

Estudio comparativo de los niveles de progesterona en leche y plasma en ovinos

Puime, P.¹; van Lier, E.²; Rodríguez-Piñón, M.¹; Garófalo, E.G.¹

RESUMEN

La intensificación de la producción ovina ha obligado a generar nuevas alternativas productivas que implican un aumento de la eficiencia reproductiva. En éste sentido, la determinación de Progesterona (P) circulante ha sido utilizada para el monitoreo de la actividad ovárica. Este trabajo plantea determinar en forma simultánea los niveles de P en sangre y leche y su correlación. Se utilizaron 6 ovejas en anestro tratadas con P (0.4 mg/kg P.V. im.), se tomaron muestras de sangre y leche a 0, 2, 4, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 y 48 hr. de la administración y se midió la concentración de P utilizando radio inmuno análisis (RIA) de P validado para plasma y leche. Los niveles de P a tiempo cero fueron basales, a las 2 hr. aumentaron significativamente y alcanzando los máximos niveles a 6 hr. y 12 hr. en plasma y leche respectivamente, retornando a niveles basales a 42 hr. en plasma y 30 hr. en leche. Los niveles de P en plasma y leche se correlacionaron positivamente con alto nivel de significación ($r=0.858$; $n=66$; $p<0.0001$). Las determinaciones de P en leche son representativas de los niveles sanguíneos y permitirían el monitoreo no invasivo de los procesos reproductivos de interés.

Palabras clave: Ovinos, Progesterona, Leche, Plasma, Correlación.

SUMMARY

The ovine production tends to be intensified and new productive alternatives are being explored. In order to improve the reproductive efficiency, plasma Progesterone (P) determination is a tool used for measuring ovarian activity. Our objective was to measure the P levels in blood and milk simultaneously and correlate them. Six anestrus sheep were injected i.m. with P (0.4mg/kg body weight) in oil vehicle. Blood and milk were taken at 0, 2, 4, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 and 48 hr. after the progesterone injection and progesterone levels were determined by radioimmunoassay (RIA) validated for plasma and milk. The P levels at 0 hr. were basal, but at 2 hr. they increased significantly, and reached maximum levels at 6 and 12 hr. in plasma and milk, respectively. The levels returned to basal concentrations at 42 and 30 hr. in plasma and milk, respectively. The correlation between P concentration in plasma and milk was highly significant and positive ($r=0.858$; $n=66$; $p<0.0001$), indicating that milk P determinations are representative of the blood levels and it can be used for non-invasive monitoring of the reproductive processes.

Keywords: Ovine, Progesterone, Milk, Plasma, Correlation.

INTRODUCCIÓN

La producción ovina en Sudamérica está basada en sistemas extensivos, siendo la producción de lana y carne sus objetivos primordiales. En los últimos años se han buscado nuevas alternativas de producción como el tambo ovino (8). Como antecedente lejano, la oveja fue ordeñada para la producción de queso antes que el vacuno (8). En general los países del Mediterráneo constituyen los principales productores y consumidores de leche ovina a escala mundial (8). En el Uruguay, la producción ovina ha estado orientada tradicionalmente a la industria lanera y a la producción de carne, y a pesar de la disminución del stock ovino en los últimos años, siguen siendo rubros importantes de exportación para el país (DIEA, 2001). Actualmente, se están realizando en diferentes ámbitos, esfuerzos dirigidos a reorientar la producción ovina nacional, a través de la producción de corderos todo el año y el desarrollo de la industria

lechera ovina (8,14). Para aumentar la producción de corderos y leche, se busca tener 3 pariciones en 2 años, por lo tanto tiene gran importancia reducir el intervalo inter-parto. El monitoreo de la actividad ovárica y el diagnóstico de preñez constituyen herramientas fundamentales para realizar un correcto manejo de la majada y lograr este objetivo (9).

Existen varias técnicas de diagnóstico de preñez, que se aplican a distintos tiempos post-concepción y tienen diferentes niveles de confiabilidad. La ultrasonografía transrectal, palpación, radiografía, biopsia vaginal y test de progesterona (P), son algunas de ellas (7).

El radioinmunoanálisis (RIA) de P en sangre y leche es de gran utilidad en bovinos para la detección de preñez, control del ciclo estral y diagnóstico de determinadas patologías como ovarios quísticos, piómetra, muerte embrionaria temprana, etc. (7,12). En menor extensión, pero con creciente interés, se están desarrollando RIAs de P en sangre y leche para caprinos y ovinos (7,15).

Recibido: 11/11/02 Aprobado: 16/12/02 Arbitrado

¹ Área Bioquímica, Depto. de Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Lasplacas 1550, Montevideo, Uruguay. pablopuime@hotmail.com

² Depto. de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Avda. Garzón 780, Montevideo, Uruguay.

Los datos presentados en este artículo se encuentran publicados en forma de Abstracts en 14th International Congress on Animal Reproduction ICAR Stockholm julio 2000 vol. 2; 22

El diagnóstico de preñez por RIA de P en sangre es un método confiable que ha demostrado 100% de exactitud al detectar cabras vacías post-servicio y 85.7 % en el diagnóstico de preñez. (7). En ovejas, Shemesh y col. 1979 (15), encontraron un 100% de exactitud en el diagnóstico de no-preñez y un 82% de exactitud en el diagnóstico de preñez por determinaciones de P en sangre y leche, ambos durante la estación reproductiva. Sin embargo durante el anestro estacional los mismos autores encuentran una exactitud del 50% en el diagnóstico de no preñez y un 100% en el de preñez, según los niveles de P en leche (15).

La determinación de los niveles de P en plasma es más reproducible que en leche, pues en ésta última existen variaciones según la forma de tomar las muestras, el momento de la lactación y el volumen de producción (2). Sin embargo, la toma de muestras de leche es una técnica más práctica, no invasiva, así como menos estresante para los animales, evitando bajas en la producción y posibles infecciones, y que se puede incorporar fácilmente a la rutina de ordeño como una tarea más y sin afectarla (7,15).

El objetivo del presente trabajo es estudiar la utilidad de las determinaciones de los niveles de P en leche comparado con los sanguíneos, con la finalidad de realizar el monitoreo no invasivo de la funcionalidad reproductiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 6 ovejas en lactación, Milchschaf cruce Corriedale de 2 a 4 años de edad con un peso corporal de 42.30 ± 5.46 kg ($X \pm SD$). El experimento se realizó durante el anestro (en primavera, mes de setiembre), en el campo experimental del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA "Las Brujas", Uruguay). Las ovejas pastaron en pradera artificial, hasta el inicio del diseño cuando fueron estabuladas y alimentadas con alfalfa cortada. El manejo del establecimiento consistió en régimen de 2 ordeños diarios y la producción de leche el día previo al inicio del diseño fue 250 ± 182 g/ordeño ($X \pm SD$). Se suministró P (Sigma) 0.4 mg/0.03 ml/kg peso vivo (en vehículo oleoso) i.m.¹, tomando el momento previo a la inyección

como tiempo cero del experimento. La dosis de P suministrada fue establecida en experimentos previos de nuestro grupo de trabajo, con la finalidad de alcanzar niveles de P en sangre similares a los de la fase lútea (datos no publicados).

Se tomaron muestras de leche y de sangre en forma simultánea a diferentes tiempos: 0, 2, 4, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 y 48 hr. de la administración de P. Dos horas antes del comienzo del protocolo se vaciaron las glándulas mamarias. En todos los casos las muestras de leche se obtuvieron luego de desechar los dos primeros chorros y posteriormente al muestreo se vació la glándula mamaria por ordeño manual.

A las muestras de leche se les agregó Azida de Sodio, (NaN_3 Sigma) 1mg por 10 mL de leche, como inhibidor del crecimiento bacteriano, y luego se refrigeraron a 4° C hasta su posterior centrifugación a 3000 x G durante 15 minutos a 4° C. Finalmente se almacenaron como leche descremada a -20° C (10).

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción yugular con Vacutainer® (Becton Dickinson VACUTAINER Systems, Gel and Lithium Heparin, NJ, USA), se centrifugaron a 3000 x G durante 15 minutos. El plasma se acondicionó a -20° C hasta su procesamiento. Se obtuvieron un total de 66 muestras de sangre y 66 de leche pareadas.

Las concentraciones plasmáticas de P se determinaron por RIA específico para P (5), DPC (Diagnostic Products Corporation, California, USA), y para las determinaciones de las concentraciones de P en leche se utilizó un kit específico de la IAEA (International Atomic Energy Agency) validado para leche ovina (10). Se trabajó en un rango del 0.3 a 63.6 nmol/L para plasma y 1.25 a 40 nmol/L para leche con una sensibilidad de 0.1 y 0.4 nmol/L respectivamente.

Los niveles de P en sangre y leche fueron analizados a diferentes tiempos por análisis de varianza multifactorial (ANOVA) La relación entre los niveles de P en leche respecto a plasma se estudió mediante el test de correlación. Para la estimación de los niveles esperados en leche en función de los obtenidos en sangre se utilizó un modelo lineal. El nivel de significación se consideró $p < 0.05$ para to-

dos los tests realizados. El programa estadístico empleado fue Statgraphic, versión 7, Oregon, USA.

RESULTADOS

Los niveles de P a tiempo 0 (considerados como basales) fueron: 0.31 ± 0.21 nmol/L y 0.52 ± 0.34 nmol/L ($X \pm SD$, $n=6$) para plasma y leche respectivamente. A las 2 hr. de la dosificación aumentaron significativamente en plasma y en leche con respecto a los valores iniciales, y alcanzaron los máximos niveles a las 6 hr. en plasma (8.90 ± 1.80 nmol/L) y a las 4 hr. en leche (4.26 ± 1.85 nmol/L), retornando a niveles no significativamente diferentes de los basales a las 36 hr. para plasma (1.62 ± 0.83 nmol/L) y 30 hr. para leche (1.90 ± 0.48 nmol/L) ($p < 0.05$) (Gráfica 1).

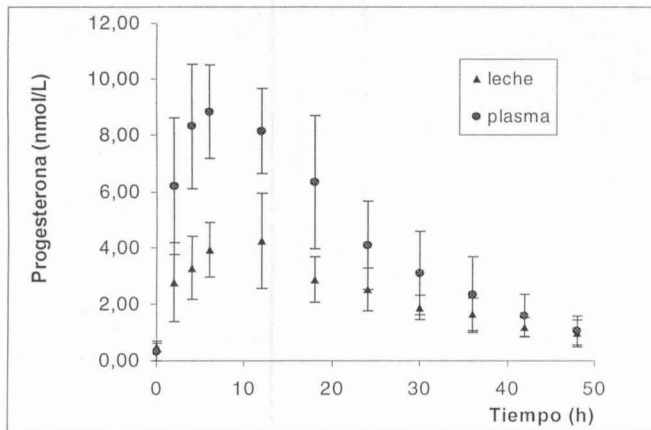
En la gráfica 1 se observa la concentración de P en función del tiempo, y se puede ver un paralelismo entre las curvas de leche y plasma mostrando perfiles similares.

Se encontró una correlación positiva y altamente significativa entre los niveles de P en plasma y en leche, con un coeficiente de correlación (r) de 0.871943 y un nivel de significación $p < 0.0001$ (Gráfica 2).

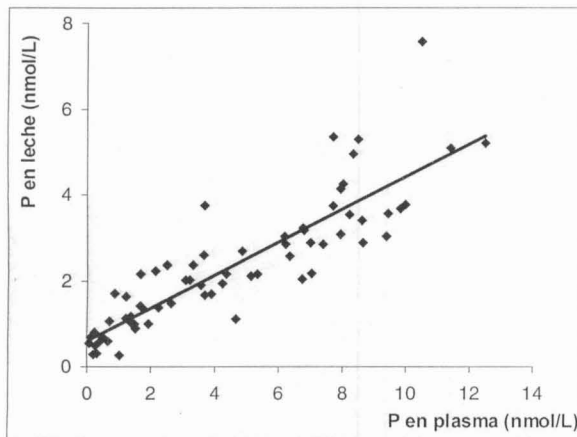
Aplicando el modelo lineal de regresión los resultados encontrados se ajustan a la siguiente ecuación:

$$P \text{ en leche (nmol/L)} = 0,613437 + 0,381473 \times P \text{ en plasma (nmol/L)}$$

La relación entre P en plasma y leche es estadísticamente significativa con $p < 0.0001$, explicando en un 76.03 % los cambios en los niveles de P en leche por diferencias en las concentraciones de P en plasma (Gráfica 2). Considerando para ovinos que niveles de P en plasma entre 6 y 13 nmol/L son indicativos de fase lútea (2) y utilizando el modelo lineal encontrado, los valores de P en leche de 2.9 ± 0.19 a 5.57 ± 0.48 nmol/L indicarían presencia de un cuerpo lúteo secretando P con un 95 % de confianza. Por el contrario, niveles plasmáticos de P entre 0.5 a 0.8 nmol/L característicos de la fase folicular, se corresponderían con valores de P en leche de 0.8 ± 0.28 a 0.92 ± 0.27 nmol/L e indicarían fase folicular o ausencia de cuerpo lúteo secretante con un 95 % de confianza.



Gráfica 1. Niveles de P ($X \pm \text{sem}$) en plasma y leche ovina en función del tiempo luego de la administración de P 0.4 mg/0.03ml/kg peso vivo (en vehículo oleoso) i.m. * Indica diferencias significativas con respecto al nivel basal correspondiente. ($p < 0.05$ para plasma y leche).



Correlación
n = 66
r = 0,871943
P < 0.0001

Correlación
n = 66
r = 0,871943
P < 0.0001

Gráfica 2. Correlación y regresión lineal de los niveles de P en sangre y leche ovina dosificadas con 0.4 mg/0.03ml/kg peso vivo (en vehículo oleoso) i.m. n=66, r=0.8580, $p < 0.0001$.

DISCUSIÓN

Los niveles de P encontrados en plasma en las muestras a tiempo 0, fueron comparables con los niveles basales de P durante la fase folicular del ciclo estral y en ovinos en anestro (2,6,16). Los niveles máximos alcanzados en plasma en forma transitoria por la administración de P fueron similares a los de la fase lútea del ciclo estral en ovinos (2,6).

Las concentraciones de P en leche a tiempo cero fueron del orden de los niveles basales encontrados en ovinos de la raza Awassi (15). Los niveles de P a las 4 - 6 h. del tratamiento fueron similares a los

de ovinos en fase lútea (12) y menores a los encontrados en leche de ovejas Awassi preñadas con niveles de P sanguíneos similares a los encontrados a las 4 y 6 h en este trabajo (15). Estas discrepancias en los niveles de P en leche pueden deberse al estado fisiológico de los animales, a posibles diferencias raciales (diferencias en el tenor butirométrico de la leche) o a la forma de obtención de la leche.

En relación a la forma de obtención de las muestras, se conoce para otras especies que los niveles de P pueden ser diferentes en leche descremada, leche entera y en la grasa de la leche (2,4). Por lo

tanto si la P se mide en la primera o última fase del ordeño o en el homogeneizado del volumen total extraído de la glándula mamaria, las diferencias encontradas en las concentraciones de P podrían deberse a diferencias en composición butirométricas de las fracciones del ordeño.

Estudios de determinaciones de P tanto en plasma, leche y en saliva en bovinos (3,11,13) demostraron que niveles de P en presencia de cuerpo lúteo son mayores que en fase folicular, por lo que la medida de determinaciones de P en estos líquidos biológicos constituye una posible herramienta para el monitoreo de la actividad ovárica y sobretodo para un diagnóstico certero de ausencia de preñez.

El estudio de los niveles de P en cabras dio perfiles similares a los encontrados en bovinos, habiendo diferencias en los niveles lácteos según la concentración de grasa en la leche (1).

Los niveles de P en plasma entre 6 y 13 nmol/L en ovinos son indicativos de fase lútea, mientras que en la folicular estos son de 0.5 a 0.8 nmol/L (2). Utilizando el modelo lineal que relaciona los niveles de P en plasma y leche podemos sugerir que los valores de P en leche indicativos de fase lútea son los mayores a 3 nmol/L y los valores de P en leche menores a 1 nmol/L indicarían fase folicular o ausencia de cuerpo lúteo.

CONCLUSIONES

Los niveles de P en plasma y leche presentaron una correlación positiva con alto nivel de significación. Se concluye que los niveles de P en leche son representativos de los niveles sanguíneos y constituirían una herramienta no invasiva que permitiría monitorear procesos reproductivos o diagnosticar patologías.

Agradecimientos

Ing. Agr. A. Ganzabal, INIA préstamo de los animales y el uso de las instalaciones para el diseño experimental.

Prof. Agdo. R. Tagle, Laboratorio de Técnicas Nucleares Facultad de Veterinaria, el suministro de los Kits de RIA para determinar la P.

Prof. Adj. Dra. C. Tasende y Dra. A. Meikle la valiosa contribución en la elaboración de las hipótesis y críticas al diseño experimental.

Referencias Bibliográfica

- 1) **Bretzlaff, K.N.; Elmore, R.G.; and Nuti, L.C.** (1989). Use of an enzyme immunoassay to determine concentrations of progesterone in caprine plasma and milk. Reports of Original Studies JAVMA, Vol 194 N° 5 March 1 664-668.
- 2) **Edqvist, L.-E.; Forsberg, M.** (1997). Clinical Reproductive Endocrinology. En Clinical Biochemistry of Domestic Animals, fifth Edition 589 – 615.
- 3) **Gao, Y.; Short, R.V. and Fletcher, T.P.** (1998). Progesterone concentrations in plasmе, saliva and milk of cows in different reproductive states. British Veterinary Journal 144, 262 – 268.
- 4) **García, M., and Edqvist, L.-E.** (1990). Progesterone determinations and clinical of reproductive organs in purebred and crossbred female zebu cattle Theriogenology 33 (5): 1091-1103.
- 5) **Garófalo E.G. and Tasende C.** (1996). Uterine estrogen and progesterone receptors in prepubertal ewes: distribution in myometrium, endometrium and caruncles. Vet. Res. 27: 177 - 183.
- 6) **Goodman, R.L.** (1994). Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. En: The Physiology of Reproduction Ed: Knobil E Neil J.D. Raven Press N.Y.: 659 - 709.
- 7) **Ishwar, A.K.** (1995). Pregnancy diagnosis in sheep and goats: a review. Small Ruminant Research 17: 37-44.
- 8) **Kremer, R.** (1999). Curso de Educación a Distancia - Leche Ovina, Facultad de Veterinaria, vol. I.
- 9) **Kremer, R.** (1995). Ovinos de Leche. Jornadas de Actualización en reproducción y Producción de Leche Ovina y Caprina. Facultad de Veterinaria.
- 10) **Laboratory Training Manual on Radioimmunoassay in Animal Reproduction FAO/IAEA.** (1984). Technical Report 233, IAEA.
- 11) **Madureira, H., Barnabe, C. R., Pinto P. A., Bernabe, V. H., and Marins Sobrino, E.** (1990) Progesterone Concentrations Measured by Radioimmunoassay in Blood Plasma and Fat-Free Milk of Gir Breed Cows (Bos Indicus). Determinations During Oestrus Cycle. Early Pregnancy Diagnosis. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci 27(2): 247-253.
- 12) **Nebel, R.L.; Whihies, W.D.; Cassell, B.G.; Britt, J.H.** (1987). Comparison of on farm and laboratory milk progesterone assay for identifying errors in detection of estrus and diagnosis of pregnancy. Anim. Reprod. Sci. 39: 171 – 182.
- 13) **Pouilly, par F.; Ducrot, C.; Humblot, P.; Viel, J.F.; Mialot, J.F.** (1993). Concordance des résultats de dosage de progesterone dans le plasma et dans le lait chez les vaches allaitantes. Recueil de Médecine Vétérinaire, Février. 101 – 105.
- 14) **Sáenz; L.P.; Raadsma, H.; Capurro, G.; Cardelino, R.; Oficialdegui, R.** (2000) Ovinocultura /Sheep Husbandry. World Buiatrics Congress, Punta del Este, Uruguay, p. 23.
- 15) **Shemesh, M.; Ayalon, N.; Mazor, T.** (1979). Early pregnancy in the ewe, based on milk progesterone levels. J. Reprod. Fert. 56: 301-304.
- 16) **Tasende, C.** (1998). Dinámica de los receptores de estrógenos y P en úteros de ovinos: Estudios en la pubertad y el postparto. Tesis de Maestría, PEDECIBA, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.