



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

División de Estudios de Posgrado



**ESTABLECIMIENTO DE LA METODOLOGIA PARA
EL MANEJO OPTIMO DE MUESTRAS DE SANGRE
Y LECHE DE GANADO CEBU (BOS INDICUS)
DESTINADAS A LA DETERMINACION DE PROGES-
TERONA POR MEDIO DE RADIOINMUNOANALISIS.**

T E S I S

Que para obtener el grado de:

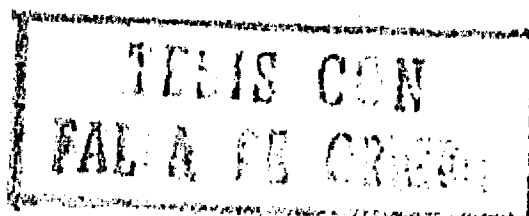
MAESTRO EN PRODUCCION ANIMAL

P r e s e n t a :

Angel Rosendo Pulido Albores

México, D. F.

1989



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DATOS BIOGRAFICOS

El autor nació en la Ciudad de Tierra Blanca, Veracruz, el día 23 de Octubre de 1962. Graduándose en la Universidad Veracruzana y obteniendo el título de Médico Veterinario Zootecnista en el año de 1984, en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

De 1984 a 1986 prestó sus servicios en la Dirección General de Ganadería del Estado de Veracruz.

En 1986 se inscribió como estudiante de posgrado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional Autónoma de México para obtener el grado de Maestro en Producción Animal: Area Reproducción Animal.

CONTENIDO

	pagina
CAPITULO 1. INTRODUCCION.....	1
CAPITULO 2. REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1 Concentraciones de progesterona en el suero o plasma de ganado <u>Bos indicus</u>	4
2.2 La progesterona en muestras de sangre.....	6
2.3 La progesterona en muestras de leche.....	11
CAPITULO 3. EFECTO DEL TIEMPO Y TEMPERATURA DE CONSERVACION PREVIAS A LA CENTRIFUGA- CION DE MUESTRAS DE SANGRE DE GANADO <u>BOS INDICUS</u> SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA MEDIBLES EN SUERO O PLASMA OBTENIDO MEDIANTE EL USO DE DIFERENTES ANTICOAGULANTES.....	16
3.1 Introducción.....	16
3.2 Objetivos.....	18
3.3 Material y Métodos.....	19
3.4 Resultados.....	26
3.5 Discusión.....	40

CAPITULO 4. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA MEDIBLES EN MUESTRAS DE LECHE PRESERVADAS CON DIFERENTES CONSERVADORES.....	49
4.1 Introducci3n.....	49
4.2 Material y M3todos.....	50
4.3 Resultados.....	53
4.4 Discusi3n.....	63
CAPITULO 5. BIBLIOGRAFIA.....	70

LISTA DE FIGURAS

figura	CAPITULO 3	Pagina
3.1	Diseño experimental.....	20
3.2	Degradación de la progesterona en muestras de sangre con diferentes concentraciones iniciales de la hormona e incubadas sin anticoagulante a 4°C, 17°C y 38°C.....	31
3.3	Degradación de la progesterona en muestras de sangre con diferentes concentraciones iniciales de la hormona e incubadas con heparina a 4°C, 17°C y 38°C.....	36
3.4	Degradación de la progesterona en muestras de sangre con diferentes concentraciones iniciales de la hormona e incubadas con fluoruro de sodio a 4°C, 17°C y 38°C.....	39

LISTA DE CUADROS

cuadro	CAPITULO 3	página
3.1	Análisis de varianza de los efectos del tiempo de incubación, temperatura de incubación y anticoagulante sobre los niveles de progesterona en plasma o suero.....	27
3.2	Concentraciones promedio de progesterona en suero obtenido después de incubar la sangre durante diferentes intervalos a 4°C, 17°C y 38°C.....	29
3.3	Concentraciones promedio de progesterona en plasma obtenido después de incubar la sangre durante diferentes intervalos a 4°C, 17°C y 38°C, utilizando heparina como anticoagulante.....	34
3.4	Concentraciones promedio de progesterona en plasma obtenido después de incubar la sangre durante diferentes intervalos a 4°C, 17°C y 38°C utilizando fluoruro de sodio como anticoagulante.....	38

LISTA DE CUADROS

CAPITULO 4

cuadro		página
4.1	Análisis de varianza manejando los efectos de tiempo de almacenamiento, temperatura de conservación y preservativo utilizado, sobre los niveles de progesterona en leche descremada.....	54
4.2	Concentración promedio de progesterona en muestras de leche descremada mantenidas con azida de sodio en congelación o refrigeración durante 5, 15 ó 30 días.....	55
4.3	Concentraciones promedio de progesterona en muestras mantenidas con dicromato de potasio en congelación o refrigeración durante 5, 15 ó 30 días.....	56
4.4	Concentraciones promedio de progesterona en muestras mantenidas con formalina en congelación o refrigeración durante 5, 15 ó 30 días.....	57
4.5	Concentraciones promedio de progesterona en muestras mantenidas con timerosal en congelación o refrigeración durante 5, 15 ó 30 días.....	58
4.6	Repetibilidad de las concentraciones de progesterona al analizar después de diversos períodos de almacenamiento muestras de leche descremada preservadas con diferentes conservadores y mantenidas en congelación o refrigeración.....	59
4.7	Coefficientes de correlación de las concentraciones de progesterona entre los tiempos de almacenamiento de muestras de leche descremada mantenidas en refrigeración o congelación usando azida de sodio.....	60
4.8	Coefficientes de correlación de las concentraciones de progesterona entre los tiempos de almacenamiento de muestras de leche descremada mantenidas en refrigeración o congelación usando dicromato de potasio.....	61

- 4.9 Coeficientes de correlación de las concentraciones de progesterona entre los tiempos de almacenamiento de muestras de leche descremada mantenidas en refrigeración o congelación usando formalina.....62
- 4.10 Coeficientes de correlación de las concentraciones de progesterona entre los tiempos de almacenamiento de muestras de leche descremada mantenidas en refrigeración o congelación usando timerosal.....62

RESUMEN

PULIDO ALBORES ANGEL ROSENDO. Establecimiento de la metodología para el manejo óptimo de muestras de sangre y leche de ganado Cebú (Bos indicus) destinadas a la determinación de progesterona por medio de radioinmunoanálisis. (Bajo la dirección de los M.V.Z. Luis Zarco Quintero, Carlos Galina Hidalgo y Eduardo Posadas Manzano).

Se realizaron dos experimentos. El primero, tuvo como objetivo determinar el efecto del tiempo y temperatura de incubación de muestras de sangre sobre los niveles de progesterona medibles en suero o en plasma obtenido mediante el uso de heparina o de fluoruro de sodio. Se usaron 10 vacas Gyr con cuerpo lúteo funcional. A cada vaca se le extrajeron 160 ml de sangre en un matraz sin anticoagulante, 160 ml en un matraz con heparina y 160 ml en otro conteniendo fluoruro de sodio. La sangre de cada matraz se dividió en 46 alícuotas, una de las cuales se centrifugó inmediatamente para separar el plasma o suero. Las restantes se dividieron en tres grupos: 15 se mantuvieron a 4°C, 15 a 17°C y 15 a 38°C. Se centrifugó una alícuota de cada vaca, anticoagulante y temperatura cada media hora hasta las seis horas, y luego a las 8, 12 y 24 horas. El plasma o suero se separó después de la centrifugación y se mantuvo congelado a -20°C hasta procesarse en duplicado por radioinmunoanálisis. La concentración inicial promedio de progesterona en suero fue de 8.3 ng/ml, disminuyendo significativamente ($P < 0.05$)

después incubar la sangre por 5 horas a 4°C (6.7 ng/ml), por 3 horas a 17°C (6.6 ng/ml), o por 2 horas a 38°C (6.5 ng/ml). El valor inicial en las muestras de plasma obtenido con heparina fue de 7.8 ng/ml disminuyendo significativamente ($P < 0.05$) después de incubar la sangre por 6 horas a 4°C (6.3 ng/ml), 2 horas a 17°C (6.3 ng/ml), 1 hora a 38°C (6.0 ng/ml). En contraste, al usar fluoruro de sodio como anticoagulante la concentración promedio inicial fue de 6.7 ng/ml y nunca disminuyó en forma significativa cuando la sangre se incubó a 4°C ó 38°C, mientras que al incubar a 17°C disminuyó después de 24 horas de incubación (4.5 ng/ml). Los resultados indican que el fluoruro de sodio es el anticoagulante de elección para determinar progesterona. En el experimento 2, el propósito fué encontrar el mejor preservativo para las muestras de leche destinadas a la determinación de progesterona; se evaluaron 4 preservativos: Dicromato de potasio (DP), Formol (FO), Azida de sodio (AS) y Thimerosal (TH); se tomaron muestras de leche de 20 vacas F1 (Holstein X Indobrasil) gestantes. Una vez añadidos los preservativos se dividieron en alícuotas, fueron centrifugadas para separar la grasa y la leche descremada fue incubada a temperaturas de refrigeración (4°C) ó congelación (-20°C). Se analizaron los niveles de progesterona 5, 15 y 30 días después de la toma de las muestras. Las concentraciones promedio de progesterona detectadas en los tres análisis en temperatura de refrigeración fueron para DP de 6.4, 5.9 y 6.5 ng/ml respectivamente; para FO 7.6, 6.1 y

4.3 ng/ml; para AS 4.3, 6.8 y 4.6 ng/ml; y para TH 6.9, 6.1 y 6.5 ng/ml respectivamente. Las concentraciones promedio de progesterona detectadas en los tres análisis en temperatura de congelación fueron para DP 4.8, 6.6 y 3.7 ng/ml; para FO 3.5, 3.5 y 1.6 ng/ml; para AS 4.4, 6.3 y 4.1 ng/ml; para TH 5.5, 6.5 y 3.9 ng/ml. Encontrándose que los mejores preservativos fueron el dicromato de potasio y el timerosal en refrigeración, este último es la mejor alternativa por ser más inocuo.

I INTRODUCCION.

Un porcentaje importante del ganado bovino en el trópico es de tipo Cebú (Bos indicus). Y generalmente la eficiencia reproductiva de este tipo de ganado es pobre (66, 70). Es posible que esta baja eficiencia sea debida en parte, a la falta de conocimiento de los mecanismos básicos que regulan la reproducción del ganado Cebú (39), y en parte, a la tendencia de tratar de aplicar tecnología desarrollada en las áreas templadas, la cual no es siempre adaptable a los trópicos (25). El desconocimiento de los fenómenos reproductivos del ganado Cebú, es especialmente importante, ya que se sabe que este ganado presenta diferencias anatómicas y fisiológicas con respecto al ganado europeo (Bos taurus) (7, 36, 40, 44, 50, 52), en el cual se ha realizado la mayor parte de la investigación. Por esto es necesario realizar investigación sobre la fisiología reproductiva del ganado Cebú.

La medición de las concentraciones de progesterona en diversos líquidos corporales, es una de las herramientas más útiles para realizar investigación en reproducción. De esta forma se puede determinar la presencia o ausencia de un cuerpo lúteo, así como su capacidad funcional (24,46,47). Estas determinaciones pueden realizarse en plasma, suero o leche.

Existen antecedentes que señalan que el metabolismo de progesterona en muestras de sangre de diversas especies es diferente al que ocurre en muestras de ganado Bos taurus (23,42,45,73), por lo que la información obtenida en ganado europeo podría no ser válida para el ganado Cebú (Bos indicus), ya que se trata de una especie distinta en la que el metabolismo de progesterona en la sangre podría ser diferente.

En la literatura no existe información sobre los aspectos que alteran el metabolismo de progesterona en muestras de ganado Bos indicus. Considerando estos hechos en un primer experimento se evaluaron los efectos del tiempo y temperatura de incubación de la sangre, así como el efecto de diversos anticoagulantes, sobre las concentraciones de progesterona detectados en muestras sanguíneas de ganado Cebú.

También cuando la determinación de progesterona se realiza en muestras de leche, se conoce que los resultados pueden alterarse por diversos factores; los más importantes son la temperatura de conservación de las muestras, y el preservativo utilizado para evitar la descomposición (19,27). Por ésta razón, en un segundo experimento se evaluó el uso de diferentes conservadores usados en las muestras de leche que serán destinadas a la determinación de progesterona.

Al evaluar los resultados obtenidos después de la cuantificación de progesterona, es necesario tomar en cuenta que los valores de progesterona encontrados posiblemente no reflejen con precisión las concentraciones presentes en la muestra al momento de su obtención. Esto es debido a que existen diversos factores que pueden causar alteraciones en la muestra durante su obtención o almacenamiento (68). Este tipo de alteraciones puede influir en el resultado final, más que la precisión y exactitud del método de radioinmunoanálisis empleado (67). Por esta razón es importante considerar los factores que afectan la estabilidad de las hormonas en muestras biológicas almacenadas y preservadas bajo diversas condiciones.

En ganado Bos taurus, existen varios estudios que señalan que las concentraciones de progesterona detectables en plasma decrecen con el intervalo del tiempo que existe entre la obtención de la muestra de sangre y su centrifugación para la separación del plasma o suero, y que este efecto es directamente proporcional a la temperatura a la que se mantenga la sangre antes de ser centrifugada (15,45,47,53,67,68,73). También se ha encontrado que este efecto es diferente al utilizarse diversos anticoagulantes (31,68).

II REVISION DE LITERATURA.

2.1. Concentraciones de progesterona en el suero o plasma de ganado Bos indicus.

En condiciones fisiológicas normales, las concentraciones de progesterona en la hembra no gestante dependen principalmente de la funcionalidad del cuerpo lúteo (5), por lo que la determinación de las concentraciones de progesterona en plasma o suero es uno de los métodos más prácticos para el estudio de la actividad ovárica de los mamíferos (61). Así, se han caracterizado los patrones de secreción de progesterona durante el ciclo estral de muchas especies, incluyendo a las domésticas. (3,4,5,21,58,59).

Existe controversia en la literatura sobre la concentración de progesterona en la sangre de ganado Bos indicus. Algunos autores han indicado que los niveles séricos de progesterona durante el estro son menores a 0.5 ng/ml. (4,43,65), incrementándose gradualmente durante el metaestro hasta alcanzar, durante la fase lútea, valores de alrededor de 6 ng/ml (43), o incluso superiores a los 7 ng/ml (20). Estos valores son similares a los que normalmente se encuentran en el ganado Bos taurus durante la fase lútea del ciclo (60). Sin embargo, otros autores han encontrado valores más bajos durante el diestro del ganado Bos indicus. En este sentido, en México Ruiloba, et al (54)

mencionan que en vacas Bos indicus los valores de progesterona no excedieron de 4 ng/ml. En otro estudio, Moreno et al (41) encontraron valores promedio de 3.68 ng/ml durante el diestro de vacas Indobrasil, mientras que Vaca et al (65) no encontraron concentraciones superiores a 3.1 ng/ml durante los días 9 y 10 del ciclo estral de ganado Bos indicus. En otros países como la India, Agarwal, et al (5,6) encontraron concentraciones todavía más bajas en vacas Haryana, siendo el promedio de 1.4 ± 0.1 ng/ml en vacas en diestro y de 2.4 ± 0.1 ng/ml en vacas gestantes. Oyedipe et al (48) encontraron resultados similares en estudios realizados en ganado Cebú en Nigeria.

Las discrepancias relacionadas con las concentraciones de progesterona encontradas por diversos autores en vacas cebuinas pueden deberse a alteraciones sufridas por las muestras durante y después de su obtención o almacenamiento. Existen varios factores que pueden acelerar el metabolismo de los esteroides, por lo que los valores de progesterona medidos en plasma o suero, pueden no reflejar con precisión la concentración presente en la muestra al momento de su obtención (45,67,68,73). Aunque no existe información al respecto en ganado Bos indicus, en otras especies se han realizado estudios que indican que la progesterona presente en la muestra sanguínea puede ser metabolizada (47), y que este efecto se ve influenciado por las condiciones de incubación de la muestra.

2.2. La progesterona en muestras de sangre.

Vahdat et al. (67) estudiaron los efectos del tiempo y temperatura en que permanecen las muestras de sangre de ganado Bos taurus antes de ser centrifugadas, sobre la concentración de progesterona detectable en plasma. Ellos encontraron que la concentración promedio de progesterona en plasma, obtenida mediante el uso de EDTA como anticoagulante, fue de 6.6 ng/ml cuando la sangre se centrifugó inmediatamente después de su obtención. La concentración disminuyó a 1.7 y 2.8 ng/ml respectivamente cuando la sangre se incubó a 40°C durante 6 ó 24 horas antes de su centrifugación. Aun cuando la temperatura de incubación fue de 4°C, la concentración de progesterona disminuyó a 4.2 ng/ml, cuando se dejaron pasar 24 horas antes de la centrifugación. En dicho trabajo la concentración de progesterona presente en plasma fue degradada cuando la muestra de sangre se conservó en refrigeración; la pérdida de progesterona se aceleró en un 50% cuando la muestra fue preservada a temperaturas mayores de 35°C, indicando que el proceso mediante el cual la progesterona es destruida es dependiente de la temperatura, lo que sugiere un proceso enzimático.

En el mismo trabajo, cuando la determinación de la progesterona se realizó en suero se observó que las concentraciones de la hormona también disminuyeron conforme

aumentó el intervalo entre la toma de la muestra y la separación del coágulo; sin embargo, el efecto no fue tan marcado como cuando las determinaciones se realizan en plasma.

En un trabajo más reciente, Vahdat et al (68) confirmaron que la temperatura de incubación afecta la velocidad con que la progesterona es metabolizada en las muestras de sangre. Ellos incubaron sangre a diferentes temperaturas utilizando EDTA como anticoagulante y encontraron que la concentración de progesterona en el plasma disminuyó de un valor inicial de 5.7 a 3.5 ng/ml cuando la sangre se incubó por 12 horas a 4°C. Los valores se recuperaron parcialmente a 4.5 ng/ml al incubar la sangre por 24 horas a la misma temperatura. En las muestras incubadas a 22°C las concentraciones disminuyeron de 5.7 ng/ml en el tiempo cero a 1 ng/ml a las 12 horas. Cuando las muestras se incubaron a 37°C, la concentración de progesterona disminuyó de 5.7 a 1 ng/ml a las 8 horas y 2.6 ng/ml a las 24 horas. Al usar heparina en muestras de sangre incubadas a 22°C, la concentración de progesterona disminuyó de 6.1 ng/ml en el tiempo cero a 2.6 ng/ml. a las 6 horas y a 1.4 ng/ml a las 24 horas.

Owens et al (47), realizaron un estudio usando muestras de sangre colectadas en vacas Bos taurus durante la fase lútea temprana (día 3) del ciclo estral, fase

lútea media (día 10 a 11) y fase lútea tardía (días 18 a 19 del ciclo) utilizando heparina como anticoagulante a intervalos de 10 minutos por 8 horas continuas. En este estudio, la concentración de progesterona en plasma disminuyó conforme transcurrió el tiempo durante el cual la sangre fue incubada a temperatura ambiente, observándose que la pérdida fue más obvia cuando la sangre fue colectada en la fase lútea media.

Recientemente, Vahdat et al (69), volvieron a confirmar que la temperatura de incubación afecta las concentraciones de progesterona en muestras de sangre y además observaron que, usando una combinación de oxalato de potasio y fluoruro de sodio como anticoagulantes, las concentraciones de progesterona no se alterarón, debido quizá a la inhibición de un proceso enzimático. Ellos colectaron sangre de vacas gestantes y las incubaron con tres diferentes anticoagulantes: heparina, oxalato de potasio-fluoruro de sodio, y dextrosa fosfato; en cada uno de los tratamientos se incubaron a tres diferentes temperaturas (4, 22 y 38°C). La concentración media de progesterona de la sangre colectada con heparina y mantenida a 4°C se redujo significativamente a las 12 horas ($P < 0.05$), pero no a las 24 horas de incubación. La concentración media de progesterona en muestras heparinizadas incubadas a 22 y 37°C disminuyó después de 12 y 24 horas de incubación respectivamente ($P < 0.05$). En contraste, las concentraciones

medias de progesterona en el plasma obtenido con oxalato de potasio-fluoruro de sodio e incubadas a 4°C por 12 o 24 horas fueron similares a las del tiempo cero. Cuando la muestra fue incubada a 22°C, la concentración media de progesterona disminuyó, y esta disminución ocurrió después de 24 horas. Es interesante mencionar que al incubar la sangre a 37°C no se encontró ninguna disminución en la concentración de progesterona aún después de 24 horas. En el grupo donde la sangre se incubó con dextrosa-fosfato, las concentraciones de progesterona en muestras mantenidas a 4°C por 12 ó 24 horas no disminuyeron significativamente. Sin embargo, cuando se mantuvieron a 22 ó 37°C la concentración media de progesterona disminuyó después de 12 horas de incubación ($P < 0.05$). Estos resultados indican que el oxalato de potasio-fluoruro de sodio pueden inhibir la destrucción de la progesterona en muestras de sangre bovina.

Existen evidencias de que la destrucción de la progesterona que ocurre en las muestras de sangre del ganado Bos taurus no es tan marcada en otras especies. Oltner y Edqvist (45) estudiaron los cambios en la concentración de progesterona en plasma durante el almacenaje de sangre completa heparinizada de varias especies, observando que no hubo ningún efecto del almacenamiento sobre las concentraciones de progesterona en la sangre de perras o cerdas. En el caso de las yeguas existió una pequeña -aunque significativa- disminución en las concentraciones de

progesterona cuando la sangre fue mantenida a temperatura ambiente. En contraste, en el caso de la vaca se observó una dramática disminución en la concentración de progesterona aún cuando la sangre fue almacenada en el refrigerador inmediatamente después de haber sido obtenida.

De la misma manera, Wiseman et al (73), estudiaron diferentes métodos de manejo entre la colección y la centrifugación de sangre bovina, porcina, ovina y equina. Ellos confirmaron una vez más la destrucción de la progesterona en muestras de sangre bovina, pero encontraron que este efecto es menos marcado en muestras de sangre ovina, mientras que en la sangre de porcinos y equinos no se produce destrucción de la progesterona, independientemente del tiempo y temperatura de incubación. Recientemente, Navarro et al (42), demostraron que en la especie caprina tampoco se reducen las concentraciones de progesterona en plasma obtenido a partir de sangre heparinizada, aún cuando la sangre se almacenó a temperatura ambiente durante 24 horas antes de su centrifugación.

Toda esta información indica que existen diferencias entre las especies en cuanto al metabolismo de la progesterona en muestras sanguíneas en respuesta a la temperatura y tiempo de incubación. Es posible que existan por lo tanto, diferencias entre el ganado Bos taurus y Bos indicus, ya que se trata de especies distintas en las que el

metabolismo o degradación de la progesterona podría ser diferente.

2.3. La progesterona en muestras de leche.

Debido a la facilidad de obtención de muestras de leche y al creciente interés de estudiar cruzas de ganado bovino especializado en producción láctea con germoplasma local en el trópico, la determinación de la concentración de progesterona en leche puede utilizarse como una ayuda para el control de los procesos reproductivos con el objeto de mejorar la fertilidad del ganado. Por ejemplo, se han realizado numerosos estudios para investigar la actividad ovárica postparto a través de la medición de progesterona en leche, en un intento para explicar entre otras cosas las causas del retraso en el retorno al estro (8,18,38). La medición de progesterona en leche también se ha usado como un método alternativo para el diagnóstico temprano de gestación (1, 12, 14, 19, 22, 27, 29, 30, 32, 35, 37, 55), para evaluar la función lútea al tiempo de la inseminación (9, 12, 16), y para el seguimiento de la actividad ovárica, ya sea individual o en hatos completos (30, 34). Sin embargo, la mayoría de éstos estudios se han realizado en ganado Bos taurus explotado en condiciones muy diferentes a las del trópico.

Un hallazgo interesante en la literatura, es que la concentración de progesterona en leche varía de acuerdo al momento en que se obtenga la muestra en relación al ordeño o amamantamiento, y que dicha concentración es mayor en leche entera que en leche descremada. Así, Abdel et al (2), encontraron que las concentraciones de progesterona en leche libre de grasa fueron de 2.08 y 7.21 ng/ml antes y después del amamantamiento respectivamente, mientras que los valores medios para progesterona en leche completa antes y después del amamantamiento fueron de 6.26 y 27.7 ng/ml respectivamente. Con respecto a esto, Schiavo et al (56) mencionan que el contenido de progesterona tiende a seguir el contenido de grasa. Así, la concentración de progesterona es más bajo en la primera leche y más alta en la última leche obtenidas durante la secuencia usual del ordeño debido a que la concentración de la grasa también va aumentando durante el ordeño. Por esta misma razón, la leche entera tiene más progesterona que la leche descremada (desgrasada). Es así que se recomienda obtener la muestra siempre en el mismo momento en relación a la ordeña (24). Para evitar la variación debido a diferencia en la concentración de grasa se ha recomendado utilizar leche descremada (38).

Dobson et al (19), midieron, por radioinmunoensayo, las concentraciones de progesterona en leche entera y en plasma a través del ciclo estral de 4 vacas, encontrando que el patrón de progesterona fue similar en ambos fluidos,

con valores altos de 7.5 ng/ml y 10 ng/ml para plasma y leche durante la fase lútea. En ese mismo experimento, ellos observaron que el almacenaje inicial de muestras de leche a -15°C no fue ventajoso debido a que al descongelado los sólidos de la leche se precipitaron y el análisis del sobrenadante dió resultados erráticos. Para evitar la congelación probaron el almacenaje a 4°C utilizando dicromato de potasio y cloruro de mercurio como preservativos. Esto facilitó el almacenamiento de las muestras y mejoró los resultados, sin embargo, la presencia de los preservativos causó cierta interferencia con el ensayo. Bishop et al (12), encontraron resultados similares, ellos tomaron muestras de leche representativa de los 4 cuartos de la glándula mamaria. Cada muestra la dividieron en tres porciones. La primera porción de cada muestra se analizó inmediatamente para determinar progesterona. La segunda porción fue almacenada a -20°C antes de ser analizada. La tercera fue preservada con formalina y mantenida a temperatura ambiente hasta ser analizada. Ellos encontraron que las muestras almacenadas a -20°C daban resultados muy variables, mientras que la formalina permitía una conservación satisfactoria sin necesidad de congelar las muestras. En una segunda fase del experimento conservaron leche utilizando dicromato de potasio/cloruro de mercurio, obteniendo una conservación adecuada por lo que concluyeron que este último era el método ideal para implementarse comercialmente debido a la disponibilidad del preservativo

en forma de tableta. Bajo condiciones ideales las muestras preservadas pueden ser mantenidas hasta un mes sin alteración significativa en las concentraciones de progesterona. Otros autores también han mantenido la leche en refrigeración por varias semanas tras agregarles dicromato de potasio (24,), y por más de un año en congelación después de agregarle este preservativo (24).

Entre los preservativos que más se han utilizado para conservar las muestras de leche destinadas a la medición de progesterona se encuentran el Dicromato de Potasio (13,19, 24,55), el cual es fácil de usar debido a que existen tabletas comerciales para agregar a la leche (13,24,28) también se ha usado la Azida de Sodio (26). Sin embargo, estos conservadores tienen desventajas ya que ambos son considerados como carcinogénicos (63). Por esta razón es importante estudiar el uso de conservadores más inocuos, como el Timerosal y la Formalina. Con respecto a esto, Arora et al (8), en un estudio realizado en búfalos para el diagnóstico de gestación mediante la determinación de progesterona en leche, usaron formalina al 0.01% como preservativo, mantuvieron la leche a 4°C hasta su análisis, el cual se realizó dentro de los dos meses de colección.

Como se desprende de la revisión anterior, también en el caso de la determinación de progesterona en muestras de leche se pueden alterar los resultados por diversos

factores, entre los que se encuentran la temperatura de conservación de las muestras, así como el preservativo utilizado (19). Por ésta razón en el segundo estudio de este trabajo se evaluó el uso de diferentes conservadores para muestras de leche destinadas a la determinación de progesterona.

III EXPERIMENTO I

EFFECTO DEL TIEMPO Y TEMPERATURA DE CONSERVACION PREVIAS A LA CENTRIFUGACION DE MUESTRAS DE SANGRE DE GANADO BOS INDICUS SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA MEDIBLES EN SUERO O EN PLASMA OBTENIDO CON DIFERENTES ANTICOAGULANTES.

3.1. INTRODUCCION.

La medición de los niveles circulantes de hormonas reproductivas es una útil herramienta para estudiar el estado reproductivo y diagnosticar los problemas de fertilidad en los animales domésticos (23). Sin embargo, los niveles medibles de hormonas pueden verse afectados por el manejo de la muestra de sangre (53, 67), aún más que la precisión y exactitud del radioinmunoensayo utilizado (67).

En ganado Bos taurus, existen varios estudios que demuestran que los niveles de progesterona detectables en plasma decrecen en forma proporcional al tiempo que existe entre la obtención de la muestra de sangre y la separación del plasma o suero. La magnitud de este efecto es directamente proporcional a la temperatura a la que se mantenga la sangre antes de centrifugarla (15,45,47,53,67, 68,73), y que se ve influenciado por el anticoagulante que se use (31,46,68).

Existen antecedentes que demuestran que el metabolismo de progesterona en muestras de sangre de diversas especies es diferente al que ocurre en muestras de ganado Bos taurus (23,42,45,73), por lo que la información obtenida en este tipo de ganado podría no ser válida para el ganado Bos indicus, ya que se trata de una especie distinta en la que el metabolismo de progesterona en la sangre podría ser diferente.

En la literatura no existe información sobre el metabolismo de progesterona en muestras de ganado Bos indicus, por lo que este experimento evalúa los efectos del tiempo y temperatura de incubación de la sangre, así como del anticoagulante utilizado, sobre los niveles de progesterona detectados en plasma y suero de ganado Cebú.

3.2.OBJETIVOS.

Los objetivos del presente estudio fueron:

3.2.1. Determinar si las concentraciones de progesterona medibles en suero de ganado Bos indicus se modifican entre el momento en que se obtiene la sangre y el momento en que se separa el suero del coágulo.

3.2.2. Determinar si las concentraciones de progesterona medibles en plasma de ganado Bos indicus, obtenido por el uso de heparina o fluroruo de sodio como anticoagulantes, se modifican entre el momento en que se obtiene la sangre y el momento en que se centrifuga para separar el plasma.

3.2.3. Determinar los efectos del anticoagulante, temperatura y tiempo de incubación de la muestra de sangre entre su obtención y su centrifugación sobre las concentraciones de progesterona medibles en el suero o plasma.

3.3. MATERIAL Y METODOS.

3.3.1. Animales experimentales.

El estudio se realizó en el rancho "La Soledad", ubicado en el municipio de Martínez de la Torre, Veracruz. Se utilizaron 5 vacas gestantes y 5 vacas en diestro de la raza Gyr.

3.3.2. Toma de muestras sanguíneas.

A cada vaca se le extrajeron 160 ml de sangre en un matraz sin anticoagulante, 160 ml en otro matraz conteniendo 16 mg de heparina (dosis de 0.1 mg/ml) y 160 ml en otro matraz conteniendo 1.6 g de fluoruro de sodio (dosis de 10 mg/ml) (11).

La sangre de cada matraz se dividió en 46 alícuotas, una de las cuales se centrifugó inmediatamente para separar el plasma o suero. Las alícuotas restantes de cada vaca se dividieron en tres grupos: 15 se mantuvieron en refrigeración a 4°C, 15 a temperatura ambiente (17°C), y las últimas 15 permanecieron a 38°C en un horno de incubación. Para cada vaca se centrifugó una alícuota de cada combinación anticoagulante-temperatura de incubación cada media hora hasta completar 6 horas, y luego a las 8, 12 y 24 horas de haber obtenido la muestra de sangre. En cada caso se separó el plasma o suero inmediatamente después de la centrifugación y se mantuvo congelado a -20°C hasta que

se procesó por duplicado mediante Radioinmunoanálisis en el Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. En la Figura 3.1 se esquematiza el diseño experimental seguido para cada muestra.

3.3.3. Determinación de progesterona.

Las concentraciones de progesterona en suero y plasma sanguíneo se determinaron por duplicado utilizando el método de radioinmunoanálisis en fase sólida descrito por Srikandakumar et al (59). La sensibilidad del método es de 0.1 ng/ml. Los coeficientes de variación interensayo fue de 16.23% y 7.6% para controles de calidad con 1.49 y 4.8 ng/ml de progesterona. Los coeficientes de variación intraensayo fue de 7.59% y 8.21% para controles de calidad de 1.49 y 4.8 ng/ml de progesterona. Todas las alícuotas pertenecientes a una vaca corrieron en el mismo análisis.

3.3.4. Análisis estadístico.

Se analizaron los efectos del tiempo de incubación, temperatura de incubación y anticoagulante mediante análisis de varianza de tres factores en un diseño de bloques al azar utilizando como bloques a las vacas:

$$Y_{ijklm} = \mu + T_i + C_j + A_k + V_l + TC_{ij} + TA_{ik} + CA_{jk} + TCA_{ijk} + E_{ijklm}.$$

donde:

Y_{ijkl} = concentración de progesterona de la l-ésima vaca al i-ésimo tiempo y la j-ésima temperatura de incubación utilizando el k-ésimo anticoagulante.

μ = Media general.

T_i = Efecto del i-ésimo tiempo de incubación.

C_j = Efecto de la j-ésima temperatura de incubación.

A_k = Efecto del k-ésimo anticoagulante.

V_l = Efecto del l-ésimo bloque (vaca).

TC_{ij} = Interacción del i-ésimo tiempo con la j-ésima temperatura de incubación.

TA_{ik} = Interacción del i-ésimo tiempo de incubación con el k-ésimo anticoagulante.

CA_{jk} = Interacción de la j-ésima temperatura de incubación con el k-ésimo anticoagulante.

TCA_{ijk} = Interacción del i-ésimo tiempo, j-ésimo temperatura y k-ésimo anticoagulante.

E_{ijklm} = Error residual.

Se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni (42a) para determinar para cada anticoagulante y temperatura en que momento se produjo por primera vez una reducción significativa en la concentración de progesterona con respecto a la muestra centrifugada inmediatamente después de obtener la sangre.

Además, para cada anticoagulante se realizó un análisis de regresión múltiple para explicar la concentración de progesterona medida en una determinada alícuota con base en la concentración inicial de progesterona presente en la muestra y al tiempo y temperatura de incubación de la alícuota antes de su centrifugación. Para esto se diseñó el siguiente modelo de regresión múltiple, el cual se aplicó por separado para las muestras de suero, para las muestras tratadas con heparina y para las muestras tratadas con fluoruro de sodio.

$$Y_i = B_0 + B_1 T_{i1} + B_2 T_{i2} + B_3 C_{i3} + B_4 C_{i4} + B_5 V_{i5} + B_6 V_{i6} + B_7 T_{i7} C_{i7} + B_8 V_{i8} T_{i8} + B_9 V_{i9} C_{i9} + B_{10} V_{i10} T_{i10} C_{i10} + E_i$$

donde:

Y_i = Concentración de progesterona en la i -ésima alícuota, expresada en ng/ml.

B_0 , es una constante.

B_1 , es un coeficiente para los efectos del tiempo.

B_2 , es un coeficiente para los efectos cuadráticos del tiempo.

B_3 , es un coeficiente para el efecto de la temperatura.

B_4 , es un coeficiente para los efectos cuadráticos de la temperatura.

B_5 , es un coeficiente para el efecto de la concentración inicial de progesterona en la muestra.

B_6 , es un coeficiente para el efecto cuadrático de la concentración inicial en la muestra.

B_7 , es un coeficiente para el efecto de la interacción tiempo por temperatura.

B_8 , es un coeficiente para el efecto de la interacción del valor inicial con el tiempo de incubación.

B_9 , es un coeficiente para los efectos de la interacción del valor inicial con la temperatura.

B_{10} , es un coeficientes para los efectos de la interacción del valor inicial con el tiempo y temperatura de incubación.

T_{i1} =Tiempo de incubación de la i -ésima alícuota (horas)

TT_{i2} =Tiempo de incubación de la i -ésima alícuota elevado al cuadrado.

C_{i3} =Temperatura de incubación de la i -ésima alícuota (grados centígrados).

CC_{i4} =Temperatura de incubación de la i -ésima alícuota elevado al cuadrado.

V_{i5} =Concentración inicial de progesterona en la i -ésima alícuota (ng/ml) (inferida a partir de la concentración determinada en la alícuota que se centrifugó en el tiempo cero).

VV_{i6} =Concentración inicial de progesterona de la i -ésima alícuota elevado al cuadrado.

$T_i C_{i7}$ =Multiplicación del tiempo por la temperatura de incubación.

$V_i T_{i8}$ =Multiplicación de la concentración inicial por el tiempo de incubación.

$V_i C_{i9}$ = Multiplicación del valor inicial por la temperatura de incubación.

$V_i T_i C_{i10}$ = Multiplicación del valor inicial por el tiempo y por la temperatura de incubación

En cada caso se utilizó el método de regresión múltiple escalonada para decidir cuales de los parámetros del modelo general se incluirían en la ecuación final (42a). Se utilizó el paquete estadístico "Statistical Package for Social Sciences" (SPSS).

3.4. RESULTADOS.

En una de las vacas utilizadas los niveles de progesterona en la muestra centrifugada inicialmente fueron menores a 1 ng/ml, por lo que se consideró que no tenía un cuerpo lúteo funcional y fue eliminada del estudio.

3.4.1. Diferencia entre los anticoagulantes.

En el cuadro 3.1 se observa que con excepción de la interacción triple (tiempo * temperatura * anticoagulante) todos los efectos incluidos en el modelo fueron altamente significativos ($P < 0.0001$), indicando que los efectos del tiempo de incubación son diferentes para cada temperatura y para cada anticoagulante. El efecto significativo de la variable de bloque indica diferencias significativas entre vacas. Esto se debe a que las concentraciones iniciales de progesterona en suero variaron entre 6.6 ng/ml y 10.6 ng/ml en las diferentes vacas; en el plasma obtenido con heparina los niveles iniciales variaron entre 6.3 ng/ml y 10.4 ng/ml, y en el plasma obtenido con fluoruro de sodio variaron entre 5.6 ng/ml y 9.3 ng/ml. La concentración promedio inicial de progesterona en las muestras de suero fue de 8.3 ± 1.1 ng/ml, ($\bar{x} \pm d.e.$), mientras que el valor inicial promedio en plasma obtenido con heparina fue de 7.8 ± 1.4 ng/ml y en el plasma obtenido con fluoruro de sodio fue de 6.7 ± 1.4 ng/ml. La prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples indicó que este último valor fue menor al encontrado en

CUADRO 3.1. ANALISIS DE VARIANZA DE LOS EFECTOS DEL TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACION Y DEL ANTICOAGULANTE USADO SOBRE LOS NIVELES DE PROGESTERONA EN PLASMA O SUERO.

VARIABLE	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
Ti	15	774.0	51.6	60.7	0.0001
T	2	333.5	166.7	196.2	0.0001
A	2	186.5	93.2	109.2	0.0001
V	8	1745.0	218.1	256.7	0.0001
Ti * T	30	131.0	4.3	5.1	0.0001
Ti * A	30	161.2	5.3	6.3	0.0001
T * A	4	63.5	15.8	18.6	0.0001
Ti * T * A	60	42.7	0.7	0.8	0.8062
ERROR	1144	972.0	0.8		
TOTAL	1295	4409.8			

Ti=Tiempo, T=Temperatura, A=Anticoagulante
V=Vaca (variable de bloqueo)

suero ($P < 0.05$). A continuación se describen por separado los hallazgos obtenidos en suero y en plasma manejados con cada uno de los anticoagulantes.

3.4.2. Muestras manejadas sin anticoagulante.

En el cuadro 3.2 se muestran las concentraciones promedio de progesterona en suero obtenido a partir de sangre incubada a las tres diferentes temperaturas. Las concentraciones de progesterona disminuyeron conforme transcurrió el tiempo a cualquier temperatura de incubación de la sangre. Sin embargo, la velocidad de disminución dependió de la temperatura de incubación; en la sangre incubada a 38°C , la concentración de progesterona se redujo significativamente ($P < 0.05$) después de un periodo de incubación de 2 horas, mientras que fueron requeridas 3 horas a 17°C ó 5 horas a 4°C para que la concentración de progesterona se redujera ($p < 0.05$) con respecto a la concentración original (cuadro 3.2). Al hacer las comparaciones entre las diferentes temperaturas se observó que cuando la sangre se incubó por más de 3.0 horas antes de centrifugarla, las concentraciones de progesterona fueron mayores en las muestras refrigeradas que a 38°C ($P < 0.05$). La concentración de progesterona en muestras incubadas a 17°C comenzaron a ser menores que en las muestras refrigeradas después de incubarlas por 5.5 horas ($P < 0.05$). No se encontraron diferencias entre muestras.

CUADRO 3.2. CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA EN MUESTRAS INCUBADAS SIN ANTICOAGULANTE A DIFERENTES TEMPERATURAS.

TIEMPO (HRS)	TEMPERATURA DE INCUBACION					
	HORNO (38°C)		AMBIENTE (17°C)		REFRIGERACION (4°C)	
	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.
0.0	8.3	± 1.1	8.3	± 1.1	8.3	± 1.1
0.5	7.4	± 1.1	7.6	± 1.5	7.8	± 1.2
1.0	6.9	± 1.4	7.1	± 1.2	7.6	± 1.3
1.5	7.0	± 1.7	6.7	± 1.1	7.7	± 1.6
2.0	* 6.5	± 1.2	7.0	± 1.3	7.0	± 1.4
2.5	* 6.4	± 1.7	7.2	± 1.2	6.9	± 1.6
3.0	* 5.9	± 1.6	*6.6	± 1.7	7.0	± 1.4
3.5	a* 5.7	± 1.7	ab*6.0	± 1.6	b 7.2	± 1.2
4.0	a* 5.7	± 1.7	ab*5.8	± 1.5	b 7.5	± 1.4
4.5	a* 5.1	± 1.8	ab*5.5	± 1.4	b 6.9	± 1.1
5.0	* 5.6	± 2.0	*5.9	± 1.4	*6.7	± 1.5
5.5	a* 5.5	± 1.9	a*5.4	± 1.3	b 6.9	± 1.1
6.0	a* 5.0	± 1.9	a*5.3	± 1.6	b 7.0	± 1.4
8.0	a* 4.7	± 1.9	a*4.9	± 1.8	b*6.7	± 1.4
12.0	a* 4.2	± 2.0	a*4.3	± 1.4	b*6.5	± 1.6
24.0	a* 4.1	± 2.0	a*3.4	± 1.6	b*5.8	± 1.5

* La concentración de progesterona en estas muestras es significativamente menor a la concentración inicial ($P < 0.05$).

a,b, para un determinado tiempo de incubación (hilera), las concentraciones de progesterona que no comparten literal son diferentes entre sí. En las hileras sin literal no existen diferencias entre las 3 temperaturas. En las hileras que no hay literales no existieron diferencias entre las temperaturas.

de sangre incubadas a 38°C y las incubadas por el mismo tiempo a 17°C (cuadro 2).

Al realizar la regresión lineal múltiple para describir el comportamiento de diferentes concentraciones iniciales de progesterona a través del tiempo en muestras de suero incubadas en tres, las variables dependientes que tuvieron efecto significativo fueron la temperatura y su efecto cuadrático, el tiempo y su efecto cuadrático, el valor inicial de progesterona en la muestra y la interacción tiempo por temperatura; la ecuación resultante fue:

$$Y = 0.75 - 0.11 C + 0.002 CC - 0.35 T + 0.01 TT + 0.96 V - 0.001 TC$$

El coeficiente de correlación múltiple de esta ecuación es de 0.79 ($P < 0.01$) y el de determinación es de 0.63; lo que indica que la ecuación explica en un 63% los niveles de progesterona medidos en el suero después de incubarse por "T" horas a "C" grados centígrados una muestra con una concentración inicial de progesterona de "V" ng/ml.

En la figura 3.2 se muestran representaciones gráficas de la ecuación, en la que se observa el comportamiento que tendría, a lo largo del tiempo, la concentración promedio de progesterona en muestras de suero con diferentes concentraciones iniciales de la hormona que se incubaron a 4°C (A), 17°C (B) y 38°C (C). Como puede observarse

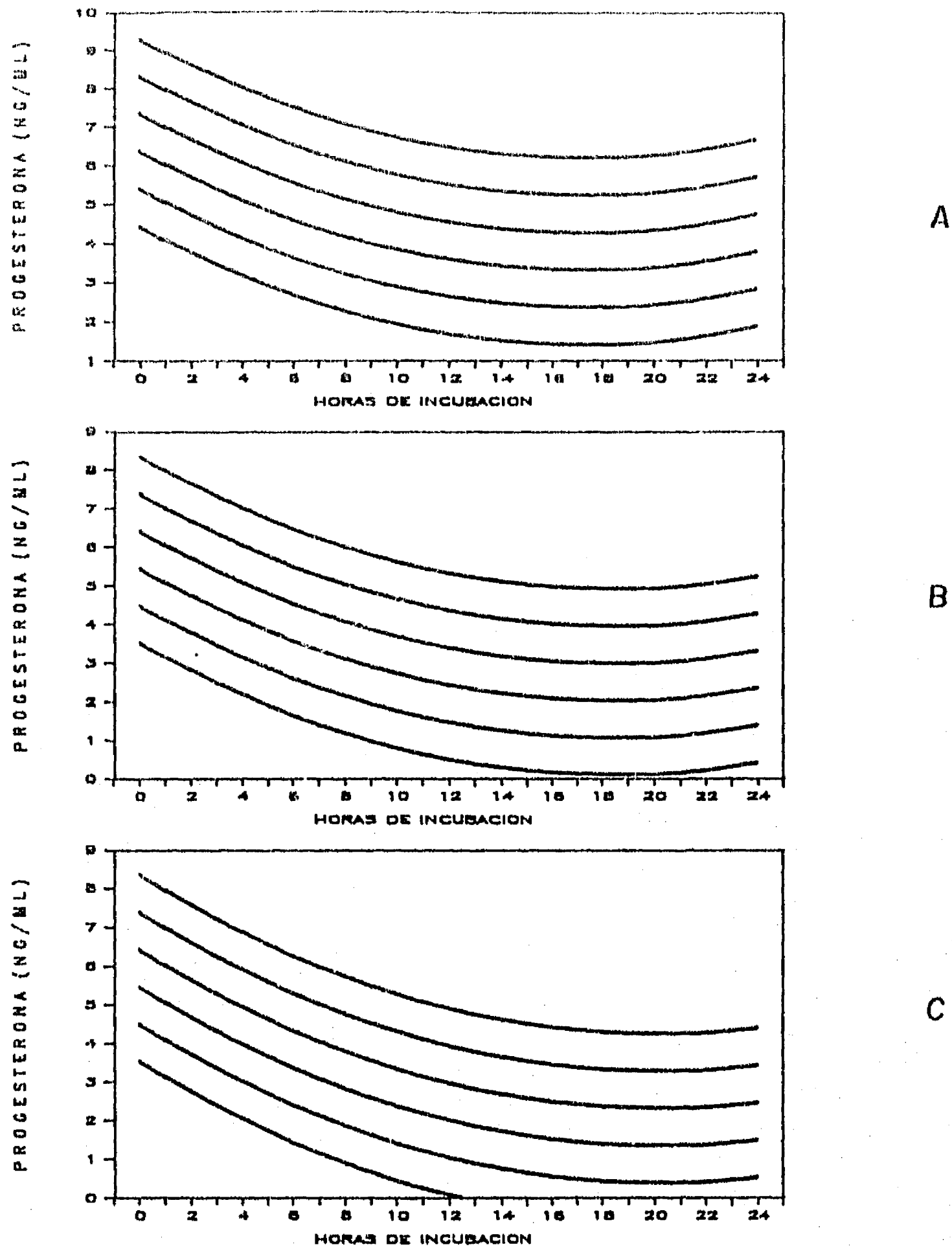


Figura 3.2. Degradación de la progesterona en muestras de sangre con diferentes concentraciones iniciales de la hormona e incubadas sin anticoagulante a 4°C (A), 17°C (B) y 38°C (C).

se produce una disminución marcada en las cantidades de progesterona detectables en plasma conforme aumenta el tiempo de incubación de la sangre antes de su centrifugación. Sin embargo, la caída al incubar a 17°C ó 38°C es mucho más drástica que al incubar a 4°C. También se observa que el ritmo de descenso en las concentraciones de progesterona se reduce conforme pasa el tiempo, tendiendo los niveles a estabilizarse después de una incubación de 12 horas.

El coeficiente de regresión de 0.96 para el efecto del valor inicial, y la falta de interacción de este efecto con el efecto del tiempo indican que la diferencia absoluta en los niveles de progesterona entre una vaca y otra se mantendrá casi constante a lo largo del tiempo a pesar de la reducción en los niveles de progesterona en ambas muestras.

3.4.3. Muestras manejadas con Heparina.

Las concentraciones promedio de progesterona en plasma obtenido a partir de muestras de sangre heparinizadas e incubadas a las tres temperaturas se muestran en el cuadro 3.3 Al igual que en el suero, las concentraciones promedio de progesterona, disminuyeron conforme aumentó el tiempo de incubación previo a la centrifugación, siendo el efecto más marcado cuando aumenta la temperatura de incubación. Así, a 38°C solo se requirió 1 hora para que la concentración de progesterona se redujera ($p < 0.05$) con respecto a la

concentración inicial. Esto requirió de 2 horas de incubación a 17°C, mientras que a 4°C se requirieron 3.5 horas (cuadro 3.3). A partir de las 3.5 horas de incubación, las concentraciones de progesterona en plasma obtenido de muestras incubadas a 38°C fueron menores que en las muestras refrigeradas ($P < 0.05$). La diferencia también existió entre muestras mantenidas a 17°C y las muestras refrigeradas, sólo que en este caso, se manifestó a partir de las 5 horas de incubación ($P < 0.05$). Nunca hubo diferencias ($P > 0.05$) entre muestras incubadas a 38°C y las incubadas a 17°C a lo largo de las 24 horas. A cualquier temperatura, los tiempos requeridos para una disminución, fueron menores que en el caso del suero (cuadro 3.2).

Al realizarse el análisis de regresión "paso a paso" las variables incluidas en la ecuación final fueron los valores lineales y cuadráticos del tiempo de incubación, el valor cuadrático de la temperatura de incubación, el valor inicial de progesterona y las interacciones entre valor inicial y tiempo y entre tiempo y temperatura, quedando la ecuación:

$$Y = 1.32 - 0.41 T + 0.01 TT + 0.001 CC + 0.93 V - 0.001 TC - 0.01 VT.$$

CUADRO 3.3 CONCENTRACIONES PROMEDIO DE PROGESTERONA EN MUESTRAS INCUBADAS CON HEPARINA A DIFERENTES TEMPERATURAS.

TIEMPO (HRS)	TEMPERATURA DE INCUBACION					
	HORNO (38°C)		AMBIENTE (17°C)		REFRIGERACION (4°C)	
	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.
0.0	7.8	± 1.4	7.8	± 1.4	7.8	± 1.4
0.5	6.4	± 1.3	7.4	± 1.6	7.4	± 1.4
1.0	*6.0	± 0.9	6.8	± 1.3	7.2	± 1.5
1.5	*6.0	± 1.2	6.4	± 1.5	7.2	± 1.2
2.0	*5.8	± 1.3	*6.3	± 1.2	7.0	± 1.4
2.5	*5.6	± 1.8	*5.7	± 1.7	6.7	± 1.9
3.0	*5.1	± 1.5	*6.1	± 2.1	6.4	± 1.7
3.5	a*4.7	± 1.3	ab*5.8	± 1.6	b 6.6	± 1.5
4.0	a*4.5	± 1.6	ab*5.7	± 1.6	b 6.6	± 1.8
4.5	a*4.3	± 1.7	ab*5.3	± 1.6	b 6.6	± 1.8
5.0	a*4.0	± 1.7	a*5.1	± 1.5	b 6.6	± 1.6
5.5	a*3.8	± 1.6	a*5.0	± 1.8	b 6.6	± 1.7
6.0	a*3.7	± 1.7	a*5.0	± 2.2	a*6.3	± 1.2
8.0	a*3.0	± 1.7	a*4.3	± 2.1	b*6.0	± 1.3
12.0	a*2.7	± 2.0	a*3.4	± 2.0	b*5.9	± 1.3
24.0	a*3.3	± 2.3	a*2.3	± 1.6	b*5.3	± 1.7

* La concentración de progesterona en estas muestras es significativamente menor a la concentración inicial al tiempo 0 ($P < 0.05$)

a, b, Para un determinado tiempo de incubación (hilera), las concentraciones que no compartan literal son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). En las hileras sin literal no existen diferencias entre las temperaturas.

Los coeficientes de correlación y determinación múltiple (0.77 y 0.59) ($P < 0.01$) respectivamente indicando que la ecuación explica en un 59% los niveles de progesterona medidos en el plasma heparinizado después de incubar por "T" horas a "C" grados centígrados en una muestra con una concentración inicial de progesterona de "V" ng/ml.

En la figura 3.3 se muestran las representaciones gráficas de esta ecuación a 4°C, 17°C y 38°C. Se puede observar que las concentraciones de progesterona en plasma heparinizado también disminuyen conforme pasa el tiempo, siendo otra vez el efecto menos marcado a temperatura de refrigeración. Se observa también, que al usar heparina las concentraciones tienden a estabilizarse después de 12 horas de incubación. Asimismo, las curvas ajustadas a la ecuación de regresión para vacas con diferentes niveles de progesterona iniciales de progesterona, tienden a ser paralelas.

3.4.4. Muestras manejadas con fluoruro de sodio.

En el cuadro 3.4 se muestran las concentraciones de progesterona a lo largo del tiempo en muestras de plasma obtenido después de incubar la sangre a diferentes temperaturas con fluoruro de sodio. Se puede observar que,

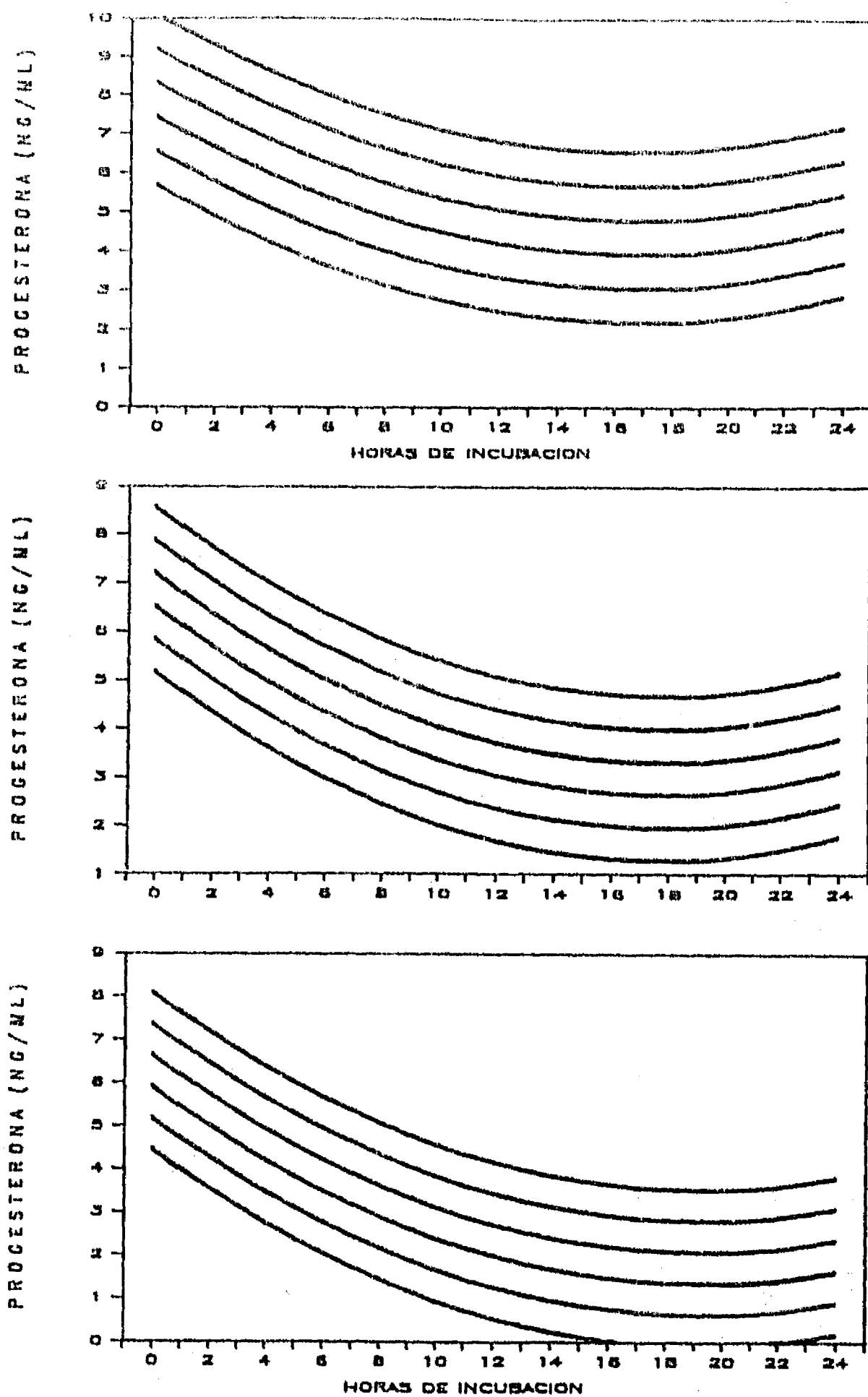


Figura 3.3. Degradación de la progesterona en muestras de sangre con diferentes concentraciones iniciales de la hormona e incubadas con heparina a 4°C (A), 17°C (B) y 38°C (C).

en contraste con lo que ocurrió con suero o sangre heparinizada, las concentraciones de progesterona casi no se modifican a lo largo del tiempo. Solo en el caso de la incubación a 17°C, se observó una diferencia en las concentraciones de progesterona encontradas después de incubar durante 24 horas. A las restantes temperaturas de incubación, las concentraciones de progesterona no fueron diferentes con respecto a la concentración inicial.

Las variables incluidas en el modelo final de regresión fueron el tiempo de incubación y su efecto cuadrático, la temperatura y su efecto cuadrático y el valor inicial de progesterona, quedando la ecuación:

$$Y=2.56- 0.09 T + 0.001 TT- 0.07 C + 0.001 CC + 0.74V.$$

El coeficiente de correlación y determinación múltiple de esta ecuación es de 0.78 y 0.62 respectivamente ($P<0.01$), indicando que los niveles de progesterona medidos en el plasma con fluoruro de sodio después de incubar por "T" horas a "C" grados centígrados una muestra con una concentración inicial de progesterona de "V" ng/ml se explica en un 62% por la ecuación.

CUADRO 3.4. CONCENTRACIONES PROMEDIO DE PROGESTERONA EN MUESTRAS INCUBADAS CON FLUORURO DE SODIO A DIFERENTES TEMPERATURAS.

TIEMPO (HRS)	TEMPERATURA DE INCUBACION					
	HORNO (38°C)		AMBIENTE (17°C)		REFRIGERACION (4°C)	
	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.
0.0	6.7	± 1.4	6.7	± 1.4	6.7	± 1.4
0.5	7.2	± 1.3	7.2	± 1.3	7.1	± 1.1
1.0	7.0	± 1.1	6.8	± 1.2	7.0	± 1.1
1.5	6.8	± 1.4	6.5	± 0.9	7.3	± 1.4
2.0	6.6	± 1.1	6.4	± 1.4	7.3	± 1.4
2.5	6.3	± 0.8	6.6	± 0.9	6.8	± 1.1
3.0	6.3	± 1.4	6.6	± 1.2	6.8	± 1.3
3.5	6.1	± 0.9	6.6	± 1.1	6.8	± 1.3
4.0	6.4	± 1.6	6.5	± 1.1	7.0	± 0.7
4.5	6.4	± 1.1	6.6	± 1.4	7.1	± 1.1
5.0	6.2	± 1.5	6.0	± 1.3	7.1	± 1.4
5.5	5.9	± 1.2	6.5	± 1.4	6.8	± 1.1
6.0	5.8	± 1.4	5.7	± 1.4	7.1	± 1.2
8.0	6.1	± 1.6	6.3	± 1.7	6.8	± 1.1
12.0	6.2	± 1.7	5.7	± 1.6	6.6	± 1.2
24.0	ab	5.9 ± 1.6	a*	4.5 ± 1.4	b	6.5 ± 1.6

* La concentración de progesterona en esta muestra es diferente a la concentración inicial tiempo 0 ($P < 0.05$) a, b, Para un determinado tiempo de incubación, las concentraciones que no comparten literal son significativamente diferentes entre sí. ($P < 0.05$). En las hileras sin literal no existen diferencias entre las temperaturas.

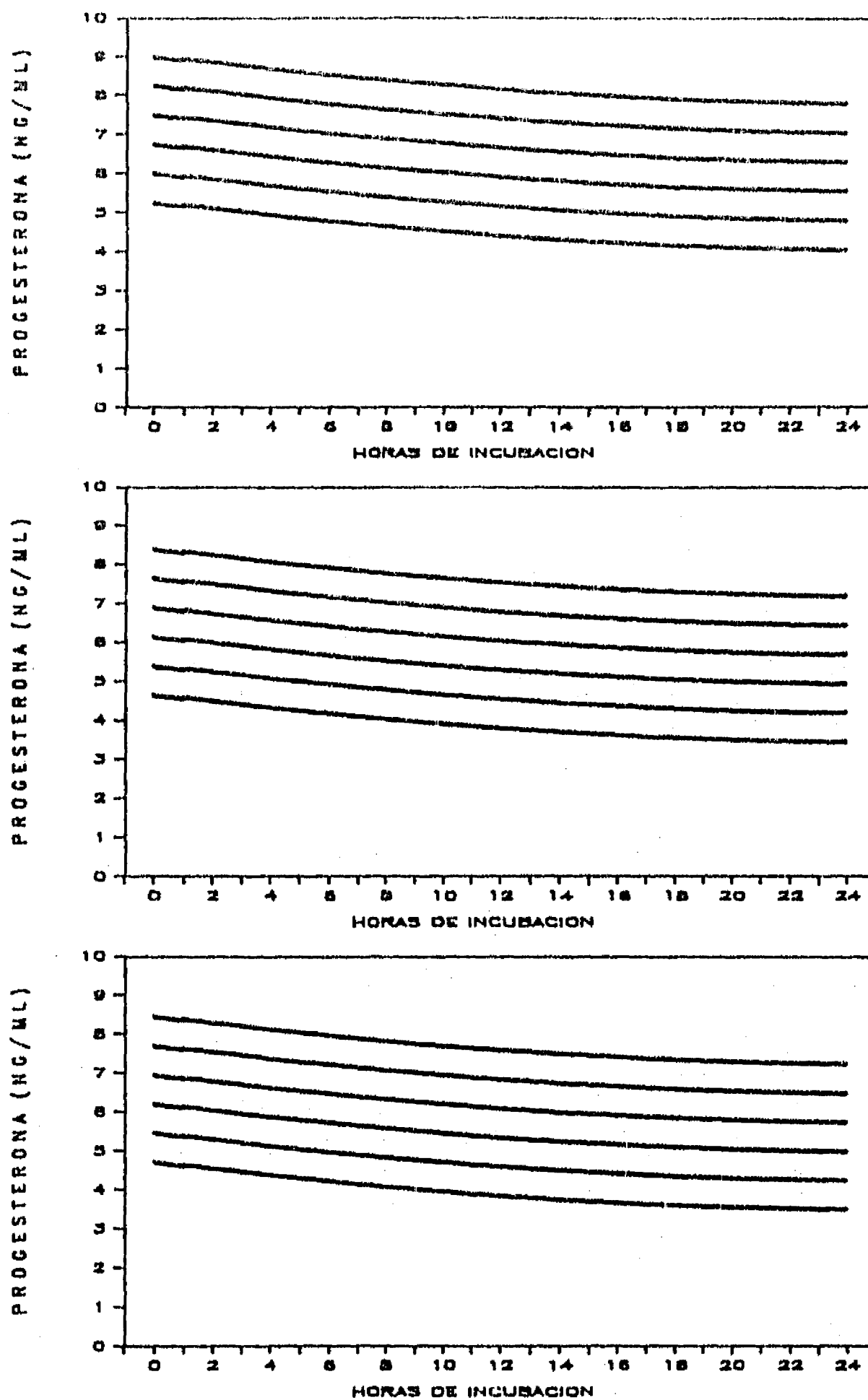


Figura 3.4. Degradación de la progesterona en muestras de sangre con diferentes concentraciones iniciales de la hormona e incubadas con fluoruro de sodio a 4°C (A), 17°C (B) y 38°C (C).

Al representar esta ecuación en la figura 3.4 se observa que el descenso en las concentraciones de progesterona es mínimo a cualquier temperatura de incubación.

3.5. DISCUSION.

Al estimar las concentraciones de una hormona en muestras biológicas, quienes realizan investigación en reproducción, generalmente justifican la capacidad del método de radioinmunoanálisis utilizado en términos de su especificidad, precisión, exactitud y sensibilidad. Sin embargo, un factor igualmente importante al determinar la confiabilidad de tales estimaciones es la calidad de la muestra en la cual la hormona es medida (23,53). Algunas investigaciones indican que las hormonas de tipo glicoprotéico como la Hormona luteinizante (LH) y Hormona folículo estimulante (FSH) son muy estables (47,53), mientras que otras hormonas no lo son tanto, como es el caso de la progesterona.

Los resultados de este experimento indican que las concentraciones de progesterona en sangre de ganado Bos indicus se comportan en forma similar a lo informado en ganado Bos taurus por Short (57), Vahdat et al (67,68,69), Holdsworth (31), Owens et al (47), Reimers

et al (53) y Oltner y Edqvist (46). Las concentraciones de progesterona en suero o en plasma obtenido mediante el uso de heparina disminuyen conforme aumenta el intervalo entre la obtención de la muestra de sangre y su centrifugación, siendo el efecto directamente proporcional a la temperatura de incubación.

En el presente trabajo se encontró que los niveles iniciales promedio de progesterona, en muestras de sangre de ganado Bos indicus con un cuerpo lúteo funcional variaron de entre 6.7 y 8.3 ng/ml, en los anticoagulantes utilizados. Esto demuestra que las concentraciones sanguíneas reales de progesterona durante el diestro o gestación del ganado Bos indicus son similares a las que se han encontrado en ganado Bos taurus (60), en el que Vahdat et al (67) encontró, en plasma, niveles iniciales de 6.6 ng/ml en un trabajo y de 5.7 ng/ml en otro trabajo (68) utilizando EDTA como anticoagulante, y de 6.1 ng/ml al usar heparina (68). Esto sugiere que los resultados de autores que han informado de concentraciones bajas de progesterona en ganado Cebú (5,6,41,48,54,65), pueden deberse a la degradación de la progesterona entre el momento de la obtención de la muestra y la obtención del plasma o suero. Esto es probable si se toma en cuenta que la mayor parte de los trabajos de investigación en ganado Bos taurus se realiza en países desarrollados, donde la infraestructura experimental facilita la refrigeración de las muestras y su

centrifugación inmediata, mientras que la mayor parte de la investigación en ganado Bos indicus se ha realizado en países en desarrollo donde es poco probable que el manejo de las muestras haya sido el óptimo. Como una prueba de lo anterior, en un experimento realizado en nuestro laboratorio en ganado Holstein*, utilizando el mismo Radioinmunoanálisis usado en el presente trabajo, se encontró que durante el diestro la concentración promedio de progesterona en plasma obtenido mediante centrifugación inmediata de las muestras fue de 5.4 ng/ml, que es incluso menor a la concentración inicial promedio encontrado en este trabajo en ganado Cebú.

La degradación de la progesterona en muestras sanguíneas resulta en un problema especialmente serio si se toma en cuenta que, para un determinado anticoagulante y temperatura de incubación, la cantidad de progesterona degradada en un cierto intervalo de tiempo es independiente de la concentración inicial de progesterona en la muestra (curvas paralelas en las figuras 3.2, 3.3 y 3.4). Esto resultará en una degradación proporcionalmente mayor en muestras con valores iniciales bajos comparadas con aquellas con valores altos. Así, en una muestra con 8 ng/ml en la cual se destruyen 2 ng/ml se habrá reducido la concentración de progesterona en un 25%, mientras que en una muestra con concentraciones iniciales de 3 ng/ml, al ser incubadas a la misma temperatura y por el mismo tiempo también se

* Guzman, R. Estudio de las dosis reducidas de PGF2 alfa. Tesis de Maestría. FMVZ de la UNAM. Datos preliminares.

destruirán 2 ng/ml de progesterona, resultando en este caso en una reducción del 66% en las concentraciones detectables en plasma. De esta manera, las concentraciones de progesterona de cada animal se alterarán de una manera diferente durante la incubación, dependiendo de su concentración inicial, lo que dificultará aún más la interpretación de resultados.

La desaparición de la progesterona se debe a la actividad de las células sanguíneas, específicamente los eritrocitos, ya que Vahdat et al (68) demostraron que la incubación del suero o plasma una vez separados del paquete celular no resultó en una baja en las concentraciones de progesterona. En contraste, la concentración de progesterona en sangre completa disminuyó casi inmediatamente después de la colección (68).

Además, Vahdat et al (69) comprobaron que la incubación a 22°C durante 8 horas de muestras de sangre hemolisada, no causó alteración en la concentración de progesterona medible, indicando que las células sanguíneas intactas son necesarias para la degradación de la progesterona.

Los resultados encontrados en suero y en plasma heparinizado en esta investigación confirman el informe de Reimers et al (53) y de Vahdat et al (67), en el sentido de que la progesterona disminuye en sangre coagulada, pero

esta degradación es más rápida en sangre con anticoagulante. Esto podría deberse a la propia formación del coágulo, ya que al agregarse los eritrocitos disminuye la superficie de intercambio entre éstos y el líquido extracelular, en el cual se encuentra la progesterona. Además, es posible que al formarse el coágulo los eritrocitos sufran transformaciones mediante las cuales pierdan la capacidad de degradar a dicha hormona.

El mecanismo por medio del cual las células sanguíneas causan la disminución en los niveles de progesterona no se conoce con precisión. Algunos investigadores apoyan la idea de que la progesterona que desaparece de la muestra se adhiere a la pared celular de los eritrocitos, donde permanece secuestrada (73). Sin embargo, Vahdat et al (69) no lograron detectar la presencia de progesterona en la superficie celular. Algunos otros descartan éste mecanismo al considerar que la unión de la progesterona con células sanguíneas no parece ser tan importante como la conversión de la progesterona en otros compuestos de menor afinidad por el anticuerpo utilizado en el radioinmunoanálisis de progesterona (45,69,71).

Tanto en el caso de sangre sin anticoagulante, como en el caso de sangre heparinizada, la velocidad de degradación de la progesterona fue mayor al incubarse a 17°C comparada con la incubación a 4°C, lo cual, como lo sugirieron Vahdat et

al (67), es compatible con la existencia de un mecanismo enzimático. Al aumentar la temperatura de 17°C a 38°C también aumenta, inicialmente, la velocidad de degradación, pero después de unas horas la degradación deja de ser más rápida a 38°C que a 17°C, lo que podría sugerir una pérdida de la viabilidad de los eritrocitos debido a la alta temperatura (67). La pérdida en la viabilidad de los eritrocitos también podría explicar la gradual reducción en el ritmo de degradación de progesterona que se produjo conforme transcurrió el tiempo a cualquier temperatura de incubación.

Se ha informado sobre la presencia de 20 alfa-dihydroxiesteroide-dehydrogenasa en sangre y eritrocitos de varios animales, incluyendo los rumiantes (71). Esta enzima cataliza la interconversión de progesterona a 20 alfa-dihidroxiprogesterona en muestras sanguíneas de borregos (71) Recientemente Choi et al (17) demostraron la conversión de progesterona en 17 α , 20 β dihidroxiprogesterona en muestras de sangre bovina. Van der Molen et al (71) informaron que la incubación de progesterona con eritrocitos de borregos en presencia de glucosa favoreció la formación de 20 α -dihidroxiprogesterona, que es un compuesto reducido, mientras que la incubación sin agregar glucosa favoreció la reacción inversa resultando en progesterona. Esto podría explicar lo ocurrido en este y otros trabajos en los que se observa una recuperación en la concentración de progesterona

pasadas 24 horas, cuando la glucosa presente en la sangre ha sido utilizada. La importancia de la disponibilidad de la glucosa y de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa para el proceso de reducción también ha sido claramente establecido para la actividad en sangre de estradiol-17 beta-deshidrogenasa y 17 beta-hydroxy-c19-esteroide deshidrogenasa (71).

En el presente trabajo se confirmó lo informado por Vahdat et al (69) en el sentido de que el uso del fluoruro de sodio como anticoagulante evitó la degradación de la progesterona, ampliándose la información ya que en el presente trabajo se midió la progesterona cada media hora, mientras que Vahdat et al (67) solamente midieron progesterona a las 0, 12 y 24 horas de incubación. La actividad preventiva del fluoruro de sodio podría deberse a que esta sustancia actúa inhibiendo el proceso de la glicólisis a través de la inhibición de la enolasa, enzima indispensable para que las células sanguíneas puedan utilizar la glucosa y por tanto generar ATP (57), por lo que bajo estas circunstancias los eritrocitos no pueden metabolizar la hormona. El conocer que los niveles de progesterona en las muestras de sangre con fluoruro de sodio se mantienen constantes a través del tiempo, resulta ventajoso para realizar investigación en ganado Cebú, permitiendo al investigador una mayor libertad en su diseño experimental y en su trabajo de campo, ya que si no es

posible mantener las muestras en condiciones óptimas de refrigeración, o bien centrifugarlas a la brevedad posible, los resultados no se afectarían en forma significativa. Esto es especialmente útil al realizar investigación en países en vías de desarrollo, en los cuales pueda ser difícil tener acceso a energía eléctrica y/o a una centrifuga cerca de la explotación donde se este obteniendo la sangre.

Sin embargo es necesario realizar más investigación respecto al uso del fluoruro de sodio como anticoagulante ya que en el presente trabajo se encontró que las concentraciones de progesterona en las muestras centrifugadas inmediatamente después de su obtención fueron menores a las encontradas en las muestras iniciales de suero o de plasma obtenido con heparina. Esto podría ser por un efecto de interferencia del fluoruro de sodio con el radioinmunoanálisis. Otra posibilidad puede estar relacionada con el hecho de que en este trabajo se observó que las muestras con fluoruro de sodio presentaban una hemólisis relativamente marcada. A este respecto, Vahdat et al (69) encontraron que al hemolizar mediante congelamiento y descongelamiento las muestras de sangre antes de su centrifugación se reducen las concentraciones de progesterona en plasma. Los investigadores arriba mencionados sugieren que este fenómeno podría deberse a que la progesterona presente en el plasma se diluye con el citoplasma de las células sanguíneas, el cual contiene

concentraciones relativamente bajas de progesterona (69). Sin embargo, en lo encontrado en este trabajo; cuando Vahdat et al (69) utilizaron el fluoruro de sodio, la concentración inicial fue igual a la concentración inicial que obtuvieron con heparina. Esto puede deberse a que Vahdat et al no utilizaron el fluoruro como anticoagulante primario, sino como adyuvante añadido al oxalato de potasio. Por esta razón la cantidad de fluoruro que usaron (0.5 mg/ml de sangre) fue mucho menor a la requerida en el presente trabajo para que el fluoruro de sodio actuara como anticoagulante primario (10 mg/ml). Esta diferencia de dosis pudo haber evitado que en el trabajo de Vahdat et al se produjera hemólisis, por lo que podría ser conveniente investigar el uso del fluoruro de sodio no como anticoagulante primario sino como adyuvante de diversos anticoagulantes.

IV EXPERIMENTO II

EFEECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA MEDIBLES EN MUESTRAS DE LECHE PRESERVADAS CON DIFERENTES CONSERVADORES.

4.1. INTRODUCCION.

La determinación de los niveles de progesterona en muestras de suero o plasma sanguíneo es una herramienta eficiente para la evaluación de la actividad reproductiva de los animales domésticos (5,20,28,37). Sin embargo, la dificultad de obtener rutinariamente muestras de sangre en el ganado bovino limita la aplicación práctica de esta técnica . Por esta razón la determinación de los niveles de progesterona en leche es una alternativa útil (9,14,16,19).

Se ha demostrado, que las concentraciones de progesterona en leche pueden ser usadas objetivamente para determinar la función reproductiva (8,24,30,34,46), así como para el diagnóstico de gestación (1,9,12,24,26,32,35,37,49,54). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han realizado en ganado Bos taurus explotados en condiciones muy diferentes a las del trópico, en donde diversos factores como la temperatura de almacenamiento de las muestras, pueden alterar las concentraciones de progesterona en leche (10). Por otra parte, entre los preservativos que más se han utilizado para conservar muestras de leche destinadas a

la determinación de progesterona se encuentran la azida de sodio (26) y el dicromato de potasio (13,19,24). Sin embargo, estos preservativos tienen la desventaja de ser potencialmente carcinogénicos (63), por lo que su utilización representa un riesgo para el personal involucrado. El objetivo del presente estudio fué determinar el efecto de la temperatura de almacenamiento (refrigeración o congelación) sobre las concentraciones de progesterona en leche descremada y preservada con diferentes conservadores, con el fin de evaluar conservadores no carcinogénicos que puedan ser utilizados con mayor confiabilidad.

4.2. MATERIAL Y METODOS.

4.2.1. Localización.

El experimento se llevó a cabo en el Centro de Investigación, Enseñanza y Extensión en Ganadería Tropical (CIEEGT), perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), ubicado en el municipio de Tlapacoyan, en el estado de Veracruz.

4.2.2. Animales experimentales.

El estudio se realizó con 20 vacas F1 (cruza de Holstein con Indobrasil), 10 de ellas gestantes y las otras 10 en diestro (día 10-14 del ciclo estral). Los animales fueron manejados de acuerdo con las prácticas convencionales

de salud, alimentación, y reproducción establecidas en el CIEEGT.

4.2.3. Toma de muestras de leche.

De cada vaca se obtuvo una muestra de 100 ml de leche en un recipiente donde una vez homogenizada se dividió en 4 fracciones de 25 ml cada una, a las que antes de separar la grasa se les añadió respectivamente Formalina al 0.1% (62), Thimerosal (0.1 mg/ ml), Azida de Sodio (1 mg/ml) o Dicromato de Potasio (1 mg/ml) (62). Cada fracción se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos para separar la grasa y obtener leche descremada. La leche descremada obtenida a partir de cada fracción se dividió a su vez en seis alícuotas de 4 ml, tres de las cuales permanecieron en refrigeración (4°C) y las otras tres se mantuvieron en congelación (-20°C) hasta ser analizadas. En cada tratamiento se determinaron los niveles de progesterona en la primera alícuota dentro de los primeros cinco días posteriores a su obtención, analizándose la segunda 15 días después y la tercera, a los 30 días de haberse obtenido la leche.

4.2.4. Determinación de progesterona.

Las concentraciones de progesterona en leche se determinaron por duplicado utilizando el método de radioinmunoanálisis en fase sólida previamente descrito por

Srikandakumar (59). La sensibilidad del método es de 0.1 ng/ml. El coeficiente de variación intraensayo fue de 17.7% y 4.6% para controles de calidad con 1.8 y 4.8 ng/ml de progesterona. El coeficiente de variación interensayo fue de 17.5% y 28.1% para controles de calidad con 1.8 y 4.8 ng/ml de progesterona respectivamente.

4.2.5. Análisis estadístico.

Se analizaron los efectos de la temperatura y tiempo de almacenaje, y preservativo utilizado sobre los niveles de progesterona detectable en leche mediante análisis de varianza, en un diseño de bloques al azar, tomando a las vacas como bloque utilizando el siguiente modelo:

$$Y_{ijkl} = M + T_i + C_j + P_k + V_l + TC_{ij} + TP_{ik} + CP_{jk} + TCP_{ijk} + E_{ijkl}$$

donde:

Y_{ijkl} = Concentración de progesterona del l-ésimo bloque (vaca) al i-ésimo tiempo y la j-ésima temperatura utilizando el k-ésimo preservativo.

M = Media general.

T_i = Efecto del i-ésimo tiempo de incubación.

C_j = Efecto de la j-ésima temperatura de incubación.

P_k = Efecto del k-ésimo preservativo.

V_l = Efecto del l-ésimo bloque (vaca).

TC_{ij} = Interacción del i-ésimo tiempo y la j-ésima temperatura de incubación.

TP_{ik} = Interacción del i -ésimo tiempo de incubación y el k -ésimo preservativo.

CP_{jk} = Interacción de la j -ésima temperatura y el k -ésimo preservativo.

TCP_{ijk} = Interacción del j -ésimo tiempo, j -ésima temperatura y k -ésimo preservativo.

E_{ijkl} = Error residual.

se realizaron comparaciones múltiples de medias mediante la prueba de Bonferroni (42a). Para cada combinación preservativo-temperatura de conservación se calculó la repetibilidad (64) de la concentración media de progesterona en los tres ensayos para evaluar la estabilidad de los resultados a lo largo del tiempo.

4.3. RESULTADOS.

4.3.1. Comparación entre los preservativos.

En el cuadro 4.1 se muestran los resultados del análisis de varianza. Todos los efectos y sus interacciones fueron altamente significativos ($P < 0.0001$). También hubo un efecto significativo de la variable de bloque ($P < 0.001$) que indica diferencias entre vacas en los niveles de progesterona. En el cuadro 4.2, se muestran las concentraciones promedio de progesterona en muestras preservadas con azida de sodio y en refrigeración o congelación durante 5, 15 ó 30 días.

CUADRO 4.1 ANALISIS DE VARIANZA DE LOS EFECTOS DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO, TEMPERATURA DE CONSERVACION Y PRESERVATIVO UTILIZADO SOBRE LOS NIVELES DE PROGESTERONA EN LECHE DESCREMADA.

VARIABLE	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
Ti	2	199.0	99.5	51.3	0.0001
T	1	257.6	257.6	132.8	0.0001
P	3	159.6	53.2	27.4	0.0001
V	18	2999.1	166.6	85.9	0.0001
Ti * T	2	62.2	31.1	16.0	0.0001
TI * P	6	116.9	19.4	10.0	0.0001
T * P	3	127.8	42.6	21.9	0.0001
Ti * T * P	6	61.5	10.2	5.2	0.0001
ERROR	414	929.4	2.2		
TOTAL					

Ti=Tiempo, T=Temperatura, P=Preservativo, V=Vaca

En los cuadros 4.3 4.4 y 4.5 se muestran los mismos datos para muestras mantenidas con dicromato de potasio, formalina o timerosal respectivamente. Las muestras conservadas con azida de sodio y mantenidas en refrigeración durante 5 días tuvieron niveles menores ($P < 0.05$) que las concentraciones obtenidas después de 5 días de refrigeración utilizando los otros tres preservativos (ver cuadros 4.2, 4.3, 4.4 Y 4.5). No hubo diferencias entre preservativos con respecto a las con-

CUADRO 4.2. CONCENTRACIONES PROMEDIO DE PROGESTERONA (NG/ML) EN MUESTRAS DE LECHE DESCREMADA MANTENIDAS CON AZIDA DE SODIO EN CONGELACION O REFRIGERACION DURANTE 5, 15 O 30 DIAS.

TIEMPO DE CONSERVACION (DIAS)	CONGELACION		REFRIGERACION	
	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.
5	a 4.4	± 2.2	a 4.3	± 1.8
15	b 6.3	± 3.7	b 6.8	± 2.8
30	a 4.1	± 3.0	a 4.6	± 4.0

Las concentraciones que no comparten literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

centraciones de progesterona en muestras conservadas en refrigeración durante 15 días ($P > 0.05$), mientras que al conservarlas en refrigeración durante 30 días se obtuvieron niveles más bajos al usar azida de sodio o formalina que al usar dicromato de potasio o timerosal ($P < 0.05$). (cuadros 4.2 a 4.5). Como se observa en el cuadro 4.6, al mantener las muestras en refrigeración, la repetibilidad más alta se obtuvo con dicromato de potasio (0.85), seguido por la formalina (0.80), timerosal (0.77) y finalmente la azida de sodio (0.69).

Cuando las muestras fueron mantenidas en congelación la única diferencia entre preservativos con respecto a los niveles de progesterona consistió en que después de 15 ó 30,

CUADRO 4.3 CONCENTRACIONES PROMEDIO DE PROGESTERONA (NG/ML) EN MUESTRAS DE LECHE DESCREMADA MANTENIDAS CON DICROMATO DE POTASIO EN CONGELACION O REFRIGERACION DURANTE 5, 15 O 30 DIAS.

TIEMPO DE CONSERVACION (DIAS)	CONGELACION		REFRIGERACION	
	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.
5	a 4.8	± 2.3	b 6.4	± 2.9
15	b 6.6	± 3.6	b 5.9	± 2.8
30	a 3.7	± 2.1	b 6.5	± 4.1

Las concentraciones que no compartan literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

días las concentraciones en las muestras mantenidas con formalina fueron significativamente menores ($P < 0.05$) que las obtenidas al usar los otros tres preservativos ($P < 0.05$) (cuadros 4.2 a 4.5). En las muestras congeladas, la repetibilidad más alta de las concentraciones de progesterona se obtuvo con azida de sodio (0.85), seguida por timerosal (0.80), dicromato de potasio (0.74) y la menor fue obtenida con formalina (0.38) (cuadro 4.6).

4.3.2. Muestras conservadas con azida de sodio.

En estas muestras hubo un aumento significativo ($P < 0.05$) en las concentraciones de progesterona detectadas después de 15 días de almacenamiento comparadas con los valores iniciales; posteriormente los niveles volvieron a

CUADRO 4.4 CONCENTRACIONES PROMEDIO DE PROGESTERONA (NG/ML) EN MUESTRAS DE LECHE DESCREMADA MANTENIDAS CON FORMALINA EN CONGELACION O REFRIGERACION DURANTE 5, 15 O 30 DIAS.

TIEMPO DE CONSERVACION (DIAS)	CONGELACION		REFRIGERACION	
	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.
5	b 3.5	± 2.0	c 7.6	± 2.7
15	b 3.5	± 2.1	c 6.1	± 2.7
30	a 1.6	± 0.9	b 4.3	± 3.6

Las concentraciones que no compartan literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

bajar a los 30 días. Este efecto se observó tanto en las muestras congeladas como en las refrigeradas (cuadro 4.2).

En ninguno de los tiempos de almacenamiento hubo diferencias en las concentraciones de progesterona entre muestras refrigeradas y congeladas.

Con este preservativo, las muestras mantenidas en congelación tuvieron una repetibilidad más alta que las mantenidas en refrigeración (cuadro 4.6).

En el cuadro 4.7 se muestran las matrices de correlación de las concentraciones de progesterona entre los tres tiempos de almacenamiento para las muestras mantenidas con azida de sodio. Tanto en congelación como en refrigeración las correlaciones entre los tiempos fueron significativas ($P < 0.05$).

CUADRO 4.5 CONCENTRACIONES PROMEDIO DE PROGESTERONA (NG/ML) EN MUESTRAS DE LECHE DESCREMADA MANTENIDAS CON TIMEROSAL EN CONGELACION O REFRIGERACION DURANTE 5, 15 O 30 DIAS.

TIEMPO DE CONSERVACION (DIAS)	CONGELACION		REFRIGERACION	
	\bar{X}	D.E.	\bar{X}	D.E.
5	b 5.5	± 2.7	b 6.9	± 3.1
15	b 6.5	± 3.3	b 6.1	± 2.8
30	a 3.9	± 2.7	b 6.5	± 4.8

Las concentraciones que no compartan literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

4.3.3. Muestras manejadas con dicromato de potasio.

Al manejar en congelación las muestras conservadas con dicromato de potasio se observó un aumento en las concentraciones promedio de progesterona después de 15 días de almacenamiento ($P < 0.05$) para luego volver a descender al valor inicial (cuadro 4.3). En cambio las concentraciones promedio de progesterona en muestras refrigeradas y preservadas con dicromato de potasio no variaron con el tiempo (cuadro 4.3). Después de 5 ó 30 días de almacenamiento los valores promedio fueron menores en las muestras congeladas que en las refrigeradas ($P < 0.05$), mientras que no hubo diferencias a los 15 días de almacena-

CUADRO 4.6 REPETIBILIDAD DE LAS CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA AL ANALIZAR DESPUES DE DIVERSOS PERIODOS DE ALMACENAMIENTO MUESTRAS DE LECHE DESCREMADA PRESERVADAS CON DIFERENTES CONSERVADORES Y MANTENIDAS EN CONGELACION O REFRIGERACION.

PRESERVATIVO	TEMPERATURA	
	CONGELACION	REFRIGERACION
AZIDA DE SODIO	0.847	0.692
DICROMATO DE POTASIO	0.738	0.853
FORMOL	0.385	0.804
THIMEROSAL	0.804	0.767

namiento (cuadro 4.3). La repetibilidad fue mayor para las muestras refrigeradas (0.85) que para las congeladas (0.74) (cuadro 4.6). Como resultado de esto, las correlaciones entre los tiempos de almacenamiento fueron mayores para las muestras en refrigeración que para las congeladas (cuadro 4.8).

4.3.4. Muestras manejadas con Formalina.

Las muestras conservadas en formalina tuvieron menores niveles de progesterona cuando se manejaron en congelación que cuando se manejaron en refrigeración ($P < 0.05$) (cuadro 4.4). Las concentraciones después de 30 días fueron menores que a los 5 ó 15 días de almacenamiento tanto en las muestras refrigeradas como en las congeladas ($P < 0.05$). La repetibilidad de la progesterona en las muestras con

CUADRO 4.7 COEFICIENTES DE CORRELACION DE LAS CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA ENTRE LOS TIEMPOS DE ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS DE LECHE DESCREMADA MANTENIDAS EN REFRIGERACION O CONGELACION USANDO AZIDA DE SODIO.

Tiempo	CONGELACION			REFRIGERACION		
	1	2	3	1	2	3
1	1.00	0.93b	0.82b	1.00	0.92b	0.75a
2	0.93	1.0	0.91b	0.92b	1.00	0.76a
3	0.82b	0.91b	1.00	0.75a	0.76a	1.00

a) Estadísticamente significativo ($P < 0.01$)

b) Altamente significativo ($P < 0.001$)

formalina refrigerada fué alta (0.80), pero la repetibilidad en muestras congeladas fué baja (0.38) en comparación con todas las demás combinaciones temperatura-preservativo. (cuadro 4.6). Esta variabilidad también se manifiesta en los bajos coeficientes de correlación entre tiempos de almacenamiento para muestras con formalina mantenidas en congelación. (cuadro 4.9).

4.3.5. Muestras manejadas con Timerosal.

Las concentraciones de progesterona en muestras conservadas con timerosal y mantenidas en refrigeración disminuyó significativamente a los 30 días de almacenamiento ($P < 0.05$) (cuadro 4.5). En contraste, las concentraciones se mantuvieron estables al conservar las muestras en refrigeración. Como resultado, después de 30 días de

CUADRO 4.8 COEFICIENTES DE CORRELACION DE LAS CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA ENTRE LOS TIEMPOS DE ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS DE LECHE DESCREMADA MANTENIDAS EN REFRIGERACION O CONGELACION USANDO DICROMATO DE POTASIO.

Tiempo	CONGELACION			REFRIGERACION		
	1	2	3	1	2	3
1	1.00	0.84b	0.66a	1.00	0.90b	0.91b
2	0.84	1.00	0.84b	0.90	1.00	0.86b
3	0.66	0.84	1.00	0.91	0.86	1.00

a) Estadísticamente significativo ($P < 0.01$)

b) Altamente significativo ($P < 0.001$)

incubación las concentraciones fueron mayores ($P < 0.05$) en muestras refrigeradas que en muestras congeladas (cuadro 4.5). La repetibilidad fue similar en muestras mantenidas en congelación (0.80) o en refrigeración (0.76) (cuadro 4.6). Los coeficientes de correlación entre tiempos de almacenamiento también fueron similares a las dos temperaturas (cuadro 4.10).

CUADRO 4.9 COEFICIENTES DE CORRELACION DE LAS CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA ENTRE LOS TIEMPOS DE ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS DE LECHE DESCREMADA MANTENIDAS EN REFRIGERACION O CONGELACION USANDO FORMALINA.

Tiempo	CONGELACION			REFRIGERACION		
	1	2	3	1	2	3
1	1.00	0.40	0.42	1.00	0.95 ^b	0.77 ^b
2	0.40	1.00	0.33	0.95	1.00	0.79 ^b
3	0.42	0.33	1.00	0.77	0.79	1.00

a) Estadísticamente significativo ($P < 0.01$)

b) Altamente significativo ($P < 0.001$)

CUADRO 4.10 COEFICIENTES DE CORRELACION DE LAS CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA ENTRE LOS TIEMPOS DE ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS DE LECHE DESCREMADA MANTENIDAS EN REFRIGERACION O CONGELACION USANDO THIMEROSAL.

Tiempo	CONGELACION			REFRIGERACION		
	1	2	3	1	2	3
1	1.00	0.89 ^b	0.83 ^b	1.00	0.87 ^b	0.85 ^b
2	0.89 ^b	1.0	0.71 ^a	0.87 ^b	1.00	0.79 ^a
3	0.83 ^b	0.71 ^a	1.00	0.85 ^b	0.79 ^a	1.00

a) Estadísticamente significativo ($P < 0.01$)

b) Altamente significativo ($P < 0.001$)

4.4. DISCUSION.

Al estudiar la estabilidad de la progesterona en muestras de leche conservadas con diferentes preservativos es necesario evaluar dos efectos principales. El primero de estos efectos es la variación sistemática, definida como un desplazamiento de los niveles promedio de la progesterona entre una medición y la siguiente. Este desplazamiento puede ser hacia arriba o hacia abajo, y resulta en que el valor promedio de progesterona de todas las muestras evaluadas es mayor o menor que el obtenido anteriormente, independientemente de si el cambio en cada una de las muestras individuales es o no en el mismo sentido y magnitud que el de los valores promedio. El efecto sistemático se evalúa entonces mediante comparación de las medias obtenidas después de diferentes periodos de almacenamiento.

El segundo efecto es la variación individual, definida como cambios en las concentraciones de progesterona en muestras individuales conforme transcurre el tiempo. Si no existe variación individual tampoco habrá variación sistémica. Sin embargo, si puede haber ausencia de variación sistémica en presencia de variación individual, ya que si el sentido y la magnitud de la variación individual es aleatoria no habrá cambio en los promedios a pesar de haber variación individual significativa debido a que los aumentos en una o varias muestras pueden ser compensados por descensos o en otra u otras muestras. En contraste, la variación sistémica

aparece cuando la variación individual ocurre predominantemente en un sentido (hacia arriba o hacia abajo), de tal forma que ocurre un cambio neto en los valores promedio.

La estadística conocida como repetibilidad (64) evalúa si los cambios individuales son similares en todas las muestras. El valor máximo de la repetibilidad es 1; cuando este valor se alcanza significa que, o bien no hubo variación individual y por lo tanto tampoco variación sistémica, o que sí existió variación individual, pero que la magnitud y sentido de la variación fué idéntico en todas las muestras, expresandose como variación sistémica. El ideal obviamente es ausencia de variación individual y de variación sistémica (resultante en alta repetibilidad y ausencia de cambio en las medias). Sin embargo, la presencia de variación sistémica acompañada de alta repetibilidad puede ser satisfactoria en estudios comparativos en los que no se requiere conocer la concentración precisa de progesterona en la muestra, ya que en estos casos todas las muestras sufrirán el mismo efecto por el almacenamiento, por lo que si se ordenan de acuerdo a sus valores de progesterona, cada muestra conservará el mismo orden que tenía antes de almacenarse.

El valor mínimo de repetibilidad es 0; cuando este valor se alcanza, significa que la variación individual ocurre totalmente al azar. En este caso los cambios individuales se

compensan unos a otros. por lo que los valores promedio no cambian; sin embargo, el orden de las muestras con respecto a sus concentraciones de progesterona cambiará completamente en cada análisis, por lo que los resultados carecen totalmente de significado.

Los valores intermedios de repetibilidad indican que la magnitud y sentido de los cambios individuales tienden a ser similares entre sí (más similares entre mayor sea el valor de repetibilidad), por lo que habrá un cierto grado de variación sistémica. La variación sistémica en estos casos puede ser engañosamente baja debido a que existe un cierto grado de compensación de los cambios individuales entre sí.

Para efectos de evaluación podemos entonces arbitrariamente clasificar a los resultados en los siguientes grupos:

A - Los promedios no cambian en forma significativa ($P > 0.05$) con el tiempo y la repetibilidad es muy alta (más de 0.95). Esta sería la situación ideal. Ninguna combinación preservativo-temperatura de almacenamiento evaluada en este trabajo cayó dentro de este grupo debido a que en ningún caso hubo una repetibilidad mayor de 0.95.

B - No hay variación sistémica significativa ($P > 0.05$) y la repetibilidad es alta (más de 0.75). Este sería un objetivo deseable desde un punto de vista realista, los

resultados son útiles tanto para estudios cuantitativos como para estudios cualitativos. De preferencia las muestras deben analizarse después del mismo periodo de almacenamiento. El dicromato de potasio en refrigeración y el timerosal en refrigeración caen dentro de este grupo ya que en ambos casos no hubo diferencias significativas en los promedios obtenidos después de diferentes periodos de almacenamiento (cuadros 2 y 5), y la repetibilidad fué mayor de 0.75 en los dos casos (cuadro 6). Estas dos combinaciones son las únicas recomendables para estudios cuantitativos.

C - Hay variación sistémica significativa ($P < 0.05$) pero la repetibilidad es muy alta (más de 0.95). Esta situación puede funcionar perfectamente bien para estudios en que no interesa conocer la concentración exacta de progesterona, sino comparar las concentraciones de progesterona entre grupos, tratamientos, etc., siempre y cuando todas las muestras se analicen después del mismo periodo de almacenamiento. Ningún método de manejo pertenece a este grupo debido a que no hubo repetibilidades mayores a 0.95.

D - Hay variación sistémica significativa ($P < 0.05$) y la repetibilidad es alta (más de 0.75). En esta situación los resultados de estudios comparativos pueden aún resultar válidos debido a que las muestras tenderán a conservar su posición relativa con respecto a las otras muestras. En este caso también hay que asegurarse que el análisis de todas las

muestras se realice después del mismo período de almacenamiento. En este grupo se encuentra la azida de sodio en congelación, el formol en refrigeración y el timerosal en congelación. En estos tres casos hubo variación significativa en los promedios obtenidos después de diferentes períodos de incubación (cuadros 2,4 y5), sin embargo la repetibilidad en los tres casos fue mayor a 0.75, por lo que los resultados aún son útiles para estudios cualitativos, pero posiblemente no para estudios cuantitativos.

E- La repetibilidad es menor a 0.75; en este caso el significado del análisis pierde sentido haya o no variación sistémica significativa, por lo que los resultados dejan de ser útiles. Los valores de repetibilidad de la azida de sodio en refrigeración (0.69), dicromato de potasio en congelación (0.73) y formalina en congelación (0.38) son bajos, por lo que su uso no puede recomendarse para estudios cualitativos ni cuantitativos.

Estos resultados confirman el valor del dicromato de potasio para conservar muestras de leche descremada en refrigeración (13,19,24,28). Esto sugeriría que el dicromato es una buena elección, sobre todo debido a la existencia de tabletas comerciales que facilitan el manejo de este preservativo (13,24,28). Sin embargo, el dicromato de potasio tiene la gran desventaja de ser potencialmente carcinogénico (63), por lo que su uso implica un riesgo

para la salud de los operarios. En esta situación se debe evaluar la alternativa presentada por el uso de timerosal en muestras de leche refrigeradas, ya que en el presente trabajo se clasificó en el mismo grupo que el dicromato de potasio, indicando una confiabilidad similar sin los riesgos asociados con su uso. Es interesante destacar que ambos conservadores funcionan mejor si las muestras se mantienen refrigeradas que si son congeladas. Esto no representa problema ya que generalmente es más fácil mantener las muestras en refrigeración que en congelación. Este efecto detrimental de la congelación ya ha sido observada por otros autores (12,19) y parece estar asociado con la coagulación y la precipitación de las proteínas que se producen al descongelar las muestras (19,46).

Además del dicromato de potasio y del timerosal en refrigeración, en estudios cualitativos se puede utilizar azida de sodio en congelación, timerosal en congelación o formalina en refrigeración. La formalina ya ha sido utilizada para mantener muestras de leche en refrigeración (8.) o a temperatura ambiente (12), y tiene la ventaja de la facilidad de su obtención. El timerosal representaría una alternativa útil cuando por alguna razón las muestras no se pudieran conservar en refrigeración, sino solo en congelación.

En cuanto a la azida de sodio, aunque ha sido utilizada previamente (54) sería difícil recomendarla ya que es un compuesto carcinogénico (63) además de ser tóxica y tener tendencia a formar compuestos explosivos en las tuberías de drenaje. La baja repetibilidad de la azida de sodio para muestras refrigeradas y dicromato de potasio en muestras congeladas, aunada a la peligrosidad de estos productos indica que no debe utilizarse.

Mención especial requiere el uso de formalina en congelación, que resultó en una repetibilidad sumamente baja. Esto fue asociado con una muy evidente precipitación de proteínas, lo que indica que la formalina facilita los efectos coaguladores de la congelación (12,19). Es interesante mencionar que la formalina funciona en forma adecuada en refrigeración pero es totalmente inadecuada en congelación, por lo que si se va a utilizar este preservativo se debe tener especial cuidado en el manejo que se tendrán con las muestras.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

V BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Abdalla, A.Z., Biersawal, C.J., Elmore, R.C., Youngquist, P.S., Sharp, A.J. and Garverick, H.A. Theriogenology, 12:3-11 (1979).
- 2.- Abdel Rahim, S.E.A., Lowman, B.G., Deas, D.W., Jeffery, F.H. and Hunter, E.A.: The effect of time of sampling in relation to time of suckling on milk progesterone levels in beef cows. Br. Vet. J., 138:409-415 (1982).
- 3.- Abilay, T.A., Johnson, H.D. and Madan, M.: Influence of environmental heat on peripheral plasma progesterone and cortisol during the bovine estrous cycle. J. Dairy Sci., 58:1836-1840 (1975).
- 4.- Adeyemo, O. and Heath, E.: Plasma progesterone concentration in Bos taurus and Bos indicus heifers. Theriogenology, 14:410-419 (1980).
- 5.- Agarwal, S.P., Rahman, S.A., Laumas, K.R., Agarwal, V.K. and Ahmad, A.: Studies on steroid hormones: Progesterone concentration in the blood serum of Zebu cows during oestrus cycle. J. Anim. Sci., 47:715-719 (1977).
- 6.- Agarwal, S.P., Agarwal, V.K. and Ahmad, A.: Studies on steroid hormones. 3. Serum progesterone concentration in zebu cows during pregnancy. Indian j. Anim. Sci. 50:706-709 (1980).
- 7.- Aguilar, J.A.: Estudio comparativo de los ovarios de la vaca cebu y la vaca holstein. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1981.
- 8.- Arora, R.C., Batra, S.K., Pahwa, G.S., Jain, G.C. and Pandey, R.S.: Milk progesterone levels to monitor reproductive status of Murrah buffalo. Theriogenology, 13:249-255 (1980).
- 9.- Ball, P.J.H., and Jackson N.W.: The fertility of dairy cows inseminated on the basis of milk progesterone measurements. Br. Vet. J., 135:537-540 (1979).
- 10.- Bedford, C.A., Harrison, F.A. and Heap, R.B.: The metabolic clearance rate and production rate of progesterone in the sheep. J. Endocr. 51:333-345 (1972).
- 11.- Benjamin M. M.: Manual de Patologia Clinica en Veterinaria. 2a. ed Editorial Limusa. Pag. 13-14. 1984.

- 12.- Bishop, C.A., Bond, C.P. and Roberts, C.: Early diagnosis of non-pregnancy in cattle: The first eighteen months of a commercial service. Br. Vet. J. 132:529-533 (1976).
- 13.- Booth, J.M.: Milk progesterone pregnancy testing in cattle and other species. Proc. IX World Cong. Anim. Reprod. and A.I. Madrid, Spain. RT-C-2, 109-117
- 14.- Booth, J.M., Davies, J. and Holdsworth, R.J. : Use of milk progesterone test for pregnancy determination. Br. Vet. J. 135:478-488. (1979).
- 15.- Breuel, K.f., Spitzer, J.C., Gimenez, T, Henricks, D.M. and Gray, S.L.:Effect of holding time and temperature of bovine whole blood on concentration of progesterone, estradiol-17 β and estrone in plasma and serum samples. Theriogenology, 30:613-627 (1988).
- 16.- Bulman, D.C., and Lamming, G.E.: Milk progesterone levels in relation to conception, repeat breeding and factors influencing acyclicity in dairy cows. J. Reprod. Fert., 54:447-458 (1978).
- 17.- Choi, H.S., Mostl, E. and Bamberg, E.: Conversion of steroids in bovine blood in vitro. Theriogenology, 31:571-581 (1989).
- 18.- Dobson, H., and Fitzpatrick, R.J.: Clinical application of the progesterone in milk test. Br. Vet. J., 132:538-542 (1976)
- 19.- Dobson, H., Midmer, S.E., and Fitzpatrick, R.J.: Relationship between progesterone concentrations in milk and plasma during the bovine oestrus cycle. Vet. Rec., 96:222-223 (1975).
- 20.- Diaz, T., Manzo, M., Tronconiz, J., Benacchio, N. and Verde O.: Plasma progesterone levels during the estrous cycle of Holstein and Brahman cows, carora type and cross-bred heifers. Theriogenology. 26:419-432 (1986).
- 21.- Donaldson, L.E., Bassett, S.M. and Thorburn, G.D.: Peripheral plasma progesterone concentration of cows during puberty, oestrus cycles, pregnancy and lactation, and the effects of under-nutrition or exogenous oxytocin on progesterone concentration. J. Endocr., 48:599-614 (1970).
- 22.- Eastman, S.A.K. :Methods of improving the accuracy of positive results from milk progesterone pregnancy test. Br. Vet. J., 135:189-190 (1979).

- 23.- Fahmi, H.A., Williamson, N.B., Tibary, A., and Hegstad, R.L.: The influence of some sample handling factors on progesterone and testosterone analysis in goats. Theriogenology, 24:227-233 (1985).
- 24.- Foote, R.H., Smith, R.D., Oltenacu, E.A.B., Braun, R.K. and Reimers, T.J.: Milk progesterone assays as part of a reproductive management program for dairy cattle. Proc. IX Cong. Anim.Reprod. and A.I. Madrid Spain. RT-C-5. Pag 135-141
- 25.- Galina, C.S.: Some aspects that affect the success of Artificial Insemination in Zebu cattle. Proc. Soc. for theriogenology. Sacramento, 1985. 9-25. Soc theriogenology. Sacramento, California. (1985).
- 26.- Garcia, M.: On the reproductive efficiency of pure- and crossbred zebu cattle in the amazon basin of Peru. Tesis de Doctorado. Faculty of Veterinary Medicine. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Sweden. 1988.
- 27.- Ginther, O.J., Nuti, L.C., Garcia, M.C., Wentworth, B.C. and Tyler, W.J.: Factors affecting progesterone concentration in cow's milk and dairy products. J. Anim. Sci., 42:155-159 (1976).
- 28.- Gowan, E.W., and Etches, R.J.: A solid-phase radioimmunoassay for progesterone and its application to pregnancy diagnosis in the cow. Theriogenology, 12:327-343 (1979).
- 29.- Gowan, E.W., Etches, P.J., Bryden, C. and King, C.J. : Factors affecting accuracy of pregnancy diagnosis in cattle. J. Dairy Sci., 65:1294-1302 (1982).
- 30.- Heap, R.B., Gwyn, M., Laing, J.A. and Walters, D.E.: Pregnancy diagnosis in cows; changes in milk progesterone concentration during the oestrus cycle and pregnancy measured by a rapid radioimmunoassay. J. Agric. Sci. Camb., 81:151-157 (1973).
- 31.- Holdsworth, R.J.: Measurement of progesterone in bovine plasma and preserved whole blood samples by a direct radioimmunoassay. Br. Vet. J., 136:135-140 (1980).
- 32.- Holdsworth, R.J., Chaplin, V.M. and Booth, J.M.: Radioimmunoassay of progesterone in milk: Development of techniques for large-scale use as a test of pregnancy. Br. Vet. J., 135:470-477 (1979).

- 33.- Holdsworth, R.J., Heap, R.B., Booth, J.M. and Hamond, M.: A rapid direct radioimmunoassay for the measurement of estrone sulphate in the milk of dairy cows and its use in pregnancy diagnosis. J. Endocr., 95:7-12 (1982).
- 34.- Hoffman, B., Gunzler, O., Hamburger, R. and Schmidt, W.: Milk progesterone as a parameter for fertility control in cattle; methodological approaches and present status of application in Germany. Br. Vet. J., 132:469-476 (1976).
- 35.- Hoffman, B., Hamburger, R., Gunzler, O., Korndorfer, L., and Lohoff, H.: Determination of progesterone in milk applied for pregnancy diagnosis in the cow. Theriogenology, 2:21-28 (1974).
- 36.- Irvin, H.J., Randal, R.D., Haensly, W.E., and Sorensen Jr., A.M.: Reproductive studies of Brahman cattle. III. Comparison of weight, progesterone content, histological characteristics and 3-B hydroxysteroid dehydrogenase activity in corpora lutea of Brahman, Hereford and Brahman X Hereford heifers. Theriogenology, 10:417-420 (1978).
- 37.- Laing, J.A., Eastman, S.A.K., and Bouflower, J.C.: The use of progesterone concentrations in milk and plasma for pregnancy diagnosis in cattle. Br. Vet. J., 135:204-209 (1979).
- 38.- Lamming, G.E., and Bulman, D.C.: The use of milk progesterone radioimmunoassay in the diagnosis and treatment of subfertility in dairy cows. Br. Vet. J., 132:507-517 (1976).
- 39.- Landivar, C., Galina, C.S., Duchateau, A., and Navarro-Fierro, R.: Fertility trial in zebu cattle after a natural or controlled estrus with prostaglandin F2 alpha, comparing natural mating with artificial insemination. Theriogenology, 23:421-429 (1985).
- 40.- Mishra, R.R., Chauhan, R.S., Bhatnagar, J.S.: A note on the effect of season in age of first calving among Brown swiss X Sahiwal/Red sindhi. Indian J. Anim. Sci., 47:418 (1975).
- 41.- Moreno, I.Y.D., Galina, C.S., Escobar, F.J., Ramirez, B. and Navarro-Fierro, R.: Evaluation of the lytic response of PGF2 alpha in zebu cattle based on serum progesterone. Theriogenology, 25:413-421 (1986).

- 42.- Navarro, G.H.A. : Efecto del tiempo y la temperatura en que permanecen las muestras de sangre caprina, antes de la centrifugación, sobre los niveles de progesterona detectables en plasma. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Veterinaria y Zootecnia. U.N.A.M. (1981).
- 42a.- Neter, J. and Wasserman, W.: Applied Linear Statistical Models. Richard, D. Irwin, Inc. Homewood, Illinois, 1974.
- 43.- Ojeda, C.: Niveles de progesterona determinados en plasma y leche en vacas postparto mediante radionmunoensayo. Arch. Med. Vet. Chile., 12:283-284 (1980).
- 44.- Oliveira Filho, E.B., Carneiro, G., Abilio, H., Miguel, H.: Idade a primeira cria em um rebanho nelore. Arq. Esc. Vet. Ufmg., 21:141 (1975).
- 45.- Oltner R. and Edqvist, L.E.: Changes in plasma progesterone levels during storage of heparinized whole blood from cow, horse, dogs and pig. Acta Vet. Scand., 23:1-8 (1982).
- 46.- Oltner, R., and Edqvist, L.E.: Progesterone in defatted milk; its relation to insemination and pregnancy in normal cows as compared with cows on problem farms and individual problem animals. Br. Vet. J., 137:78-87 (1981).
- 47.- Owens, R.E., Atkins, D.T., Rahe, C.H., Fleeger, J.L. and Harms, P.G.: Time-dependent loss of radioimmunoassayable levels of progesterone following ambient temperature incubation of heparinized bovine blood. Theriogenology, 13:305-309 (1980)
- 48.- Oyedipe, E.O., Voh, A.A., Marire, B.N. and Pathiraja, N.: Plasma progesterone concentration during the oestrus cycle and following fertile and non-fertile inseminations of Zebu heifers. Br. Vet J., 142:41-46 (1986).
- 49.- Pennington, J.A., Spahr, S.L. and Lodge, J.T.: Factors affecting progesterone in milk for pregnancy diagnosis in dairy cattle. Br. Vet. J., 132:469-476 (1976).
- 50.- Plasse, D., Koger, M., Warnick, A.C.: Reproductive behavior of Bos indicus females in a subtropical environment. III. Calving intervals from first exposure to conception and intervals from parturition to conception. J. Anim. Sci. 27: 105 (1968).

- 51.- Pope, G.S., Majzlik, J., Ball, P.J.H. and Leaver, J.D.: Use of progesterone concentration in plasma and milk in the diagnosis of pregnancy in domestic cattle. Br. vet. j., 132:497-506 (1976).
- 52.- Randel, R.D.: Seasonal effects on female reproductive functions in the bovine (Indian breeds). Theriogenology, 21:170-185 (1984).
- 53.- Reimers, T.J., McCann, J.P., and Cowan, R.G.: Effects of storage times and temperatures on T3, T4, LH, Prolactin, Insulin, Cortisol and Progesterone concentrations in blood samples from cows. J. Anim. Sci., 57:683-691 (1983).
- 54.- Ruiloba, C., Galina, C.S., Murcia, C., Navarro-Fierro, R. and Posse, C.: Niveles de progesterona en la vaca Cebú gestante después de la aplicación del dispositivo liberador de progesterona y monta natural. Proc. X Inter. Cong. Anim. Rep. and A.I. Urbana, Illinois 1984
- 55.- Sainz C.F. and Perez G.T. : Pregnancy diagnosis from milk: Latest results from Spain. Br. Vet. J., 138:538-542 (1982).
- 56.- Schiavo, J.J., Matuszczak, E.A., Oltenacu, E.A.B. and Foote, R.H.: Milk progesterone in post partum and pregnant cows as a monitor of reproductive status. J. Dairy Sci., 58:1713-1716 (1975).
- 57.- Short, R.V.: Progesterone in blood. I. The clinical determination of progesterone in peripheral blood. J. Endocrinol., 16:415-425 (1958).
- 58.- Silberzahn, P., Quincey, O., Rosier, C. and Leymarie, P.: Testosterone and progesterone in peripheral plasma during the oestrus cycle in the mare. J. Reprod. Fert., 53:1-5 (1978).
- 59.- Srikandakumar, A., Ingraham, R.H., Ellsworth, M., Archbald, L.F., Liao, A. and Godke, R.A. : Comparison of a solid-phase, no-extraction radioimmunoassay for progesterone with an extraction assay for monitoring luteal function in the mare, bitch and cow. Theriogenology, 26:779-793 (1986).
- 60.- Stabenfeldt, G.H., Ewing, L.L. and McDonald, L.E.: Peripheral plasma progesterone levels during the bovine oestrus. J. Reprod. Fert., 19:433-442 (1969).

- 61.- Stabenfeldt, G.H., Osburn, B.I. and Ewing, L.L. : Peripheral plasma progesterone levels in the cow during pregnancy and parturition. Am. J. Physiol., 218:571-575 (1970).
- 62.- Stevenson, J.S. and Britt, J.H.: Detection of estrus by three methods. J. Dairy Sci., 60:1994-1998 (1977)
- 63.- The Merck Index. Merck and Co. Inc. Eighth edition. Rahway, N.J. USA. 1968.
- 64.- Turner, C.O., First, N.L. and Young R.: Quantitative genetics in sheep breeding. Cornell University Press, Chapter 7 pp. 77-83 (1969).
- 65.- Vaca, L.A., Galina, C.S., Fernandez-Baca, S., Escobar, J. and Ramirez, B.: Progesterone levels and relationship with the diagnosis of a corpus luteum by rectal palpation during the estrous cycle in zebu cows. Theriogenology, 20:67-76 (1983).
- 66.- Vaccaro, de Pearson L.: Some aspects of the performance of purebred and crossbred dairy cattle in the tropics. Anim. Breed. Abstr., 41:571-591 (1973)
- 67.- Vahdat, F., Hurtgen, J.P., Whitmore, H.L., Johnston, S.D., and Ketelsen, C.L.: Effect of time and temperature on bovine serum and plasma progesterone concentration. Theriogenology, 12:371-374 (1979).
- 68.- Vahdat, F., Hurtgen, J.P., Whitmore, H.L., Seguin, B.E. and Johnston, S.D.: Decline in assayable progesterone in bovine plasma: Effect of time, temperature, anticoagulant and presence of blood cells. Am. J. Vet. Res., 42:521-522 (1981).
- 69.- Vahdat, F., Seguin, B.E., Whitmore, H.L. and Johnston, S.D.: Role of blood cells in degradation of progesterone in bovine blood. Am. J. Vet. Res., 45:240-243 (1984).
- 70.- Vale-Fiho, V.R., Pinheiro, L.E.L., Basrur, P.K.: Reproduction in zebu cattle. In: Morrow, A. Current Therapy in Teriogenology. , W.B. Saunders Company. PP. 437-442 (1986)
- 71.- Van der Molen, H.J., and Groen. O.: Interconversion of progesterone and 20 alpha-dihydroprogesterone and of androstenedione and testosterone in vitro by blood and erythrocytes. Acta endocrinologica. 58:419-444 (1968).

72. Villa, R.A. Estudio comparativo entre la determinación de los niveles de progesterona y la palpación del cuerpo lúteo a los 24 días después de la I.A. como método de diagnóstico de gestación. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México. D.F., 1985.
- 73.- Wiseman, B.S., Vincent, D.L., Thomford, P.J., Scheffrahn, N.S., Sargent, G.F., and Kesler, D.j.: Changes in porcine, ovine, bovine and equine blood progesterone concentrations between collection and centrifugation. Animal Reproduction Science. 5:157-165 (1983).