

01669

7

2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

METABOLISMO DE PROGESTERONA EN MUESTRAS
DE SANGRE DE GANADO F1 (HOLSTEIN X
INDOBASIL). EFECTO DEL TIPO DE
ANTICOAGULANTE, TIEMPO Y TEMPERATURA
DE INCUBACION PREVIOS A LA CENTRIFUGACION
SOBRE LOS NIVELES DE PROGESTERONA
EN PLASMA.

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRIA EN PRODUCCION ANIMAL

(reproducción animal)

P R E S E N T A I

IRERY YAKIMO DEBIJLRMAH MORENO FUENTES

ASESORES:

M.V.Z.PhD. LUIS ZARCO QUINTERO

M.V.Z.PhD. CARLOS GALINA HIDALGO

M.V.Z.M.P.A. ANGEL PULIDO ALBORES

MEXICO, D. F.

1995



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.

DEDICATORIA

A LA MEMORIA DE MI MADRE LUZ FUENTES DE MORENO †

Con gratitud por su inmenso amor, al demostrar ser una madre ejemplar y una gran mujer.

A LA MEMORIA DE ANTONIO HUMBERTO (MI HERMANO) †

Con admiración por su ejemplo como padre de familia y hermano.

A MI PADRE ANTONIO MORENO MARTINEZ

Con agradecimiento y admiración, por su fuerza para continuar al frente de su familia.

AL M. V. Z. SERGIO LUNA OROZCO

Con amor, porque es el sentimiento que nos mantiene unidos y por tal, siempre me ha apoyado.

A MIS HIJAS EVALUZ, YETLANEZI Y YOLOTZIN

Con amor, porque son el producto de la felicidad con mi esposo, y que Dios, con su gracia, me ha permitido concebirlas.

A MIS HERMANAS, HERMANO Y SOBRINOS

Con cariño, por perpetuar el recuerdo de mi madre quien nos enseñó a ser una familia unida.

A MIS AMIGAS

Yolanda y Mary Carmen. Con aprecio, porque con el paso de los años nuestra amistad se ha fortalecido y lo seguirá haciendo.

AL M. V. Z. CARLOS GALINA

Con agradecimiento, por su apoyo y confianza durante toda mi carrera, tanto como asesor de tesis, profesor y tutor de posgrado.

Es patente mi agradecimiento porque ha sido como un hermano mayor y un ejemplo a seguir como investigador.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco eternamente a Dios por permitirme SER.

A mis asesores, el Dr. Luis Zarco, Dr. Carlos Galina y Dr. Angel Pulido, por su apoyo, confianza y paciencia para la conclusión del proyecto.

Un agradecimiento especial para el Dr. Angel Pulido por su participación y apoyo en el análisis estadístico del trabajo de tesis y su constante empuje.

Al Dr. Andrés Ducoing, Gabriela Rivero, Patricia Vázquez, Gabriela Rúfz, Lorena y Rabindranath de la Fuente por su participación desinteresada en la realización del proyecto.

A Mariana Bernal, por ser mi amiga y apoyarme, ya que siempre estuvo dispuesta a ayudarme para que concluyera el trabajo lo más pronto posible.

Al Dr. Eduardo Posadas que además de ser parte de mi jurado, me apoyó ampliamente en un proyecto de tesis previo al presente, y que por diversas razones no se pudo llevar a cabo. Sin embargo, me brindó amplias facilidades para el trabajo experimental del proyecto, ya que cuando se realizó la tesis él estaba a cargo del Centro experimental.

A todo el personal del Centro de Investigación Enseñanza y Extensión en Ganadería Tropical (C.I.E.E.G.T.) por su colaboración y ayuda desinteresada.

Al personal del Departamento de Reproducción de la F.M.V.Z. por su apoyo, muy especialmente a la Dra. Clara Murcia por procesar las muestras sanguíneas, asimismo a Susana y Beto.

A mi jurado integrado por los Doctores: Javier Valencia, Rosa Ma. Páramo, Ivette Rubio, Eduardo Posadas y Carlos Galina.

INDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCION	3
II. REVISION DE LITERATURA.....	5
III. MATERIAL Y METODOS	11
IV. RESULTADOS	16
V. DISCUSION	36
VI. LITERATURA CITADA	39

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Análisis de varianza de los efectos del tiempo, temperatura de incubación y uso de tres diferentes anticoagulantes sobre los niveles plasmáticos de progesterona.....	23
Cuadro 2. Concentraciones plasmáticas de progesterona (ng/ml) en muestras manejadas con heparina a diferentes temperaturas	24
Cuadro 3. Concentraciones plasmáticas de progesterona (ng/ml) en muestras manejadas con citrato de sodio a diferentes temperaturas	25
Cuadro 4. Concentraciones plasmáticas de progesterona (ng/ml) en muestras manejadas con EDTA a diferentes temperaturas	26
Cuadro 5. Análisis de varianza de los efectos del tiempo, temperatura de incubación y uso o ausencia de anticoagulante sobre los niveles de progesterona medidos en plasma o suero ...	27
Cuadro 6. Concentraciones séricas de progesterona (ng/ml) en muestras manejadas sin anticoagulante a diferentes temperaturas	28
Cuadro 7. Concentraciones plasmáticas de progesterona (ng/ml) en muestras manejadas con fluoruro de sodio a diferentes temperaturas	29
Figura 1. Efecto del tiempo de incubación sobre las concentraciones de progesterona en plasma, provenientes de muestras de sangre con diferentes concentraciones iniciales de la hormona e incubadas con heparina a 4°C (A), 17°C (B) y 37°C (C)	30
Figura 2. Efecto del tiempo de incubación sobre las concentraciones de progesterona en plasma, provenientes de muestras de sangre con diferentes concentraciones iniciales de la hormona e incubadas con citrato de sodio a 4°C (A), 17°C (B) y 37°C (C)	31
Figura 3. Efecto del tiempo de incubación sobre las concentraciones de progesterona en plasma, provenientes de muestras de sangre con diferentes concentraciones iniciales de la hormona e incubadas con EDTA a 4°C (A), 17°C (B) y 37°C (C)	32
Figura 4. Efecto del tiempo de incubación sobre las concentraciones de progesterona en suero, provenientes de muestras de sangre con diferentes concentraciones iniciales de la hormona e incubadas sin anticoagulante a 4°C (A), 17°C (B) y 37°C (C).....	33
Figura 5. Efecto del tiempo de incubación sobre las concentraciones de progesterona en plasma, provenientes de muestras de sangre con diferentes concentraciones iniciales de la hormona e incubadas con fluoruro de sodio a 4°C (A), 17°C (B) y 37°C (C)	34

RESUMEN

MORENO FUENTES IRERY YAKIMO DEBIILLRMAH. Metabolismo de progesterona en muestras de sangre de ganado F₁. Efecto del tipo de anticoagulante, tiempo y temperatura de incubación previos a la centrifugación sobre los niveles de progesterona detectables en plasma. (Bajo la dirección de los M. V. Z. Luis Zarco Quintero, Carlos Galina y Angel Pulido Albores). Con el objeto de determinar el efecto del manejo de la muestra sanguínea sobre los valores de progesterona, se realizaron dos experimentos. El primero fue determinar el efecto del tipo de anticoagulante (heparina, citrato de sodio y ácido etilén-diamino tetraacético (EDTA)), tiempo y temperatura de incubación en muestras sanguíneas sobre los niveles de progesterona cuantificados en plasma sanguíneo. Se utilizaron 7 vacas F₁ (Holstein x Indobrasil) con cuerpo lúteo funcional. De cada vaca se obtuvieron 3 muestras de 150 ml. de sangre, los cuales se colectaron en matraces, conteniendo uno heparina, otro citrato de sodio y el último EDTA. La sangre de cada matraz se fraccionó en 3 grupos de 16 alícuotas. Cada grupo se almacenó a diferente temperatura: en refrigeración a 4 °C, a temperatura ambiente (aproximadamente a 17 °C) y en horno de incubación a 37°C. De las 16 alícuotas de cada grupo se centrifugó una inmediatamente después de su obtención, una cada media hora hasta completar 6 horas, y a las 8, 12 y 24 horas posteriores a la obtención de la muestra. El plasma obtenido se congeló a -20°C hasta procesarse por radioinmunoanálisis. La concentración promedio inicial de progesterona en muestras de plasma obtenido con heparina fue de 6.6 ng/ml, disminuyendo significativamente ($P < 0.05$) después de incubar la muestra por 2 horas a 17°C (5.5 ng/ml) y 37°C (5.3 ng/ml) a 4°C no se observó tal diferencia en 24 horas. En el caso del citrato de sodio, el valor promedio inicial de la hormona fue de 6.3 ng/ml, disminuyendo significativamente ($P < 0.05$), a las 2.5 horas a 17°C (4.8 ng/ml) y a 3 horas a 37°C (4.6 ng/ml), sin embargo a 4°C no se observó diferencia. Para muestras manejadas con EDTA el valor inicial fue de 5.9 ng/ml, observandose una disminución significativa de

($P < 0.05$) a las 4.5 horas almacenando a 4°C (4.4 ng/ml) a 2 horas a 17°C (4.3 ng/ml) y a 37°C (4.4 ng/ml). No se encontró diferencia entre el tipo de anticoagulante. El segundo experimento tuvo como objetivo comparar los valores de progesterona en plasma y suero utilizando una muestra con fluoruro de sodio y otra sin anticoagulante. En las muestras sin anticoagulante la concentración promedio inicial en suero fue de 5.1 ng/ml, se observó una diferencia significativa ($P < 0.05$) a las 4.5 horas (3.4 ng/ml) a 4°C, y para de 17°C (3.1 ng/ml) y 37°C (3.4 ng/ml) a las 2.5 horas en ambas temperaturas. En el caso del fluoruro de sodio la concentración inicial fue de 4.2 ng/ml y no observó diferencia significativa en los valores de progesterona durante las 24 horas de incubación a las 3 diferentes temperaturas, considerándose que este es el anticoagulante de elección en caso de cuantificar progesterona cuando no se tiene el material necesario para centrifugar la muestra de inmediato.

I. INTRODUCCION.

La actividad ovárica en la hembra bovina puede ser determinada por diversos métodos, posiblemente el más utilizado y práctico es la palpación rectal, por medio de la cual es factible determinar las estructuras presentes en los ovarios, así como las características del útero y el cérvix (Holy, 1987). Otro método empleado es la observación de los ovarios por medio de laparoscopia (Holland y col., 1981). También se ha utilizado la técnica de ultrasonido (Kito y col., 1986). Estos dos últimos métodos presentan la desventaja del costo del equipo, y la necesidad de contar con personal capacitado. Además, son imprácticos para utilizarlos rutinariamente. Otra alternativa para evaluar la actividad ovárica es mediante la determinación de las concentraciones circulantes de diferentes hormonas, lo cual se realiza mediante radioinmunoanálisis o enzimoimmunoanálisis (Linhart y col., 1986; Srikandakumar y col., 1986). Específicamente, las mediciones de progesterona permiten realizar un seguimiento de la actividad del cuerpo lúteo. Es posible medir esta hormona en diferentes fluidos corporales, como leche, sangre (plasma y suero) (Oltner y Edqvist, 1982; Grunert y col., 1986).

Generalmente es preferible trabajar con plasma que hacerlo con suero, ya que la separación del plasma es más fácil que la del suero. Esta separación se hace mediante la centrifugación de sangre con anticoagulante, removiendo con una pipeta el sobrenadante (plasma), el cual es entonces congelado y almacenado hasta ser analizado. Sin embargo existen evidencias en la literatura de que la concentración de progesterona detectada en plasma puede verse afectada por diversos factores que causan alteraciones en la muestra durante su obtención y almacenamiento (Owens y col., 1980; Oltner y Edqvist, 1982; Reimers y col., 1983; Vahdat y col., 1981). Estas alteraciones consisten en una disminución en las concentraciones de progesterona presentes en la muestra debido al metabolismo de la misma por parte de los eritrocitos (Molen van der y Groen, 1968). Se ha informado que el ritmo de

destrucción de la progesterona aumenta en relación directa a la temperatura de almacenamiento de las muestras de sangre (Vahdat y col., 1979; Vahdat y col., 1981; Pulido y col., 1991), y que el uso de diferentes anticoagulantes puede afectar este metabolismo (Vahdat y col., 1981; Pulido y col., 1991). En este sentido, se han utilizado diferentes tipos de anticoagulantes, tales como heparina (Oltner y Edqvist, 1982; Breuel y col., 1988; Owens y col., 1980; Okada y col., 1990; Pulido y col., 1991), EDTA (Vahdat y col., 1979; Vahdat y col., 1981), citrato de sodio (Owens y col., 1980; Vahdat y col., 1981) y fluoruro de sodio (Vahdat y col., 1984; Pulido y col., 1991) y, aunque algunos autores han comparado el efecto de dos anticoagulantes diferentes, no se ha realizado ningún proyecto en el que se comparen todos ellos, bajo las mismas condiciones de campo.

El objetivo de este trabajo es comparar el metabolismo de progesterona en muestras de sangre bovina obtenidas utilizando Heparina, Citrato de sodio, EDTA o Fluoruro de sodio como anticoagulantes. Adicionalmente se determinará el efecto de la temperatura de incubación sobre la destrucción de progesterona en presencia de cada anticoagulante.

II. REVISION DE LITERATURA.

El ciclo estrol del ganado bovino, evaluado de acuerdo a las estructuras presentes en los ovarios, se puede dividir en dos fases: la fase folicular y la fase lútea. Estas dos fases a su vez, desde el punto de vista hormonal se encuentran bajo la influencia de los estrógenos y progesterona, respectivamente (Hafez, 1987).

Durante la fase lútea, la estructura ovárica dominante es el cuerpo lúteo (Cl), el cual produce progesterona (P4). Este Cl se forma después de la ovulación y es posible determinar su presencia por medio de palpación rectal (Holy, 1987).

El Cl es el resultado de la hipertrofia y luteinización de las células de la granulosa del folículo debido a la acción de la hormona luteinizante (LH) secretada por la adenohipófisis. En la vaca, el Cl incrementa su peso y contenido de progesterona entre los días 3 y 12 del ciclo estrol, permaneciendo relativamente constante hasta el día 16 del mismo que es cuando ocurre la regresión del cuerpo lúteo (Hafez, 1987).

Los niveles séricos y plasmáticos de progesterona pueden medirse por análisis de doble dilución isotópica, cromatografía de gas y radioinmunoanálisis (RIA) (Morato, 1980). Las técnicas modernas de RIA para progesterona no requieren cromatografía, ni extracción de la fase lípida lo cual ha hecho que la técnica sea más rápida y económica, por lo que el uso del RIA se ha popularizado a nivel mundial (Srikandakumar y col., 1986).

2.1 Radioinmunoanálisis.

El radioinmunoanálisis se utiliza para medir cantidades muy pequeñas de algunas sustancias, principalmente hormonas. El principio de este método es la competencia de una hormona marcada con material radiactivo, conocido como trazador, y la misma hormona no marcada, por los que los sitios de unión de un anticuerpo específico contra la hormona a analizar. La hormona marcada es esencialmente idéntica a la hormona que se quiere medir en

la muestra (Libertun, 1980). Al realizar el radioinmunoanálisis se mezclan una cantidad conocida de la hormona marcada, una cantidad conocida de anticuerpos y la muestra conteniendo una concentración desconocida de la hormona que se quiere medir. Estos componentes interactúan, compitiendo el trazador y la hormona presente en la muestra por los sitios de unión del anticuerpo. Posteriormente se realiza una separación de los componentes unidos al anticuerpo (fase unida), y los que no alcanzan lugar en los sitios del anticuerpo quedaron libres (fase libre). Entonces puede medirse la radioactividad presente ya sea en la fase libre o en la fase unida, la cual será proporcional a la cantidad de la hormona no marcada presente en la muestra. El valor obtenido se compara con los valores obtenidos mediante una "curva estandar" elaborada con cantidades conocidas de la hormona no marcada (Boyd y Herzberg, 1976).

2.2 Aplicaciones de la cuantificación de progesterona.

Generalmente para determinar que un animal está ciclando se realiza la palpación rectal, ya que de esta manera se diagnostica el cuerpo lúteo, sin embargo dicha estructura no se determina correctamente en el 100% de las vacas. Al respecto, Dawson (1975) palpó un grupo de vacas, mismas que posteriormente se sacrificaron para determinar el índice de error en el diagnóstico de las estructuras ováricas, encontrando una precisión del 89% en la determinación del cuerpo lúteo. Por otro lado, al comparar la palpación del cuerpo lúteo por vía rectal con la existencia de un cuerpo lúteo funcional mediante la cuantificación de los niveles de progesterona, se ha encontrado en vacas Holstein un 84% de precisión en la palpación (Villa y col., 1978, Revah y col., 1990) y en vacas Indobrasil alrededor del 80% (Moreno y col., 1986; Rubio y col., 1989). Ott y col. (1982) encontraron que el 18% de 124 vacas fueron diagnosticadas erróneamente con cuerpo lúteo y el 37% sin él. Asimismo Watson, y Munro (1980) estudiaron la consistencia y tamaño del cuerpo lúteo con respecto a su funcionalidad, diagnosticaron el 85% de animales con cuerpo lúteo y encontraron que no había relación entre el tamaño y la consistencia de dicha estructura, con respecto a su funcionalidad.

La determinación de los niveles de progesterona, tanto en leche como en sangre, a través del RIA, es un método más preciso para evaluar el estado del cuerpo lúteo de las vacas (Elmore, 1982). Además, como esta técnica es cuantitativa, no solo permite determinar la presencia o ausencia del cuerpo lúteo funcional, sino también evaluar el grado de funcionalidad del mismo (Srikandakumar y col., 1986).

Debido a estas ventajas, la técnica se ha utilizado en muchos estudios. Por ejemplo, Grunert y col. (1986) midieron los niveles de progesterona en leche para diferenciar entre animales en anestro y animales ciclando después del parto.

Los niveles de progesterona también se han determinado para corroborar el efecto lúteo de la prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) (Beal y col., 1980; Moreno y col., 1986; Revah y col., 1989) y para realizar un diagnóstico de gestación precoz (Villa y col., 1978; Gowan y Etches, 1979; Kay col., 1986; Pennington y col., 1986), así como la comparación de niveles hormonales entre animales gestantes y no gestantes (Shemesh y col., 1968).

2.3 Alteración de las concentraciones de progesterona durante la obtención y almacenamiento de la muestra.

Algunos autores han determinado las concentraciones de progesterona durante la fase lútea del ciclo estral de los bovinos mantenidos en condiciones tropicales, encontrando resultados contradictorios. Por ejemplo, Adeyemo y Heath (1980) han mencionado que los niveles de progesterona son mayores a 5 ng/ml, mientras que Vaca y col., (1983) encontraron que raramente excedían de 3 ng/ml., valores similares encontraron Agarwal y col. (1977). Pulido y col. (1991) han sugerido que esta discrepancia podría deberse simplemente al manejo de la muestra, ya que en las condiciones en que se realizan los trabajos en el trópico es difícil mantener las muestras en refrigeración y centrifugarlas inmediatamente después de su obtención. En efecto, algunos trabajos mencionan que los niveles plasmáticos de progesterona en sangre completa de la vaca disminuyen casi a cero 1 a 2 días después de

haberse obtenido la muestra y permanecido almacenadas a temperatura ambiente (Oltner y Edqvist, 1982). Vahdat y col. (1981) manejaron muestras de vacas Holstein a 3 diferentes temperaturas (4° C, 22° C y 37° C), y separaron el plasma del paquete celular a diversos tiempos después de su obtención. En dichos estudios se encontró que los valores de progesterona empezaron a disminuir casi inmediatamente después de su colección al incubar la sangre a 22° C y 37° C. Pulido y col., (1991) encontraron que en muestras de sangre heparinizada mantenidas a 37° C se produce una reducción significativa en las concentraciones de progesterona después de tan solo 1 hora de incubación.

El metabolismo de la progesterona en las muestras de sangre también puede verse afectado por diversas sustancias, especialmente por anticoagulantes que son agregadas a las muestras. Así, en un estudio se compararon los niveles de progesterona en muestras con o sin anticoagulante, mantenidas a 4 y 40° C (Vahdat y col., 1979). En dicho trabajo se observó que al almacenar las muestras con anticoagulante a 40° C, los niveles plasmáticos de progesterona disminuyeron de un valor inicial de 6.6 ng/ml a 1.7 y 2.8 ng/ml después de 6 y 24 horas respectivamente. Sin embargo, las muestras sin anticoagulante manejadas bajo las mismas condiciones mostraron valores de 3.9 y 4.4 ng/ml a las 6 y 24 horas respectivamente, después de un valor inicial de 6.1 ng/ml. De la misma manera, Reimers y col. (1983) encontraron que al colectar las muestras con EDTA o sin anticoagulante e incubarlas por 24 horas a 4° C, la concentración media de progesterona disminuyó un 55% y 26% respectivamente. Sin embargo, cuando las muestras se almacenaron a temperatura ambiente, a las 24 horas de incubación la concentración de progesterona en muestras con EDTA disminuyó un 92%, mientras que en suero solo disminuyó un 60% a las 24 horas de incubación.

Owens y col. (1980) realizaron un estudio en el cual se midieron los niveles sanguíneos de progesterona en muestras con heparina o citrato de sodio como anticoagulantes, y en muestras sin anticoagulante, observando que al incubar a 24° C por 24 horas los valores de

progesterona habfan disminuido un 37% en suero, comparado con el 77 y 75% para heparina y citrato de sodio, respectivamente. Los niveles en suero disminuyeron significativamente hasta pasadas las 12 horas de incubación, mientras que en las muestras manejadas con heparina y citrato de sodio las concentraciones habfan disminuído significativamente después de tan solo 3 horas de incubación.

Debido a que la progesterona presente en la muestra es degradada por los eritrocitos (Vahdat y col., 1984), el uso de anticoagulantes permite mejor el acceso de la progesterona a los mismos, mientras que la coagulación en ausencia de anticoagulantes dificulta la degradación de la progesterona.

Por otro lado, Pulido y col. (1991) midieron progesterona en vacas Gyr utilizando heparina o fluoruro de sodio como anticoagulantes, y comparado con muestras sin anticoagulante.

Las muestras se incubaron a 4° C, 17° C y 38° C, encontrándose en las muestras sin anticoagulante un valor inicial de 8.3 ng/ml, que disminuyó significativamente a las 24, 4 y 3 hrs al incubarlas a 4° C, 17° C y 38° C respectivamente. En las muestras heparinizadas los valores iniciales disminuyeron significativamente a las 12, 4.5 y 3 hrs al incubar a 4, 17 y 38° C respectivamente. Sin embargo, en las muestras manejadas con fluoruro de sodio los valores nunca disminuyeron en forma significativa cuando se incubaron a 4 y 38°C , y al incubarlas a 17° C los valores de progesterona solo disminuyeron después de 24 horas.

De acuerdo al trabajo de Pulido y col. (1991) el anticoagulante de elección es el fluoruro de sodio. Sin embargo, esta substancia presenta la desventaja de que es difícil de disolver en la muestra, lo que en ocasiones resulta en la coagulación de la sangre, dificultando su utilización masiva, de ahí la importancia de evaluar otros anticoagulantes que tengan un manejo más fácil. Aunque otros autores han evaluado la heparina (Owens y col., 1980; Vahdat y col., 1981; Oltner y Edqvist, 1982; Wiseman y col., 1983; Breuel y col., 1988; Choi y col., 1989; Okada y col., 1990), el citrato de sodio (Owens y col., 1980), el

EDTA (Vahdat y col., 1979, 1981, 1984; Reimers y col., 1983) y fluoruro de sodio (Vahdat y col., 1984; Pulido y col., 1991), en ninguna publicación se han comparado los 4 anticoagulantes bajo las mismas condiciones, por lo que es difícil emitir un juicio definitivo sobre la aparente ventaja del fluoruro de sodio (Pulido y col., 1991) en comparación a lo publicado por otros autores con respecto a los otros anticoagulantes. Por esta razón en el presente trabajo se evaluaron el ácido etilén-diamino-tetraacético (EDTA), citrato de sodio, heparina y fluoruro de sodio, comparando en un experimento los tres primeros anticoagulantes y en otro experimento el fluoruro de sodio con muestras de sangre sin anticoagulante para la obtención del suero.

OBJETIVOS:

- a) Determinar el efecto de la temperatura de incubación durante el almacenamiento de muestras sanguíneas de ganado bovino sobre los niveles de progesterona medidos en plasma y suero sanguíneo.
- b) Determinar el efecto del tiempo de almacenamiento de la muestra sanguínea previo a la centrifugación para su procesamiento por RIA.
- c) Evaluar el efecto del uso de diferentes anticoagulantes sobre el metabolismo de la progesterona presente en la muestra .

III. MATERIAL Y METODOS.

El trabajo se realizó en el Centro de Investigación, Enseñanza y Extensión en Ganadería Tropical (C.I.E.E.G.T.), perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. El Centro está ubicado a 360 Km de la ciudad de México, sobre la carretera México-Nautla, a 5 Km de la ciudad de Martínez de la Torre, a 20° 4' latitud norte y 97° 3' longitud oeste, a una altitud de 151 metros sobre el nivel del mar, con una temperatura media anual de 24° C y una precipitación pluvial de 1743.4 mm, con un clima caliente húmedo con lluvias todo el año (García, 1973).

Se realizaron 2 experimentos: Experimento I: Estuvo encaminado hacia el manejo de muestras sanguíneas con 3 diferentes anticoagulantes (heparina, ácido etilén-diamino-tetraacético (EDTA) y citrato de sodio), para obtención de plasma sanguíneo. Experimento II: Se realizó con el objeto de manejar 2 grupos de muestras, un grupo con anticoagulante (fluoruro de sodio) y otro sin anticoagulante, para obtención de plasma y suero, respectivamente.

Experimento I:

Se utilizaron 7 vacas F1 (Holstein x Indobrasil), 5 de ellas gestantes y 2 en fase de diestro (día 10-14). Se verificó que todos los animales seleccionados tuvieran concentraciones de progesterona mayores a 1 ng/ml.

De cada vaca se obtuvieron 150 ml de sangre en un matraz que contenía 1.5 ml de heparina (dosis de 0.1 ml/10 ml. de sangre), 150 ml en otro matraz con 7.5 ml de EDTA y otros 150 ml, en un matraz con 17 ml de citrato de sodio.

La sangre de cada matraz se subdividió a su vez en 46 alícuotas, una fue centrifugada inmediatamente para separar el plasma (tiempo cero). Las 45 restantes se dividieron en 3 grupos de 15 alícuotas cada uno. Uno de los grupos fue almacenado en refrigeración a 4°

C, otro a temperatura ambiente (aproximadamente 17° C) y otro en un horno de incubación a 37° C. De las 15 alicuotas de cada grupo se centrifugó una cada media hora durante las primeras 6 horas, y el resto a las 8, 12 y 24 horas de su obtención. La centrifugación se hizo a 2500 rpm durante 10 minutos. Una vez obtenido el plasma éste se almacenó a -20° C hasta que se procesó por duplicado mediante Radioinmunoanálisis en fase sólida (Pulido y col., 1991).

Experimento II:

Se utilizaron 4 vacas F1 (Holstein x Indobrasil) en fase de diestro. De cada vaca se obtuvieron 160 ml de sangre en un matraz conteniendo 1.6 g de fluoruro de sodio (dosis de 10 mg/ml de sangre), y 160 ml en un matraz sin anticoagulante. La distribución de las alicuotas, almacenamiento de muestras a diferentes temperaturas y tiempos de centrifugación fueron iguales a los del experimento I.

Análisis estadístico:

Los efectos del tiempo de incubación, temperatura de incubación y anticoagulante sobre las concentraciones de progesterona fueron evaluados en cada experimento mediante análisis de varianza de tres factores en un diseño de bloques al azar, utilizando como bloques a las vacas:

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

donde:

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

M = 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_i = Efecto del i-ésimo bloque (vaca).

T_{Cij} = 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-ésima temperatura y k-ésimo anticoagulante.

E_{ijklm} = Error residual.

Se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni (Neter y Wasserman, 1974) para determinar para cada anticoagulante y temperatura de incubación 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 la obtención de la sangre.

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 a la que la muestra se incubó antes de centrifugarla. Para ambos experimentos se realizó el siguiente diseño:

$$Y_i = B_0 + B_1 T_i + B_2 T T_i + B_3 C_i + B_4 C C_i + B_5 V_i + B_6 V V_i + B_7 T C_i + B_8 V T_i + B_9 V C_i + B_{10} V T C_i + E_i$$

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 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 de la muestra.

B_7 , es un coeficiente para 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 coeficiente para los efectos de la interacción del valor inicial con el tiempo y temperatura de incubación.

Ti_1 = Tiempo de incubación de la i -ésima alícuota (horas).

TTi_2 = Tiempo de incubación de la i -ésima alícuota elevado al cuadrado.

Ci_3 = Temperatura de incubación de la i-ésima alícuota (grados centígrados).

CCi_4 = Temperatura de incubación de la i-ésima alícuota elevado al cuadrado.

Vi_5 = 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).

VVi_6 = Concentración inicial de progesterona de la i-ésima alícuota elevado al cuadrado.

$Ti Ci_7$ = Interacción del tiempo por la temperatura de incubación.

$Vi Ti_8$ = Interacción de la concentración inicial por el tiempo de incubación.

$Vi Ci_9$ = Multiplicación del valor inicial por la temperatura de incubación.

$VViCi_{10}$ = Multiplicación del valor inicial por el tiempo y por la temperatura de incubación.

E = Error residual.

En cada caso se utilizó el método de regresión múltiple escalonada (stepwise) para decidir cuales de los parámetros del modelo general se incluyeron en la ecuación final (Neter y Wasserman, 1974). Se utilizó el paquete estadístico "Statistics Package for Social Sciences" (SPSS).

IV. RESULTADOS

En el Cuadro 1 se muestra el análisis de varianza, donde se observa que los efectos del tiempo, temperatura, anticoagulante, valor inicial y tiempo por temperatura son altamente significativos ($P < 0.0001$), sin embargo no hubo diferencia en la interacción entre tiempo con anticoagulante, así como en la temperatura con el anticoagulante, y las interacciones del tiempo con la temperatura y anticoagulante.

En el Cuadro 2 se muestran los valores de progesterona a diferentes tiempos en las muestras manejadas con heparina incubadas a 3 diferentes temperaturas. Se observa que el valor de progesterona presente en la muestra disminuye conforme transcurre el tiempo a cualquier temperatura de incubación, pero el descenso es más rápido entre mayor es la temperatura. En las muestras incubadas a 17 y 37° C, la progesterona se redujo significativamente ($P < 0.05$) con respecto al valor inicial después de 2 horas de incubación. Sin embargo, al incubar las muestras de plasma a 4° C se observa una reducción en las cantidades con respecto al valor inicial, pero esta reducción solamente fue significativa después de incubar por 24 horas. A partir de las 4 horas, las muestras manejadas a 17 y 37° C fueron significativamente menores ($P < 0.05$) al valor inicial de las muestras almacenadas a 4° C.

En el Cuadro 3 se muestran los valores plasmáticos de progesterona en muestras manejadas con citrato de sodio a 4, 17 y 37° C. Se observa que en las muestras incubadas a 4° C solamente hubo una reducción significativa con respecto al valor inicial después de incubar por 24 horas. En las muestras mantenidas a 17° C hubo una reducción significativa ($P < 0.05$) a las 2.5 horas y en las muestras manejadas a 37° C se observó a las 3 horas. Los valores en las muestras mantenidas a temperatura ambiente (17° C) y a 37° C fueron significativamente menores a los de las muestras refrigeradas a partir de las 4.5 horas de incubación ($P < 0.05$).

En el Cuadro 4 se muestran los valores plasmáticos de progesterona en muestras manejadas con EDTA a 4, 17 y 37°C. A diferencia de las muestras manejadas con heparina y citrato de sodio, en las cuales a 4°C solo hubo reducciones significativas después de 24 horas de incubación, en el caso de EDTA los valores iniciales disminuyeron significativamente ($P < 0.05$) a las 4.5 horas de incubación en muestras refrigeradas. En las muestras mantenidas a 17 y 37°C los valores decrecieron significativamente a las 2 horas. Las muestras mantenidas a 17°C tuvieron concentraciones significativamente menores a la de las muestras refrigeradas a partir de 5.5 horas de incubación y las mantenidas a 37°C tuvieron concentraciones menores a las de las muestras refrigeradas a partir de las 4 horas de incubación.

Con respecto al modelo de regresión múltiple, en el caso de muestras trabajadas con heparina y citrato de sodio, los únicos términos que no tuvieron efecto significativo fueron las interacciones del tiempo y el valor inicial con la temperatura, quedando la ecuación como

$$Y_i = B_0 + B_1 T_{i1} + B_2 TT_{i2} + B_3 C_{i3} + B_4 CC_{i4} + B_5 V_{i5} + B_6 VV_{i6} + B_7 TC_{i7} + E_i$$

En el caso del EDTA el único término que no tuvo efecto fue la interacción entre tiempo, temperatura y valor inicial, quedando:

$$Y_i = B_0 + B_1 T_{i1} + B_2 TT_{i2} + B_3 C_{i3} + B_4 CC_{i4} + B_5 V_{i5} + B_6 VV_{i6} + B_7 TC_{i7} + B_8 TV_{i8} + B_9 CV_{i9} + E_i$$

En el caso de la heparina la ecuación de regresión resultante fue la siguiente:

$$Y = -0.09 - 0.33 T + 0.01 TT - 0.14 C + 0.002 CC + 1.7 V - 0.07 VV - 0.0006 TCV$$

El coeficiente de correlación múltiple en esta ecuación fue de 0.90 ($P < 0.01$) y el de determinación de 0.82; lo que indica que los niveles de progesterona medidos en plasma

utilizando heparina, después de incubar por "T" horas a "C" grados centígrados una muestra con una concentración inicial de "V" ng/ml de progesterona, se explican en un 82% por la ecuación.

En la Figura 1 se muestra la representación gráfica del comportamiento de la progesterona en las muestras de plasma manejadas con heparina, a través del tiempo y almacenadas a 4, 17 y 37°C.

En el caso del citrato de sodio las variables incluidas fueron los valores lineales y cuadráticos del tiempo, temperatura y el valor inicial, así como la interacción del tiempo con la temperatura y el valor inicial, quedando la ecuación:

$$Y = 0.62 - 0.20 T + 0.01 TT - 0.14 C + 0.003 CC + 1.2 V - 0.02 VV - 0.0007 TCV$$

El coeficiente de correlación múltiple en esta ecuación fue el de 0.90 ($P < 0.01$) y el coeficiente de determinación de 0.82, lo que indica que los niveles de progesterona medidos en el plasma manejado con citrato de sodio después de incubar por "T" horas a "C" grados centígrados una muestra con una concentración inicial de "V" ng/ml de progesterona se explica en un 82% por la ecuación.

En la Figura 2 se muestra la representación a través del tiempo del comportamiento de progesterona en las muestras manejadas con citrato de sodio y almacenadas a 4, 17 y 37°C. Se puede observar en las 3 gráficas la disminución de los valores de progesterona, a partir de la muestra inicial; no obstante, cuando las muestras se manejaron a 4°C (Figura 2A) la disminución no fue tan marcada al finalizar el período de incubación en comparación a las muestras manejadas a 17°C (Figura 2B) y 37°C (Figura 2C) siendo más evidente en esta última.

En el análisis de regresión las variables incluidas fueron los valores lineales y cuadráticos del tiempo, temperatura y el valor inicial, asimismo la interacción del tiempo con la temperatura: el tiempo con el valor inicial y de la temperatura con el valor quedando la ecuación:

$$Y = 1.88 - 2.9 T + 0.013 TT - 0.09 C = 0.002 CC + 2.17 V - 0.11 VV - 0.001 TC - 0.02 VT - 0.0036 VC$$

El coeficiente de correlación múltiple en esta ecuación fue el 0.94 ($P < 0.01$) y el coeficiente de determinación de 0.88; lo que indica que los niveles de progesterona medidos en plasma manejado con EDTA después de incubar por "T" horas a "C" grados centígrados una muestra con una concentración inicial de "V" ng/ml de progesterona, se explica en un 88% por la ecuación.

En la Figura 3 se encuentra la representación gráfica del comportamiento de la progesterona en las muestras de plasma manejadas con EDTA, a través del tiempo de incubación y almacenadas a 4, 17 y 37°C. Se observa en las 3 gráficas que conforme

transcurre el tiempo de incubación los valores de la progesterona van disminuyendo, sin embargo, a diferencia de los otros anticoagulantes, la reducción de los valores es drástica en las 3 temperaturas.

EXPERIMENTO II.

En el Cuadro 5 se muestra el Análisis de Varianza del experimento II, donde se muestra que el efecto del tiempo, temperatura, anticoagulante, valor inicial, así como la interacción del tiempo con el anticoagulante fueron altamente significativos ($P < 0.0001$). También fue significativa ($P < 0.05$) la interacción tiempo por temperatura por anticoagulante. No existió efecto significativo de las interacciones del tiempo con la temperatura, temperatura con anticoagulante, así como tiempo con temperatura.

En el Cuadro 6 se muestran los valores séricos de progesterona en las muestras manejadas sin anticoagulante a 3 diferentes temperaturas de incubación: Se observa en las muestras manejadas a 17 y 37°C que los valores de progesterona disminuyeron significativamente ($P < 0.05$) con respecto al valor inicial al transcurrir 2.5 horas de incubación, a diferencia de las muestras refrigeradas en donde se observó una reducción significativa de la hormona a las 4.5 horas. A las 3.5 horas y a las 5.5 horas los valores de progesterona fueron significativamente menores ($P < 0.05$) en las muestras mantenidas a 17°C que en las muestras refrigeradas.

En el Cuadro 7 se muestran los valores plasmáticos de progesterona en las muestras manejadas con fluoruro de sodio a 3 diferentes temperaturas de incubación. Se puede observar que las cantidades de progesterona varían poco en el transcurso de 24 horas de incubación, y nunca se encontraron diferencias significativas con respecto al valor inicial.

Para el análisis de regresión de las concentraciones de progesterona en las muestras trabajadas sin anticoagulante el término que no tuvo efecto fue el tiempo con la temperatura de

incubación, siendo:

$$Y_i = B_0 + B_1 T_{i_1} + B_2 T T_{i_2} + B_3 C_{i_3} + B_4 C C_{i_4} + B_5 V V_{i_5} + B_6 T C V_{i_6} + E_i$$

Las variables incluidas fueron los valores lineales y cuadrático del tiempo y la temperatura, así como el cuadrático del valor inicial, así como la interacción triple tiempo por temperatura por valor inicial, quedando la ecuación:

$$Y = 4.4 - 0.44 T + 0.01 TT - 0.12 C + 0.002 CC + 0.04 VV + 0.0003 TCV$$

El coeficiente de correlación múltiple en esta ecuación fue de 0.81 ($P < 0.01$) y el coeficiente de determinación de 0.66: lo que indica que los niveles de progesterona medidos en suero 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 81% por la ecuación.

En la Figura 4 se muestra la representación gráfica del comportamiento de la progesterona en las muestras de suero manejadas sin anticoagulante a través del tiempo de incubación y almacenadas a 4, 17 y 37°C, representados en las Figuras 4a, 4b y 4c, respectivamente.

Se puede observar que en las muestras almacenadas a 4°C y 17°C se comportan de manera similar, aunque la degradación es más lenta a 4°C. Sin embargo, cuando las muestras fueron almacenadas a 37°C se observó que a pesar de que la degradación de progesterona con respecto al valor inicial fue más rápida, conforme transcurrió el tiempo de incubación estas concentraciones se fueron recuperando hasta las 24 horas de incubación.

El análisis de regresión para las muestras manejadas con fluoruro de sodio no incluyeron los efectos lineales y cuadráticos del tiempo y la temperatura de incubación, así como la interacción del valor inicial con el tiempo y la temperatura de incubación, por lo que

el modelo utilizado fué:

$$Y_i = B_0 + B_1 T C_i + B_2 V V_i + E_i$$

De manera que las variables incluidas fueron los valores de tiempo por temperatura, y el valor cuadrático del valor inicial, quedando:

$$Y = 1.34 - 0.0016 TC + 0.15 VV$$

El coeficiente de correlación múltiple en esta ecuación fue de 0.82 ($P < 0.01$) y el coeficiente de determinación de 0.68; lo que indica que los niveles de progesterona medidos en plasma 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 68% por la ecuación.

En la Figura 5 se muestra la representación gráfica del comportamiento de la progesterona en las muestras de plasma mantenidas con fluoruro de sodio, a través del tiempo de incubación y almacenadas a 4, 17 y 37°C, representadas en las Figuras 5A, 5B y 5C, respectivamente. Se puede observar en las 3 gráficas que los valores permanecen casi constantes por lo que las líneas son rectas, manteniendo esta característica hasta transcurridas las 24 horas de incubación.

CUADRO 1. ANALISIS DE VARIANZA DE LOS EFECTOS DEL TIEMPO, TEMPERATURA DE INCUBACION Y USO DE TRES DIFERENTES ANTICOAGULANTES SOBRE LOS NIVELES PLASMATICOS DE PROGESTERONA.

Variable	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
Ti	15	1039.76	106.73	106.73	0.0001
T	2	361.22	180.61	278.09	0.0001
A	2	278.38	109.19	168.12	0.0001
V	6	1813.56	302.26	465.40	0.0001
Ti * T	30	195.38	6.51	10.03	0.0001
Ti * A	30	12.82	0.42	0.66	0.9207
T * A	4	9.28	2.32	3.57	0.0067
Ti * T * A	60	23.71	0.39	0.61	0.9917
Error	858	557.2	0.649		
Total	1007	4231.37			

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

CUADRO 2. CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE PROGESTERONA (ng/ml)
EN MUESTRAS MANEJADAS CON HEPARINA A DIFERENTES TEMPERATURAS.

Tiempo (horas)	Temperatura (4°C)	Temperatura (17°C)	Temperatura (37°C)
0	6.6 ± 2.1 ^a	6.7 ± 2.1 ^a	6.7 ± 2.1 ^a
0.5	6.3 ± 1.9 ^a	6.3 ± 2.1 ^a	6.1 ± 2.0 ^a
1	6.1 ± 1.6 ^a	5.9 ± 1.7 ^a	5.5 ± 2.3 ^a
1.5	6.3 ± 2.1 ^a	5.9 ± 1.8 ^a	5.3 ± 1.7 ^a
2	6.1 ± 1.8 ^a	5.2 ± 1.6 ^{a*}	5.3 ± 2.0 ^{a*}
2.5	6.2 ± 2.1 ^a	5.3 ± 1.7 ^{a*}	5.0 ± 1.8 ^{a*}
3	5.5 ± 1.5 ^a	5.1 ± 1.8 ^{a*}	5.0 ± 2.1 ^{a*}
3.5	5.9 ± 1.8 ^a	4.7 ± 1.8 ^{a*}	4.5 ± 1.6 ^{a*}
4	6.0 ± 2.2 ^a	4.4 ± 1.6 ^{b*}	4.4 ± 1.7 ^{b*}
4.5	6.1 ± 1.9 ^a	4.4 ± 1.7 ^{b*}	4.0 ± 1.7 ^{b*}
5	5.9 ± 1.8 ^a	4.2 ± 1.6 ^{b*}	3.6 ± 1.5 ^{b*}
5.5	5.3 ± 1.8 ^a	4.0 ± 1.6 ^{ab*}	3.3 ± 1.3 ^{b*}
6	5.9 ± 2.0 ^{a*}	3.8 ± 1.6 ^{b*}	3.3 ± 1.4 ^{b*}
8	5.7 ± 2.0 ^{a*}	3.1 ± 1.3 ^{b*}	2.9 ± 1.5 ^{b*}
12	5.5 ± 2.0 ^a	2.0 ± 0.9 ^{b*}	1.9 ± 0.9 ^{b*}
24	5.3 ± 1.6 ^a	1.4 ± 0.6 ^{b*}	2.2 ± 0.9 ^{b*}

* La concentración de progesterona es significativamente menor a la concentración inicial (P<0.05) a,b para un determinado tiempo de incubación (renglón), las concentraciones de progesterona que no comparten literal son diferentes entre sí.

CUADRO 3. CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE PROGESTERONA (ng/ml) EN MUESTRAS MANEJADAS CON CITRATO DE SODIO A DIFERENTES TEMPERATURAS.

Tiempo (horas)	Temperatura (4°C)	Temperatura (17°C)	Temperatura (37°C)
0	6.3 ± 1.9 ^a	6.3 ± 1.9 ^a	6.3 ± 1.9 ^a
0.5	6.1 ± 1.7 ^a	5.8 ± 1.9 ^a	6.0 ± 1.7 ^a
1	5.7 ± 1.4 ^a	5.6 ± 1.8 ^a	5.8 ± 1.9 ^a
1.5	5.7 ± 1.7 ^a	5.3 ± 1.7 ^a	5.6 ± 1.5 ^a
2	5.6 ± 1.7 ^a	5.3 ± 1.7 ^a	5.0 ± 1.6 ^a
2.5	5.5 ± 1.7 ^a	4.8 ± 1.8 ^{a*}	5.0 ± 1.5 ^a
3	5.4 ± 1.5 ^a	4.6 ± 1.9 ^{a*}	4.6 ± 1.9 ^{a*}
3.5	5.4 ± 1.5 ^a	4.5 ± 1.8 ^{a*}	4.6 ± 1.8 ^{a*}
4	5.4 ± 1.7 ^a	4.2 ± 1.6 ^{a**}	4.5 ± 1.7 ^{a**}
4.5	5.5 ± 1.6 ^a	4.0 ± 1.7 ^{b**}	4.2 ± 1.8 ^{b**}
5	5.2 ± 1.5 ^a	3.8 ± 1.7 ^{b**}	3.9 ± 1.5 ^{b**}
5.5	5.5 ± 1.6 ^a	3.7 ± 1.8 ^{b**}	3.8 ± 1.6 ^{b**}
6	5.2 ± 1.9 ^a	3.5 ± 1.5 ^{b**}	3.5 ± 1.5 ^{b**}
8	5.3 ± 1.8 ^a	2.7 ± 1.2 ^{b*}	2.7 ± 1.2 ^{b*}
12	5.5 ± 2.5 ^a	2.0 ± 1.2 ^{b*}	2.3 ± 1.2 ^{b*}
24	4.9 ± 2.2 ^a	1.4 ± 0.9 ^{b*}	2.1 ± 1.0 ^{b*}

* La concentración de progesterona es significativamente menor a la concentración inicial (P<0.05) a,b para un determinado tiempo de incubación (renglón), las concentraciones de progesterona que no comparten literal son diferentes entre sí.

CUADRO 4. CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE PROGESTERONA (ng/ml)
EN MUESTRAS MANEJADAS CON EDTA A DIFERENTES TEMPERATURAS.

Tiempo (horas)	Temperatura (4°C)	Temperatura (17°C)	Temperatura (37°C)
0	5.9 ± 1.7 ^a	5.9 ± 1.7 ^a	5.9 ± 1.7 ^a
0.5	5.4 ± 1.5 ^a	5.6 ± 2.4 ^a	5.1 ± 1.6 ^a
1	5.4 ± 1.6 ^a	4.9 ± 1.7 ^a	5.1 ± 1.6 ^a
1.5	5.1 ± 1.4 ^a	4.7 ± 1.7 ^a	4.8 ± 1.7 ^a
2	4.9 ± 1.3 ^a	4.3 ± 1.5 ^{a*}	4.4 ± 1.6 ^{a*}
2.5	4.7 ± 1.3 ^a	4.1 ± 1.4 ^{a*}	3.9 ± 1.5 ^{a*}
3	4.9 ± 1.4 ^a	4.0 ± 1.4 ^{a*}	3.6 ± 1.3 ^{a*}
3.5	4.5 ± 1.5 ^a	3.7 ± 1.5 ^{a*}	3.3 ± 1.2 ^{a*}
4	4.5 ± 1.4 ^a	3.2 ± 1.4 ^{ab*}	3.0 ± 1.2 ^{b*}
4.5	4.4 ± 1.3 ^{a*}	3.2 ± 1.2 ^{ab*}	2.9 ± 1.2 ^{b*}
5	4.2 ± 1.3 ^{a*}	3.1 ± 1.2 ^{ab*}	2.8 ± 1.1 ^{b*}
5.5	4.4 ± 1.6 ^{a*}	2.7 ± 1.2 ^{b*}	2.5 ± 1.1 ^{b*}
6	4.2 ± 1.4 ^{a*}	2.6 ± 1.2 ^{b*}	2.3 ± 0.9 ^{b*}
8	4.0 ± 1.4 ^{a*}	2.0 ± 1.0 ^{b*}	1.8 ± 0.8 ^{b*}
12	3.9 ± 1.4 ^{a*}	1.4 ± 0.6 ^{b*}	1.3 ± 0.7 ^{b*}
24	2.6 ± 1.4 ^{a*}	1.1 ± 0.7 ^{b*}	1.8 ± 1.0 ^{a*}

* La concentración de progesterona es significativamente menor a la concentración inicial (P<0.05)
a,b para un determinado tiempo de incubación (renglón), las concentraciones de progesterona que no comparten literal son diferentes entre sí.

CUADRO 5. ANALISIS DE VARIANZA DE LOS EFECTOS DEL TIEMPO, TEMPERATURA DE INCUBACION Y USO O AUSENCIA DE ANTICOAGULANTE SOBRE LOS NIVELES DE PROGESTERONA MEDIDOS EN PLASMA O SUERO.

Variable	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
Ti	15	131.8422076	8.7894805	19.46	0.0001
T	2	31.9778707	15.9889354	35.40	0.0001
A	1	57.7486941	57.74846941	127.85	0.0001
V	3	204.1110180	68.0370060	150.62	0.0001
Ti * T	30	13.7562884	0.4585429	1.02	0.4488
Ti * A	15	43.0137657	2.8675844	6.35	0.0001
T * A	2	2.2284098	1.1142049	2.47	0.0867
Ti * T * A	30	20.9375705	0.6979190	1.55	0.0385
Error	285	128.73	0.45170		
Total	383	634.351			

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

CUADRO 6. CONCENTRACIONES SERICAS DE PROGESTERONA (ng/ml) EN MUESTRAS MANEJADAS SIN ANTICOAGULANTE A DIFERENTES TEMPERATURAS.

Tiempo (horas)	Temperatura (4°C)	Temperatura (17°C)	Temperatura (37°C)
0	5.1 ± 1.5 ^a	5.1 ± 1.5 ^a	5.1 ± 1.6 ^a
0.5	4.8 ± 1.5 ^a	4.3 ± 1.1 ^a	3.9 ± 0.9 ^a
1	4.3 ± 0.8 ^a	4.1 ± 1.0 ^a	3.7 ± 1.2 ^a
1.5	4.0 ± 1.1 ^a	4.2 ± 0.9 ^a	3.5 ± 1.3 ^a
2	4.2 ± 1.2 ^a	3.9 ± 0.8 ^a	3.8 ± 1.5 ^a
2.5	4.0 ± 0.9 ^a	3.1 ± 0.8 ^{a*}	3.4 ± 1.2 ^{a*}
3	4.1 ± 1.1 ^a	3.1 ± 0.9 ^{a*}	3.1 ± 1.4 ^{a*}
3.5	4.3 ± 1.0 ^a	2.7 ± 0.7 ^{b*}	2.9 ± 1.4 ^{ab*}
4	3.6 ± 0.8 ^{a*}	2.4 ± 0.5 ^{a*}	2.9 ± 1.5 ^{a*}
4.5	3.4 ± 0.6 ^{a*}	2.2 ± 0.6 ^{a*}	2.7 ± 1.6 ^{a*}
5	3.4 ± 1.0 ^{a*}	2.3 ± 0.8 ^{a*}	2.8 ± 1.5 ^{a*}
5.5	3.3 ± 0.6 ^{a*}	1.7 ± 0.5 ^{b*}	2.6 ± 1.7 ^{ab*}
6	3.1 ± 0.9 ^{a*}	2.5 ± 1.7 ^{a*}	2.3 ± 1.5 ^{a*}
8	2.8 ± 0.6 ^{a*}	1.4 ± 0.6 ^{a*}	2.0 ± 1.4 ^{a*}
12	2.4 ± 0.9 ^{a*}	1.1 ± 0.5 ^{a*}	2.1 ± 1.7 ^{a*}
24	1.5 ± 0.7 ^{a*}	0.7 ± 0.4 ^{a*}	2.9 ± 2.0 ^{a*}

* La concentración de progesterona es significativamente menor a la concentración inicial (P<0.05) a,b para un determinado tiempo de incubación (renglón), las concentraciones de progesterona que no comparten literal son diferentes entre sí.

CUADRO 7. CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE PROGESTERONA (ng/ml) EN MUESTRAS MANEJADAS CON FLUORURO DE SODIO A DIFERENTES TEMPERATURAS.

Tiempo (horas)	Temperatura (4°C)	Temperatura (17°C)	Temperatura (37°C)
0	4.2 ± 0.5	4.2 ± 0.5	4.2 ± 0.5
0.5	4.4 ± 0.8	4.2 ± 0.7	4.3 ± 0.6
1	4.6 ± 1.0	4.2 ± 0.8	4.4 ± 0.9
1.5	4.4 ± 1.1	4.0 ± 0.6	3.9 ± 0.9
2	4.3 ± 0.6	3.8 ± 0.8	3.8 ± 0.8
2.5	4.4 ± 0.9	3.8 ± 0.9	3.8 ± 0.7
3	4.2 ± 0.5	4.0 ± 0.8	3.8 ± 0.9
3.5	4.1 ± 0.6	4.0 ± 0.7	3.9 ± 0.6
4	4.8 ± 1.4	3.7 ± 0.8	4.1 ± 1.2
4.5	4.1 ± 0.6	3.6 ± 0.9	3.6 ± 0.6
5	4.3 ± 0.7	3.6 ± 0.8	3.8 ± 0.7
5.5	4.2 ± 0.5	3.4 ± 0.7	3.4 ± 0.6
6	4.3 ± 0.9	3.8 ± 0.7	3.7 ± 0.7
8	3.8 ± 0.8	3.5 ± 0.9	3.5 ± 1.1
12	3.9 ± 1.2	3.2 ± 0.8	3.6 ± 0.8
24	3.7 ± 0.9	3.4 ± 1.0	3.1 ± 0.9

No existieron diferencias significativas entre tiempos ni entre temperaturas.

FIGURA 1

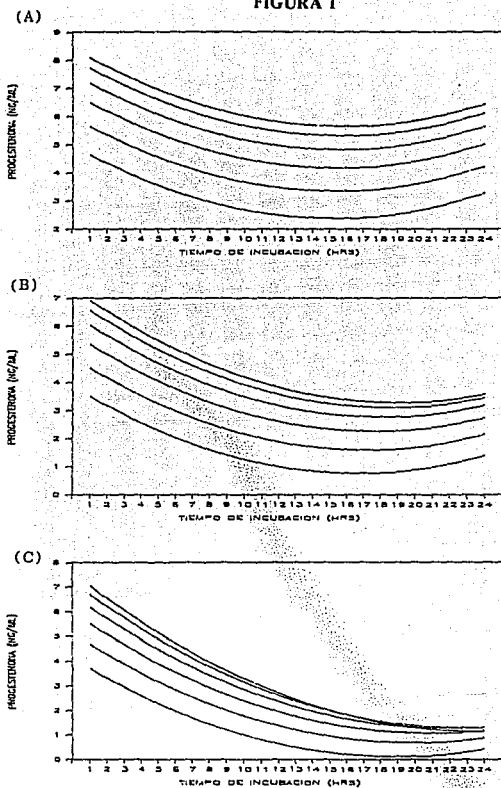


FIG. 1. EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA EN PLASMA, PROVENIENTES DE MUESTRAS DE SANGRE CON DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE LA HORMONA E INCUBADAS CON HEPARINA A 4°C (A), 17°C (B) Y 37°C (C). (SON VALORES AJUSTADOS)

FIGURA 2

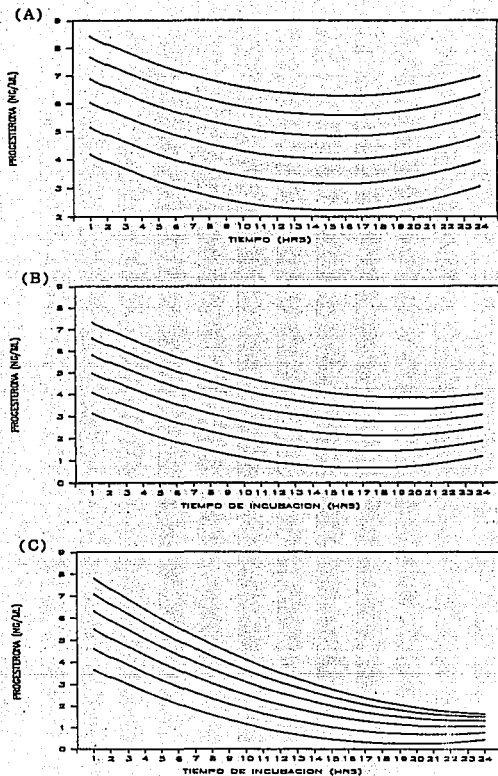


FIG. 2. EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA EN PLASMA, PROVENIENTES DE MUESTRAS DE SANGRE CON DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE LA HORMONA E INCUBADAS CON CITRATO DE SODIO A 4°C (A), 17°C (B) Y 37°C (C). (SON VALORES AJUSTADOS)

FIGURA 3

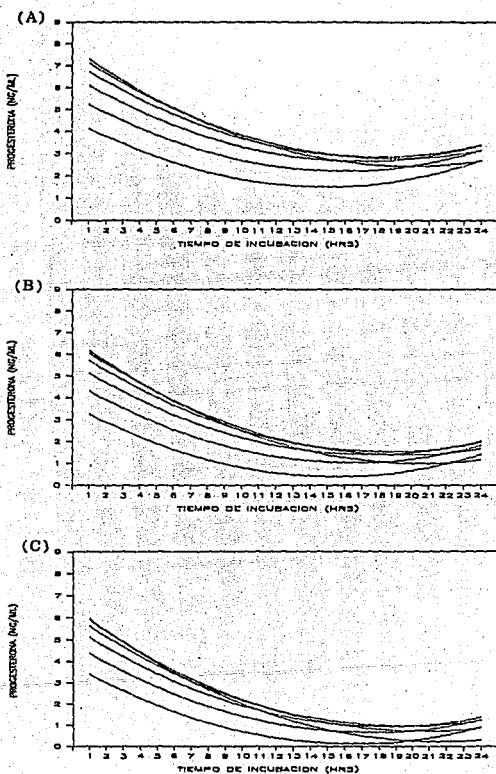


FIG. 3. EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA EN PLASMA, PROVENIENTES DE MUESTRAS DE SANGRE CON DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE LA HORMONA E INCUBADAS CON EDTA DE SODIO A 4°C (A), 17°C (B) Y 37°C (C). (SON VALORES AJUSTADOS)

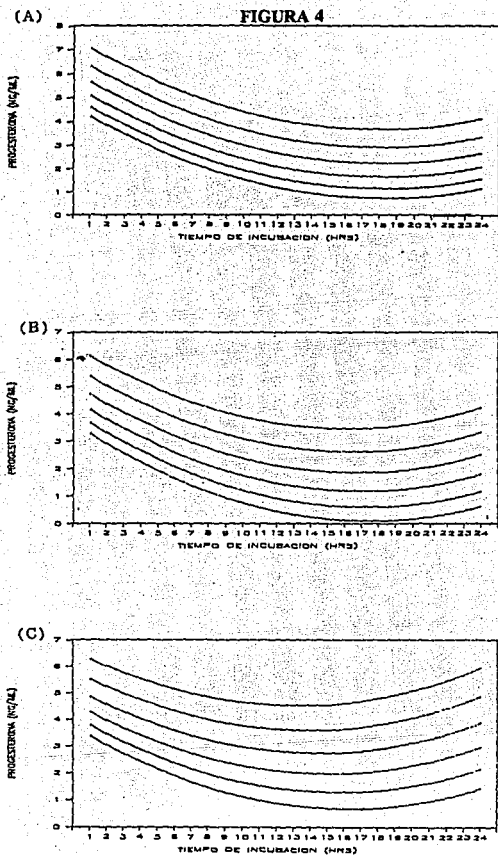


FIG. 4. EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA EN SUERO, PROVENIENTES DE MUESTRAS DE SANGRE CON DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE LA HORMONA E INCUBADAS SIN ANTICOAGULANTE A 4°C (A), 17°C (B) Y 37°C (C). (SON VALORES AJUSTADOS)

FIGURA 5

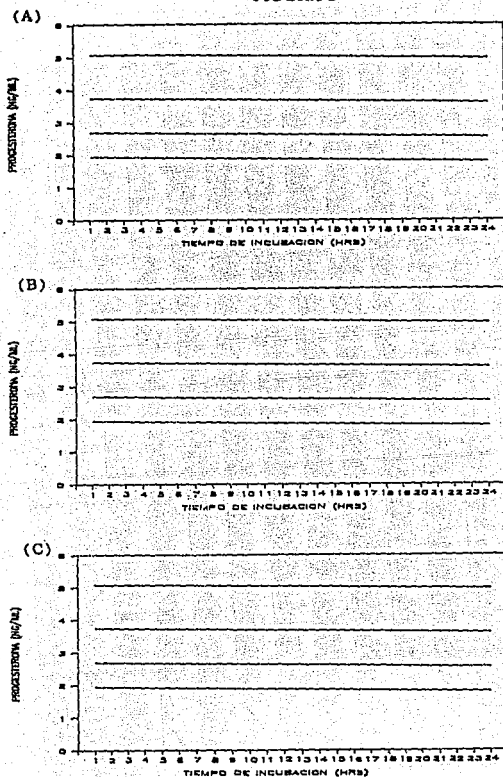


FIG. 5. EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA EN PLASMA, PROVENIENTES DE MUESTRAS DE SANGRE CON DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE LA HORMONA E INCUBADAS CON FLUORURO DE SODIO A 4°C (A), 17°C (B) Y 37°C (C). (SON VALORES AJUSTADOS)

V. DISCUSION

El método de elección para evaluar la funcionalidad del cuerpo lúteo es la determinación de las concentraciones de progesterona por medio del radioinmunoanálisis (Watson y Munro, 1980; Holland y col., 1981; Kito y col., 1986). Sin embargo, el presente trabajo confirma que la estabilidad de la progesterona en muestras de sangre bovina puede verse afectada por el manejo de la muestra, específicamente por la temperatura de almacenamiento, tiempo transcurrido hasta la separación del plasma o suero, y tipo de anticoagulante utilizado.

Se ha mencionado que los niveles de progesterona en el ganado cebú son diferentes (Adeyemo y Heat, 1980; Vaca y col., 1983; Moreno y col., 1986; Rubio y col., 1989) a los del ganado europeo (Bosu y col., 1981). Sin embargo, Pulido y col. (1991) mencionan que tal diferencia puede ser un artefacto debido a la diversidad en el manejo de la muestra sanguínea, ya que lo recomendable es centrifugarla lo más pronto posible después de su obtención.

Varios estudios han comparado el metabolismo de progesterona en muestras de sangre al utilizar diversos anticoagulantes. Vahdat y col. (1981), al emplear EDTA como anticoagulante incubando la muestra a 22°C observaron una disminución de progesterona ligeramente menor que cuando se utilizó heparina, resultados similares se han observado en otros estudios (Owens y col., 1980a; Choi y col., 1989). Sin embargo, en el presente trabajo no se encontró la diferencia entre heparina y EDTA, ya que con ambos anticoagulantes la primera disminución significativa en los niveles de progesterona se produjo a las 2 horas, tanto al incubar a 17°C como al incubar a 37°C. Owens y col. (1980b) encontraron que el metabolismo de progesterona es más rápido en muestras que contienen anticoagulante comparado con el que ocurre en muestras sin anticoagulante, ya que los niveles de progesterona en suero solamente disminuyeron un 37% después de incubar la sangre por 24 horas, mientras que los niveles de plasma disminuyeron en un 77 y 75% después de incubar por 24 horas tratadas con heparina o citrato de sodio, respectivamente. También Pulido y col.

(1991) encontraron que la destrucción de la progesterona fue ligeramente más rápida en muestras de sangre con anticoagulante que en aquellas sin anticoagulante. En el presente trabajo no se confirmó dicho hallazgo, ya que tanto en el caso de suero como en plasma obtenido a partir de muestras de sangre tratadas con heparina, citrato de sodio o EDTA la primera disminución significativa en los niveles de progesterona se produjo después de incubar por 2 ó 2.5 horas, tanto a 17°C como a 37°C.

Estos resultados sugieren que, aunque la coagulación de la sangre, al reducir la superficie de exposición de eritrocitos al líquido sanguíneo puede interferir con la degradación de progesterona (Wiseman y col., 1983), este efecto es ilimitado y el metabolismo de la progesterona puede proseguir casi al mismo ritmo en sangre en proceso de coagulación.

En el presente trabajo se confirmó que, independientemente del tipo de anticoagulante utilizado, cuando la sangre es incubada a 4°C los valores de progesterona no disminuyen tan rápidamente como ocurre al manejar la muestra a 22 y 37°C (Vahdat y col., 1979; Vahdat y col., 1981), o a temperatura ambiente (Holdsworth, 1980; Owens y col., 1980a; Oltner y Edqvist, 1982; Reimers y col., 1983; Wiseman y col., 1983; Breuel y col., 1988; Okada y col., 1990). Lo anterior demuestra que a temperatura de refrigeración disminuye la capacidad catabólica de los eritrocitos (Wintrobe, 1974). Sin embargo, en el presente trabajo es evidente que la velocidad de la destrucción de la progesterona no es totalmente dependiente de la temperatura, ya que con ninguno de los anticoagulantes se observó un ritmo de degradación mayor al incubar a 37°C que el obtenido al incubar a 17°C. Esto podría indicar que la capacidad de degradación de progesterona por los eritrocitos es limitada, por lo que el proceso se satura y alcanza su máximo alrededor de los 17°C, siendo incapaz de incrementarse a mayores temperaturas. A este respecto, Pulido y col. (1991) también encontraron que la degradación de progesterona fue más rápida al incubar a 17 y 37°C que al incubar a 4°C, pero no se encontraron diferencias entre 17°C y 37°C.

Al utilizar el fluoruro de sodio como anticoagulante en el presente estudio, no se observó una disminución significativa de las concentraciones de progesterona durante las 24 horas del

proyecto a ninguna de las 3 temperaturas en las cuales se manejaron las muestras. Resultados similares fueron encontrados por Vahdat y col (1984) y Pulido y col. (1991), quienes mencionan una diferencia significativa a las 24 horas cuando las muestras se incubaron a 17°C y 22°C. El motivo por el cual los valores de progesterona permanecen sin cambios significativos durante un tiempo es porque el fluoruro de sodio es considerado un factor letal para las enzimas glucolíticas (Medway y col., 1973), entre ellas la enolasa (Lehninger, 1985) la cual interviene en la glucólisis cuando el 2 fosfoglicerol libera una molécula de agua y se produce el fosfoenolpiruvato y el fosfato de alta energía de este compuesto es transferido al ADP por la enzima piruvatoquinasa para generar 2 moles de ATP por mol de glucosa oxidada. De tal manera que, en presencia de fluoruro de sodio las células no podrán utilizar la glucosa para generar ATP, y bajo tales circunstancias las células no pueden metabolizar a la progesterona, ya que su degradación requiere ATP como fuente de energía (Murray y col., 1988).

De acuerdo a los resultados de este trabajo se considera que el anticoagulante de elección para determinar los niveles de progesterona en plasma es el fluoruro de sodio, ya que utilizando este anticoagulante las concentraciones de progesterona medibles no se afectan si no se cuenta con el material necesario para centrifugar la muestra de inmediato. Sin embargo, se debe realizar más investigación respecto a este anticoagulante ya que el valor de progesterona obtenido en la muestra inicial conservada con este anticoagulante, fue menor en comparación con el encontrado en la muestra inicial de suero. Este efecto ya había sido encontrado por Pulido y col. (1991) quienes mencionan que la causa podría ser una interferencia del fluoruro de sodio con el radioinmunoanálisis. Sin embargo, cabe mencionar que en el presente trabajo, al igual que en el de Pulido y col. (1991), al mezclar el fluoruro de sodio con la muestra se presentó una hemólisis relativamente marcada, tal como lo menciona Medway, (1973). Vahdat y col (1984) encontraron que al hemolizar la muestra sanguínea lo más pronto posible de su obtención la cantidad de progesterona medible es menor a la encontrada en sangre no hemolisada.

Cabe mencionar que en el estudio de Vahdat y col. (1984) con fluoruro de sodio, el valor inicial fue similar al obtenido al trabajar paralelamente con heparina, y no mencionan que hubiera hemólisis. Esto puede deberse a que dichos autores no utilizaron el fluoruro de sodio como anticoagulante sino como adyuvante añadido al oxalato de potasio, por lo que emplearon menor cantidad de fluoruro de sodio (0.5 mg/ml de sangre) que en el presente trabajo (10 mg/ml de sangre).

VI. LITERATURA CITADA

- 1.- Adeyemo, O. and Heat, E.: Plasma progesterone concentration *Bos taurus* and *Bos indicus* heifers. Theriogenology 14: 411-419 (1980).
- 2.- 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. Ind. J. Sci. 47: 715-719 (1977).
- 3.- Beal, W.E., Milvae, R.A. and Hansel, W.E.: Oestrous cycle length and plasma progesterone concentrations following administration of prostaglandin F-2 α early in the bovine oestrus cycle. J. Reprod. Fert. 52: 393-396 (1980).
- 4.- 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(3): 613-627 (1988).
- 5.- Bosu, W.T.K., Doig, P.A. and Baker, C.A.V.: Pregnancy and peripheral plasma progesterone levels in cows inseminated after synchronization of estrus with prostaglandin F2 α . Can. Vet. J. 22: 59-61 (1981).
- 6.- Boyd, Ch. M. and Herzberg, D.L.: Fundamentals of radioimmunoassay. In: Practical Radioimmunoassay by Moss Jr. A.J., Dalrymple, G.V. and Boyd, Ch.M. The C.V. Mosby Company, PP. 1-13. 1976.
- 7.- Choi, H.S., Mostl, E. and Bamberg, E.: Conversion of steroids bovine blood in vitro. Theriogenology 31(3): 571-581 (1989).
- 8.- Dowson, F.L.M.: Accuracy of rectal palpation in the diagnosis of ovarian function in the cows. Vet. Rec. 26: 218-220 (1975).
- 9.- Elmore, R. G.: Rapid progesterone assays the latest in kit technology. Vet Med-US 81(7): 659-662 (1982).
- 10.- García, E.: Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Geografía cap. 15, México (1973).
- 11.- Gowan, E.W. and Etches, R.J.: A solid-phase radioimmunoassay for progesterone and its application to pregnancy diagnosis in the cow. Theriogenology 12(6): 327-343 (1979).
- 12.- Grunert, E., Schallenberger, E., Quack, M., Grunert, D. and Karg, H.: Use of the milk progesterone test for evaluating clinical diagnoses and monitoring the efficacy of veterinary treatment of sterility in the cattle. Vet. Bulletin 56(1): 50 (1986).
- 13.- Hafez, E.S.E.: Ciclos reproductivos. En: Reproducción e inseminación artificial en animales. Interamericana, México. 5a. ed. pp. 116-141. 1987.
- 14.- Holdsworth, R.J.: Measurement of progesterone in bovine plasma and preserved whole blood samples by a direct radioimmunoassay. Br. vet. J. 135-140 (1980).

- 15.- Holland, E.J., Bindon, B.M., Piper, L.R., Thimonier, J., Cornish, K.A. and Radford, H. M.: Endoscopy in cattle: techniques for ovarian examination by the paralumbar and midventral routes. Anim. Reprod. Sci. 4: 127-135 (1981).
- 16.- Holy, L. : Biología de la reproducción bovina. pp. 272-273. Editorial Científico-Técnica. La Habana, Cuba. 1987.
- 17.- Kay, G. W., Zyl, J.P. van, Naudé, R.T.: Milk progesterone concentrations: an accurate early pregnancy diagnostic aid in dairy cattle. Anim. Breed. Abstr. 54(4): 282 (1986).
- 18.- Kito, S., Okuda, K., Miyazawa, K. and Sato, K. : Study on the appearance of the cavity in the corpus luteum of cows by using ultrasonic scanning. Theriogenology 25(2): 325-337 (1986).
- 19.- Lehninger, A.: Bioquímica. Las bases de la estructura y función celular. p. 441. 2a. ed. Omega S.A. Barcelona. 1985.
- 20.- Libertun, C.: Radioinmunoanálisis fundamentos y aplicaciones. pp. 1-6 López Libreros Editores S.R.L. Buenos Aires, Argentina. 1980.
- 21.- Linhart, R.D., Youngquist, R.S., Clark, B.L., Smith, C.A., Braun, W.F. and Bierschwal, C.J.: Progesterone enzyme immunoassay as an aid to estrus detection in physiologically anestrus dairy cows treated with prostaglandin. Theriogenology Proceedings of Animal Meeting pp. 310-313. Sept. 17-19, 1986. New York, U.S.A.
- 22.- Medway, W., Prier, J.: Patología clínica veterinaria. p. 5. U.T.E.H.A. México, D.F. 1973.
- 23.- Molen van der, H. J. and Groen, D. : Interconversion of progesterone and 20- α -dihydroprogesterone and androstenedione and erythrocytes. Acta Endocrinológica 58: 419-444 (1968).
- 24.- Morato, T.: Determinaciones hormonales en endocrinología. En: Fundamentos de endocrinología clínica. Editado por Malacara, J.M., García, M., Valverde, C. pp. 364-383. La Prensa Médica Mexicana. 3a. ed. 1980.
- 25.- Moreno, I.Y.D., Galina, C.S., Escobar, F.J., Ramírez, B. and Navarro-Fierro, R.: Evaluation of the lytic response of prostaglandin F² alpha in zebu cattle based on serum progesterone. Theriogenology 25(3): 413-421 (1986).
- 26.- Murray, R., Granner, D., Mayes, A., Rodwell, V.: Bioquímica de Harper. El Manual Moderno S.A. de C.V. pp. 160. México, D.F. 11a. ed. 1988.
- 27.- Neter, J. and Wasserman, W.: Applied linear statistical models. Richard, D. Irwin, Inc. Homewood. Illinois, 1974.
- 28.- Okada, K., Sato, S., Suzuki, T. and Kaneda, Y.: Changes in the progesterone levels of plasma during storage of heparinized whole blood from cows. Veterinary Bulletin: 60(12): 1235 (1990) Abstr.
- 29.- Oltner, R. and Edqvist, L.E.: Changes in plasma progesterone levels during storage of heparinized whole blood from cow, horse, dog and pig. Acta vet. Scand. 23: 1-8 (1982).

- 30.- Ott, R.S., Bretzlaff, K.N., Hixon, J.E.: Comparison of palpable corpora lutea with serum progesterone concentrations in cows. Vet. Bulletin 56(10): 934 (1986) Abstr.
- 31.- 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(4): 305-309 (1980).
- 32.- Owens, R.E., Fleeger, J.L. and Harms, P.G.: Effect of different methods of handling bovine blood on subsequent progesterone levels as measured by radioimmunoassay. J. Anim. Sci. 51(suppl.1): 312 (1980).
- 33.- Pennington, J. A., Schultz, L. H., Hoffman, W. F.: Comparison of pregnancy diagnosis by milk progesterone on day 21 and day 24 postbreeding: field study in dairy cattle. Vet. Bulletin 56(2): 128 (1986).
- 34.- Pulido, A., Zarco, L., Galina, C.S., Murcia, C., Flores, G. and Posadas, E.: Progesterone metabolism during storage of blood samples from Gyr cattle: Effects of anticoagulant, time and temperature of incubation. Theriogenology 35(5): 965-975 (1991).
- 35.- 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. of Anim. Sci. 57(3): 683-691 (1983).
- 36.- Revah, I., Lomas, R., Zarco, L. y Galina, C.: Evaluación del tratamiento rutinario con prostaglandina F² Alfa en el día 30 ó 40 posparto sobre la actividad ovárica y la eficiencia reproductiva de vacas Holstein. Vet. Méx. 20: 135-143 (1989).
- 37.- Rubio, I., Moreno, I., Galina, C., Escobar, F., Ramírez, B., Navarro-Fierro, R.: Progesterona sérica. Expresión de estro y fertilidad después de la inyección de prostaglandina F²α en ganado cebú en verano e invierno. Vet. Méx. 20: 145-149 (1989).
- 38.- Shemesh, M., Ayalon, N. and Linder, H. R.: Early effect of conceptus on plasma progesterone level in the cow. J. Reprod. Fert. 15: 161-164 (1968).
- 39.- 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 extraction assay for monitoring luteal function in the mare, bitch, and cow. Theriogenology 26(6): 779-793 (1986).
- 40.- Vaca, L. A., Galina, C., Fernández-Baca, L., Escobar, J. and Ramírez, B.: Progesterone levels and relationship with the diagnosis of corpus luteum rectal palpation during the estrous cycle in zebu cows. Theriogenology 20(1): 67-76 (1983).
- 41.- Vahdat, F. Hurtgen, J. P., Whitmore, H. L., Johnston, S.D. and Ketsen, C.L.: Effect of time and temperature on bovine serum and plasma progesterone concentration. Theriogenology 12 (6): 371-374 (1979).
- 42.- 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 (3): 521-522 (1981).

- 43.- Vahdat, F., Seguin, B. E., Whitmore, H. L. and Johnson, S. D.: Role of blood cells on progesterone degradation in bovine blood. *Am. J. vet. Res.* **45**:240-243 (1984).
- 44.- Villa, B., Morato, T., Avila, J. y Espinosa, J. : Concentraciones de progesterona (P⁴) en suero durante el ciclo estral y gestación temprana en vacas normales y repetidoras. En: Memorias del X Congreso Nacional de Buiatría, pp.33, México, D.F., 1978.
- 45.- Watson, E. D. and Munro, C. D.: A reassessment of the technique of rectal palpation of corpora lutea in cows. *Br. Vet. J.* **136**: 555-560 (1980).
- 46.- Wintrobe, M.M.: Clinical hematology. pp.101-102. 7th. ed. Lea & Febiger. 1974.
- 47.- 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. *Anim. Reprod. Sci.* **5**(3): 157-165 (1983).