

**Nota Técnica:****COMPARACION DE METODOS DE CONSERVACION PARA MUESTRAS DE SANGRE Y LECHE EN LA DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE LA PROGESTERONA.****Technical Note:****Comparison of methods to preserve blood and milk samples for progesterone concentration determination**

Omar Araujo F. \*  
 R. Betancourt \*\*  
 Maritza Romero \*

\* Postgrado de Producción Animal  
 Facultad de Agronomía  
 Universidad del Zulia  
 Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela

\*\* Egresado de la Escuela de Zootecnia  
 Facultad de Ciencias Agropecuarias  
 Universidad Rafael Urdaneta  
 Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela

**RESUMEN**

Se evaluaron dos métodos de manejo de muestras de sangre y leche para la determinación de los niveles de progesterona en 48 vacas gestantes (3 meses), de las cuales 25 eran Mosaico Perijanero (MP) con predominancia de Holstein y 23 Criollo Limonero (CL). Se procedió a tomar muestras de leche en el segundo ordeño, del cuarto posterior derecho y se dividió en dos alícuotas para T1 (sin descremar, con preservativo y a temperatura ambiente por 48 horas); y T2 (descremada, con preservativo y congelada a -20 °C inmediatamente). También se obtuvo una muestra de sangre en la vena yugular y se dividió en dos alícuotas para T3 (suero a 5 °C por 48 horas) y T4 (suero congelado a -20 °C inmediatamente). La progesterona fue determinada por RIA. No se encontraron diferencias entre T1 vs. T2, ni tampoco entre T3 y T4. En base a los resultados obtenidos se puede concluir que las muestras de leche pueden ser manejadas a temperatura ambiente (28 °C) y las de suero a temperatura de refrigeración (5 °C) hasta por 48 horas sin afectar significativamente los valores de progesterona que se pretenden determinar.

**Palabras claves:** Progesterona, métodos de determinación, vacas en producción, RIA.

**ABSTRACT**

To evaluate two methods of handling in both blood and milk samples to determine progesterone concentration. Forty eight

3 mo.-pregnant cows from which 25 were crossbred with Holstein predominance (Mosaico Perijanero: MP) and 23 were purebred Criollo Limonero (CL). Milk samples were taken on afternoon milking from the right, rear quarter. Each sample was divided into two aliquots: T1, consisted in whole-milk preserved with potassium dichromate immediately after milking and stored at room temperature during 48 h.; T2, consisted in fat-free milk, with preservative and stored at -20 °C immediately prior to the assay. Blood samples were collected from the jugular vein, and they were divided into two aliquots: T3, serum sample stored at 5 °C for 48 h and the at -20 °C prior to the assay; T4, serum sample stored at -20 °C immediately prior to the assay. Progesterone concentrations were determined by RIA. No difference between T1 vs. T2 were observed, and neither between T3 vs. T4. Results indicated that milk samples may be kept at 28 °C air temperature and blood samples at 5 °C by 48 h prior to the assay.

**Key words:** Progesterone, methods of determination, milking cows, RIA.

**INTRODUCCION**

El reinicio de la función ovárica postparto puede ser determinado a través de los niveles de progesterona presentes en muestras de leche, suero sanguíneo y otras sustancias biológicas utilizando la técnica de radioinmunoanálisis (RIA), la cual se ha establecido que es de gran precisión y confiabilidad.

Para que este proceso de resultados confiables, las muestras deben ser de alta calidad, por lo que el método de colección, tratamiento y conservación es de mucha importancia.

La técnica sugerida para muestras de leche por la FAO/IAEA\* [14] consiste en la manipulación de la muestra a temperatura de refrigeración (4 °C) hasta su centrifugación a 300 rpm durante 10 - 15 min., utilizando dicromato de potasio o ázida de sodio como preservativo, luego almacenar las muestras de la leche descremada a -20 °C hasta el procesamiento por RIA\*\*. Para muestras de sangre, se sugiere separar inmediatamente el plasma a 3000 rpm durante 10 - 15 min y almacenar las muestras a -20 °C.

Se ha determinado que las concentraciones de progesterona en sangre decrecen significativamente a medida que aumenta el intervalo entre la colección de la muestra y el proceso de centrifugación, Reimers et al. [8], Brevet et al. [1], Pulido [7]. La disminución de la concentración de progesterona se debe a que existe una metabolización por parte de las células sanguíneas, la cual aumenta a medida que aumenta el tiempo, Pulido [7].

Estos procesos deben ser adaptados a nuestras condiciones ambientales; caracterizados en general por altas temperaturas y falta de servicios tales como electricidad y vialidad rural adecuada; dificultando esto su conservación *in situ* y prolonga el tiempo de traslado de las muestras a los centros de investigación.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la temperatura de conservación de las muestras de leche y suero durante las primeras 48 horas sobre la concentración de la progesterona.

## MATERIALES Y METODOS

El ensayo se realizó en dos haciendas del Estado Zulia. La primera correspondió a la Estación Experimental "El Laral", propiedad del FONAIAP\*\*\*, situada en el Municipio Mara. La topografía es plana susceptible a las inundaciones; suelos aluvionales de formación reciente; de regular a buena fertilidad y de origen calcáreo, Coplanarh [2]. La zona se caracteriza por ser un clima seco tropical, presentando una temperatura media anual de 28 °C y precipitación promedio de 920 mm, distribuidos en forma irregular. El pasto en la explotación es el alemán (*Echinochloa polystachya*) regado por bordas rectas. El rebaño es de raza Criollo Limonero. El sistema de reproducción es por inseminación artificial con semen de toros de la misma estación. Las vacas en producción se ordeñan dos veces al día sin apoyo del becerro.

La segunda finca fue "La Esperanza" propiedad de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia, la cual está situada en el Km 108 de la vía que conduce de Maracaibo a Machiques. La temperatura media anual es de 28 °C y la precipitación promedio de 1200 mm distribuidos bimodalmente de abril a junio y de agosto a noviembre. El rebaño es un mestizo con predominancia de Holstein y un componente indefinido de las razas criollas, Pardo Suizo, y Cebú (Mosaico Perijanero).

Se utilizaron un total de 48 vacas, 25 en la hacienda La Esperanza y 23 en la Estación Experimental "El Laral". Todas se encontraban en buenas condiciones de salud, desparasitadas, vacunadas según el plan sanitario de cada finca y con promedio de 102 ± 17,4 días de preñez.

Las muestras de leche (10 cc) se recolectaron del cuarto posterior derecho de la ubre, al inicio del segundo ordeño del día, obteniéndose una muestra suficiente para dividirla en dos alícuotas, previa adición de cuatro flotas de dicromato de potasio como preservativo, correspondiendo cada una a un tratamiento:

T1: Leche sin descremar, conservada a temperatura ambiente (28 °C) por 48 horas. Luego fue centrifugada a 3000 rpm (10 min) eliminando posteriormente la grasa por aspiración y almacenada a -20 °C hasta su procesamiento por RIA.

T2: Leche descremada es inmediatamente congelada a -20 °C hasta su procesamiento por RIA. Este procedimiento es el recomendado por la IAEA y se consideró como testigo en este trabajo.

Las muestras de sangre (10 cc) fueron tomadas de la vena yugular a través de un "vacutainer", sin anticoagulante, centrifugadas antes de 15 min a 3000 rpm por 15 min para separar el suero y éste dividido en dos alícuotas correspondiendo cada una a un tratamiento:

T3: suero sanguíneo almacenado con hielo (5 - 6 °C) por 48 horas, luego congelado a -20 °C hasta su procesamiento por RIA.

T4: suero sanguíneo almacenado inmediatamente a -20 °C hasta su procesamiento por RIA. Este tratamiento se tomó como testigo debido a que es el recomendado por la IAEA.

Todas las muestras se colocaron en viales de polipropileno se trasladaron hasta el laboratorio de RIA de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia.

Para la determinación de la progesterona se siguió la metodología de RIA (FAO/IAEA) [4].

Se realizó un análisis de varianza por el método de los mínimos cuadrados, considerando como variables indepen-

\* Food Agricultural Organization / International Atomic Energy Agency.

\*\* Radioimmunoassay

\*\*\* Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias.

dientes los tratamientos y razas y, como variables dependientes los niveles de progesterona en leche y suero sanguíneo. Se utilizó el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS [9].

El modelo matemático utilizado para describir las variables en estudio fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = u + T_i + R_j + (TxR)_{ij} + E_{jk}$$

donde:

$u$  = media general

$T_i$  = efecto del  $i$ -ésimo tratamiento

$R_j$  = efecto de la  $j$ -ésima finca.

$(TxR)_{ij}$  = efecto de la interacción del  $i$ -ésimo tratamiento por la  $j$ -ésima finca.

$E_{ijk}$  = error experimental.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Determinación de la progesterona en leche

En la TABLA I se presentan los promedios de niveles de progesterona con respecto a los diferentes tratamientos. En los resultados obtenidos, podemos observar que los valores más altos de concentración de progesterona se reportaron en el método 2, siendo utilizado en el ensayo como testigo, debido a que la leche fue descremada y congelada de manera inmediata a la colección; método recomendado para eliminar contaminantes.

TABLA I

#### MEDIAS CUADRATICAS ± DESVIACION ESTANDAR DEL ERROR PARA LOS NIVELES DE PROGESTERONA EN LECHE CON RESPECTO AL METODO UTILIZADO

Método ó Tratamiento	Nº obs.	Nivel de Progesterona en Leche (ng/ml)
1	48	2.35 ± 0.23
2	48	2.59 ± 0.23

El valor de concentración obtenido por el método 1, no muestra diferencias significativas con respecto al método 2 o testigo, y por tanto nos permite sugerir que pudiese ser utilizado con suficiente confianza. Es importante señalar que Ordoñez y col. [6], reportan el manejo de las muestras a temperatura ambiente, la cual fue de 18 °C, sin embargo las condiciones de este ensayo fueron de 28 °C promedio. Nachereiner et al. [5], reportan que la leche descremada puede ser conservada hasta por tres semanas a 37 °C preservada con azida de sodio sin que se observen cambios en la concentración de la progesterona. En nuestro caso fue conservada sin descremar.

La TABLA II nos permite observar los promedios en los niveles de progesterona, de acuerdo con la finca donde se encontraban los animales utilizados en el ensayo.

TABLA II

#### MEDIAS CUADRATICAS ± DESVIACION ESTANDAR DEL ERROR PARA LOS NIVELES DE PROGESTERONA EN LECHE CORRESPONDIENTES A LA FINCA

Finca	Nº obs.	Nivel de Progesterona en Leche (ng/ml)
La Esperanza	25	2.29 ± 0.23
El Laral	23	2.65 ± 0.22

ns

No se encontraron diferencias entre los valores obtenidos en las fincas que se analizaron, lo que es muy importante por cuanto añade confianza al método en prueba.

### Determinación de la progesterona en suero sanguíneo

Los resultados de la TABLA III evidencian que no existe diferencia significativa en los niveles de progesterona obtenidos en suero con respecto al método aplicado, implicando que las muestras pueden ser mantenidas refrigeradas por el tiempo de 48 horas previo a la congelación sin que ocurran cambios en la concentración de la hormona al momento de la determinación en el laboratorio.

García y Edqvist [3], señalan que la concentración de progesterona disminuye aceleradamente en las muestras sanguíneas sin separar, probablemente porque está siendo metabolizada a 20  $\alpha$ -dihydroprogesterona por la presencia de los eritrocitos; la separación del suero de las células rojas inhibe el metabolismo de la progesterona.

TABLA III

#### MEDIAS CUADRATICAS ± DESVIACION ESTANDAR DEL ERROR PARA LOS NIVELES DE PROGESTERONA EN SUERO CON RESPECTO AL METODO UTILIZADO

Método	Nº obs.	Nivel de Progesterona en Suero (ng/ml)
3	48	4.93 ± 0.22
4	48	4.75 ± 0.22

ns

Estos datos concuerdan con lo citado por Reimers et al. [8], Brevel y col. [1], y Pulido [7], quienes recomiendan la centrifugación inmediata de la muestra, para separar lo más rápido posible el suero de células sanguíneas evitando errores en la determinación de las concentraciones de la hormona.

TABLA IV

**MEDIAS CUADRATICAS ± DESVIACION ESTANDAR DEL ERROR PARA LOS NIVELES DE PROGESTERONA EN SUERO CON RESPECTO A LA FINCA**

Finca	Nº obs.	Nivel de Progesterona en Suero (ng/ml)
La Esperanza	25	4.48 ± 0.22
El Laral	23	5.21 ± 0.22

ns

Los datos arrojados en la TABLA IV, nos muestran que no hubo diferencia en las concentraciones séricas de progesterona en función de la variable finca.

**CONCLUSIONES**

Al hacer las comparaciones de los diferentes métodos para evaluar los niveles de progesterona tanto en leche como en sangre, podemos concluir que conservar las muestras de leche entera a temperatura ambiente (28 °C), durante 48 horas y descremarla luego para su congelación no altera la calidad de las muestras y permite una determinación confiable de la progesterona. Igualmente podemos conservar las muestras de suero sanguíneo por 48 horas a temperatura de refrigeración (5 °C) y luego congelarlas hasta ser procesadas en el laboratorio.

**AGRADECIMIENTO**

Los autores desean expresar su agradecimiento a las direcciones de las fincas La Esperanza (LUZ) y El Laral (FONAIAP), al Dr. Carlos González-Stagnaro y a la FAO/IAEA por su apoyo para la realización de este trabajo.

**REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

[1] Brevel, K.F.; Spitzer, J.C.; Giménez, T.; Henricks, D.M. and Gray, S. L. Effect of holding time and temperature of bovine whole blood on concentration of progesterone, estradiol - 17B and estrone in plasma and serum samples. *Theriogenology*. 30:613-627. 1988.

[2] Coplanarh. Inventario nacional de tierras. Región del Lago de Maracaibo. Región 1. Subregiones 1A, 1B, 1C. Publicación Nº 34. Caracas. 1974.

[3] García, M. and Edqvist, E. Progesterone determination and clinical examination of reproductive organs in purebred and crossbred female Zebu cattle. 33:1091-1103. 1990.

[4] Internacional Atomic Energy Agency. The FAO/IAEA. Progesterone RIA Kit A - 1400 Vienna, Austria, p. 8. 1988.

[5] Nachreiner, R. F.; Oschmann, S.J.; Edqvist, L.E. and Richards, J. I. Solid-phase radioimmunoassay (RIA) appropriate for use in developing countries. In: Nuclear and related techniques in animal production and health. IAEA. Vienna. pp. 653 - 659. 1988.

[6] Ordoñez, H.; Gatica, A.; Miranda, J. y Matamoros, R. Actividad ovárica durante el período posparto de vacas adultas y primerizas de doble propósito en Guatemala. In: Livestock Reproduction in Latin America. Proceeding of the final research Coordination meeting. Bogotá, 19-23. September. Joint FAO-IAEA. p. 159-165. 1990.

[7] Pulido, R.A. Establecimiento de la metodología para el manejo óptimo de muestras de sangre y leche de ganado cebú (*Bos indicus*) destinados a la determinación de progesterona por medio de radioinmunoanálisis. Post-Grado en Producción Animal. Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de México. México D. F. 1989.

[8] Reimers, T.J.; Mc Cann, J.P. and Cwan, R.G. Effects of storage time and temperatures on T3, T4, LH, Prolactin, Insulin, Cortisol and Progesterone Concentrations in blood Samples from cows. *J. Anim. Sci.* 57:683-691. 1993.

[9] Statistical Analysis System. SAS. User's guide: Basic. SAS. Institute Inc. Cary, North Carolina. U.S.A. 1988.