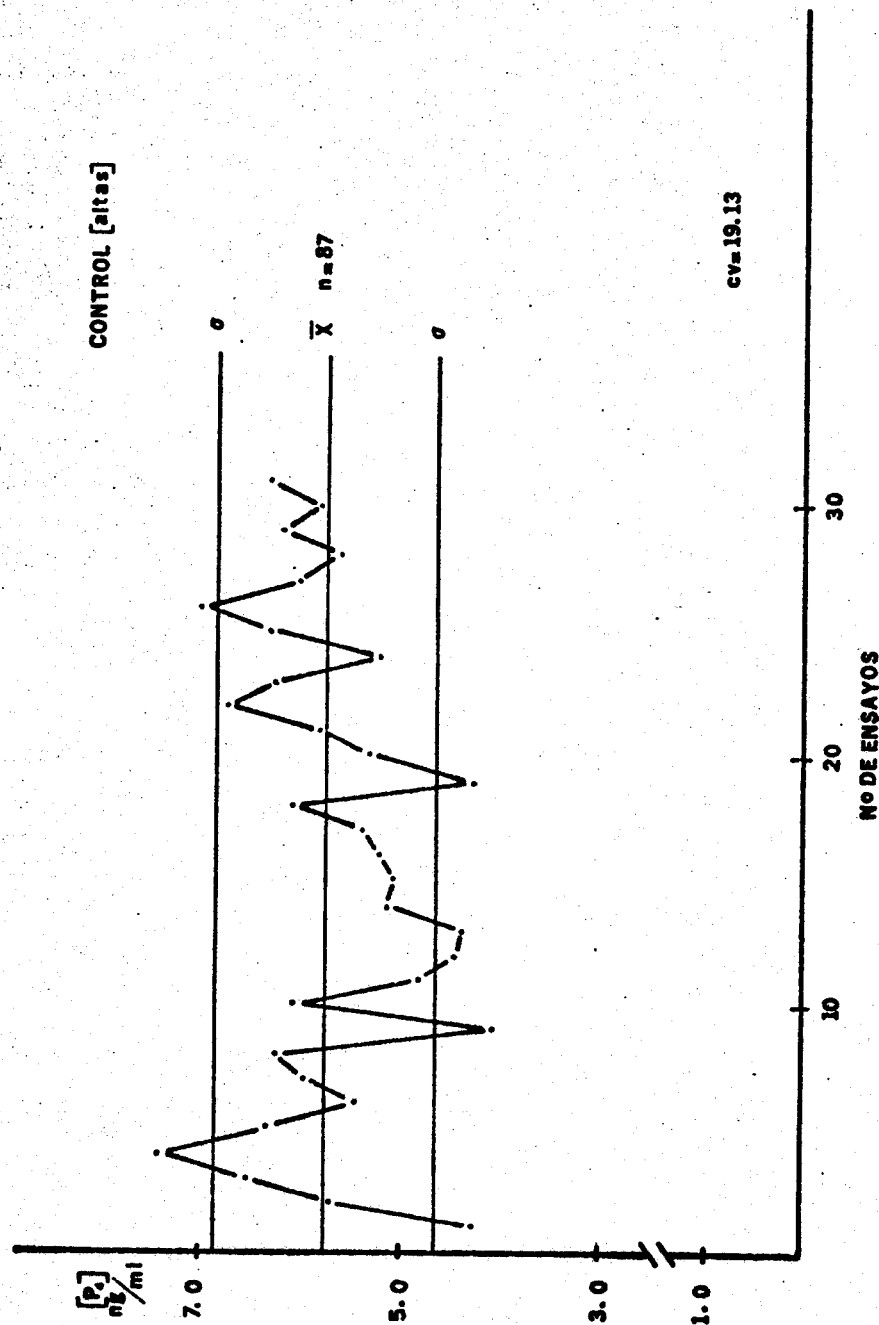
Los controles de calidad de concentración de 6 ng/ml (altos), 3 ng/ml (medios) y, 0.5 ng/ml (bajos), se alicuotaron en frascos de plástico con capacidad de 5 ml en volúmenes de 1 ml en cada uno de ellos, siendo almacenados a -4°C hasta el momento de su uso. Las variaciones que presentaron las concentraciones de éstos controles aparecen en las Figuras Nos. 10, 11 y 12.

8. Preparación de controles de calidad de T.

Cinco carneros del hato experimental fueron sangrados por punción en yugular, obteniendo un volumen de 100 ml de sangre de cada uno de los animales. Esta sangre se sometió al proceso ya descrito para controles de P4, hasta obtener el suero libre de esteroides.

Para la preparación de controles de calidad para T de concentración de 6 ng/ml (altos), 3 ng/ml (medios) y 0.5 ng/ml (bajos) se procedió en la forma ya descrita para la preparación de controles de calidad de P4, agregando T estándar en metanol. Su almacenamiento fue en las condiciones ya indicadas para los

FIGURA No. 10



Variación interanálisis de los controles en RIA de Progesterona (concentración alta)

n Número de controles de calidad

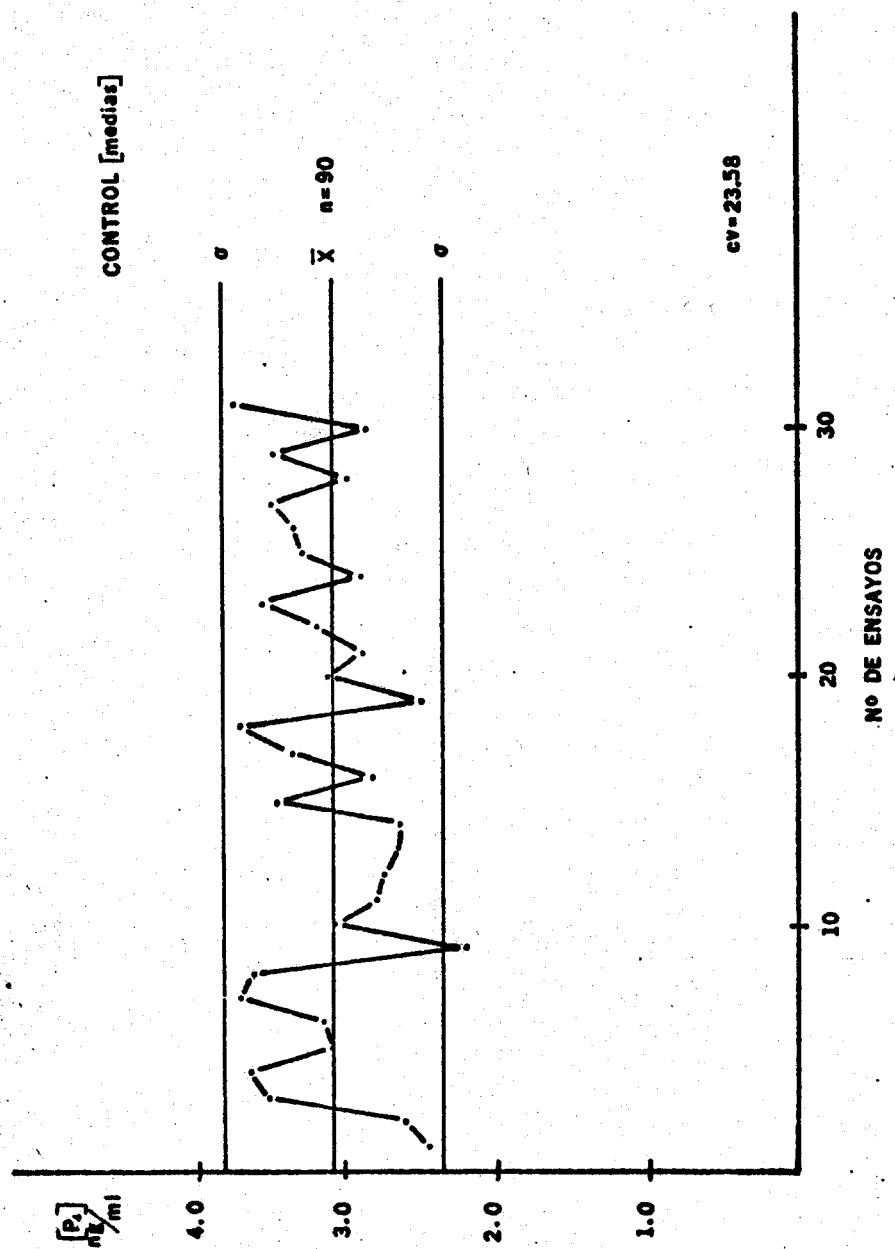
CV Coeficiente de variación

Desviación estándar

() Concentración.

$\bar{X}$ Promedio

FIGURA No. 11



92.

Variación interanálisis de los controles en RIA de Progesterona (Concentración media)

Desviación estándar

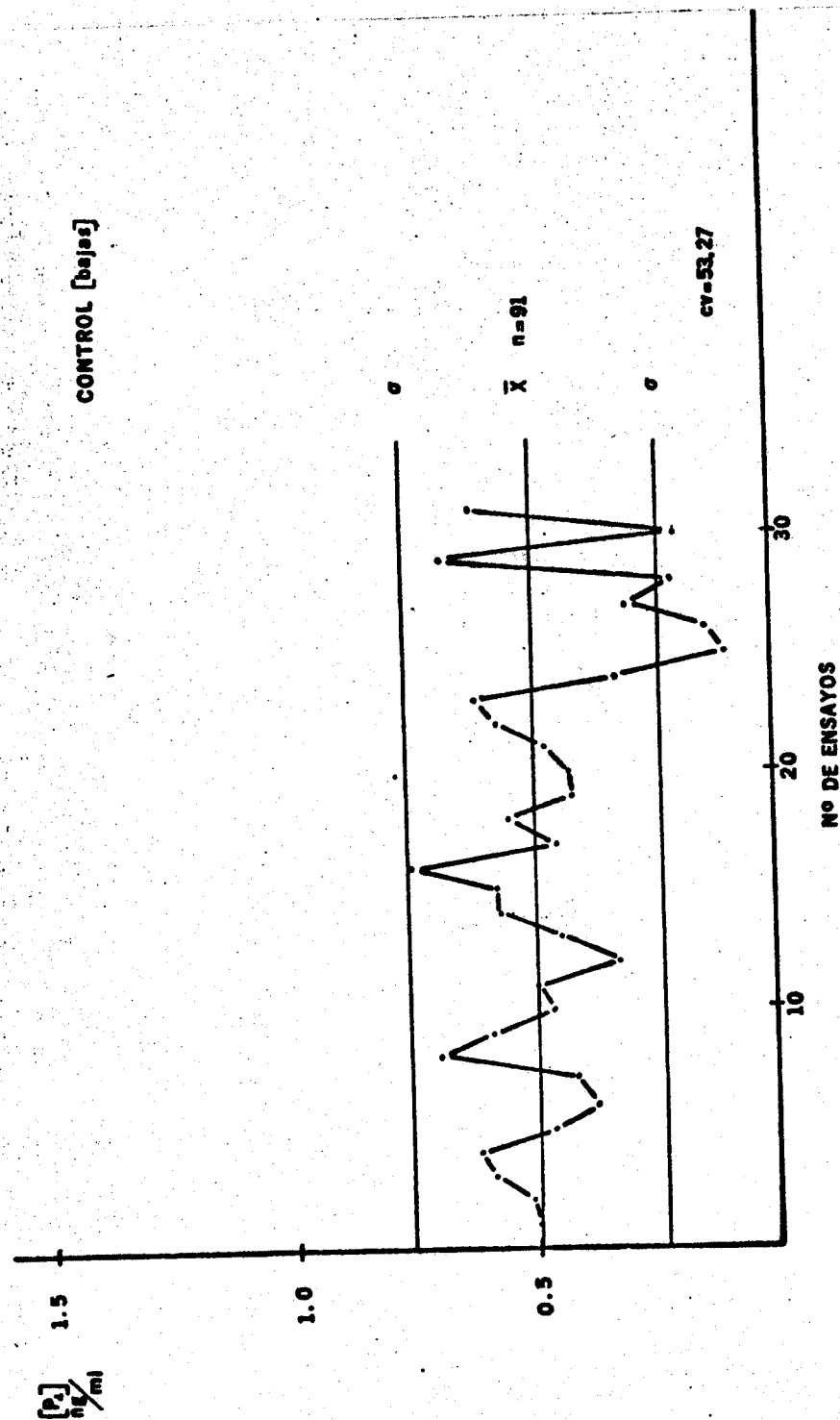
n Número de controles de calidad

$\bar{X}$ Promedio

() Concentración

CV Coeficiente de variación

FIGURA No. 12



Variación interanálisis de los Controles en RIA de Progesterona (Concentración Baja)

Desviaciones estándar

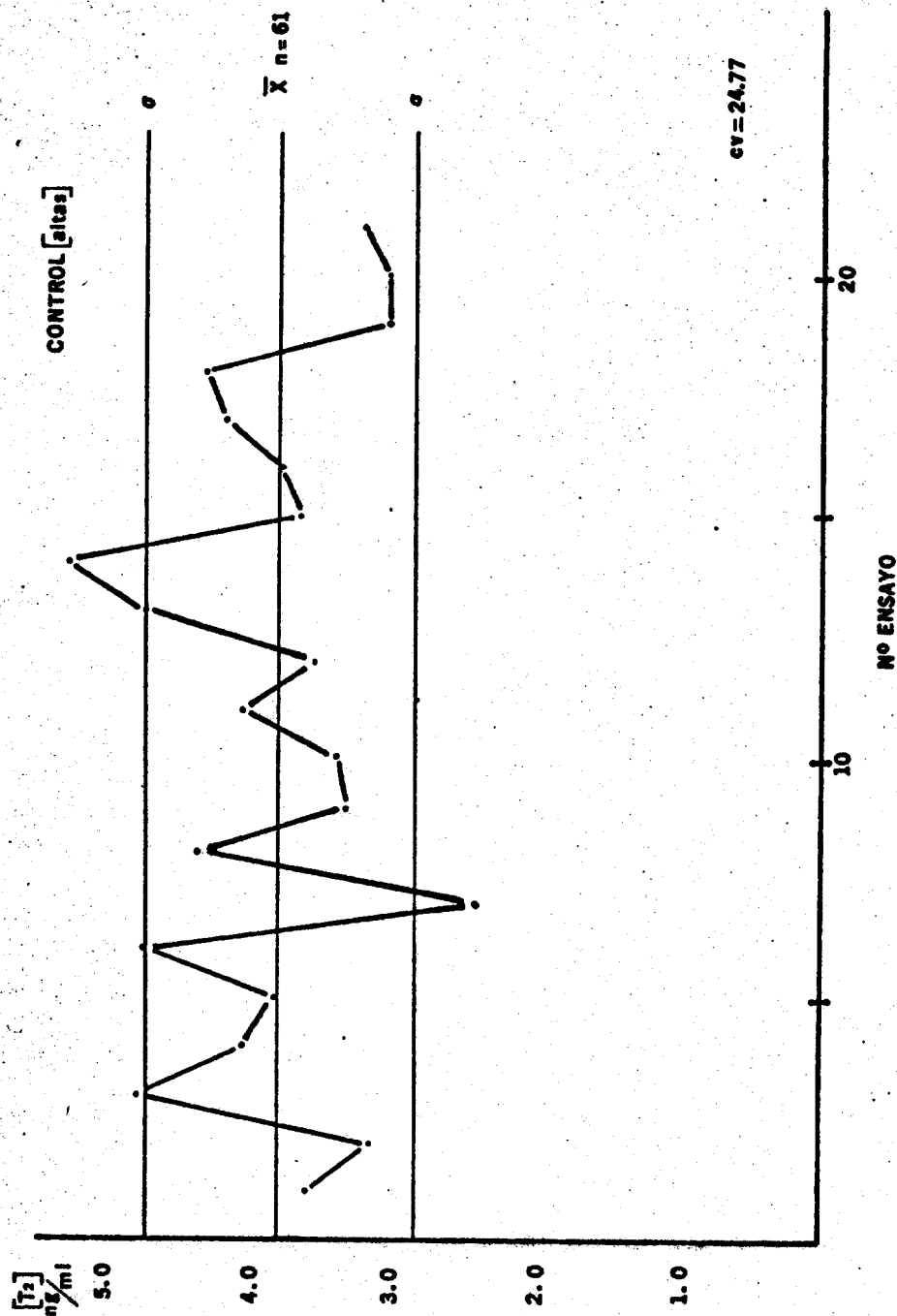
n Número de controles de calidad

CV Coeficiente de variación

$\bar{X}$ Promedio

() Concentración.

FIGURA N° 13

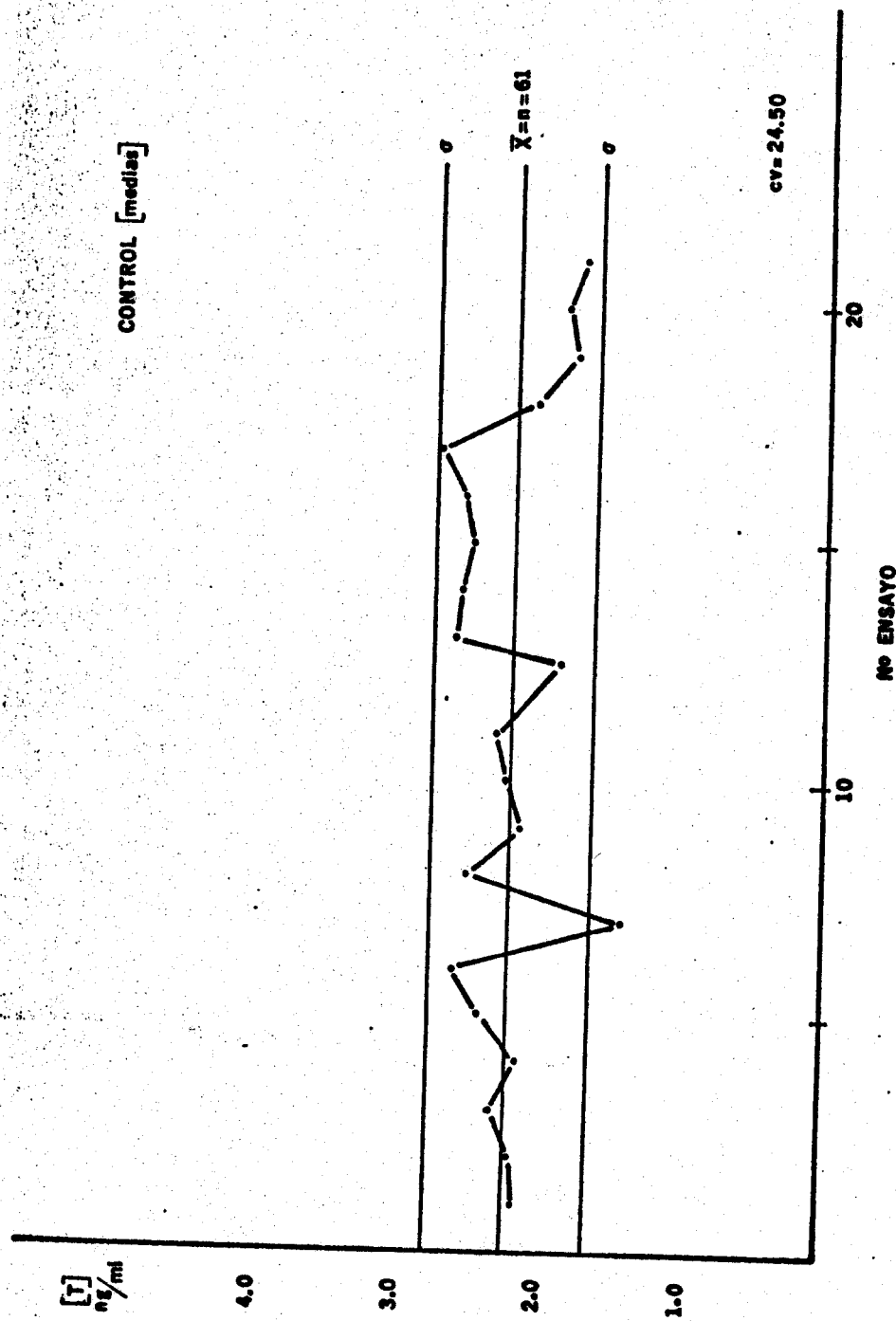


Variación interanálisis de los controles en RIA de Testosterona (Concentración alta)

Desviaciones estándar
X Promedio

CV Coeficiente de variación
n Número de Controles de calidad
() Concentración

FIGURA N° 14



Variación interanálisis de los controles en RIA de Testosterona (Concentración media)

Desviaciones estándar

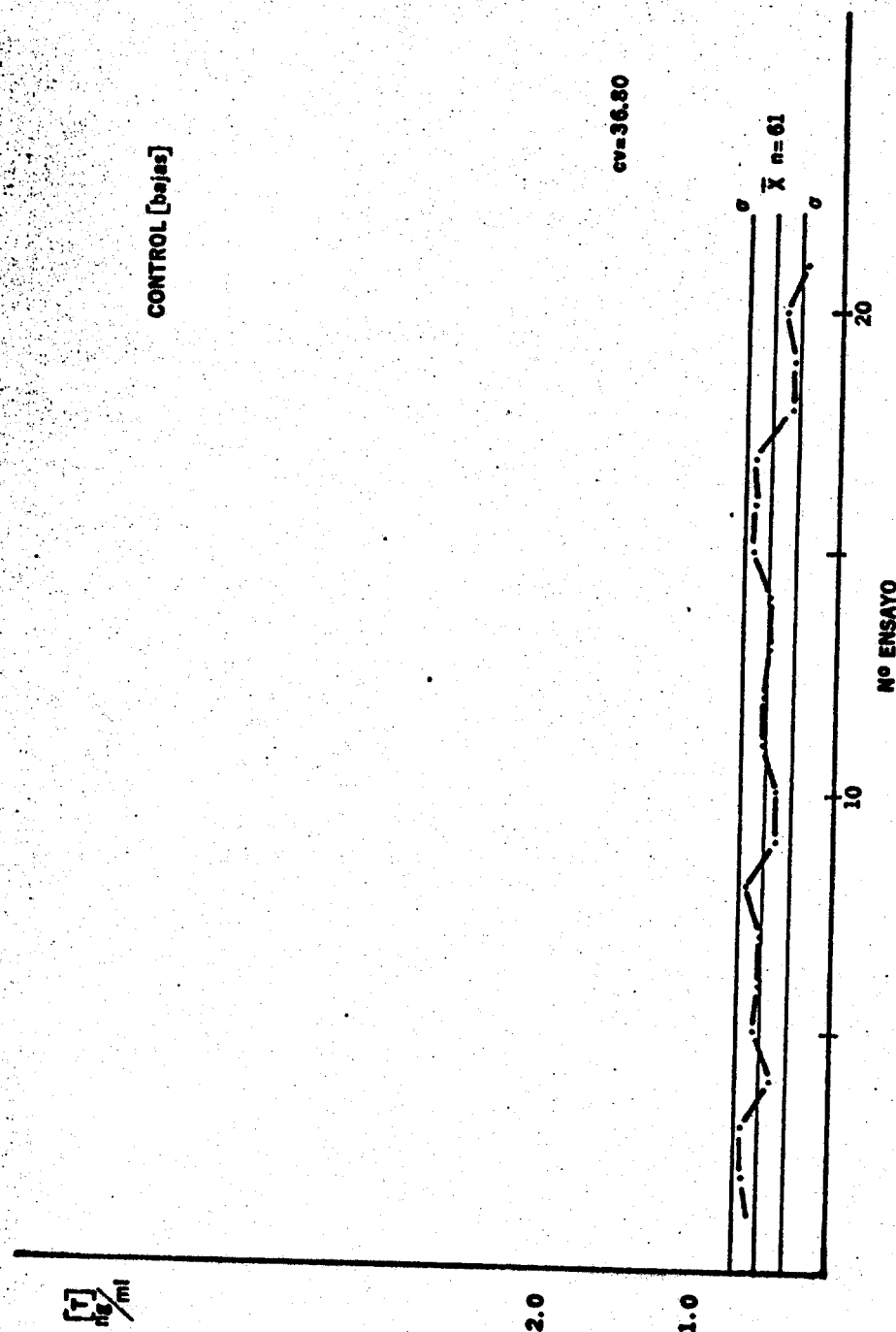
n Número de controles de calidad

$\bar{X}$ Promedio

CV Coeficiente de variación

() Concentración

FIGURA No. 15



Variación interanálisis de los controles en RIA de Testosterona (Concentración baja)

Desviaciones estándar

$\bar{X}$ Promedio

n Número de Controles de calidad

CV Coeficiente de variación

s Concentración

controles de progesterona. Las fluctuaciones que se observaron en las concentraciones de este grupo de controles aparecen en las figuras 13, 14 y 15.

9. Titulación del antisuero anti-progesterona.

El antisuero anti-progesterona, fue obtenido en conejos con el conjugado 11-⁴-hidroxiprogesterona comercialmente disponible en los laboratorios Radioassay System No. de catálogo 1692.

CUADRO No. 14
DATOS DE LA CARACTERIZACION DEL
ANTISUERO ANTI-PROGESTERONA

<u>Esteroides</u>	<u>Índice de Reacción Cruzada</u>
Colesterol	0.01
Pregnenolona	0.01
Sulfato de pregnenolona	0.01
17-Hidroxipregnenolona	0.01
Progesterona	100
17- α -Hidroxiprogesterona	0.18
20- α -Dihidroprogesterona	6.5
Desoxicorticosterona	1.5
11-desoxicortisol	0.01
Cortisol	0.01
Corticosterona	0.01
Aldosterona	0.01
Androstendiona	0.01
Testosterona	0.01
Dihidrotestosterona	0.01
Androsterona	0.01
Etiocolanolona	0.01
17- β -estradiol	0.01
17- α -estradiol	0.01
Estrona	0.01
Estriol	0.01

Al antisuero diluido 1:50 en buffer de fosfatos pH - 7.2 le fue agregado buffer para obtener una concentración de 1:500, a partir de la cual se prepararon las soluciones de 1:5000, 1:6000, 1:7000, 1:8000 y - 1:9000. Los datos obtenidos por RIA que aparecen en el cuadro No. 15, indicaron que la dilución más conveniente a usar fue 1:7000 dado que en general se recomienda una dilución del antisuero que presente una unión máxima (Bo) entre 25-50% pues una unión menor de 25%, produce un análisis impreciso, mientras que uniones mayores de 50% dan análisis poco sensibles. Para la selección de la dilución del antisuero, además del porcentaje de unión máxima se usaron otros parámetros implicados en la validación de la curva dosis-respuesta linearizada como se ve en el cuadro No. 16. la dilución 1:7000 da una recta con pendiente de - - 2.37, lo cual indicó que la hormona marcada-no marcada posee la misma afinidad de unión al anticuerpo y que el sistema se encontraba en equilibrio. (Rodbard, y Col., 1969; Rodbard, 1974). Figura No. 16.

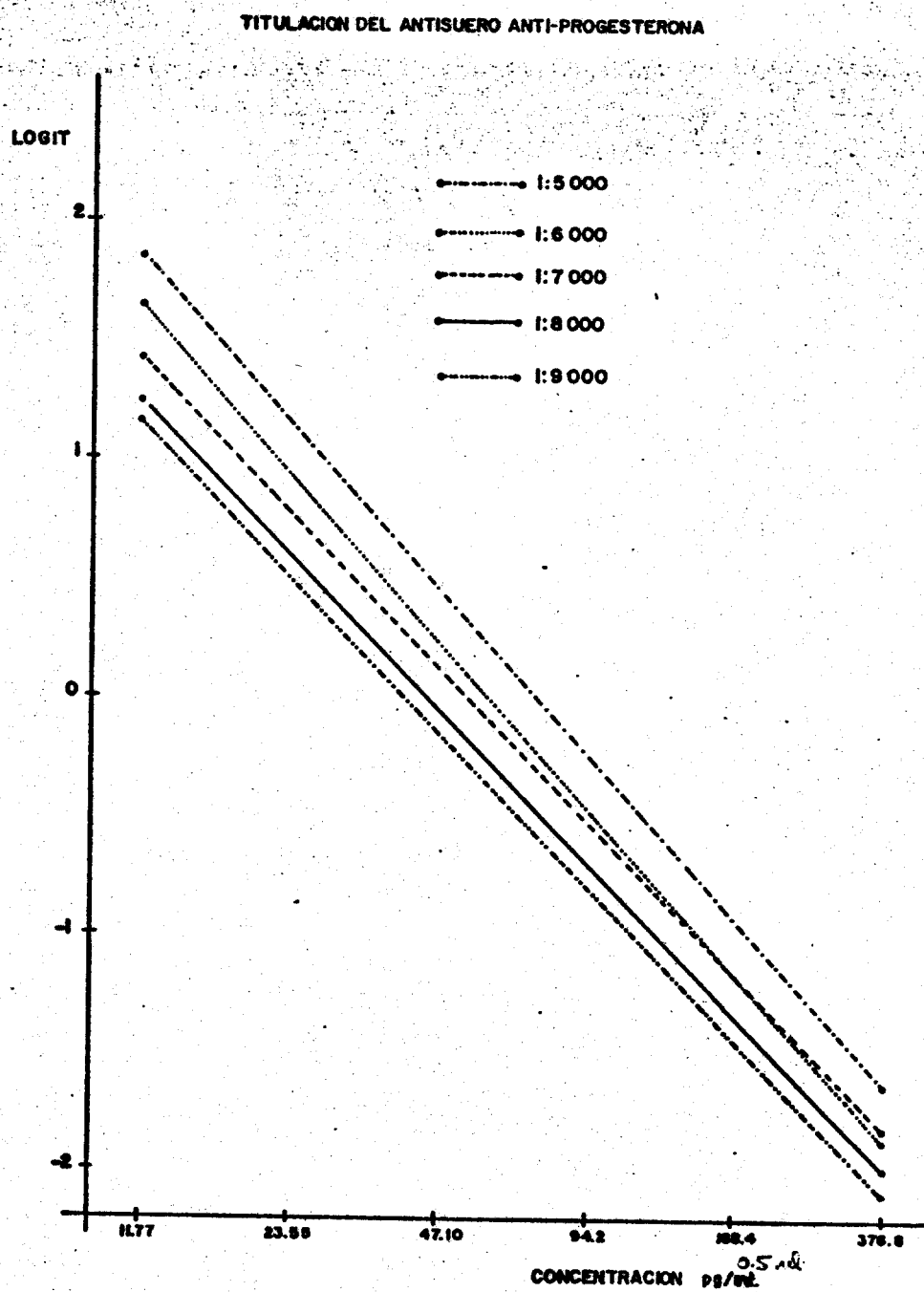
El antisuero fue almacenado a una dilución 1:7000 en alícuotas de 1 ml en frascos de vidrio con capacidad para 20 ml a -80°C en revco ultra low. Para cada RIA se tomó una alícuota del antisuero, a la cual se le agregaron 9 ml de buffer de fosfatos pH 7.2 para obtener una dilución final de 1:7000.

CUADRO No. 15
TITULACION DEL ANTISUERO ANTIPROGESTERONA CATALOGO
No. 1692 RADIOASSAY SYSTEMS LABORATORIES

DILUCION DEL ANTISUE- RO.	%UNION NO ESPECIFICA (%UNE)	% UNION MAXIMA (%Bo)	PENDIENTE	50% INTER- CEPTO.	RELACION RESPUESTA ERROR (RRE)	DOSIS PRO- GESTERONA ESTANDAR pg/0.5 ml	PERFIL DE PRECISION
1:5000	1.09	64.96	-2.33	73.09	11.77 376.80	40.51 6.52	
1:6000	1.09	63.86	-2.20	52.02	11.77 376.80	21.87 4.88	
1:7000*	1.09	54.68	-2.37	59.05	11.77 376.80	16.01 2.92	
1:8000	1.09	54.33	-2.16	44.06	11.77 376.80	14.70 3.74	
1:9000	1.09	51.17	-2.09	41.09	11.77 376.80	9.93 2.61	

* Dilución seleccionada 1:700

FIGURA No. 16



10. Titulación del antisuero anti-testosterona

El antisuero anti-testosterona se obtuvo en conejos por inoculación del conjugado testosterona-19-carboximetiletiléter-BSA. Se adquirió en los laboratorios Radioassay System, Inc., catálogo No. 1720.

CUADRO No. 16

DATOS DE LA CARACTERIZACION DEL ANTISUERO
ANTI-TESTOSTERONA

<u>Esteroides</u>	<u>% de Reacción Cruzada</u>
Testosterona	100.00
19-Hidroxitestosterona	28.00
5 α -Dihidrottestosterona	7.00
11 β -Hidroxitestosterona	0.00
11-oxitestosterona	2.00
11 β -Hidroxiandrostendiona	0.00
Androstendiona	0.90
5 α -Androstan-3, 17-diona	0.00
5 β -Androstan-3, 17-diona	0.00
5 β -Dihidrottestosterona	0.63
Andosterona	0.00
Epiandrosterona	0.20
5 -Androstan-3 β , 17 β -diol	0.00
5 -Androstan-3 β , 17 β -diol	2.20
5-Androstan-3 β , 17 β -diol	0.71
Dehidroepiandrosterona	0.00
6 β -hidroxitestosterona	0.95
17 β -Estradiol	0.26
Estrógenos	0.01
Glucorticoides	0.01

Al antisuero diluido 1:2000 en buffer de fosfatos pH 7,0 conteniendo 0,1% de gelatina, le fue agregado buffer para obtener una concentración de 1:20000, partiendo de esta solución para preparar diluciones - - 1:25000, 1:30000, 1:35000, 1:40000, 1:45000, 1:50000, 1:55000 y 1:60000.

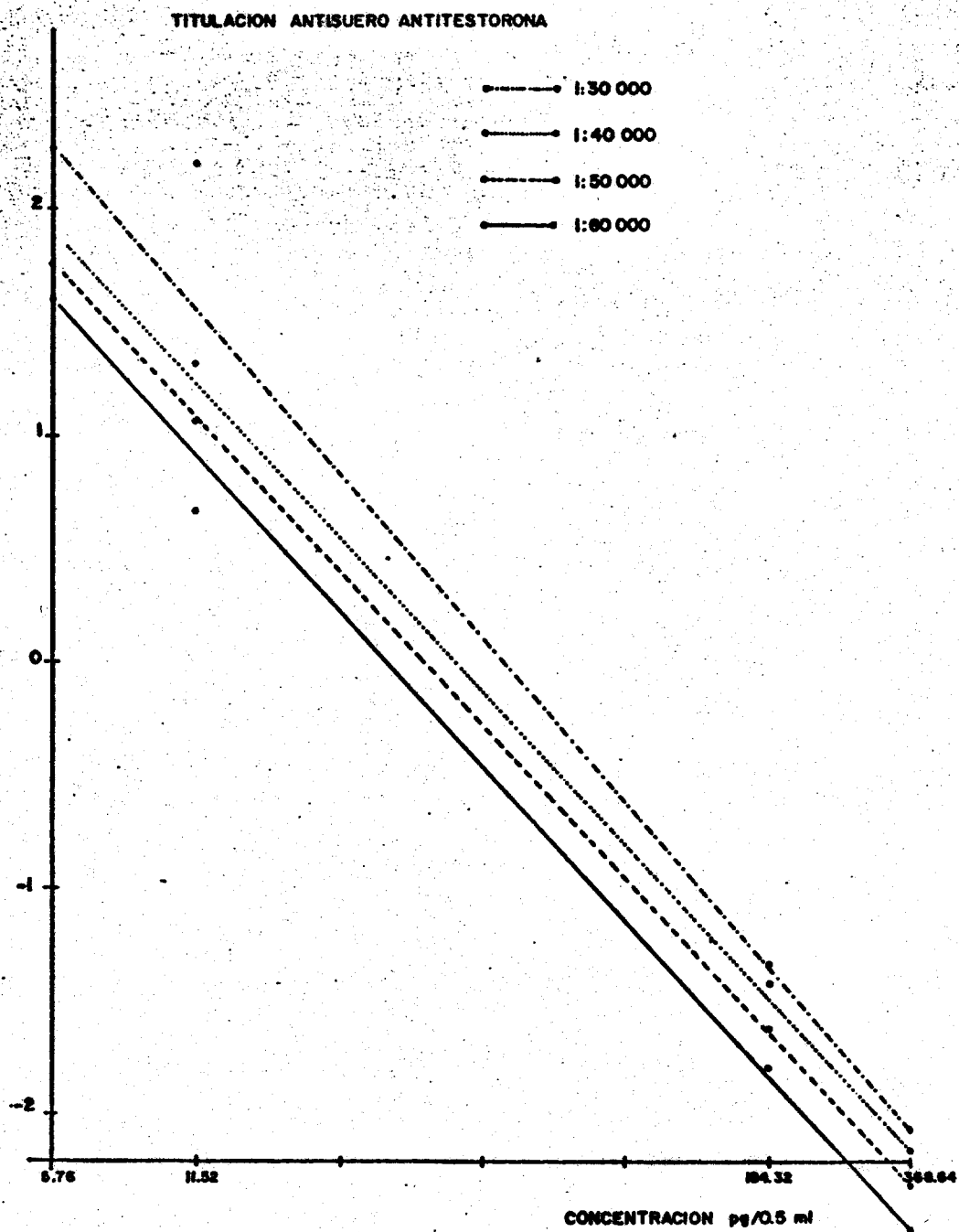
Los valores que aparecen en el cuadro y figura No. - 17, como resultado del RIA, indican que la dilución - más apropiada bajo nuestras condiciones de trabajo es de 1:45000. Los parámetros que se utilizaron para decidir la dilución más adecuada del antisuero fueron - los mismos que para la titulación del antisuero anti-progesterona (Pendiente perfil de precisión y % de -- unión máxima del antisuero en la curva dosis-respues-ta).

C U A D R O No. 17
TITULACION DEL ANTISUERO ANTITESTOSTERONA CATALOGO
1720 RADIOASSAY SYSTEMS LABORATORIES.

DILUCION DEL ANTISUERO	% UNION NO ESPECIFICA (%UNE)	% UNION MAXIMA (%Bo)	PENDIENTE	50% INTERCEPTO	RELACION RESPUESTA ERROR (RRE)	DOSIS TESTOSTERONA ESTANDAR pg/0.5 ml	PERFIL DE PRECISION
1:30 000	1.21	76.28	-2.39	50.75	3.66	5.76 11.52 184.32 368.64	37.43 - 4.46 3.98
1:40 000	1.21	72.09	-2.20	40.53	3.66	5.76 11.52 184.32 368.64	23.64 16.63 4.74 4.81
1:50 000	1.21	62.17	-2.23	34.46	3.16	5.76 11.52 184.32 368.64	32.93 19.19 5.87 5.40
1:60 000	1.21	52.30	-2.11	28.15	4.77	5.76 11.52 184.32 368.64	35.41 21.86 7.85 7.29
1:40 000	1.93	70.01	-2.35	46.98	3.01	2.88 5.76 11.52 184.32 368.64	NO 28.20 15.32 3.67 3.60
1:42 500	1.93	65.35	-2.41	46.41	2.98	2.83 5.76 11.52 184.32 368.64	NO 28.31 15.15 3.52 3.17
*1:45 000	1.93	62.58	-2.25	38.11	3.17	2.83 5.76 11.52 184.32 368.64	55.12 29.93 17.16 4.91 4.40

* Dilución Seleccionada 1:45 000

FIGURA No. 17



ANEXO 4. PURIFICACION DEL MATERIAL BIOLOGICO (SUERO)
PREVIO AL RIA.

EXTRACCION:

Para la extracción de progesterona y testosterona del suero, se usó éter etílico que permitió la extracción de estas hormonas con un % de recuperación elevado (80-90%). El proceso a que se sometieron las muestras de suero, para extraer progesterona y testosterona es como sigue:

En tubos de vidrio de 18 X 150 mm se agregaron 0.2 ml de suero y 0.3 ml de buffer de fosfatos pH7.2, mezclándose en vortex durante 30 segundos y quedando a temperatura ambiente por 20 minutos para lograr su equilibrio. Después de este tiempo cada uno de los tubos recibió un volumen de 5 ml de éter etílico. Cada tubo se agitó en vortex durante un minuto para extraer la hormona del suero problema, después de agitados permanecieron a temperatura ambiente durante 15 min para separar las dos fases: inferior (suero) y superior (éter etílico con la hormona extraída). El grupo de tubos fue sometido a un baño de hielo seco-acetona para congelar rápidamente la fase inferior; el líquido sobrenadante se decantó en tubos de vidrio de 10 X 130 mm con la identificación correspondiente al tubo de donde provenían. El solvente se evaporó en baño de agua a 37°C dentro de una campana con extractor.

Al residuo seco de la evaporación, le fueron agregados - 2 ml de buffer de fosfatos pH 7.2, 0.1 molar agitando cada uno de los tubos en vortex durante un minuto para desprender la hormona extraída de las paredes internas del tubo de extracción, quedando durante 20 minutos a temperatura ambiente para lograr su equilibrio y solubilizar la hormona en el buffer.

Después de este tiempo, se tomaron 2 alícuotas de 0.5 ml de cada uno de los tubos de extracción, transfiriéndolas a tubos de vidrio de 7.5 X 100 mm para el desarrollo de la reacción del RIA. Las alícuotas fueron medidas con pipeta Oxford con rango de medición de 0.2 a 1 ml.

ANEXO 5. PARAMETROS EVALUADOS PARA LA VALIDACION DEL -
RIA DE TESTOSTERONA Y PROGESTERONA, EN SUERO
DE OVEJAS CRIOLLAS.

ESPECIFICIDAD.

La forma para evaluar especificidad de un análisis es a -
través de 3 procedimientos

- Pruebas de reacción cruzada
- Curva de paralelismo
- Pruebas cualitativas

• Para probar reacción cruzada del antisuero, se -
usaron compuestos químicamente similares a la hor-
mona contra la cual se produjo el antisuero. --
Los datos que aparecen en los cuadros No. 14 y -
No. 16 corresponden a los resultados obtenidos -
para probar reacción cruzada por los laborato---
rios de Radioassay System, donde se adquirió el
antisuero antitestosterona y anti-progesterona.

• La curva de paralelismo para probar la similitud
entre el comportamiento de la hormona estándar y
la hormona contenida en el suero de ovejas y bo-
rregos del hato experimental se hizo en suero.
Para probar paralelismo en suero de ovejas fue--
ron sangradas de la yugular 2 hembras durante la

fase lútea, obteniendo un volúmen aproximado de 20 ml de sangre, separando el suero en condiciones iguales a las muestras problema. De este suero, se tomaron alícuotas de 0.05 ml, 0.1 ml, 0.2 ml, 0.4 ml y 0.8 ml colocando cada una de éstas alícuotas en tubos de vidrio de 18 X 150 mm. A cada uno de éstos tubos se le agregó buffer de fosfatos $\text{pH } 7.2 \pm 0.1$ para completar un volúmen de 0.5 ml ó bien, cuando el volúmen de suero fue mayor de 0.5 ml fue agregado buffer suficiente para completar un ml. Cada tubo se agitó por 30 segundos y permaneció a temperatura ambiente durante 20 minutos para su estabilización. Después, en aquellos tubos que tenían un volúmen de 0.5 ml, se agregó 5 ml de éter etílico y en los que tenían un volúmen de un ml, 10 ml de éste solvente. Cada tubo se agitó en vortex, durante un minuto para la extracción de la hormona, luego se dejaron a temperatura ambiente durante 20 min, para la separación de las fases. Después de este período, los tubos fueron sometidos a un baño de hielo seco-acetona, para congelar la fase acuosa rápidamente; el solvente de cada uno de éstos tubos fue decantado en tubos de vidrio de 10 X 130. El grupo de tubos con solvente y la hormona se colocaron en baño de agua a 37°C dentro de una campana

con extractor hasta evaporar completamente el sol
vente. Al extracto seco de la hormona, se agrega
ron 2 ml de buffer de fosfatos pH 7.2, 0.1 molar
con pipetor Oxford rango 0.1 a 5 ml con depósito
de 150 ml.

Cada tubo se agitó en vortex durante un minuto -
para desprender la hormona extraída de las pare-
des internas del tubo, después quedaron a tempe-
ratura ambiente durante 20 minutos para lograr el
equilibrio de la solución contenida en cada tubo.
Al término de este período, se tomó una alícuota
de 0.5 y se transfirió a tubos de vidrio de - - -
7.5 X 100 mm, para ser procesados por RIA. Cada
alícuota del suero fue procesada por duplicado.

Los resultados obtenidos por RIA indicaron parale-
lismo entre la curva estándar y volúmenes diferen-
tes del suero de ovejas durante la fase lútea. -
Este paralelismo de muestreo una combinación úni-
ca del antisuero y el antígeno Figura No. 18.

Para desarrollar la curva de paralelismo en el -
suero de machos, se sangraron 2 borregos del gru-
po experimental al final del período de muestreo,
obteniendo un volumen aproximado de 20 ml, de san

gre de la yugular con jeringas estériles, en tubos vacutainer. El proceso para la separación del suero y para alícuotar el suero, se siguió en la forma ya descrita para la curva de paralelismo en hembras.

Los resultados del RIA indican paralelismo para el suero de machos (Figura 19).

Las pruebas cualitativas, reproduciendo previamente respuestas biológicas in vivo con sustancias que aumentarían o disminuirían concentración de la hormona a medir no fueron desarrolladas para este análisis. (Reimers y Cols., 1981; Niswender y Nett, 1977; Midgley Jr. y Cols., 1969).

FIGURA No. 19

RIA TESTOSTERONA BORRIGOS

CURVA DE PARALELISMO

CURVA ESTANDAR

CURVA DE PARALELISMO

PENDIENTE -2.078
INTERCEPTO 33.45

PENDIENTE -2.079
INTERCEPTO 33.45

SUERO DE BORRIGO CRULLO

0.05 ml 0.1 ml 0.2 ml 0.4 ml 0.8 ml

