



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS Y FORESTALES

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**INDOMETACINA COMO INHIBIDOR DE LA SECRECIÓN DE
PROSTAGLANDINA $F_{2\alpha}$ Y SU EFECTO SOBRE LA TASA DE
GESTACIÓN EN OVEJAS DE PELO**

TESIS
QUE PRESENTA:

MVZ. JESÚS LÓPEZ TORRES

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Biológicas

TUTOR: DR. JOSÉ HERRERA CAMACHO

Morelia, Michoacán, julio de 2009



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Programa de Maestría Institucional en Ciencias Biológicas

DR. DANIEL VAL ARREOLA
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "INDOMETACINA COMO INHIBIDOR DE LA SINTESIS DE PROSTAGLANDINA F₂ Y SU EFECTO SOBRE LA TASA DE GESTACIÓN EN OVEJAS DE PELO" presentado por el MVZ. JESÚS LÓPEZ TORRES, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestro en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Morelia, Michoacán, 26 de junio de 2009

MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA

Dr. José Herreña Camacho

Dr. Jesús Ricardo Aké López

Dr. Aureliano Juárez Caratachea

Dr. José C. Segura Correa

Dra. Laura Guadalupe Sánchez Gil

c.c.p. Archivo de la AT

Agradecimientos

A la Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria por apoyarme en la realización de esta maestría.

A mi querida Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por haberme dado la oportunidad de ser nuevamente su alumno después de 18 años.

A los integrantes de mi comité tutorial, quienes me acompañaron y guiaron a través de esta aventura.

A mi asesor Dr. José Herrera Camacho, por confiar en mi, haberme dado la oportunidad de superarme académicamente y haber sido mi cómplice y amigo en todo momento.

A mi esposa, Alejandra, mis hijos Jesús Alejandro, Carlos Alfredo y Daniela Montserrat y a mis padres J. Jesús y Ana María, por darme ánimo e impulsarme a realizar este anhelo.

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología (CECYT), por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto.

CONTENIDO

I. RESUMEN	1
II. SUMMARY	2
III. INTRODUCCIÓN	3
IV. HIPÓTESIS.....	18
V. OBJETIVOS.....	19
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
VIII. CONCLUSIONES	32
IX. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES	33
X. BIBLIOGRAFÍA	34
IX. ANEXOS	43

I. RESUMEN

El estado de Michoacán, es uno de los 11 principales productores de ovinos en el país. Participa con el 3.3% de la producción de cabezas de ovinos (232,546 cabezas) del total nacional (7'287,446). Datos reportados por el Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados, indican que el 41.4% de la carne de ovino consumida a nivel nacional en 2007 fue importada. Sin embargo, el incremento en la producción de carne ovina, implica poder incidir en el aspecto reproductivo entre otros, ya que puede ser causa de bajas tasas de gestación de hasta el 58%. En pequeños rumiantes, la mortalidad embrionaria es responsable de las mayores pérdidas prenatales y económicas, al respecto se ha reportado una incidencia, en ovejas, de hasta 36.7%. La pérdida de gestación puede deberse a luteólisis por una secreción prematura de prostaglandina $F_{2\alpha}$. La indometacina es un antiinflamatorio no esterooidal, considerado un potente inhibidor de la síntesis de prostaglandinas. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la indometacina sobre la tasa de gestación y las concentraciones de prostaglandina $F_{2\alpha}$ y progesterona. Se utilizaron 40 ovejas de pelo, en las cuales se sincronizó el ciclo estral con esponjas impregnadas con 40 mg de acetato de fluorogestona colocadas intravaginalmente por espacio de 10 días, las hembras que manifestaron celo, fueron cubiertas por monta natural, utilizando sementales previamente evaluados seminalmente. Las ovejas fueron distribuidas aleatoriamente en un grupo control tratado con un dispositivo intravaginal de glicerina, como placebo (PLA; n=20) y un grupo experimental tratado con un dispositivo de 100 mg de indometacina (IND; n=20), el cual se aplicó a intervalos de 12 h. El tratamiento inició el día 10 y finalizó el día 16 post-servicio, se colectaron muestras sanguíneas a intervalos de 24 h, por punción de la vena yugular para la determinar la concentración plasmática de progesterona y del día 10 al día 16 post-servicio a intervalos de 4 h para MPGF. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm a -4°C durante 15 minutos, el plasma se almacenó a -20°C hasta la determinación de P_4 y de MPGF, el diagnóstico de gestación se realizó a los 35 post-servicio por ultrasonografía en tiempo real. Los resultados no muestran diferencias significativas para tasa gestación ($X^2=0.2867$). Se encontró efecto del tratamiento ($P<0.05$) sobre la concentración sérica de MPGF siendo menor en las ovejas IND (112.39 ± 7.60) que en las PLA (129.69 ± 7.62). La concentración del MPGF fue superior ($P<0.01$) en las ovejas vacías del grupo PLA (209.64 ± 8.80 pg/ml) que en las del IND (166.11 ± 8.78 pg/ml), mientras que en las ovejas gestantes del grupo PLA e IND, no se observaron diferencias significativas (49.72 ± 8.78 vs 58.66 ± 8.78 pg/ml, respectivamente). No se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($P<0.05$) en la concentración plasmática de P_4 en las ovejas vacías tratadas con PLA (1.26 ± 0.27 ng/ml) y con IND (1.26 ± 0.34 ng/ml). De la misma manera en las ovejas gestantes no hubo diferencias significativas (IND= 2.41 ± 0.59 ng/ml y PLA= 2.8653 ± 0.59 ng/ml). Se concluye que la indometacina utilizada en estas condiciones, inhibe la síntesis de prostaglandina $F_{2\alpha}$, sin favorecer el incremento en la tasa de gestación.

II. SUMMARY

The state of Michoacán, one of the 11 largest producers of sheep in the country, contributes with 3.3% of the heads of sheep (232.546 heads) of the national total (7'287,446). Data reported by the National Information System and Market Integration, indicate that 41.4% of sheep meat consumed by the Mexican population in 2007 was imported. However, the increase in the production of sheep meat, means being able to influence the reproductive aspect among others, as it may be because of low rates of pregnancy up to 58%. In small ruminants, embryonic mortality is responsible for major economic losses antenatal and in this respect has been a reported incidence in sheep, up to 36.7%. The loss of pregnancy may be due to premature luteolysis by a secretion of prostaglandin $F_{2\alpha}$. Indomethacin is a non-steroidal anti-inflammatory, as a potent inhibitor of prostaglandin synthesis. The aim of this study was to evaluate the effect of indomethacin on the rate of pregnancy and the concentrations of progesterone and prostaglandin $F_{2\alpha}$. Forty hair sheep were used; the estrous cycle was synchronized with sponges impregnated with 40 mg fluorogestone acetate placed intravaginal by space of 10 days, the females that show estrus activity were mating by natural breeding with rams with good seminal quality. The sheep were randomly distributed into a control group treated with an intravaginal device glycerin as placebo (PLA, n=20) and an experimental group treated with a 100 mg indomethacin (IND, n=20), both placed intravaginal to 12 h intervals, from day 10 until day 16 post-service. Blood samples were collected during treatment period to 24 h intervals from jugular vein-puncture to determine plasma concentration of progesterone and day 10 to day 16 post-service to 4 h intervals to determine serum concentration of MPGF. Samples were centrifuged at 3000 rpm at -4°C for 15 min, the plasma was stored at -20°C until the determination of P_4 and MPGF, pregnancy diagnosis was performed at 35 post-service by real-time ultrasonography. Pregnancy rates was not affected by treatment ($X^2=0.2867$). Serum concentration of MPGF was higher ($P<0.05$) in PLA (129.69 ± 7.62) that IND (112.39 ± 7.60) group. MPGF concentration was higher ($P<0.01$) in non pregnant sheep in PLA group (209.64 ± 8.80 pg/ml) than in the IND (166.11 ± 8.78 pg/ml), whereas in pregnant sheep and the PLA group IND, no significant differences (49.72 ± 8.78 vs 58.66 ± 8.78 pg/ml, respectively) was observed. Progesterone serum concentration was not affected by treatment ($P>0.05$; 1.26 ± 0.27 vs 1.26 ± 0.34 ng/ml, in PLA or IND group, respectively). The same in pregnant ewes there was no significant difference (IND= 2.41 ± 0.59 ng/ml and PLA= 0.59 ± 2.8653 ng/ml). We conclude that indomethacin used in these conditions, inhibits the synthesis of prostaglandin $F_{2\alpha}$ without affect the pregnancy rate.

III. INTRODUCCIÓN

3.1 Situación actual de la ovinocultura

El estado de Michoacán, es uno de los 11 principales productores de ovinos en el país, al participar con el 3.3 % de la producción de cabezas de ovinos (232,546 cabezas) a la producción nacional (7'287,446) (INEGI, 2008a).

Si se considera que el 57.8% de la superficie territorial total del estado corresponde a climas templados, que cuenta con tres de los principales lagos de México como fuente de agua (Chapala, Cuitzeo y Pátzcuaro) y adicionalmente un rango de precipitación pluvial anual que oscila entre los 400 y 2000 mm (INEGI, 2008b), Michoacán cuenta con el potencial para ubicarse entre los primeros lugares en producción ovina en el país.

De acuerdo con datos reportados por el Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados (SNIIM, 2008) de la Secretaría de Economía, en el año 2007, el 41.4% de la carne de ovino que se consumió a nivel nacional fue de importación (Cuadro 1), lo que representa un área de oportunidad para el crecimiento de la industria de la producción ovina.

Cuadro 1. Consumo nacional aparente de carne ovina (Miles de toneladas)

Año	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Producción	33.0	36.2	38.2	42.2	44.3	46.2	47.2	48.3
Importación	52.3	56.8	56.0	40.3	56.5	37.9	32.5	34.1
Oferta nacional	85.3	93.0	94.2	82.4	100.8	84.2	79.7	82.4
Consumo aparente	85.3	93.0	94.2	82.4	100.8	84.2	79.6	82.4

Fuente: Secretaría de economía (SNIIM, 2008).

La producción de carne ovina en México, aportó únicamente el 58% de las 82,400 toneladas que se consumieron en el país durante el 2007 (SNIIM, 2008), por lo que tiene una gran importancia disminuir la importación de carne de esta especie ya que se cuenta con los recursos naturales suficientes en el estado de Michoacán (INEGI,

2008a) para de esta forma posicionar el estado dentro de los primeros lugares de producción nacional.

El incremento en la producción de carne ovina, depende de poder incidir en el aspecto reproductivo entre otros, ya que puede ser causa de bajas tasas de gestación de hasta el 58% (Aké, 2000) lo cual indica que se deben realizar trabajos para disminuir la pérdida de gestaciones por esta causa.

Sin embargo, las pérdidas económicas en las explotaciones ovinas, debido a diversos factores como son los ambientales, genéticos (Ayalon, 1978), y reproductivos impactan de forma importante en la producción ovina, ya que se puede llegar a disminuir la tasa de gestación hasta un 36.7% (Kaulfuss *et al.*, 1997). En trabajos más recientes, Aké (2000) reportó una tasa de gestación de 58%, lo que indica la necesidad de realizar trabajos y encaminar los esfuerzos para disminuir la pérdida de gestación.

3.2 Endocrinología de la gestación

La dinámica hormonal que se presenta en el ciclo reproductivo de los animales domésticos, es regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas e involucra principalmente a las hormonas folículo estimulante (FSH), Luteinizante (LH), progesterona (P_4), estradiol (E_2), prolactina (PRL), prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), inhibina, activina, cortisol, relaxina, folistatina y oxitocina (Hafez y Hafez, 2002).

El ciclo estral en la oveja tiene una duración promedio de 17 días; sin embargo, cuando tiene lugar la fertilización del óvulo, se realizan cambios en la dinámica hormonal, que permiten el desarrollo de la gestación. A partir de la fertilización y durante el periodo de gestación la mayor importancia se centra en las hormonas progesterona, estrógenos, prostaglandina, cortisol, relaxina y oxitocina (Rahman, 2006).

El embrión ovino alcanza el útero aproximadamente el día cuatro de la gestación, en el momento en que se encuentra en la etapa de mórula (Figura 1), hacia el día seis inicia la etapa de blastocito y la elongación se lleva a cabo entre el día 11 y 16 post-servicio, momento en el que se encuentra adherido al epitelio luminal endometrial (Spencer y Bazer, 2004). La implantación se lleva a cabo gracias a una interacción recíproca entre el blastocito y el útero receptivo, y es crucial para una gestación exitosa (Burnum *et al.*, 2008).

A partir del día 10 de la gestación, el trofoectodermo del embrión sintetiza y secreta interferón tau ovino (oIFN- τ) (Spencer y Bazer, 2004), el cual representa una señal para el reconocimiento materno de la gestación (Spencer y Bazer, 2004; Arosh *et al.*, 2004b; Klein *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008; Krishnaswamy *et al.*, 2009), e inhibe la expresión de receptores a oxitocina y estrógenos previniendo la producción endometrial de pulsos luteolíticos de PGF_{2 α} (Kim *et al.*, 2003; Shirasuna *et al.*, 2007; Spencer *et al.*, 2007; Krishnaswamy *et al.*, 2009).

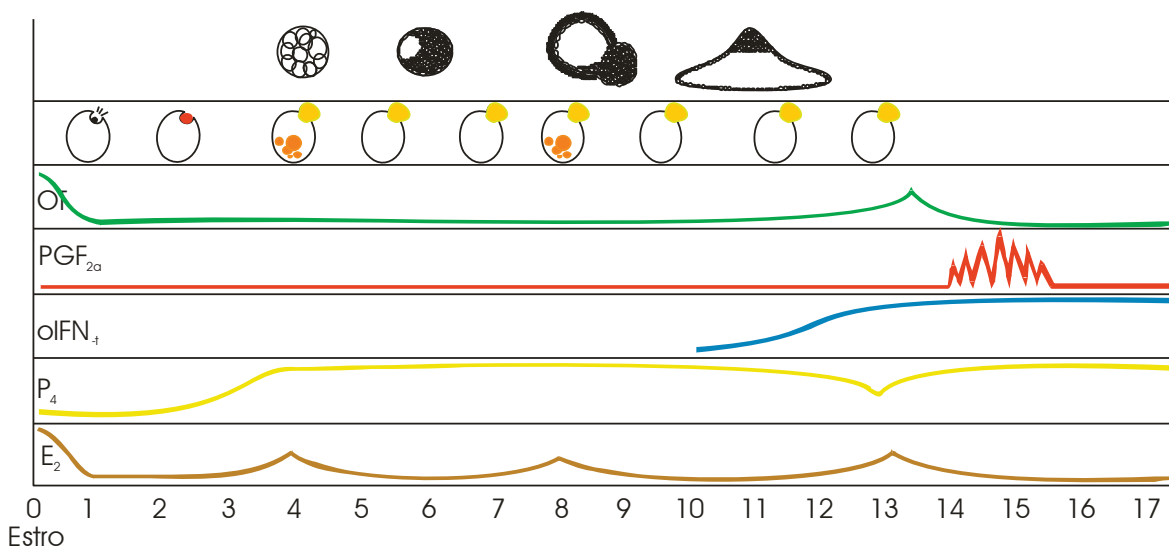


Figura 1. Comportamiento de la concentración de estrógenos (E₂), progesterona (P₄), prostaglandina F_{2 α} (PGF_{2 α}), interferon-tau ovino (oIFN- τ), oxitocina (OT), así como desarrollo del embrión y el cuerpo lúteo, durante los primeros 17 días post-estro en ovejas.

El oIFN- τ participa en la receptividad del endometrio uterino para la implantación del embrión (Song *et al.*, 2007), a través de un mecanismo paracrino, que actúa sobre el cuerpo lúteo (CL) (Oliveira *et al.*, 2008), para promover a partir de colesterol (Stocco *et al.*, 2007), la secreción continua de P₄, (Ealy *et al.*, 2006), conocida como la hormona de la gestación (Rahman, 2006), debido a que es esencial para el establecimiento de la preñez (Arosh *et al.*, 2004a), al ayudar de manera muy importante en la preparación del endometrio para la implantación (Goyeneche *et al.*, 2003).

La P₄ es indispensable en conjunto con el oIFN- τ , para el soporte, sobrevivencia y desarrollo del embrión en los rumiantes durante la peri-implantación (Gray *et al.*, 2006), y su producción es mediada por la expresión de receptores de progesterona (PR) (Spencer y Bazer, 2002).

La P₄ es producida también por la placenta y las glándulas suprarrenales (Hafez y Hafez, 2002); sin embargo, su producción uterina hacia los días 11 a 13 del ciclo estral en ovejas es disminuida debido a que la expresión de los receptores a la progesterona es prácticamente indetectable (Spencer y Bazer, 2002; Spencer *et al.*, 2004), por lo que el apoyo del oIFN τ es fundamental para inhibir la producción de pulsos luteolíticos de PGF_{2 α} .

La P₄ tiene como principales funciones:

- Preparar el endometrio para la implantación y mantenimiento de la preñez, lo cual aumenta la actividad de glándulas secretorias en el endometrio e inhibe la movilidad del miometrio a través de la disminución de calcio extracelular disponible y que es requerido para la contracción de las células miometriales (Niswender *et al.*, 2000).
- Estimula el crecimiento y elongación del blastocito (Spencer *et al.*, 2007).
- Actúa sinérgicamente con los estrógenos para inducir el comportamiento estral.
- Desarrolla el tejido secretor (alvéolos) de las glándulas mamarias.
- En altas concentraciones, inhibe el estro y la oleada ovulatoria de LH.

- Inhibe la movilidad uterina.
- Participa parcialmente en la regulación de la amplitud del ciclo reproductivo (Niswender *et al.*, 2000).

La disminución en la síntesis de P_4 al fin de la preñez y la consecuente disminución de la P_4 circulante, son evidencia que indica el inicio de la regresión funcional de las células lúteas, atribuida al incremento de los niveles de $PGF_{2\alpha}$ (Stocco *et al.*, 2007).

Por otro lado el endometrio uterino parece ser el principal productor de $PGF_{2\alpha}$ (Kim *et al.*, 2003) reconocido universalmente como luteolisina (Arosh *et al.*, 2004a), en cuya biosíntesis (Figura 2) la fosfolipasa A2 citosólica cataliza la formación de ácido araquidónico (AA) a partir de glicerofosfolípidos de la membrana celular (Stocco *et al.*, 2007) y la ciclooxigenasa 2 (COX_2) que es una enzima clave en este proceso (Frungieri *et al.*, 2006), cuya expresión se incrementa a partir de los días 10 a 12 y decrece hacia el día 16 (Kim *et al.*, 2003), lo que permite la conversión de AA en prostaglandinas, que representa un estímulo que incrementa la producción de dicha hormona en el CL posiblemente por un proceso de interconversión de PGE_2 a $PGF_{2\alpha}$, que lleva a una amplificación del proceso luteolítico (Stocco *et al.*, 2007).

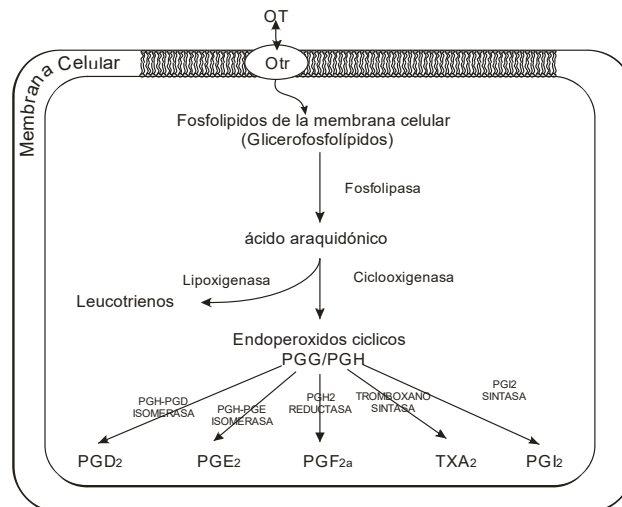


Figura 2. Cascada de biosíntesis de prostaglandinas (Adaptado de Smith, 1989; Mattos *et al.*, 2000).

La oxitocina, hormona neurohipofisiaria sintetizada en el núcleo supraóptico y paraventricular del hipotálamo (Teruyama *et al.*, 2008), también producida por el CL (Ndiaye *et al.*, 2008), es un nonapéptido que media acciones relacionadas con la reproducción (Devost *et al.*, 2008), especialmente en las últimas etapas de la gestación dado que estimula las contracciones uterinas que favorecen el proceso de parto (Hafez y Hafez, 2002) e interviene también de manera directa en el proceso de lactación (Teruyama *et al.*, 2008) y la función lútea, al actuar en el endometrio para producir $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Hafez y Hafez, 2002; Ndiaye *et al.*, 2008), ya que la oxitocina es el mayor factor inductor de la expresión de COX_2 y liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ al término de la gestación y durante el parto en rumiantes (Fush *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2003).

La relaxina es secretada principalmente por el cuerpo amarillo durante la gestación e inhibe la contractilidad uterina y su función antes del parto consiste en la dilatación y relajación de la vagina (Min *et al.*, 1997) y del cuello uterino (Sherwood, 2004).

3.3 Cuerpo lúteo: formación, mantenimiento y regresión.

El cuerpo lúteo (CL) es una glándula endocrina que se forma de los residuos de otro órgano y su función y sobrevivencia son limitadas en alcance y tiempo, es un sitio de rápida remodelación, crecimiento, diferenciación y muerte de células procedentes de células de la granulosa, teca, capilares y fibroblastos (Stocco *et al.*, 2007), elementos que han formado parte del folículo ovárico y que por medio del proceso llamado luteinización dan lugar al CL (Bruce, 2000). Después de la ovulación, la cavidad antral del folículo se llena de sangre y por esta razón se le conoce como cuerpo hemorrágico (Niswender *et al.*, 2000).

La luteinización es esencial para una gestación temprana exitosa (Bruce, 2000), ya que su función principal es la producción de progesterona (P_4) y todas sus características funcionales y estructurales están orientadas para este fin (Stocco *et al.*, 2007).

Posterior al pico preovulatorio de hormona luteinizante (LH) se generan una serie de eventos que finalizan con la ovulación; las células foliculares se involucran en un proceso de diferenciación, las células de la granulosa se diferencian a células lúteas grandes que duplican su tamaño sin incrementar su número y las células de la teca interna a células lúteas pequeñas que proliferan y responden a la LH con un incremento en la secreción de progesterona (Niswender *et al.*, 2000). Este proceso de reprogramación de células foliculares a células lúteas es irreversible y requiere primero la salida del ciclo celular (Stocco *et al.*, 2007).

En las ovejas vacías la pérdida de receptores a progesterona (RP) es seguida de un incremento de receptores a estrógenos (RE) y después un incremento de receptores a oxitocina (ROT) en el endometrio, lo que desencadena la síntesis y liberación de pulsos luteolíticos de $\text{PGF}_{2\alpha}$; sin embargo, la producción de P_4 se mantiene si un embrión logra el reconocimiento por parte de la madre, inhibiendo la transcripción de los genes de RE y ROT (Spencer y Bazer, 2004). De esta forma se evita que se desencadene el mecanismo luteolítico sobre el cuerpo lúteo, prolongando la vida de éste y garantizando la producción de P_4 para el mantenimiento de la preñez (López *et al.*, 2008). En ausencia de gestación (Rosales y Guzmán, 2008), el CL debe ser eliminado para continuar con la función reproductiva normal y esta regresión está constituida por dos etapas; regresión funcional y estructural (Stocco *et al.*, 2007).

La regresión funcional implica la disminución en la producción principalmente de progesterona (Hussein, 2005), debido a factores que incluyen la síntesis y liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y LH, eventos que ocurren antes de que los cambios en la integridad celular del cuerpo lúteo puedan ser observados (Stocco *et al.*, 2007), mientras que la regresión estructural se caracteriza por la disminución del tamaño y peso del CL, debido a la muerte por apoptosis de las células lúteas y vasculares que en el caso de un CL de una gestación, tendrá lugar varios días después de la disminución de la producción de progesterona (Stocco *et al.*, 2007); esta regresión morfológica y su gradual involución dentro del ovario hasta una pequeña cicatriz compuesta de tejido

conectivo constituye la formación de una estructura llamada cuerpo *albicans* (Hussein, 2005).

3.3.1 Factores de sobrevivencia y apoptosis en el CL

Existen diversos factores que determinan la sobrevivencia o muerte de las células del CL y estos son determinantes en el destino de esta estructura ovárica. Entre estos factores se encuentran las gonadotropinas, estrógenos y factores de crecimiento para la sobrevivencia. Como determinantes de la apoptosis algunos integrantes de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) y algunas otras proteínas proapoptóticas como son caspasas efectoras, citocromo c, factor inductor de apoptosis, factor activador de la apoptosis, p53, caspasas de iniciación (Rosales y Guzmán, 2008); y Bcl-2, que son una familia integrada por miembros antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xl, Boo) y otros proapoptóticos (Bax, Bok, Bim, Bid) (Hussein, 2005). Respecto al factor de necrosis tumoral TNF los datos reportados por Okano *et al.* (2006), indicaron que es un importante factor para la inducción de la apoptosis en células lúteas.

Las principales hormonas que intervienen en el soporte del CL, son la LH que favorece la sobrevivencia de las células lúteas y promueve la actividad esteroidogénica mediante las enzimas citocromo P450scc y 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD), que actúan sobre el colesterol para la síntesis de P₄ (Rosales y Guzmán, 2008), la cual inhibe la expresión del antígeno Fas que es un factor desencadenante de apoptosis en células sensibles, el mRNA para caspasa 3 e inhibe también la activación de caspasa 3, lo que sugiere que la P₄ es indirectamente un supresor intraluteal de apoptosis celular (Okuda *et al.*, 2004).

La acetilcolina, es un neurotransmisor derivado de la acción de la enzima colina acetiltransferasa sobre la colina y acetil-CoA en algunas neuronas, incrementa la viabilidad celular y previene la muerte de las mismas, lo que significa que tiene un rol antiapoptótico en las células del CL (Al-zi'abi *et al.*, 2009)

Por otro lado resultados publicados por Bowolaksono *et al.* (2008), sugieren que la PGE₂ y la PGF_{2 α} locales, suprimen la apoptosis de las células lúteas esteroidogénicas por lo que juegan un papel luteoprotector.

El factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1), participa en la regresión del CL al favorecer incrementos en la secreción de estradiol y por lo tanto proliferación de células foliculares e incremento de la respuesta celular a las gonadotropinas (Rosales y Guzmán, 2008).

Reportes recientes de Nishimura *et al.* (2006), indican que la deficiencia en la disponibilidad de oxígeno disminuye la síntesis de P₄ por atenuación de la producción y actividad de la P450_{scc}. Esta hipoxia propicia la expresión de la proteína proapoptótica BNIP3 y la activación de la caspasa 3, lo que sugiere que la hipoxia causada por una disminución en el flujo sanguíneo hacia el CL es uno de los principales factores que contribuyen a la regresión tanto funcional como estructural (Nishimura *et al.*, 2008).

Komiyama *et al.* (2008), mencionan que el cortisol, es un glucocorticoide que actúa como modulador de funciones fisiológicas en varios órganos, a nivel de células lúteas inhibe la actividad de la caspasa 3 y la caspasa 8 inducidas por las señales apoptóticas del TNF y el interferón gamma (IFN- γ), ayudando a mantener la función del CL.

Por otro lado, Korzekwa *et al.* (2008), reportan que una disminución en la concentración de TNF estimula *in vivo* factores luteolíticos tales como la PGF_{2 α} , leucotrieno C₄, y óxido nítrico, lo que hace posible su participación en la apoptosis; sin embargo, el TNF en altas dosis puede estimular la vía de la supervivencia incrementando los niveles de P₄ y PGE₂ en el CL.

Peluffo *et al.* (2006), sugieren que las caspasas, una familia de proteasas, participan en el proceso apoptótico de las células lúteas, al ser observadas en concentraciones elevadas durante la formación y la regresión del CL en ratas y es la caspasa-3 el principal efector de la síntesis de los principales sustratos apoptóticos.

La $PGF_{2\alpha}$ como agente luteolítico, tiene diferentes mecanismos de acción:

- Incrementa la expresión de Bax (Proteína X asociada a Bcl-2), que pertenece a la familia de proteínas proapoptóticas Bcl-2.
- Incrementa la expresión de p53, que es una proteína clave en la regulación del ciclo celular y la principal reguladora de apoptosis por la activación de genes proapoptóticos como Bax.
- Es capaz de incrementar la actividad de caspasas iniciadoras y efectoras.

Por lo que al incrementarse la síntesis de $PGF_{2\alpha}$, se inicia la regresión funcional, se altera la producción de P4 y se dispara la apoptosis de las células lúteas (Rosales y Guzmán, 2008).

3.4 Mortalidad embrionaria temprana

La tasa reproductiva, expresada como el número de descendientes viables producidos anualmente por cada hembra destinada a la reproducción es uno de los principales factores determinantes de la eficiencia económica y biológica de los sistemas de producción animal (Azzarini, 1992).

La MET en ovinos es causa de elevadas pérdidas económicas en las explotaciones ovinas. Su etiología, puede deberse a factores de diversa naturaleza, pero los principales son los factores ambientales y los genéticos (Kaulfuss *et al.*, 1997).

La mortalidad embrionaria/fetal puede disminuir de manera importante la eficiencia reproductiva (Perry *et al.*, 2005). En pequeños rumiantes, es responsable de las mayores pérdidas prenatales y económicas. Al respecto, Kaulfuss *et al.* (1997), reportan una incidencia, en ovejas, de 36.7%, Mientras que Ake (2000) reporta una

incidencia en la pérdida de gestación de hasta el 58% en ovejas mantenidas en zonas tropicales, la cual puede ocurrir durante el período de pre-implantación (Santos *et al.*, 2004), que es indetectable cuando ocurre antes del reconocimiento materno de la gestación (RMG), en consecuencia, el cuerpo lúteo involucre y el animal retorna al estro dentro del período normal de duración del ciclo estral (Kwon *et al.*, 2004).

Algunos factores de tipo genético (consanguinidad, grupos sanguíneos, raza, entre otros), y ambiental (nutrición, manejo, temperaturas elevadas, infecciones) han sido asociados, en forma indirecta, con la MET (Ayalon, 1978); mientras que la alteración en el ambiente uterino, la asincronía materno embrionaria (Dey *et al.*, 2004) y el desbalance hormonal han sido relacionados de manera directa con este problema (Mattos *et al.*, 2003), éste último factor reconocido por Catena (2007), como una de las principales causas de MET.

El establecimiento de la gestación depende de eventos endocrinos y fisiológicos sincronizados perfectamente, que permiten la unión en el momento y lugar precisos, de un espermatozoide y un óvulo; además del ambiente del oviducto y del útero, el cual es determinante en el desarrollo del embrión, ya que los días previos a la implantación, éste sobrevive gracias a las secreciones de éstos órganos, los cuales le aportan nutrimentos, sustancias reguladoras del pH y factores de crecimiento, además de la participación de factores que actúan de manera autocrina, paracrina y endocrina (Catena, 2007).

El término *conceptus* se define como el producto completo de la gestación: embrión temprano / vesícula amniótica, embrión / membranas fetales, o feto / placenta fetal, es decir, desde la etapa de expansión trofoblástica hasta el parto (Wu *et al.*, 2008).

Se reconoce un estado de privilegio en la protección de la unión *conceptus*-maternal por el sistema inmune local y sistémico de la madre durante implantación,

placentación y gestación (Catena, 2007). Este estado armonioso durante la etapa embrionaria permite la viabilidad del *conceptus*, dependiendo de una serie de factores anatómo-fisiológicos, hormonales, inmunológicos, genéticos, entre otros, que permiten mantener la compleja interacción. Dicha interacción puede verse alterada ante la presencia de diferentes agentes y la incapacidad del aparato reproductor de restaurar el equilibrio (Catena, 2007).

El embrión en el día 12 a 13 de la gestación, después de la concepción, debe establecer los mecanismos que evitarán la regresión del cuerpo lúteo, lo cual se conoce, como reconocimiento materno de la gestación; este efecto se logra mediante la producción de $\text{oIFN-}\tau$ cuya propiedad es bloquear los procesos enzimáticos que conducen a la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Hernández y Morales, 2001).

En rumiantes, el interferón-tau ($\text{IFN-}\tau$), conocido como trofoblastina o proteína trofoblástica-1 (TP-1), es sintetizada por el embrión en desarrollo e interactúa con el útero para promover la secreción continua de progesterona (Ealy *et al.*, 2006), y es considerado como la señal del reconocimiento de la preñez (Arosh *et al.*, 2004b). De tal forma que en las hembras ovinas, el útero está programado para establecer, alrededor de los días 14 a 16 del ciclo estral, un patrón de secreción pulsátil y luteolítico de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Banu *et al.*, 2008), a menos que el embrión sintetice el $\text{oIFN-}\tau$ (Niswender *et al.*, 1997) entre los días 12 y 13 de la gestación, para impedir la acción de la ciclooxigenasa y la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ a partir del ácido araquidónico, rescatando al cuerpo lúteo y en consecuencia permitir que tenga lugar el reconocimiento materno de la gestación (Roberts y Schalue, 1990). Por lo tanto, solo se cuenta con uno o dos días para que este fenómeno se lleve a cabo y de no realizarse adecuadamente ocurre la pérdida embrionaria (Aké *et al.*, 2003).

Con la intención de reducir la actividad de la enzima ciclooxigenasa y la biosíntesis endometrial de $\text{PGF}_{2\alpha}$, se han utilizado diversas estrategias que incluyen, la aplicación de interferón tipo τ (Demmers *et al.*, 2001), la inclusión de ácidos grasos

poliinsaturados en la dieta (Cheng *et al.*, 2001; Mattos *et al.*, 2003, Caldari *et al.*, 2006) y, la aplicación de agentes antiinflamatorios no esteroides (Troxel y Kesler, 1984; Lacroix y Kann, 1986; Buford *et al.*, 1996; Lemaster *et al.*, 1999; Aké, 2000; Merrill 2007).

La síntesis de prostaglandinas requiere como paso inicial la liberación de ácido araquidónico, por acción de la fosfolipasa A₂ sobre los fosfolípidos de la membrana plasmática; posteriormente la enzima ácido graso ciclooxigenasa, cataliza la acción del ácido araquidónico para formar la PGG₂ y de ahí en adelante diferentes prostanoides son sintetizados en forma específica por varios tejidos (Zentella *et al.*, 2000). En el caso de la PGF_{2α}, es sintetizada por acción de la endoperóxido reductasa, la cual induce el proceso de luteólisis, además de provocar contracción en el miometrio y broncoconstricción (Hall *et al.*, 2001).

Los efectos farmacológicos de los AINEs, son en su mayor parte dependientes de la inhibición directa de las COX, que son las enzimas limitantes en la síntesis de prostaglandinas (PG). Estas enzimas sintetizan un precursor (PGH₂) mediante la oxidación del ácido araquidónico, liberado desde las membranas celulares por la fosfolipasa A₂. Éste precursor da lugar a diferentes PG y tromboxanos (TX) sintetizados por una serie de enzimas denominadas PG isomerasas o sintetetas terminales, específicas de un determinado grupo de PG. Cada tipo celular expresa específicamente un grupo limitado de estas enzimas, lo que explica que el producto final de las ciclooxigenasas varíe en las diferentes tipos celulares, donde las endoteliales sintetizan predominantemente prostaciclina (PGI₂). Las diferentes PG participan en aspectos específicos de la fisiopatología de los diferentes órganos y sistemas (Pablos, 2005).

Otros sitios de síntesis de la PGF_{2α} son el miometrio, las membranas fetales y el cordón umbilical. La capacidad de estos tejidos para sintetizar PG se incrementa durante la gestación por inducción de COX₂; en el periodo de parto las

concentraciones de PG se incrementan en sangre y líquido amniótico. Al principio del embarazo las COX 1 y 2 son expresadas y participan en la implantación del óvulo, la angiogénesis y la formación de la placenta (Kam y See, 2000).

En el aspecto reproductivo, la COX₂ se encuentra de manera constitutiva en el ovario y en el útero e interviene en varios procesos reproductivos de la hembra; durante la ovulación contribuye en la ruptura del folículo y después de la fertilización participa en la implantación embrionaria en el endometrio (Lizarraga *et al.*, 2002).

La indometacina es un antiinflamatorio no esteroide derivado del ácido indolacético que inhibe la actividad de la enzima ciclooxigenasa para disminuir la formación de precursores de prostaglandinas y tromboxanos a partir del ácido araquidónico. Uno de sus efectos es la inhibición en la síntesis de prostaglandinas en el útero, lo que disminuye las contracciones y aumenta la perfusión uterina.

En la forma de administración oral se absorbe de manera rápida y completa, 90% de la dosis en cuatro horas, mientras que en forma de tópica (supositorios), la absorción es más rápida en 80% o 90% de una dosis debido a que el supositorio no se retiene en el recto durante una hora completa. Se metaboliza en el hígado, excretándose el 60% de la dosis por la orina como indometacina inalterada (10 a 20%) y el 33% por vía biliar (el 1,5% como indometacina inalterada) (Merck, 2008).

En el caso del interferón- τ , Demmers *et al.* (2001), mencionan que el uso de esta proteína en rumiantes, inhibe la síntesis endometrial de PGF_{2 α} , no obstante la dificultad de aplicación y el costo del producto limitan su utilización, además de que su administración incrementa la temperatura del útero, lo que puede provocar la muerte del embrión (Niswender *et al.*, 1997).

En ovinos, el útero produce pulsos de PGF_{2 α} entre los días 15 a 16 del ciclo estral, lo que promueve la regresión del cuerpo lúteo; estos impulsos de PGF_{2 α} son

producidos por el lumen del epitelio endometrial y superficial del epitelio glandular como respuesta a las señales enviadas por los receptores de oxitocina y la consecuente liberación de ácido araquidónico, precursor de las PGF. Las ciclooxigenasas de los tipos 1 (COX₁) y 2 (COX₂), son enzimas limitantes en la síntesis de PGF, y en especial en los ovinos, la COX₂, donde la expresión de dicha enzima, juega un papel regulador en la implantación y desarrollo del *conceptus* (Kim *et al.*, 2003).

IV. HIPÓTESIS

La administración de indometacina, favorece la tasa de gestación y modifica las concentraciones séricas de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y de progesterona en ovejas de pelo

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la indometacina sobre la tasa de gestación y las concentraciones séricas de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y progesterona en ovejas de pelo.

5.1.1 Objetivos particulares

5.1.1.1 Evaluar el efecto de la indometacina sobre la tasa de gestación.

5.1.1.2 Evaluar el efecto de la indometacina sobre la concentración plasmática de metabolito de prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ (15-ceto13,14-dihidro- $\text{PGF}_{2\alpha}$).

5.1.1.3 Evaluar el efecto de la indometacina sobre la concentración plasmática de progesterona (P_4).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Localización del área de estudio

El presente estudio se realizó en el sector de ovinos de la Posta Zootécnica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) en el Municipio de Tarímbaro, Michoacán, México; localizada a 19° 48'' de latitud norte y 101° 11'' de longitud oeste, altura de 1860 msnm, con temperatura media de 18.4° C y precipitación pluvial anual de 777.5 mm (García, 1988).

6.2 Animales y sincronización de ciclo estral

Se utilizaron 40 ovejas de pelo de la raza Pelibuey, con una condición corporal de 3 puntos en la escala de 1 a 5, donde 1=emaciada y 5=obesa (Manazza, 2006), con dos y tres partos, y sin problemas reproductivos al menos en el último parto.

Se conformaron cuatro grupos de 10 ovejas cada uno y se trabajaron sucesivamente. El ciclo estral se sincronizó mediante la utilización de esponjas comerciales intravaginales, impregnadas con 40 mg de acetato de fluorogestona (Chronogest, Intervet S.A. México) por espacio de 10 días, el día previo al retiro de las esponjas se aplicaron por vía intramuscular, 15 mg de PGF_{2α} (Lutalyse, Upjhon USA). Las hembras que manifestaron celo, fueron servidas por monta natural entre las 12 y 72h después del retiro de las esponjas, con dos sementales previamente evaluados seminalmente, proporcionando dos servicios a intervalos de 12 h.

Posterior al servicio, las hembras fueron distribuidas de manera aleatoria en dos grupos; grupo control (PLA; n=20) que fue tratado con un placebo (dispositivo de glicerina), y un grupo experimental (IND; n=20) tratado con un dispositivo de 100 mg de indometacina, ambos se aplicaron a intervalos de 12 h y se colocaron intravaginalmente, a partir del día 10 y hasta el día 16 post-servicio.

6.3 Diagnóstico de gestación

El diagnóstico de gestación se realizó por una sola persona, mediante ultrasonografía de tiempo real, por la presencia del embrión a los 35 días post-servicio.

6.4 Determinación de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$)

La concentración plasmática de la prostaglandina $F_{2\alpha}$, es directamente proporcional a la concentración del metabolito 15-ceto, 13-14-dihidro $PGF_{2\alpha}$ (MPGF), por lo que la concentración del MPGF, fue determinada en muestras sanguíneas colectadas de la vena yugular a intervalos de 4 h a partir del día 10 y hasta el día 16 post-servicio, en 4 de las 10 ovejas de cada grupo, seleccionadas al azar. Las muestras sanguíneas colectadas fueron centrifugadas a 3000 rpm por 15 min a -4°C , el plasma obtenido se almacenó a -20°C hasta la determinación del MPGF, el cual se realizó en la unidad de servicios auxiliares al diagnóstico (USAD) de la FMVZ-UMSNH, mediante enzimoimmunoanálisis (EIA) con la utilización un paquete comercial (Cat 516671, Cayman Chemical, Michigan, EUA) y un lector de placa de 96 pozos (Multiscan ascent, Thermo Scientific).

El MPGF se determinó en las muestras obtenidas de dos ovejas diagnosticadas al día 35 como vacías y dos gestantes sometidas a cada uno de los tratamientos (PLA y IND) planteados en el estudio.

6.5 Determinación de progesterona

La determinación de progesterona se realizó en las muestras sanguíneas colectadas a intervalos de 24 h a partir del día 10 post-servicio (día del servicio=0) y hasta el día 24 post-servicio. La sangre se colectó mediante punción de la vena yugular en tubos vacutainer con anticoagulante (EDTA, 10%), y posteriormente se centrifugaron por 15 minutos a 3000 rpm a -4°C . El plasma obtenido se almacenó a -20°C hasta la determinación de la hormona en el laboratorio de reproducción de la UNAM, mediante la técnica de radioimmunoanálisis (RIA) de fase sólida con la utilización de

un paquete comercial (Cat. DSL-3900, Diagnostic Systems Laboratories, Inc. Webster, Texas, EUA) y un contador gamma (Oakfield SD-12, Oakfield Instruments).

6.6 Análisis estadístico

Las variables de respuesta en este estudio fueron la concentración de progesterona, metabolito 15-ceto, 13-14-dihidro PGF₂ α (MPGF) y tasa de gestación. Los resultados de la tasa de gestación de las ovejas de pelo se analizaron mediante una prueba de Chi-cuadrada y los obtenidos de las concentraciones hormonales se analizaron mediante el procedimiento de modelos lineales generales en un modelo mixto (PROC MIXED) para medidas repetidas, donde la variable aleatoria fue la oveja, la variable fija fue el tratamiento y la medida repetida fueron cada una de las muestras (MPGF y P₄) durante los días de muestreo, los análisis se realizaron con el paquete estadístico SAS (2000).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del diagnóstico de gestación, indican que no hubo diferencias estadísticamente significativas ($X^2=0.2867$) entre el GIND (80%) respecto al GPLA (75%).

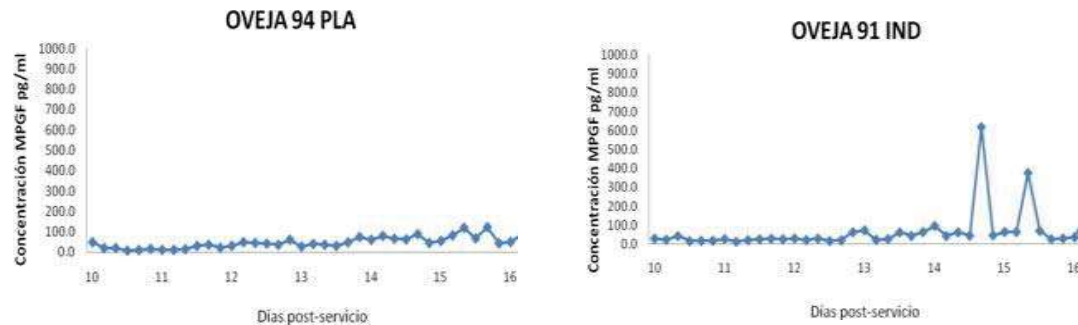
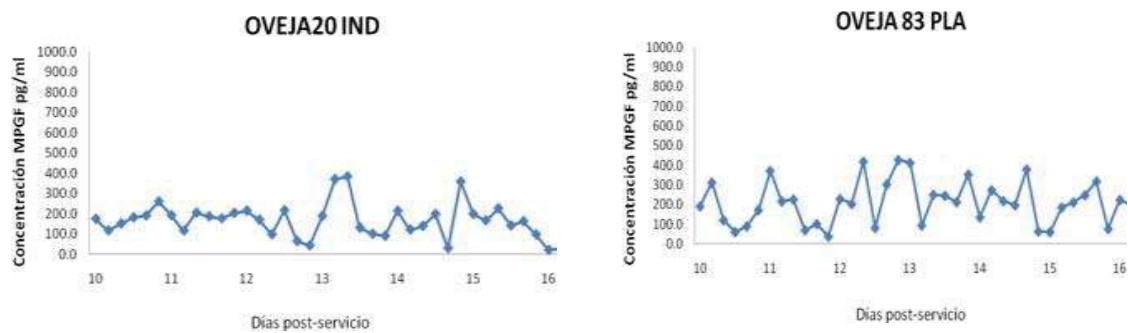
Estos resultados son similares a los reportados por Aké (2000), el cual no encontró diferencia entre las ovejas tratadas con FM y en el grupo testigo (56.5% y 58%, respectivamente $P>0.05$), sin embargo la tasa de gestación fue mayor en este estudio. Es posible que el tamaño de muestra, la diferencia en la aplicación de los tratamientos y las condiciones ambientales en que se desarrolló cada experimento, sean los responsables de la respuesta obtenida entre los datos del presente estudio y los datos obtenidos por Aké (2000).

Los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con lo reportado previamente por Merrill *et al.* (2003), donde un grupo de vacas con aptitud de carne fueron sometidas a estrés de transporte por espacio de 4 h, mostraron una menor tasa de gestación (69 vs 84%; $P=0.17$) que aquellas vacas que fueron sometidas al mismo tipo de estrés pero que adicionalmente fueron tratadas con flunixin meglumine (1.1 mg/kg de peso vivo; i.m.).

En otros estudios más recientes Merrill *et al.* (2007), encontraron que vacas sometidas a estrés del transporte tratadas con FM, presentaron una tendencia ($P=0.07$) hacia una mayor tasa de gestación (74%) que aquellas que no recibieron el agente antiinflamatorio (66%). En este mismo estudio se demostró que las vacas que no fueron sometidas al estrés de transporte pero que recibieron FM presentaron mayor tasa de gestación ($P<0.05$) que las vacas que no fueron tratadas con el AINE (71 vs 61%, respectivamente).

Respecto a la concentración del $\text{PGF}_{2\alpha}$ (media \pm ee), se encontró efecto del tratamiento ($P<0.05$) sobre la concentración sérica del MPGF, observando menor

concentración en el grupo IND (112.39 ± 7.60 pg/ml) respecto al grupo PLA (129.69 ± 7.62 pg/ml). La concentración del MPGF fue superior ($P < 0.01$) en las ovejas vacías (Figura 3) del grupo PLA (209.64 ± 8.80 pg/ml) que en las del grupo IND (166.11 ± 8.78 pg/ml), mientras que en las ovejas gestantes (Figura 4) del grupo PLA e IND, no se observaron diferencias significativas (49.72 ± 8.78 vs 58.66 ± 8.78 pg/ml, respectivamente).



Estudios previos en ovejas (Lacroix y Kann, 1986), demostraron que la aplicación de indometacina afectaba negativamente la liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$, lo que permitió mantener la concentración de progesterona hasta el día 30 post-estro. Otros estudios (Troxel y Kesler, 1984) también mostraron una reducción en concentración de MPGF en vacas de carne tratadas con una infusión intrauterina de indometacina. Lemaster *et al.* (1999) reportaron menor concentración del MPGF en vacas de carne tratadas

con flunixin meglumine (FM) comparado con el grupo control tratado con solución salina. En el mismo sentido, los datos reportados por Aké, (2000), indican que las ovejas tratadas con flunixin meglumine mostraron una fase lútea más larga. Por el contrario Merrill *et al.* (2003) no observaron disminución en la concentración de MPGF, entre los grupos de vacas de carne al aplicar FM, posiblemente debido a que ambos grupos se sometieron a estrés lo cual puede ser una diferencia importante con el presente trabajo.

Por otra parte, en las ovejas gestantes tratadas con indometacina no se observaron diferencias con respecto a las del grupo control debido posiblemente a que en la especie ovina, el trofoectodermo del embrión sintetiza y secreta interferón tau ovino (oIFN- τ) (Spencer y Bazer, 2004), que representa una señal para el reconocimiento materno de la gestación, e inhibe la producción endometrial de pulsos luteolíticos de PGF_{2 α} (Krishnaswamy *et al.*, 2009); sin embargo, en las ovejas vacías por no encontrarse presente el oIFN- τ , el efecto del tratamiento con indometacina disminuyó la concentración sérica de MPGF, respecto al grupo tratado con el placebo. La administración de indometacina modifica la liberación endometrial de PGF_{2 α} , lo que pudiera favorecer un incremento en la tasa de gestación en ovejas de pelo.

En la concentración media plasmática de P₄ no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre el grupo PLA (1.84 \pm 0.32 ng/ml) y el grupo IND (2.06 \pm 0.34 ng/ml), no obstante, en la ovejas tratadas con el placebo se observó un descenso en la concentración de la hormona a > 1 ng/ml a partir del día 18 post-servicio (Figura 5), incrementando la duración de la fase lútea en las ovejas tratadas con indometacina.

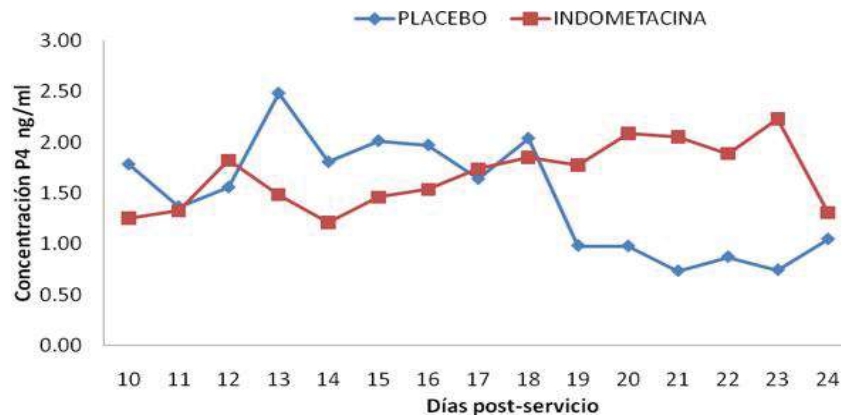


Figura 5. Concentración media de P₄ plasmática (ng/ml) en ovejas tratadas con placebo e indometacina.

En las ovejas vacías (Figura 6), la concentración media de progesterona no mostró diferencias significativas entre tratamientos, observado una concentración 1.26 ± 0.27 vs 1.26 ± 0.34 ng/ml, en los grupos PLA e IND, respectivamente. No obstante, la concentración sérica de la hormona en las ovejas del grupo control descendió a partir del día 18 post servicio a > 1 ng/ml, mientras que en las ovejas tratadas del grupo IND la concentración de la hormona se mantuvo por arriba de 1 ng/ml hasta el día 24 donde se registró un descenso similar al del grupo control.

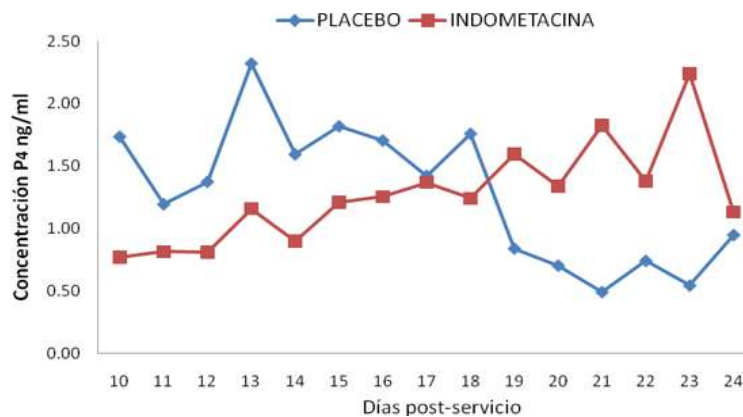


Figura 6. Concentración media de P₄ plasmática en ovejas vacías tratadas con indometacina y placebo.

En las ovejas gestantes (Figura 7), la concentración media de progesterona no fue afectada por el tratamiento ($P>0.05$) observando una concentración similar en ambos grupos (2.41 ± 0.59 vs 2.86 ± 0.59 ng/ml; en el grupo IND y PLA; respectivamente), durante todo el periodo de muestreo.

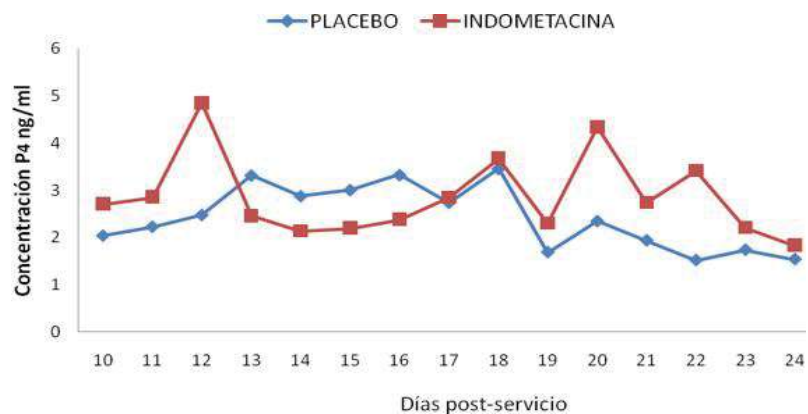


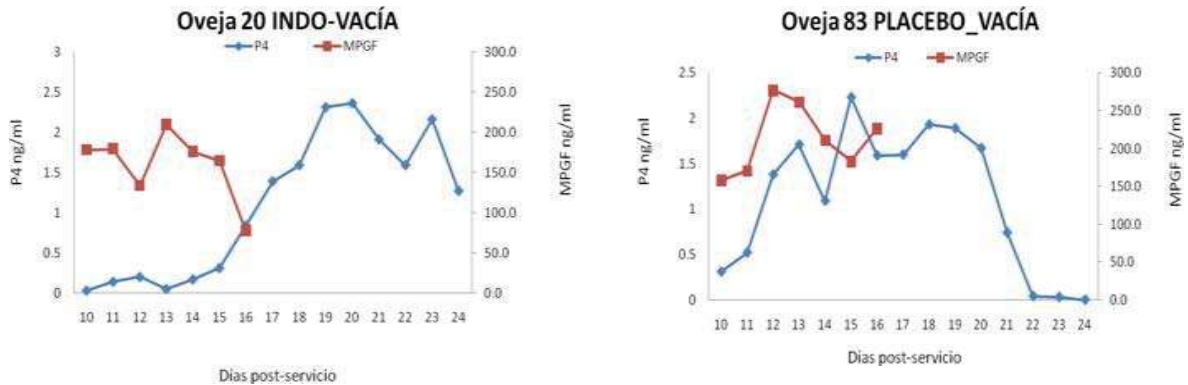
Figura 7. Concentración media de P_4 plasmática en ovejas gestantes tratadas con indometacina y placebo.

Los niveles observados en la concentración plasmática de P_4 , muestran que dos de las ovejas tratadas con indometacina y diagnosticadas como vacías a los 35 días, presentaron concentraciones > 1 ng/ml (Figura 8), entre los días 17 y 24 post-servicio, lo cual indica una prolongación de la fase lútea, por lo que se considera que probablemente en la oveja 274, se estableció la gestación, en la cual posiblemente se presentó la muerte del embrión entre los días 24 y 35 post-servicio. La oveja 20 posiblemente presentó un cuerpo lúteo de vida media corta por lo cual la concentración de P_4 fue < 1 ng/ml durante los días 10 a 16 post-servicio, con la presentación de un nuevo cuerpo lúteo por lo cual se incrementó la concentración serica de P_4 entre los días 17 y 24.



Figura 8. Concentración de progesterona plasmática en ovejas del día 10 al 24 post-servicio.

La Figura 9, muestra las gráficas de las cuatro ovejas en las que se realizó la determinación de las dos hormonas que se analizaron en este estudio. Se puede observar que la concentración plasmática de MPGF es menor en las ovejas gestantes (< 100 pg/ml), que en las vacías (> 200 pg/ml).



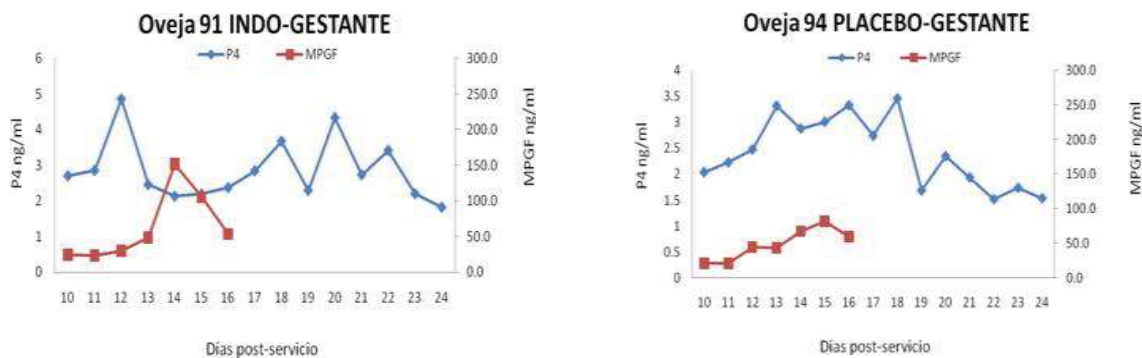


Figura 9. Comportamiento de las concentraciones diarias de P₄ y promedios diarios de MPGF.

Estos resultados coinciden con lo observado por Buford *et al.* (1996), quienes reportaron que entre las vacas tratadas con solución salina y las tratadas con FM no encontraron diferencias, al igual que Merrill *et al.* (2003), que no encontraron diferencias significativas en la concentración de progesterona, entre las vacas sometidas a estrés, las vacas sometidas a estrés + FM y las vacas del grupo control.

Por el contrario Lacroix y Kann, (1986) comentaron que al aplicar indometacina del día 8 al 20 post-estro en ovejas cíclicas, se incrementó la duración de la fase lútea hasta el día 30. Por su parte, Troxel y Kesler, (1984) encontraron que hubo un incremento en la duración de la fase lútea de vacas tratadas con indometacina comparadas con el grupo control (11.8 ± 1.3 vs 5.9 ± 4 respectivamente $P < 0.01$). Estudios recientes reportan que con la utilización de flunixin meglumine en vacas sometidas a estrés de transporte y transporte + FM mostraron concentraciones superiores de progesterona, que aquellas que no fueron transportadas (3.4 ± 0.2 , 3.3 ± 0.2 y 2.9 ± 0.2 respectivamente; $P < 0.05$).

Estudios realizados en cultivos *in vitro* de porciones de CL de ovejas tanto cíclicas como gestantes, reportaron que el tratamiento con indometacina, inhibe la producción de PGF_{2 α} , disminuyendo también la concentración sérica de P₄ tanto en el día 8 para ovejas cíclicas, como el día 90 de la gestación para ovejas preñadas

(Kim *et al.*, 2001). En el mismo sentido Weems *et al.*, (2002) observaron que el tratamiento con indometacina de tejido lúteo de vacas *Bos indicus* y *Bos taurus* gestantes, redujo las concentraciones de $\text{PGF}_{2\alpha}$, y P_4 a las 4 y 8 h posteriores a la administración del tratamiento.

Sin embargo Beltman *et al.* (2009), reportaron datos que sugieren que la suplementación con progesterona exógena en la etapas tempranas de la gestación incrementa la concentración de progesterona periférica y resulta en una asociación positiva entre los cambios en la concentración de progesterona durante la fase lútea temprana y la tasa de sobrevivencia embrionaria, sin embargo al no afectar el peso del cuerpo lúteo ni el tamaño del *conceptus*, esto tiene un significativo efecto negativo en la sobrevivencia embrionaria temprana.

La producción de un embrión viable y el mantenimiento de la gestación requieren de varios factores entre los que están la ovulación de un ovocito competente y adecuada producción de progesterona por el cuerpo lúteo (Perry *et al.*, 2005), ya que en las etapas tempranas del desarrollo del blastocito influye, tanto la calidad del folículo ovulado, como el grado de luteinización que determina la tasa de producción lútea de progesterona (Demmers *et al.*, 2001), lo cual pudo ser un factor que influyó para que posterior al día 24 post-servicio, se hubieran perdido las gestaciones, aún con el apoyo de la indometacina durante los días más críticos (días 10 al 16) por la cascada de producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Otros trabajos han reportado datos que mostraron, que la aplicación de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) 5 días después de la inseminación artificial en ganado lechero, incrementó la concentración sérica de progesterona comparado con el grupo que recibió solución salina (5.22 ± 0.46 ng/ml vs 3.36 ± 0.48 ng/ml); sin embargo, aunque este incremento se debió al desarrollo de un CL accesorio, no hubo incremento en la tasa de gestación (Howard *et al.*, 2006).

La utilización de IFN- τ con la finalidad de reducir las pérdidas embrionarias, fue propuesto por Demmers *et al.* (2000); sin embargo, Demmers *et al.* (2001), sugieren que ante la dificultad para administrar el IFN- τ en el sitio de acción y el costo de las grandes cantidades requeridas, hacen más factible el tratamiento con progesterona.

VIII. CONCLUSIONES

La tasa de gestación no se ve afectada con la utilización de indometacina.

La indometacina tiene un efecto positivo en la inhibición de la cascada de producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

La concentración sérica de P_4 , no se afecta con la utilización de indometacina, sin embargo probablemente puede haber un incremento de la fase lútea.

IX. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Los resultados de este trabajo sugieren la realización de trabajos en condiciones ambientales y diseño de esquemas de aplicación diferentes para validar la efectividad de la utilización de la indometacina, como puede ser su utilización en condiciones de climas calurosos, donde las tasas de gestación suelen ser menores, condiciones de manejo cotidianas de empresas comerciales, número mayor de ovejas, aplicación de la indometacina intramuscular.

Por otro lado aunque no necesariamente con la utilización de indometacina, se sugiere la realización de trabajos con la utilización de sustancias que puedan inhibir de manera más específica la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ con la finalidad de mantener la producción de PGE_2 y su influencia luteotrópica, la realización de trabajos encaminados a lograr la producción de ovocitos de buena calidad para obtener embriones vigorosos que mantengan producción de $\text{oIFN-}\tau$ suficiente para su sobrevivencia y la inducción de folículos que garanticen CL's con producción de progesterona suficiente para estimular la producción de $\text{oIFN-}\tau$ suficiente y el mantenimiento de la gestación.

X. BIBLOGRAFÍA

- Aké, L.J.R. 2000. Efecto del flunixin meglumine en el ciclo estral y la fertilidad de ovejas pelibuey bajo condiciones de tropico. "Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Agropecuarias". Universidad de Colima, Tecomán, Colima, México. 106 pp.
- Aké, L.J.R., A.M. Heredia, G.M. Alfaro, C.F. Centurión y R.O. Rojas. 2003. Efecto de la hormona en la respuesta superovulatoria y de la sincronía del estro en el porcentaje de gestación de ovejas pelibuey. *Revista Veterinaria México* 34 (3):225-233.
- Al-zi'abi, M.O., A. Bowolaksono and K. Okuda. 2009. Survival role of locally produced acetylcholine in the bovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*. 80 (4):823-832.
- Arosh, J.A., S.K. Banu, P. Chapdelaine, E. Madore, J. Sirois and M.A. Fortier. 2004a. Prostaglandin biosynthesis, transport, and signalling in corpus luteum: a basis for autoregulation of luteal function. *Endocrinology*. 145 (5):2551-2560.
- Arosh, J.A., S.K. Banu, S. Kimmins, P. Chapdelaine, L.A. Maclaren and M.A. Fortier. 2004b. Effect of interferon-t on prostaglandin biosynthesis, transport, and signalling at the time of maternal recognition of pregnancy in cattle: evidence of polycrine actions of prostaglandin E2. *Endocrinology*. 145 (11): 5280-5293.
- Ayalon N. 1978. A review of embryonic mortality in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 54:483-493.
- Azzarini M. 1992. Reproducción en ovinos en América Latina. Algunos resultados de la investigación sobre factores determinantes del desempeño reproductivo y su empleo en condiciones de pastoreo. *Producción Ovina*. 5:7-56.
- Banu, S.K., J. Lee, M.C. Satterfield, T.E. Spencer, F.W. Bazer and J.A. Arosh. 2008. Molecular cloning and characterization of prostaglandin (PG) transporter in ovine endometrium: role for multiple cell signaling pathways in transport of PGF_{2α}. *Endocrinology*. 149 (1): 219-231.

-
- Beltman, M.E., P. Lonergan, M.G. Diskin, J.F. Roche, M.A. Crowe. 2009. Effect of progesterone supplementation in the first week post conception on embryo survival in beef heifers. *Theriogenology*. 71 (7):1173-1179.
- Bowolaksono, A, R. Nishimura, T. Hojo, R. Sakumoto, T.J. Acosta and K. Okuda. 2008. Anti-apoptotic roles of prostaglandin E2 and F2alpha in bovine luteal steroidogenic cells. *Biology of Reproduction*. 79 (2):310-317.
- Bruce D.M. 2000. Models of luteinization. *Biology of reproduction*. 63 (1):2-11.
- Buford, W.I., N. Ahmad, F.N. Schrick, R.L. Butcher, P.E. Lewis and K. Inskeep. 1996. Embryotoxicity of a regressing corpus luteum in beef cows supplemented with progestogen. *Biology of Reproduction*. 54 (3):531-537.
- Burnum, KE, S. Tranguch, D. Mi, T. Daikoku, S.K. Dey and R.M. Caprioli. 2008. Imaging mass spectrometry reveals unique protein profiles during embryo implantation. *Endocrinology*. 149 (7):3274-3278.
- Caldari, TC, S.C. Rodríguez, E.S. Greene and L. Badinga. 2006. Differential effects of n-3 and n-6 fatty acids on prostaglandin F_{2α} production by bovine endometrial cells¹. *Journal of Dairy Science*. 89 (3):971-977.
- Catena M.C. 2007. Vaca vacía-mortalidad embrionaria. Programa de Educación Continua. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Pp. 1-6.
- Cheng, Z., R.S. Robinson, P.G.A. Pushpakumara and R.J. Mansbridge. 2001. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on uterine prostaglandin synthesis in the cow. *Journal of Endocrinology*. 171 (3):463-473.
- Demmers, K.J., H.N. Jabbour, D.W. Deakin and A.P.F. Flint. 2000. Production of interferon by red deer (*Cervus elaphus*) conceptuses and the effects of rolFN- τ on asynchronous embryo transfer. *Journal of Reproduction and Fertility*. 118 (2):387-395.
- Demmers, K.J., K. Derecka and A. Flint. 2001. Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction*. 121 (1):41-49.
-

-
- Devost, D., M.E. Carrier, H.H. Zingg. 2008. Oxytocin-induced activation of eukaryotic elongation factor 2 in myometrial cells is mediated by protein kinase C. *Endocrinology*. 149 (1):131-138.
- Dey, S.K., H. Lim, S.K. Das, J. Reese, B.C. Paria, T. Daikoku and H. Wang. 2004. Molecular cues to implantation. *Endocrine Reviews*. 25 (3):341-373.
- Ealy, A.D., K.A. Pennington and T.M. Rodina. 2006. Interferon-tau polymorphisms and their potential functions in ruminants. *Annual Review of Biomedical Sciences*. 8:9-18.
- Frungieri, M.B., S.I.G. González, F. Parborell, M. Albrecht, A. Mayerhofer, and R.S. Calandra. 2006. Cyclooxygenase-2 and prostaglandin F2a in syrian hamster leidyg cells: Inhibitory rol on luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin-stimulated testosterone production. *Endocrinology*. 147 (9):4476-4485.
- Fuchs, A.R., W. Rust and M.J. Fields. 1999. Accumulation of cyclooxygenase-2 gene transcripts in uterine tissues of pregnant and parturient cows: stimulation by oxytocin. *Biology of Reproduction*. 60 (2):341-348.
- García E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. UNAM. Instituto de Geografía. México. 217 pp.
- Goyeneche, A.A., R.P. Deis, G. Gibory and C.M. Telleria. 2003. Progesterone promotes survival of the rat corpus luteum in the absence of cognate receptors. *Biology of Reproduction*. 68 (1):151-158.
- Gray, C.A., C.A. Abbey, P.D. Beremand, Y. Choi, J.L. Farmer, D.L. Adelson, T.L. Tomas, F.W. Bazer and T.E. Spencer. 2006. Identification of endometrial genes regulated by early pregnancy, progesterone, and interferon tau in the ovine uterus. *Biology of Reproduction*. 74 (2):383-394.
- Hafez, E.S.E., B. Hafez. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. Editorial McGraw-Hill Interamericana, 7ª. Ed. 519 pp.
- Hall, V.R., N.P. Murillo, M.P. Rocha y E.V. Rodriguez. 2001. Antiinflamatorios no esteroidales (AINE's). Centro nacional de información de medicamentos. Instituto de Investigaciones Farmaceuticas. Facultad de farmacia. Universidad de Costa Rica. 93 pp.
-

-
- Hernández, C.J., R.J.S. Morales. 2001. Falla en la concepción en el ganado lechero: Evaluación de terapias hormonales. *Veterinaria México*. 32 (4):279-287.
- Howard, J.M., R. Manzo, J.C. Dalton, F. Frago and A. Ahmadzadeh. 2006. Concepción rates and serum progesterone concentration in dairy cattle administered gonadotropin releasing hormone 5 days after artificial insemination. *Animal Reproduction Science*. 95 (3-4):224-233.
- Hussein RM. 2005. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human Reproduction Update*. 11 (2):162-178.
- INEGI. 2008a. El sector alimentario en México 2008. 301 pp.
http://www.inegi.gob.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/sociodemografico/SAM/2007/sam2007.pdf
- INEGI. 2008b. Anuario de estadísticas por entidad federativa edición 2008. 222 pp.
http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/pais/aepef/2008/Aepef0801.pdf
- Kam, P., and U. See. 2000. Ciclo-oxygenase isoenzymes: physiological and pharmacological role. *Anaesthesia*. 55 (5):442-449.
- Kaufuss, K.H., J. May, R. Suss and U. Moog. 1997. *In vivo* diagnosis of embryo mortality in sheep by real-time ultrasound. *Small Ruminant Research*. 24 (2):141-145.
- Kim, L., Y.S. Weems, P.J. Bridges, B.R. Leamaster, L. Ching, D.L. Vincent and C.W. Weems. 2001. Effects of indomethacin, luteinizing hormone (LH), prostaglandin E₂ (PGE₂), trilostane, mifepristone, ethamoxytriphetol (MER-25), prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) and progesterone by ovine corpora lutea of pregnancy or the oestrous cycle. *Prostaglandins & Other Lipids Mediators*. 63 (4):189-203.
- Kim, S., Y. Choi, T.E. Spencer and F.W. Bazer. 2003. Effects of the estrous cycle, pregnancy and interferon tau on expression of cyclooxygenase two (COX-2) in ovine endometrium. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1:58-66.
- Klein, C., S. Bauersachs, S.E. Ulbrich, R. Einspainer, H.H.D. Meyer, S.E.M. Schmidt, H.D. Reichenbach, M. Vermehren, F. Sinowatz, H. Blum and E. Wolf. 2006. Monozygotic twin model reveals novel embryo-induced transcriptome changes in
-

- bovine endometrium in the preattachment period. *Biology of Reproduction*. 74 (2):253-264.
- Komiyama, J., R. Nishimura, H.Y. Lee, R. Sakumoto, M. Tetsuka, T.J. Acosta, D.J. Skarzynski and K. Okuda. 2008. Cortisol is a suppressor of apoptosis in bovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*. 78 (5):888-895.
- Korzekwa, A., S. Murakami, P.I. Woclawek, M.M. Bah, K. Okuda and D.J. Skarzynski. 2008. The influence of the tumor necrosis factor- α (TNF) on the secretory function of bovine corpus luteum: TNF and its receptors expressions during the estrous cycle. *Reproductive Biology*. 8 (3):245-262.
- Krishnaswamy, N., G. Danyod, P. Chapdelaine and M.A. Fortier. 2009. Oxytocin receptor down-regulation is not necessary for reducing oxytocin-induced prostaglandin $F_{2\alpha}$ accumulation by interferon- τ in a bovine endometrial cell line. *Endocrinology*. 150 (2):897-905.
- Kwon, H, S.P. Ford, F.W. Bazer, T.E. Spencer, P.W. Nathanielsz, M.J. Nijland, B.W. Hess and G. Wu. 2004. Maternal nutrient restriction reduces concentrations of amino acids and polyamines in ovine maternal and fetal plasma and fetal fluids. *Biology of Reproduction*. 71 (3):901-908.
- Lacroix, M.C., G. Kann. 1986. Aspects of the antiluteolytic activity of the conceptus during early pregnancy in ewes. *Journal of Animal Science*. 63 (5):1449-1458.
- Lemaster, J.W., R.C. Seals, F.M. Hopkins and F.N. Schrick. 1999. Effects of administration of oxytocin on embryonic survival in progestogen supplemented cattle. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 57 (4):259-268.
- Lizarraga, M.I., L.H. Sumano y A.F. Castillo. 2002. Inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa COX-2: usos potenciales en perros. *Veterinaria México*. 33 (3):285-307.
- López, A.P., L.F. Gómez, C.Z.T. Ruiz, M. Olivera y C.A. Giraldo. 2008. Reconocimiento materno de la preñez e implantación del embrión: modelo bovino. *Analecta Veterinaria* 28 (1):42-47.
- Manazza J. 2006. Condición corporal en ovinos. *Visión rural*, INTA Balcarce. 60:1-3. <http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/ganaderia/ovinos/condcorp.htm>

-
- Mattos, R., L. Badinga, C.R. Staples and W.W. Thatcher. 2000. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. *Reviews of Reproduction*. 5 (1):38-45.
- Mattos, R., A. Guzeloglu, L. Badinga, C.R. Staples and W.W. Thatcher. 2003. Polyunsaturated fatty acids and bovine interferon- τ modify phorbol ester-induced secretion of prostaglandin $F_{2\alpha}$ and expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 and phospholipase- A_2 in bovine endometrial cells. *Biology of Reproduction*. 69 (3):780-787.
- Merck sharp & dome de México S.A. de C. V. 2008. Indocid. Nota técnica. Whitehouse Station, N.J., U.S.A.
- Merrill, L.M., R.P. Ansotegui, N.E. Wamsley, P.D. Burns and T.W. Geary. (2003). Effects of flunixin meglumine on embryonic loss in stressed beef cows. *Proceedings Western Section. American Society of Animal Science*. 54.
- Merrill, M.L., R.P. Ansotegui, P.D. Burns, M.D. MacNeil and T.W. Geary. (2007). Effects of flunixin meglumine and transportation on establishment of pregnancy in beef cows. *Journal of Animal Science*. 85 (6):1547-1554.
- Min, G., M.G. Hartzog, R.L. Jennings, R.J. Winn and O.D. Sherwood. 1997. Evidence that endogenous relaxin promotes growth of the vagina and uterus during pregnancy in gilts. *Endocrinology*. 138 (2):560-565.
- Ndiaye, K., D.H. Poole and J.L. Pate. 2008. Expression and regulation of functional oxytocin receptors in bovine t lymphocytes. *Biology of Reproduction*. 78 (4):786-793.
- Nishimura, R., R. Sakumoto, Y. Tatsukawa, T.J. Acosta and K. Okuda. 2006. Oxygen concentration is an important factor for modulating progesterone synthesis in bovine corpus luteum. *Endocrinology*. 147 (9):4273-4280.
- Nishimura, R., J. Komiyama, Y. Tasaki, T.J. Acosta and K. Okuda. 2008. Hypoxia promotes luteal cell death in bovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*. 78 (3):529-536.
- Niswender, K.D., J. Li, M.R. Powell, K.R. Loos, R.M. Roberts, D.H. Keisler and M.F. Smith. 1997. Effect of variance of interferon- τ with mutations near the carboxyl terminus on luteal life span in sheep. *Biology of Reproduction*. 56 (1):214-220.
-

-
- Niswender, G.D., J.L. Juengel, P.J. Silva, M.K. Rollyson and E.W. McIntush. 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews*. 80 (1):1-29.
- Okano, A., H. Kishi, H. Takahashi and M. Takahashi. 2006. Tumor necrosis factor- ∞ induces apoptosis in cultured porcine luteal cells. *Journal and reproduction and development*. 52 (2):301-306.
- Okuda, K., A. Korzekua, M. Shibaya, S. Murakami, R. Nishimura, M. Tsubouchi, P.I. Woclawec and D.J. Skarzynski. 2004. Progesterone is a supresor of apoptosis in bovine luteal cells. *Biology of Reproduction*. 71 (6):2065-2071.
- Oliveira, J.F., L.E. Henkes, R.L. Ashley, S.H. Purcell, N.P. Smirnova, D.N.R. Veeramachaneni, R.V. Anthony and T.R. Hansen. 2008. Expression of interferon (IFN)-stimulated genes in extrauterine tissues during early pregnancy in sheep is the consequence of endocrine IFN- τ release from the uterine vein. *Endocrinology*. 149 (3):1252-1259.
- Pablos A.J.L. 2005. Antiinflamatorios no esteroideos y analgésicos en las enfermedades articulares. *Medicine*. 9(32):2117-2123.
- Peluffo, M.C., L. Bussmann, R.L. Stouffer and M. Tesone. 2006. Expression of caspase-2, -3, -8 and -9 proteins and enzyme activity in the corpus luteum of the rat at different stages during the natural estrous cycle. *Reproduction*. 132 (3)465-475.
- Perry, G.A., M.F. Smith, M.C. Lucy, J.A. Green, T.E. Parks, M.D. MacNeil, A.J. Roberts and T.W. Geary. 2005. Relationship between follicle size at ovulation and pregnancy success in beef cattle. *Proceedings of National Academy of Sciences. USA*. 102 (14):5268-259.
- Rahman A.N.M.A. 2006. Hormonal changes in the uterus during pregnancy- lessons from the ewe: a review. *Journal of Agriculture and Rural Development*. 4 (1):1-7.
- Roberts, R.M. and F.T. Schalue. 1990. Maternal recognition of pregnancy and embryonic loss. *Theriogenology*. 33:175-183.
- Rosales, T.A.M. y S.A. Guzmán. 2008. Apoptosis en la atresia folicular y la regresión del cuerpo lúteo. *Técnica Pecuaria México*. 46 (2):159-182.
-

-
- Santos, J.E.P., W.W. Tatcher, R.C. Chevel, R.L.A. Cerry y K.N. Galvão. 2004. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Animal Reproduction Science*. 82-83:513–535.
- SAS. 2000. *Statistical Analysis System*. Institute Inc. North Caroline. USA.
- Sherwood OD. 2004. Relaxin's physiological roles and other diverse actions. *Endocrine Reviews*. 25:205-234.
- Shirasuna, K., T. Shimizu, K. Hayashi, K. Nagai, M. Matsui, A. Miyamoto. 2007. Positive association, in release, of luteal oxytocin with endothelin 1 and prostaglandin F2a during spontaneous luteolysis in the cow: a possible intermediary role for luteolytic cascade within the corpus luteum. *Biology of Reproduction*. 76 (6):965-970.
- Smith W.L. 1989. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochemical Journal*. 259 (2):315-324.
- SNIIM. 2008. Consumo nacional aparente de productos pecuarios seleccionados. Secretaria de economía.
- Song, G., F.W. Bazer and T.E. Spencer. 2007. Pregnancy and interferon tau regulate RSAD2 and IFIH1 expression in the ovine uterus. *Reproduction*. 133 (1):285-295.
- Spencer, T.E. and F.W. Bazer. 2002. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Frontiers in Bioscience*. 7:1879-1898.
- Spencer, T.E. and F.W. Bazer. 2004. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2:49-63.
- Spencer, T.E., G.A. Johnson, F.W. Bazer and R.C. Burghardt. 2004. Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction*. 128 (6):657-668.
- Spencer, T.E., G.A. Johnson, F.W. Bazer, R.C. Burdghardt and M. Palmarini. 2007. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reproduction, Fertility and Development*. 19 (1):65-78.
-

-
- Stocco, C., C. Telleria and G. Gibori. 2007. The molecular control of corpus luteum formation, function and regression. *Endocrine Reviews*. 28 (1):117-149.
- Teruyama, R., D.L. Lipschitz, L. Wang, G.R. Ramoz, W.R. Crowley, S.L. Bealer and W.E. Armstrong. 2008. Central Blockade of oxytocin receptors during mid-late gestation reduces amplitude of slow after hiperpolarization in supraoptic oxytocin neurons. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 295 (5):1167-1171.
- Troxel, T.R. and D.J. Kesler. 1984. Ability of indomethacin to alter prostaglandin metabolite concentrations and to enhance the function of corpora lutea induced in postpartum suckled beef cows. *Journal of Animal Science*. 59 (1):177-181.
- Weems, Y.S., A.W. Lewis, R.D. Randel and C.W. Weems. 2002. Effects of prostaglandins E₂ and F_{2 α} (PGE₂; PGF_{2 α}), trilostane, mifepristone, palmitic acid (PA), indomethacin (INDO), ethamoxytriphetol (MER-25), PGE₂ + PA, or PGF_{2 α} + PA on PGE₂, PGF_{2 α} and progesterone secretion by bovine corpora lutea of mid-pregnancy in vitro. *Chinese Journal of Physiology*. 45 (4):163-168.
- Wu, G., F.W. Bazer, S. Datta, G.A. Johnson, P. Li, M.C. Satterfield and T.E. Spencer. 2008. Proline metabolism in the conceptus: implications for fetal growth and development. *Amino Acids*. 35 (4):691-702.
- Zentella, M.P., V.L. Pimentel, M.H. Velázquez, Z.G. Piña y R.H. Héctor. 2000. Algunas nuevas acciones de los antiinflamatorios no esteroideos. *Boletín de Educación Bioquímica*. 19 (3):174-181.

IX. ANEXOS

ANEXO 1

PROTOCOLO PARA DETERMINACION DE METABOLITO DE PROSTAGLANDINA

Paquete EIA 13,14-dihidro-15-ceto Prostaglandina

Catalogo No. 516671

Cayman Chemical

ACERCA DE ESTE ENSAYO

La prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) es una de las 5 prostaglandinas primarias derivadas enzimáticamente directamente del endoperoxido PGH_2 . $PGF_{2\alpha}$ fue inicialmente descubierto en el fluido seminal, y a la fecha la mayoría de los roles funcionales atribuidos a ella se relacionan con la fertilidad, preñez y parto. La $PGF_{2\alpha}$ es un potente agente luteolítico y es usado para inducir la ovulación en ganado doméstico. Es también un potente estimulante uterino, y es parte de la cascada de estimulantes miométriales los cuales inducen y sostienen el parto. La $PGF_{2\alpha}$ es rápidamente metabolizada a 13,14-dihidro-15-keto $PGF_{2\alpha}$ in vivo, por las enzimas 15-hidroxy prostaglandin deshidrogenasa y Δ^{13} -reductasa.¹⁻⁴ La determinación de 13,14-dihidro-15-keto $PGF_{2\alpha}$ en plasma puede ser usada como un marcador de la producción in vivo de $PGF_{2\alpha}$.⁵⁻⁶

INTRODUCCIÓN A ACE EIAs

Descripción del enzimoinmunoensayo competitivo ACE

Este ensayo esta basado en la competencia entre 13,14-dihidro-15-keto $PGF_{2\alpha}$ y 13,14-dihidro-15-keto $PGF_{2\alpha}$ -acetilcolinesterasa (AChE) conjugado (17-phenil trinor $PGF_{2\alpha}$ tracer) por un limitado número de sitios de unión de anticuerpo específico de conejo-13,14-dihidro-15-keto $PGF_{2\alpha}$. A causa de que la concentración del trazador 13,14-dihidro-15-keto $PGF_{2\alpha}$ se mantiene constante, mientras la concentración de 13,14-dihidro-15-keto $PGF_{2\alpha}$ varia, la cantidad del trazador 13,14-dihidro-15-keto

PGF_{2α} que esta disponible para unir al antisuero de conejo será inversamente proporcional a la concentración de 13,14-dihidro-15-keto PGF_{2α} en el pozo. Estos complejos antisuero de conejo-13,14-dihidro-15-keto PGF_{2α} (ya sea en forma libre o trazador) unidos al anti-IgG de conejo monoclonal de ratón que ha sido previamente adicionado al pozo. La placa es lavada para remover cualquier reactivo suelto, y después el reactivo de Ellman (El cual contiene el sustrato de AChE) es adicionado al pozo. El producto de esta reacción enzimática tiene un distinto color amarillo y absorbe fuertemente a 412 nm. La intensidad de este color, determinada espectrofotométricamente, es proporcional a la cantidad de trazador 13,14-dihidro-15-keto PGF_{2α} ligado en el pozo, el cual es inversamente proporcional a la cantidad de 13,14-dihidro-15-keto PGF_{2α} libre presente en el pozo durante la incubación; o

$$\text{Absorbancia } \alpha [\text{trazador ligado 13,14-dihidro-15-keto PGF}_{2\alpha}] \propto 1/[\text{13,14-dihidro-15-keto PGF}_{2\alpha}]$$

Un esquema de este proceso es mostrado en la figura 2 (ver pagina 4).

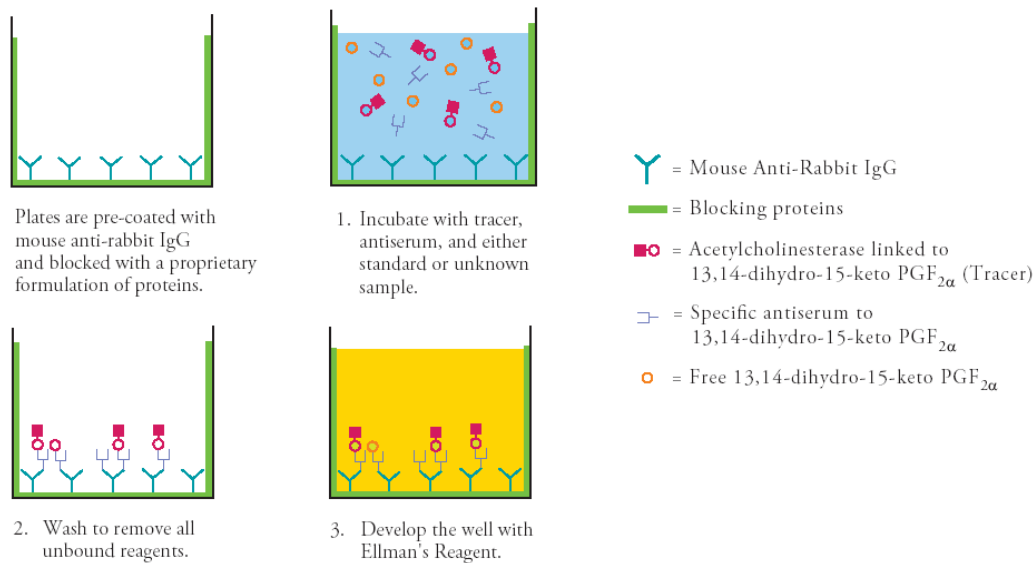


Figura 2. Esquema de EIA ACE™

Bioquímica de EIA ACETM

El órgano eléctrico del eel eléctrico, *Electrophorus electricus*, contiene un acetilcolinesterasa ávido AChE capaz de un giro masivo catalítico durante la generación de sus descargas electroquímicas. El eel eléctrico AChE tiene una estructura en forma de trébol terciaria consistente en una triada de tetrámeros adjuntos a un fibril estructural similar al colágeno. Esta enzima estable es capaz de alto volumen ($64,000 \text{ s}^{-1}$) para la hidrólisis de la Acetiltiocolina.

Una molécula de analito covalentemente adjunto a una molécula de AChE sirve como trazador en el enzimoimmunoensayo ACETM. La cuantificación del trazador se logra por medición de la actividad de AChE con el reactivo de Ellman. Este reactivo consiste de acetilcolina y 5,5'-ditiobis-(2-acido nitrobenzoico). LA hidrólisis de la acetiltiocolina por AChE produce tiocolina (ver figura 3, pagina 5). La reacción no enzimática de tiocolina con 5,5'-ditiobis-(2-acido nitrobenzoico) produce acido 5-tio-2-nitrobenzoico, el cual tiene una fuerte absorbancia a 412 nm ($\epsilon = 13,600$).

La AChE tiene varias ventajas sobre otras enzimas comúnmente usadas para enzimoimmunoanálisis. A diferencia de la peroxidasa de horseradish, la AChE no se inactiva por si misma durante el cambio. Esta propiedad de la AChE también permite múltiples desarrollos de el ensayo si este es accidentalmente salpicado o derramado. Además la enzima es altamente estable bajo condiciones de ensayo, tiene un ancho rango de pH (pH 5-10), y no es inhibido por los amortiguadores comunes como sales y preservativos. Desde que AChE es estable durante el desarrollo del paso, es innecesario usar un reactivo "stop", y la placa puede ser leída siempre que sea conveniente.

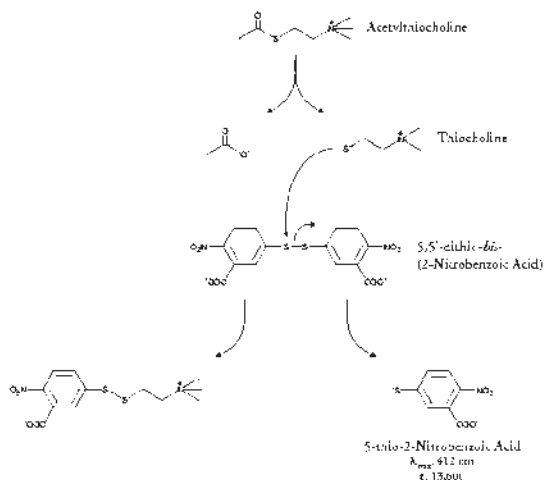


Figura 3. Reacción catalizada por Acetilcolinesterasa

Definición de términos clave

Blanco: Fondo de Absorbancia causado por el reactivo de Ellman's. Aún recientemente preparado el reactivo de Ellman tiene alguna absorbancia medible, aproximadamente 0.1 unidades de absorbancia (A.U.). LA absorbancia Blanco debe ser separada de las lecturas de absorbancia de todos los otros pozos.

Actividad total: (TA) actividad total enzimática del trazador AchE-ligado. Este es análogo a la actividad específica de un trazador radioactivo.

NSB (Uniones no específicas): Las uniones no inmunológicas del trazador al pozo. Aún en ausencia de antisuero específico una muy pequeña cantidad de trazador inmóvil fija al pozo; NSB es una medida de esta baja fijación.

B_0 (Máxima unión): Máxima cantidad de trazador que el antisuero puede fijar en la absorbancia de analito libre.

%B/ B_0 (%Ligado/Máxima unión): Tasa de absorbancia de una muestra particular o pozo estándar respecto del pozo de máxima fijación (B_0).

Curva Estándar: un trazo (curva) de los valores de %B/ B_0 contra la concentración de una serie de pozos que contienen cantidades conocidas de analito.

PREPARACIÓN DEL PRE-ENSAYO

El Agua utilizada para preparar todos los reactivos y buffers del EIA debe ser deionizada y libre de rastros de contaminantes orgánicos (“Ultrapura”). Usar cartuchos de filtro de carbón activado u otros limpiadores orgánicos. Agua destilada en vidrio (aún si es bidestilada), Agua grado-HPLC, y agua estéril. (por inyecciones) no es adecuada para EIA. Agua ultrapura puede ser abastecida por Cayman Chemical (Núm. de Catalogo 400000).

Preparación del Buffer (Almacenar todos los buffers a 4°C)

1.- Preparación del Buffer EIA

Diluir el contenido de un vial de buffer concentrado de EIA (vial #4) con 90 ml de agua ultrapura. Asegurarse de limpiar el vial para remover cualquier sal que pudiera tener precipitada. [NOTA: es normal que el buffer concentrado contenga sales cristalinas después de descongelarse. Esas serán completamente disueltas por dilución con agua.]

Preparación de la solución buffer

Diluir el contenido del vial (5 ml) de solución concentrada de buffer (vial #5) a un volumen total de 2 litros de agua ultrapura y adicionar 1 ml de Tween 20 (vial #5^a), o diluir el contenido del vial (12.5 ml) de solución concentrada (vial #5) en un volumen de 5 litros con agua ultrapura y adicionar 2.5 ml de Tween 20 (vial #5^a). [NOTA: Tween 20 es un liquido viscoso y no es medido por una pipeta. Un dispositivo de desplazamiento seguro tal como una jeringa debería usarse para liberar pequeñas cantidades correctamente] Un más pequeño volumen de solución buffer puede ser preparada por dilución de solución buffer concentrada 1:400 y adicionando Tween 20 (0.5 ml/litro de solución buffer).

Preparación de muestras

En general, orina y muestras de cultivo de tejido sobrenadante pueden ser diluidas con buffer EIA y adicionados directamente al pozo de ensayo. Plasma, suero y sangre entera, también como otras muestras heterogéneas, tales como fluidos de

lavado y aspirados, seguido contienen contaminantes los cuales pueden interferir en el ensayo. Es mejor checar en busca de interferencia antes de poner un gran número de medidas de muestras. Para probar interferencias, diluir una o dos muestras de prueba para obtener por lo menos dos diferentes diluciones de cada muestra entre 10 y 100 pg/ml. Si las dos diferentes diluciones de la muestra muestran buena correlación (difieren el 20% o menos) en la concentración final calculada de 13,14-dihidro-15-keto PGF_{2α}, la purificación no se requiere. Si no se ve buena correlación de las diferentes diluciones, la purificación es prudente. El protocolo de purificación abajo es tal método.

1. Precauciones Generales

- A. Todas las muestras deben estar libres de solventes orgánicos previo al ensayo.
- B. Las muestras deben ser ensayadas inmediatamente después de su colección; las muestras que no puedan ser ensayadas inmediatamente deben ser tratadas como se describe abajo y almacenadas a -80°C.

2. Plasma

Las muestras de plasma deben ser colectadas en vacutainers con sodio, heparina, o EDTA. Los vacutainers pueden también ser suplementados con indometacina para dar la concentración final de al menos 10 μM. La indometacina prevendrá ex vivo la formación de eicosanoides, los cuales tienen el potencial de interferir con este ensayo (sin embargo, la mayoría de los eicosanoides no parecen exhibir cualquier reacción cruzada (ver página 10)).

Preparación de los reactivos específicos del ensayo

1. Estándar 13,14-dihidro-15-keto PGF_{2α}

Equilibrar una punta de pipeta en etanol mediante repetidos llenados y vaciados de la punta con etanol varias veces. Usando la punta de pipeta equilibrada, transferir 100 μl de 13,14-dihidro-15-keto PGF_{2α} Estándar (vial #3 o #9) en un tubo limpio de

prueba, después diluir con 900 μl de agua ultrapura. La concentración de esta solución (el volumen estándar) será de 10 ng/ml.

Para preparar el estándar para uso en EIA: Obtener 8 tubos limpios de prueba y numerarlos del #1 hasta el #8. Poner una alícuota de 900 μl de buffer EIA al tubo #1 y 500 μl de buffer EIA a los tubos # 2 a 8. Transferir 100 μl del volumen estándar (10ng/ml) al tubo #1 y mezclar completamente. Sucesivamente diluir el estándar por remoción de 500 μl del tubo #1 y colocarlo en el tubo #2; mezclar completamente. A continuación, remover 500 μl del tubo #2 y colocarlos en el tubo #3; mezclar completamente. Repetir este proceso para los tubos #4-8. Esas diluciones estándar no deben ser almacenadas por más de 24 horas.

2. Trazador AChE 13,14-dihidro-15-keto $\text{PGF}_{2\alpha}$

Reconstituir los 100 dtn del trazador 13,14-dihidro-15-keto $\text{PGF}_{2\alpha}$ (vial #2) con 6 ml de buffer EIA o los 500 dtn de trazador 13,14-dihidro-15-keto $\text{PGF}_{2\alpha}$ (vial #2) con 30 ml de buffer EIA. Almacenar el trazador 13,14-dihidro-15-keto $\text{PGF}_{2\alpha}$ a 4°C (no congelar) y usar dentro de las cuatro siguientes semanas. Un 20% en demasía de trazador 13,14-dihidro-15-keto $\text{PGF}_{2\alpha}$ a sido incluido para contar por cualquier pérdida incidental.

Colorante trazador instrucciones (opcional)

Este colorante puede ser adicionado al trazador, si se desea, para auxiliar en la visualización de los pozos contenedores de trazador. Adicionar el colorante al trazador reconstituido al una dilución final de 1:100 (adicionar 60 μl de colorante a 6 ml de trazador o adicionar 300 μl de colorante a 30 ml de trazador).

3. Antisuero 13,14-dihidro-15-keto $\text{PGF}_{2\alpha}$

Reconstituir los 100 dtn de Antisuero 13,14-dihidro-15-keto $\text{PGF}_{2\alpha}$ (vial #1) con 6 ml de buffer EIA o los 500 dtn de Antisuero 13,14-dihidro-15-keto $\text{PGF}_{2\alpha}$ con 30 ml de buffer EIA. Almacenar el Antisuero 13,14-dihidro-15-keto $\text{PGF}_{2\alpha}$ reconstituido a 4°C. Será estable por al menos cuatro semanas. Un 20% en demasía de Antisuero 13,14-dihidro-15-keto $\text{PGF}_{2\alpha}$ ha sido incluido para contar por cualquier pérdida incidental.

Instrucciones del colorante antisuero (opcional)

Este colorante puede ser adicionado al antisuero, si desea, para auxiliar en la visualización de los pozos contenedores de antisuero. Adicionar el colorante al antisuero reconstituido a una dilución final de 1:100 (adicionar 60 μ l de colorante a 6 ml de antisuero o adicionar 300 μ l de colorante a 30 ml de antisuero).

EJECUCIÓN DEL ENSAYO

Poner la placa

La placa de 96 pozos, incluida en este paquete, es suministrada lista para su uso. No es necesario lavar la placa previo a adicionar los reactivos. [NOTA: Si no necesita usar todas las tiras a la vez, colocar las tiras no usadas atrás en el paquete de la placa y almacenar a 2-4°C. Asegurarse de que el paquete esta sellado con el desecante dentro.]

Cada placa o juego de tiras debe contener un mínimo de dos blancos (Blk), dos pozos de tiras no específicas (NSB), dos pozos de máxima fijación (B_0), y en ocho puntos de corrida de curva estándar en duplicado. [NOTA: Cada ensayo debe contener esta configuración mínima a fin de asegurar resultados exactos y reproducibles.] Como mínimo, cada muestra debe ser ensayada a dos diluciones, y cada dilución debe ser ensayada en duplicado. Para propósitos estadísticos, recomendamos ensayar muestras en triplicado.

Un formato sugerido de placa se muestra en la figura 3 (ver página 8). El usuario puede variar la localización y tipo de pozos presentes como sea necesario para cada experimento particular. El formato de placa provisto en la página 8 ha sido diseñado para permitir un fácil análisis de datos usando un conveniente hoja de calculo ofrecida por Cayman Chemical (ver Calculando los resultados, Página 9, para más detalles). Sugerimos registrar los contenidos de cada pozo en la hoja modelo provista (ver página 12).

Full Plate Format

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	S1	S1	1	1	1	9	9	9	17	17	17
B	Blk	S2	S2	2	2	2	10	10	10	18	18	18
C	NSB	S3	S3	3	3	3	11	11	11	19	19	19
D	NSB	S4	S4	4	4	4	12	12	12	20	20	20
E	B ₀	S5	S5	5	5	5	13	13	13	21	21	21
F	B ₀	S6	S6	6	6	6	14	14	14	22	22	22
G	B ₀	S7	S7	7	7	7	15	15	15	23	23	23
H	TA	S8	S8	8	8	8	16	16	16	24	24	24

Blk - Blank
 TA - Total Activity
 NSB - Non-Specific Binding
 B₀ - Maximum Binding
 S1-S8 - Standards 1-8
 1-24 - Samples

Figura 4. Formato de la placa de muestras

Pipeteo de reactivos

SUGERENCIAS DE PIPETEO

- Usar diferentes puntas para pipetear el buffer, Estándar, Muestra, trazador y anticuerpo.
- Antes de pipetear cada reactivo, equilibrar la punta de la pipeta en ese reactivo (es decir, lentamente llenar la punta y suavemente expulsar el contenido, repetir esto varias veces).
- No exponer la punta de la pipeta a los reactivos que están ya en el pozo.

1. Buffer EIA

Adicionar 100 μl de buffer EIA a los pozos de tiras no específicas (NSB). Adicionar 50 μl de buffer EIA a los pozos de Máxima fijación (B₀).

2. Estándar 13,14-dihidro-15-keto PGF_{2 α}

Adicionar 50 μl del tubo #8 a los dos pozos de más abajo (S8). Adicionar 50 μl del tubo #7 a cada uno de los siguientes dos pozos estándar (S7). Continuar con este procedimiento hasta que todos los estándar sean dosificados. La misma punta de pipeta debe ser usada para dosificar todos los tubos estándar. Antes de pipetear cada estándar, asegurarse de equilibrar la punta de la pipeta en ese estándar.

3. Muestras

Adicionar 50 μl de muestra por pozo. Cada muestra debe ser ensayada a un mínimo de dos diluciones. Cada dilución debe ser ensayada en duplicado (triplicado recomendado).

4. Trazador AChE 13,14-dihidro-15-keto PGF_{2 α} Adicionar 50 μl a cada pozo excepto al Actividad Total (TA) y a los Blanco (Blk).

5. Antisuero 13,14-dihidro-15-keto PGF_{2 α}

Adicionar 50 μl a cada pozo excepto al Actividad Total (TA), unión no específica (NSB) y a los Blanco (Blk).

Pozo	Buffer EIA	Estandar/Muestra	Trazador	Anticuerpo
Blk	-	-	-	-
TA	-	-	5 μl (at devl. step)	-
NSB	100 μl	-	50 μl	-
B ₀	50 μl	-	50 μl	50 μl
Std/Muestra	-	50 μl	50 μl	50 μl

Tabla 1. Referencia rápida Resumen de pipeteo

Incubado de la placa

Cubrir cada placa con una película plástica (artículo #7) e incubar por 18 horas a 4°C.

Desarrollo de la placa

Cuando estén listas para desarrollar la (s) placa (s), reconstituir un vial de 100 dtn de reactivo de Ellman (vial #8) con 20 ml de agua ultrapura, o reconstituir un vial de 250 dtn de reactivo de Ellman (vial #8) con 50 ml de agua ultrapura (20ml de reactivo es suficiente para desarrollar 100 pozos). Reconstituido el reactivo de Ellman es inestable y debe ser usado el mismo día en que es preparado; proteger el reactivo de

Ellman de la luz cuando no esté en uso. Viales extras del reactivo han sido provistos si la placa necesita ser re-desarrollada o múltiples ensayos necesitan ser corridos en diferentes días.

Vaciar los pozos y lavar seis veces con solución buffer. Adicionar 200 μ l de reactivo de Ellman a cada pozo y 5 μ l de trazador a los pozos de Total Actividad (TA). Cubrir la placa con una película plástica.

El óptimo desarrollo es obtenido usando un vibrador orbital equipado con una cubierta plana grande para permitir a la placa desarrollar en la obscuridad. Este ensayo se desarrolla típicamente (es decir, pozos B_0 igual a 0.3 A.U. (sustraído el blanco)) en 90-12 minutos.

Lectura de la placa

Leer la placa en una onda larga entre 405 y 420 nm (usualmente 412 nm). Antes de leer cada placa, limpiar la base de la placa con una gasa limpia para remover huellas, suciedad, etc., del mismo modo manchas en la base de la placa pueden alterar significativamente las lecturas de absorbancia. Asegurarse de que el reactivo de Ellman no salpique la cubierta de la placa como cualquier pérdida de reactivo de Ellman afectará las lecturas de absorbancia. Si esto sucede, use una pipeta para remover el reactivo de Ellman de la cubierta y colóquela dentro del pozo. Si se ha salpicado mucho reactivo de Ellman en la cubierta como para redistribuirlo de regreso a los pozos, lavar la placa 3 veces con solución buffer y repetir el desarrollo con reactivo de Ellman fresco.

La placa debe ser revisada periódicamente hasta que los pozos B_0 estén en el rango de 0.3-0.8 A.U. (sustraído el blanco). Si la absorbancia de los pozos excede 1.5, lavar la placa, adicionar reactivo de Ellman fresco y repetir el desarrollo nuevamente.

CALCULANDO LOS RESULTADOS

Es usualmente más conveniente calcular los resultados del ensayo por computadora; la mayoría de los lectores de placa vienen con un software de reducción de datos, o

un programa de hoja de calculo puede ser usado (4-parameter logistic o una curva de ajuste log-logit). [Cayman Chemical tiene una hoja de cálculo para computadora disponible para análisis de datos. Por favor contacte a servicio técnico o visite nuestro sitio Web (www.caymanchem.com/eiatools/promo/kit) para más información u obtener una copia libre de esta conveniente herramienta de análisis de datos.] si los resultados necesitan ser calculados manualmente, el procedimiento es como sigue:

[NOTa: si el lector de placa no ha extraído las lecturas de absorbancia de los pozos Blanco de las lecturas de absorbancia del resto de la placa, asegurarse de hacer eso ahora.]

1. Promediar las lecturas de absorbancia de los pozos NSB.
2. Promediar las lecturas de absorbancia de los pozos B_0
3. Restar los promedios NSB de los promedios B_0 . Este es el B_0 corregido o el máximo ligado corregido.
4. Calcular el $\%B/B_0$ (% de muestra o ligado estándar/máximo ligado) para los pozos restantes. Para hacer esto, restar el promedio de absorbancia NSB de la absorbancia del S1 y dividirlo por B_0 corregido (del paso 3). Multiplicar por 100 para obtener $\%B/B_0$. Repetir para S2-S8 y todos los pozos de muestra.
5. Los valores de actividad total no se usan en los cálculos de curva estándar. Más bien, son usado como una herramienta de diagnostico; la B_0 corregida dividida por la actividad total (TA) actual (10X la absorbancia medida) dará el % ligado. Este valor deberá aproximarse cercanamente al % ligado que puede ser calculado del dato de la muestra (ver página 11). Valores erráticos de absorbancia y un bajo (o no) % ligado puede indicar la presencia de solventes orgánicos en el buffer u otros problemas técnicos (ver página 11 para solución de problemas).

Trazando la curva estándar

Trazar %B/B₀ para S1-S8 estandars contra concentración de 13,14-dihidro-15-keto PGF_{2α} (usualmente en pg/ml) en papel semi-log.

Determinando la concentración de las muestras

Calcular el valor de %B/B₀ para cada muestra. Determinar la concentración de cada muestra por identificación de %B/B₀ en la curva estándar y leyendo los valores correspondientes en el eje X. [NOTA: Recordar contar cualquier dilución de las muestras previo a la adición al pozo.] valores de %B/B₀ más grandes de 80% y menores de 20% deben ser reensayados como generalmente caen fuera del rango lineal de la curva estándar. Una disparidad del 20% o mayor entre la aparente concentración de dos diferentes soluciones de la misma muestra debería indicar interferencia la cual debe ser eliminada por purificación.

[Cayman Chemical tiene una hoja de cálculo para computadora disponible para el análisis de datos. Por favor contacte a servicio técnico o visite nuestro sitio Web (www.caymanchem.com/eiatools/promo/kit) para más información u obtener una copia libre de esta conveniente herramienta de análisis de datos.]

Cálculos

$$\text{Factor.de.recuperación} = \frac{10 \times \text{cpm.de.la.muestra}}{[\text{3H}] - \text{PGF}_{2\alpha}.\text{adicionado a la muestra. (cpm)}}$$

$$13,14 - \text{dihidro} - 15 - \text{keto PGF}_{2\alpha}.\text{(pg).en.muestras.purificadas} = \left[\frac{\text{Valor.de.EIA. (pg/ml)}}{\text{Factor.de.recuperación}} \right] \times 0.5 \text{ml} - [\text{3H}] - \text{PGF}_{2\alpha}.\text{(pg).adicionado}$$

$$\frac{13,14 \text{ - dihidro -15 - keto PGF}_{2\alpha} \cdot \text{total.en.muestra.}(pg / ml) = 13,14 \text{ - dihidro -15 - keto PGF}_{2\alpha} \cdot (pg) \cdot \text{en.la.muestra.purificada}}{\text{Volumen.de.muestra.usada.para.purificación.}(ml)}$$

CARACTERISTICAS DE EJECUCIÓN

Precisión

Los coeficientes de variación intra e interensayo han sido determinados en múltiples puntos en la curva estándar; esos datos son resumidos en la grafica a continuación.

Especificidad

13,14-dihydro-15-keto PGF _{2α}	100%	Prostaglandin F _{2α}	<0.01%
13,14-dihydro-15-keto Prostaglandin E ₂	2.7%	8-iso Prostaglandin F _{2α}	<0.01%
15-keto Prostaglandin F _{2α}	1.8%	8-iso-13,14-dihydro-15-keto Prostaglandin F _{2α}	<0.01%
Prostaglandin D ₂	<0.01%	8-iso-15-keto Prostaglandin F _{2α}	<0.01%
Prostaglandin E ₂	<0.01%	Prostaglandin F _{2β}	<0.01%
Prostaglandin F _{1α}	<0.01%	8-iso Prostaglandin F _{3α}	<0.01%
2,3-dinor-6-keto Prostaglandin F _{1α}	<0.01%	Thromboxane B ₂	<0.01%
6-keto Prostaglandin F _{1α}	<0.01%		

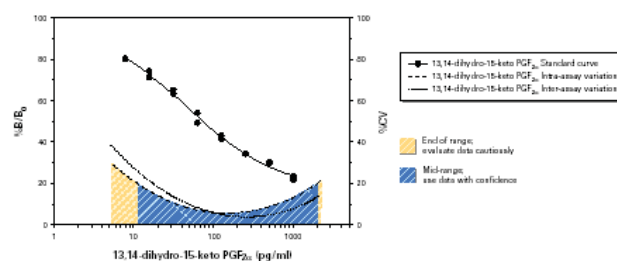
Datos de muestras

La curva estándar presentada aquí es un ejemplo de datos típicamente producidos con este paquete; sin embargo, sus resultados no serán idénticos a estos. Deberá correr una nueva curva estándar - no usar esta para determinar los valores de sus muestras. Dependiendo de las condiciones de desarrollo y pureza del agua usada, sus resultados sus resultados pueden diferir sustancialmente de los datos presentados a continuación. [NOTA: el dato crudo es reportado en unidades de miliabsorbancia.]

	Raw Data		Average	Corrected
Total Activity	654	730	692	
NSB	2	4	3	
B_0	384	386	403	400
	394	448		

Standard Curve

Dose (pg/ml)	Raw Data		Corrected		%B/ B_0	
1,000	97	90	94	87	23.5	21.8
500	124	122	121	119	30.6	29.8
250	141	140	138	137	34.5	34.6
125	175	169	172	166	43.0	41.5
62.5	219	200	216	197	54.0	49.3
31.3	264	256	261	253	65.6	63.3
15.6	288	300	285	297	71.6	74.3
7.8	324	325	321	322	80.6	80.5



50% B/ B_0 - 75 pg/ml
 Detection limit (80% B/ B_0) - 8.2 pg/ml

SOLUCION DE PROBLEMAS

Problema: Valores erráticos; dispersión de duplicados

Causas: Rastros de contaminantes orgánicos en la fuente de agua;
 reemplazar el filtro de carbón activado o cambiar la fuente de agua
 ultrapura. o pobre técnica de pipeteo.

Problema: Alto NSB (>0.035).

Causas: Pobre lavado o exposición de los pozos de NSB al anticuerpo
 específico.

Problema: Muy bajo B_0 .

Causas: Contaminación del agua con solventes orgánicos o la placa
 requiere un tiempo adicional de desarrollo.

Problema: Baja sensibilidad (cambia en dosis la curva de respuesta).

Causa: El estandar esta degradado.

Problema: El análisis de dos diluciones de una muestra biológica no están de
 acuerdo (es decir, más del 20% de diferencia).

Causa: Hay presentes sustancias que interfieren. La muestra debe ser
 purificada previo al análisis por EIA.⁸

Problema: Solo los pozos de actividad total (TA) desarrollan.

Causa: Residuos de contaminantes orgánicos en la fuente de agua;
reemplace el filtro de carbón activado o cambie la fuente de agua
ultrapura.

REFERENCIAS

1. Samuelsson, B., Granström, E., Green, K., *et al.* prostaglandins. *Annu Rev. Biochem.* 44, 669-695 (1975).
2. Keirese, M.J.N.C. and Turnbull, A.C. Metabolism of prostaglandins within the pregnant uterus. *Br. J. Obstet. Ginecol.* 82, 887-893 (1975).
3. Basu, S. and Stjernschantz, J. Δ^{13} -reductase dependent metabolism of prostaglandins in the mammalian brain and eye. *Prostaglandins Leucot. Essent. Fatty Acids* 57, 305-310 (1997).
4. Ensor, C.M., Yang, J.Y., Okita, R.T., *et al.* Cloning and secuence analisys of the cDNA for the human placental NAD⁺-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase *J. Biol. Chem.* 265, 14888-14891 (1990).
5. Del Vecchio, R.P., Maxey, K.M. and Lewis, G.S. A quantitative solid-phase enzyme immunoassay for 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F_{2 α} in plasma. *Prostaglandins* 43, 321-330 (1992).
6. Meyer, H.H.D., Eisele, K., and Osaso, J. A biotin-streptavidin amplified enzyme immunoassay for 13,14-dihydro-15-keto-PG F_{2 α} . *Prostaglandin* 38, 375-383 (1989).
7. Pradelles, P., Grassi, J. and Maclouf, J. Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholinesterase as label: An alternative to radioimmunoassay. *Annual Chem.* 57, 1170-1173 (1985).
8. Maxey, K.M., Maddipati, K.R. and Birkmeier, J. Interference in enzyme immunoassays. *J Clin. Immunoassay.* 15, 116-120 (1992).

MODELO DE PLACA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

ANEXO 2

PROTOCOLO PARA DETERMINACION DE PROGESTERONA

ACTIVE PROGESTERONE RIA

DSL 3900

Este paquete inserto (instrucciones de uso) está previsto para uso profesional y debe ser leído completamente antes de usar el producto.

I. USO PREVISTO DEL EQUIPO

El equipo de radioinmunoensayo DSL-3900 ACTIVE[®] Progesterone Coated-Tube RIA proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa de progesterona en suero o plasma. El ensayo está concebido para uso diagnóstico in vitro.

II. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

La progesterona (4-pregнено-3,20-diona) es un esteroide producido en las glándulas suprarrenales, las gónadas y la placenta. Tal como ocurre con otros esteroides, la progesterona se sintetiza a partir del colesterol a través de una serie de pasos mediados por enzimas [1,2]. La enzima del sistema P450 que escinde la cadena lateral del colesterol (P450_{scc}) media el primer paso, que lleva a la conversión del colesterol en pregnenolona. Este paso es estimulado por la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) en la glándula suprarrenal y por las gonadotropinas en el ovario y la placenta [1]. La pregnenolona se convierte entonces bien en progesterona (mediado por la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa) o bien en 17 α -hidroxipregnenolona (mediado por la 17 α -hidroxilasa o P450_{c17}). Tanto la progesterona como la 17-hidroxipregnenolona se pueden transformar entonces en 17-hidroxiprogesterona, que actúa como precursora en la síntesis de glucocorticoides y de esteroides sexuales. Son lugares específicos en los que tiene lugar la síntesis de progesterona la corteza suprarrenal, el cuerpo lúteo, los testículos y la placenta.

La producción adrenal y testicular de progesterona se deriva casi inmediatamente hacia otras rutas de esteroidogénesis, y una pequeña cantidad se libera a la sangre. La progesterona producida en el cuerpo lúteo y en la placenta durante el embarazo interviene en varias funciones fisiológicas diferentes relacionadas con su capacidad para convertir el endometrio uterino preparado por la acción de los estrógenos en endometrio secretor [3]. Estas funciones incluyen la preparación del endometrio para la implantación del ovocito fecundado y el mantenimiento del endometrio durante el embarazo. La progesterona realiza muchas otras acciones en la fisiología reproductora femenina, como la participación en la regulación mediante retroalimentación de las gonadotropinas hipofisarias y los estrógenos ováricos, la estimulación de la maduración de la glándula mamaria durante la lactancia, el mantenimiento del epitelio vaginal, la relajación de la musculatura lisa uterina durante la embriogénesis y la estimulación de la temperatura corporal basal. Las concentraciones séricas de progesterona son relativamente altas en el momento del nacimiento debido a la producción placentaria, descienden rápidamente durante la primera semana tras el nacimiento y aumentan durante la pubertad [4]. Las concentraciones séricas en varones adultos y en mujeres postmenopáusicas son similares a las de las mujeres durante la fase folicular del ciclo menstrual y reflejan la producción adrenal de progesterona. Las concentraciones séricas son relativamente altas en las mujeres durante la fase lútea del ciclo menstrual y durante el embarazo, debido a la estimulación por las gonadotropinas. La determinación de las concentraciones séricas de progesterona se ha empleado en la evaluación de la función ovárica [3,5]. El equipo DSL ACTIVE[®] Progesterone RIA emplea un antisuero altamente específico para la progesterona. La reactividad cruzada con otros esteroides presentes de forma natural en el organismo es baja y no significativa en la mayoría de las muestras biológicas.

III. PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El procedimiento sigue el principio básico del radioinmunoensayo, que consiste en la competición entre un antígeno radiactivo y otro no radiactivo por una cantidad fija de

lugares de unión a anticuerpos [6]. La cantidad de progesterona marcada con I-125 unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de progesterona no marcada presente. La separación del antígeno libre y el unido a anticuerpos se realiza rápida y fácilmente mediante decantación de los tubos.

IV. REACTIVOS

Las referencias del equipo DSL Coated-Tube Progesterone RIA son: DSL-3900 (100 tubos) y (500 tubos). Cada equipo contiene los siguientes reactivos:

A. Estándares de progesterona: (liofilizados)

Un vial, etiquetado con la letra A, que contiene 0 ng/mL, y cinco viales, etiquetados con las letras B-F, que contienen concentraciones de aproximadamente 0,3, 1,0, 5,0, 20,0 y 60,0 ng/mL (1,0-190,8 nmol/L) de progesterona en suero, con azida sódica como agente conservante. Consulte las etiquetas de los viales para conocer las concentraciones exactas. Conserve los estándares cerrados a 2-8°C hasta la fecha de caducidad. Reconstituya cada vial con 0,5 mL de agua desionizada, excepto el estándar de 0 ng/mL, que debe reconstituirse con 1 mL de agua desionizada. Tras la reconstitución, conserve los viales a 2-8°C durante un máximo de tres semanas. Para periodos de tiempo más prolongados, consérvelos a una temperatura igual o inferior a -20°C.

NOTA CON RESPECTO A LA ESTANDARIZACIÓN: Debido a la falta de material de referencia universalmente aceptado, se obtuvo la preparación de referencia de los estándares y controles de progesterona de Sigma Biochemicals, EE.UU., purificada mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia; la pureza se verificó (una sola mancha) mediante cromatografía en capa fina y el rendimiento mediante inmunoensayo. * DSL-3900 (500 tubos) contiene tres juegos de estándares.

B. Progesterona marcada con I-125: (AMARILLO) Un frasco (DSL-3900) de 55 mL que contiene <5 μ Ci (185 kBq) de progesterona marcada con I-125 en un tampón

constituido por proteínas, con benzoato sódico como agente conservante. Consérvelo a 2-8°C hasta la fecha de caducidad. * DSL-3900 (500 tubos) contiene cinco viales de reactivo.

C. Tubos recubiertos de anticuerpos frente a progesterona: (AMARILLO)

Cien (100) o quinientos (500) tubos de plástico con inmunoglobulina de conejo frente a progesterona fijada a la pared interna de cada tubo. Consérvelos a 2-30°C hasta la fecha de caducidad.

D. Controles de progesterona: (líoofilizados)

Dos viales, correspondientes a los niveles I y II, que contienen concentraciones bajas y altas de progesterona en suero con azida sódica como agente conservante. Consulte las etiquetas de los viales de los controles para conocer sus rangos. Conserve los controles cerrados a 2-8°C hasta la fecha de caducidad. Reconstituya cada vial con 0,5 mL de agua desionizada. Tras la reconstitución, consérvelos a 2-8°C durante un máximo de tres semanas. Para periodos de tiempo más prolongados, consérvelos a una temperatura igual o inferior a -20°C.

* DSL-3900 (500 tubos) contiene tres juegos de controles.

NOTA: antes de su empleo, hay que permitir que todos los reactivos y muestras alcancen la temperatura ambiente (~25°C) y mezclarlos completamente mediante una inversión suave.

V. PRECAUCIONES

Sólo para uso in vitro. No indicado para su uso externo o interno en seres humanos ni animales

PRECAUCIÓN: MATERIAL RADIATIVO

Consulte la reglamentación, normas y procedimientos acerca de radiación que sean pertinentes para su centro en lo que se refiere a la manipulación, conservación y desecho de materiales radiactivos. Para clientes de Estados Unidos: este material radiactivo sólo puede ser recibido, adquirido, utilizado y estar en posesión de médicos, veterinarios, laboratorios clínicos, centros de investigación u hospitales y únicamente para pruebas clínicas o de laboratorio in vitro que no conlleven la administración interna o externa del material o la irradiación del mismo a seres humanos ni animales. La recepción, adquisición, posesión, utilización y transferencia de este producto está regulada por la legislación vigente en cada país, que aplica para este tipo de productos. Para minimizar el riesgo de exposición a la radiación, manipule los materiales radiactivos tal como recomiendan las normas reglamentarias pertinentes y como se indica en las guías "Occupational Radiation Protection Safety Guide, Safety Standards Series No. RS-G-1.1," (Guías de seguridad para la protección frente a la radiación ocupacional, Serie de Pautas de Seguridad N° RS-G-1.1)1999, publicadas por la International Atomic Energy Agency (Agencia Internacional de Energía Atómica). Deben seguirse las Buenas Prácticas de Laboratorio universales que figuran a continuación:

- No ingiera alimentos, beba, fume ni aplique cosméticos en los lugares donde se manipulen materiales de inmunodiagnóstico.
- No pipetee con la boca.
- Use batas de laboratorio y guantes desechables cuando manipule materiales de inmunodiagnóstico.
- Lávese cuidadosamente las manos al terminar.
- Cubra la zona de trabajo con papel absorbente desechable.
- Limpie inmediatamente todo vertido de material y descontamine las superficies afectadas.
- Evite la formación de aerosoles.
- Facilite una ventilación adecuada.

- Manipule y deseche todos los reactivos y materiales de acuerdo con la reglamentación pertinente.

ADVERTENCIA: MATERIAL POTENCIALMENTE BIOPELIGROSO

Este equipo puede contener reactivos preparados a partir de materia de origen humano (como suero o plasma) o puede ser utilizado con materia de origen humano. El material empleado en este equipo ha sido analizado con métodos aprobados por la FDA y no ha presentado positividad para anticuerpos frente a VIH (tipos 1 y 2), VHC y Ag de superficie del VHB. Ninguno de los métodos analíticos disponibles puede garantizar por completo la eliminación de posibles riesgos biológicos. Manipule todos los reactivos y muestras de pacientes acatando las normas de bioseguridad de nivel 2, tal como se recomienda para toda muestra de sangre o suero humanos potencialmente infecciosos en el Manual « Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories » (Bioseguridad en laboratorios médicos y microbiológicos), 4ª edición, abril de 1999.

ADVERTENCIA: POSIBLE PELIGRO QUÍMICO

Algunos de los reactivos del equipo contienen azida sódica como conservante a concentraciones por debajo del límite reglamentario: < 0.1%. Aunque se encuentra significativamente diluida, la azida sódica concentrada es una sustancia irritante para la piel y las membranas mucosas y puede reaccionar con el plomo y el cobre de las cañerías para formar azidas metálicas explosivas, especialmente si se acumula. Esta sustancia está diluida y, por tanto, los riesgos de exposición pueden estar significativamente disminuidos, pero no ausentes por completo. Evite el contacto con piel, ojos y ropa. En caso de contacto con cualquiera de los reactivos, lave la zona afectada con agua abundante y consulte a un médico. Deseche todos los reactivos no radiactivos que no sean peligrosos por el sistema de desagüe, diluyéndolos con grandes cantidades de agua para prevenir la acumulación de sustancias químicamente peligrosas en el sistema de tuberías. Si desea obtener más información acerca de las sustancias peligrosas presentes en el equipo, consulte la

hoja de datos sobre seguridad del componente en particular, bien en el sitio web www.DSLabs.com o mediante solicitud a DSL.

VI. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Se debe emplear suero o plasma, y deben seguirse todas las precauciones habituales para la realización de punciones venosas. Las muestras se pueden conservar a 2-8°C durante un máximo de siete días y deben congelarse a una temperatura igual o inferior a -20°C durante un máximo de tres meses [7]. No use muestras muy hemolizadas o muy lipémicas.

VII. NOTAS ACERCA DEL PROCEDIMIENTO

Es necesaria una total comprensión de lo explicado en este folleto para que la utilización del producto sea satisfactoria. Sólo se obtendrán resultados fiables si se emplean técnicas de laboratorio precisas y si se siguen con exactitud las instrucciones de este folleto. Se debe incluir una curva estándar con cada ensayo. No mezcle varios lotes de ningún componente del equipo en el seno de un mismo ensayo. No utilice ningún componente después de la fecha de caducidad indicada en su etiqueta. Tras extraer los reactivos del ensayo del refrigerador, permita que alcancen la temperatura ambiente (~25°C) antes de pipetear. Los reactivos que no hayan sido utilizados deben conservarse tal y como se indica en la sección "Reactivos". Los estándares y controles deben mezclarse antes de su uso, para lo cual es mejor invertirlos o removerlos ligeramente que emplear un vórtex. Para garantizar una mezcla homogénea de los reactivos en cada tubo de ensayo, es esencial agitarlos suave y uniformemente o mezclarlos con un vórtex. No obtener valores apropiados para los controles puede indicar que la manipulación ha sido imprecisa, que la muestra no se ha manejado de forma adecuada o que los reactivos se han deteriorado. La ausencia de un secado adecuado de los tubos tras la decantación puede tener como consecuencia una replicación deficiente y la obtención de valores falsos.

VIII. PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR EL ENSAYO

A. Materiales suministrados:

Materiales suministrados con los equipos DSL ACTIVE[®] Progesterone Coated-Tube RIA, referencia DSL-3900:

MATERIAL	DSL-3900 (100 tubos)		DSL-3900 (500 tubos)	
	CANTIDAD	REFERENCIA	CANTIDAD	REFERENCIA
Estándar de progesterona A	Un vial	3901	Tres viales	3901
Estándar de progesterona B	Un vial	3902	Tres viales	3902
Estándar de progesterona C	Un vial	3903	Tres viales	3903
Estándar de progesterona D	Un vial	3904	Tres viales	3904
Estándar de progesterona E	Un vial	3905	Tres viales	3905
Estándar de progesterona F	Un vial	3906	Tres viales	3906
Tubos recubiertos de anticuerpos frente a progesterona	100 tubos	3910	500 tubos	3910
Progesterona marcada con I-125 Control de progesterona, nivel I	Un frasco	3920	Cinco frascos	3920
Control de progesterona, nivel I	Un vial	3951	Tres viales	3951
Control de progesterona, nivel II	Un vial	3952	Tres viales	3952

B. Materiales necesarios pero no suministrados con el equipo:

-
- Tubos de ensayo de plástico de 12 x 75 mm
 - Gradilla para tubos de ensayo de 12 x 75 mm
 - Pipeta de precisión para la administración de 25 μ L
 - Pipeta de precisión de repetición para la administración de 500 μ L
 - Baño de temperatura controlada a $37 \pm 2^\circ\text{C}$
 - Gradilla de esponja para tubos de ensayo o un dispositivo para decantación similar.
 - Material absorbente para secado de los tubos.
 - Contador gamma
 - Papel gráfico semilogarítmico (logarítmico – lineal) o programa informático de análisis de datos de RIA.

C. Procedimiento de realización del ensayo:

Antes de su empleo, permita que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$) y mezcle los reactivos líquidos completamente mediante una inversión suave. Tras la reconstitución de los estándares y los controles, mezcle bien, evitando formar espuma. Los estándares, controles y muestras de concentración desconocida deben ser sometidos a ensayo por duplicado.

1. Etiquete dos tubos normales (no recubiertos) para cuentas totales. Etiquete y disponga los tubos recubiertos de anticuerpos frente a progesterona por duplicado.
2. Añada 25 μ L de los estándares, controles y muestras problema a los tubos correspondientes. Pipetee en el fondo de los tubos.
3. Añada inmediatamente 500 μ L de progesterona marcada con I-125 a cada tubo.
4. Mezcle agitando suavemente la gradilla de tubos de ensayo con la mano.
5. Incube todos los tubos en un baño a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 60-70 minutos.
6. Decante todos los tubos, excepto los tubos de cuentas totales, mediante inversión simultánea con una gradilla de esponja sobre un contenedor para residuos radiactivos. Sacuda los tubos firmemente sobre un material absorbente para facilitar el drenaje completo y a continuación déjelos drenar sobre el material

absorbente durante al menos 2 minutos. Toque con papel secante los tubos para eliminar toda gota que pueda estar adherida al borde antes de volver a colocarlos en posición vertical. La ausencia de un secado adecuado de los tubos puede tener como consecuencia una replicación deficiente y la obtención de valores falsos.

7. Introduzca todos los tubos en un contador gamma durante un minuto.

IX. RESULTADOS

Los resultados indicados en este folleto fueron calculados utilizando un modelo de curva de ajuste lineal - logarítmica. El empleo de otros métodos de reducción de datos puede dar lugar a resultados ligeramente diferentes.

A. Calcule la media de las cuentas por minuto (CPM) para cada estándar, control y muestra problema. Calcule el porcentaje de unión (B/T) o el porcentaje B/Bo para cada estándar, control y muestra problema, tal como se indica a continuación:

$$\%B/T = \frac{\text{Mediade.las.cuentasde.la.muestra} - \text{cuentasde.uni3n.inespecifca}}{\text{cuentastotales}} \times 100$$

$$\%B/Bo = \frac{\text{Mediade.las.cuentasde.la.muestra} - \text{cuenta.de.uni3n.inespecifca}}{\text{media.de.las.cuentasde.la.muestra} - \text{cuentasde.uni3n.inespecifca}} \times 100$$

Media de las cuentas para el estándar de 0 ng/mL

B. Construya una curva que represente el porcentaje de B/T o de B/Bo para los estándares (eje y) frente a la concentración de progesterona (eje x) en papel gráfico semilogarítmico. Trace una línea estándar a través de los valores medios de los duplicados.

C. Determine las concentraciones de progesterona mediante la media de las cuentas de los duplicados para cada control y muestra problema a partir de la curva estándar.

- D. Toda muestra con un resultado mayor que el estándar más alto debe ser adecuadamente diluida con estándar de progesterona de 0 ng/mL y ser sometida de nuevo a ensayo.
- E. Toda muestra con un resultado menor que el estándar más bajo debe ser informada como tal.

X. LIMITACIONES

- Los reactivos suministrados con este equipo están optimizados para la medición de las concentraciones de progesterona en suero y plasma.
- Evite congelar y descongelar repetidamente los reactivos y las muestras.
- Las muestras hemolizadas y lipémicas pueden dar lugar a falsos resultados y, por tanto, deben evitarse.
- Los resultados de este ensayo se deben utilizar en combinación con el resto de la información clínica pertinente.

XI. CONTROLES DE CALIDAD

- Los controles de DSL o cualquier otro control disponible en el mercado deben presentar resultados comprendidos dentro de los límites de confianza establecidos. Los límites de confianza para los controles de DSL aparecen impresos en las etiquetas de los viales correspondientes.

DATOS TÍPICOS DE LA CURVA ESTÁNDAR DEL EQUIPO ACTIVE[®] PROGESTERONE

Nº DE TUBO	ETIQUETA DEL TUBO	UNIÓN (cpm)	MEDIA (cpm)	B/T (%)	B/Bo (%)	PROGESTERONA (ng/mL)
1, 2	CUENTAS TOTALES	70189	70775	---	---	---
3, 4	ESTANDÁRES A	29202	28982	40,9	100	0

5, 6	B	28762 26149 26570	26359	37,2	90,9	0,3
7, 8	C	20697 20731	20714	29,2	71,4	1,0
9, 10	D	11333 10799	11066	15,6	38,1	5,0
11, 12	E	5540 5173	5356	7,5	18,4	20,0
13, 14	F	2372 2370	2371 19812	3,3	8,1	60,0
CONTROLES						
15, 16	Nivel I	20534 19091	7980	27,9	68,3	1,16
17, 18	Nivel II	7606 8354		11,2	27,5	10,57

$ED_{50} = 2,82 \text{ ng/ml}$

PRECAUCIÓN: estos datos no deben ser utilizados en lugar de los datos obtenidos por el usuario en el laboratorio.

XII. VALORES ESPERADOS

Un amplio estudio (n=422) en el que se utilizó el equipo DSL-3900 ACTIVE[®] Progesterone Coated-Tube RIA presentó los resultados que aparecen a continuación. Estos resultados se facilitan para servir únicamente como guía inicial. Cada laboratorio debe establecer sus propios rangos de valores esperados, basados en una población de muestra representativa.

POBLACIÓN DE LA MUESTRA	N	MEDIA		RANGO CON 2 DE	
		(ng/mL)	(nmol/L)	(ng/mL)	(nmol/L)

1 ^{er} trimestre de embarazo	23	20,3	64,7	2,9 - 37,8	7,8 - 121,6
2 ^o trimestre de embarazo	54	35,3	112,2	4,3 - 66,3	13,6 - 210,7
3 ^{er} trimestre de embarazo	28	94,9	301,9	17,4 - 172,5	55,3 - 548,5
Fase folicular, mujeres	29	0,5	1,4	ND - 0,9	ND - 3,0
Fase lútea, mujeres	72	10,5	33,3	ND - 24,2	ND - 77,1
Fase lútea media, mujeres	33	15,6	49,5	2,3 - 28,8	7,3 - 91,7
Mujeres postmenopáusicas	53	0,3	0,9	ND - 0,6	ND - 2,0
Anticonceptivos orales	21	0,4	1,1	ND - 0,7	ND - 2,2
Varones adultos	106	0,3	0,9	ND - 0,5	*0,1 - 1,7

*Valores extrapolados ND = No detectable

POBLACIÓN DE LA MUESTRA	N	MEDIANA		RANGO ABSOLUTO	
		(ng/mL)	(nmol/L)	(ng/mL)	(nmol/L)
1 ^{er} trimestre de embarazo	23	19,5	62,0	7,4 - 37,5	23,5 - 119,3
2 ^o trimestre de embarazo	54	32,3	102,6	18,7 - 96,7	59,5 - 307,6
3 ^{er} trimestre de embarazo	28	82,7	236,1	56,8 - 196,0	180,5 - 623,3
Fase folicular, mujeres	29	0,4	1,4	*0,2 - 1,6	*0,5 - 5,0
Fase lútea, mujeres	72	9,4	29,7	1,6 - 31,7	5,2 - 100,8
Fase lútea media, mujeres	33	13,5	42,9	5,4 - 31,7	17,2 - 100,8
Mujeres postmenopáusicas	53	0,3	0,8	ND - 0,8	ND - 2,5
Anticonceptivos orales	21	0,4	1,2	ND - 0,6	ND - 1,9
Varones adultos	106	0,3	0,8	*0,1 - 0,8	*0,3 - 2,5

*Valores extrapolados ND = No detectable (<0,1 ng/mL)

XIII. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Todas las características del ensayo están expresadas en ng/mL. Para su conversión a nmol/L:

$$\text{ng/mL} \times 3,18 = \text{nmol/L}$$

A. Sensibilidad:

La sensibilidad teórica, o límite mínimo de detección, calculada utilizando la media menos dos desviaciones estándar de 12 replicados del estándar de 0 ng/mL, es 0,12 ng/mL.

B. Precisión:

La precisión intraensayo se determinó a partir de la media de diez replicados de cada muestra.

MUESTRA	N	MEDIA (ng/mL)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (ng/mL)	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (%)
I	10	0,50	0,04	8,0
II	10	5,93	0,41	6,9
III	10	15,61	0,75	4,8

La precisión interensayo se determinó a partir de la media del promedio de los duplicados en diez series independientes.

MUESTRA	N	MEDIA (ng/mL)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (ng/mL)	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (%)
I	10	0,61	0,08	13,1
II	10	5,18	0,67	12,9
III	10	18,48	1,71	9,2

C. Recuperación:

Se añadieron diferentes cantidades de una muestra sérica con contenido elevado de progesterona a tres muestras de suero con diferentes concentraciones de progesterona endógena y se procedió a realizar el ensayo.

MUESTRA	ENDÓGENA (ng/mL)	AÑADIDA (ng/mL)	ESPERADA (ng/mL)	OBSERVADA (ng/mL)	RECUPERACIÓN (%)
I	0,16	0,18	0,34	0,3	94
		8,45	8,61	8,7	101
		14,52	14,68	14,2	96
II	1,95	0,18	2,13	1,9	89
		8,45	10,40	11,0	105
		14,52	16,47	16,8	101
III	7,15	0,18	7,33	7,8	106
		8,45	15,60	15,0	95
		14,52	21,67	19,4	89

D. Linealidad:

Se diluyeron tres muestras de suero con el estándar de progesterona de 0 ng/mL y, a continuación, se procedió a su análisis.

MUESTRA	FACTOR DE DILUCIÓN	ESPERADA (ng/mL)	OBSERVADA (ng/mL)	RECUPERACIÓN (%)
I	---	---	34,2	---
	1:2	17,11	16,8	98
	1:4	8,55	7,9	91
	1:8	4,27	3,9	90
	1:16	2,13	1,9	89
	1:32	1,06	1,1	99
	1:64	0,53	0,6	109
	1:128	0,26	0,3	119
II	---	---	11,9	---
	1:2	5,95	7,0	118
	1:4	2,97	3,2	106
	1:8	1,48	1,5	100

III	1:16	0,74	0,6	81
	1:32	0,37	0,4	94
	---	---	8,4	---
	1:2	4,22	4,2	98
	1:4	2,11	2,2	102
	1:8	1,05	1,2	117
	1:16	0,52	0,6	119
	1:32	0,26	0,3	119

E. Especificidad:

La reactividad cruzada del antisuero frente a progesterona se ha determinado frente a varios compuestos. El porcentaje de reactividad cruzada se expresa como el cociente entre la concentración de progesterona y la concentración del compuesto que presenta reactividad cuando la proporción de unión del estándar de progesterona de 0 ng/mL es del 50%.

COMPUESTO	% DE REACTIVIDAD CRUZADA
Progesterona	100,00
5 α -pregnano-3,20-diona	6,00
11-desoxicorticosterona	2,50
17 α -hidroxiprogesterona	1,20
5 β -pregnano-3,20-diona	0,80
11-desoxicortisol	0,48
20 α -dihidroprogesterona	0,10
Medroxiprogesterona	ND
5 β -pregnan-3 α -ol-20-ona	ND
Corticosterona	ND
Danazol	ND
Cortisol	ND
Androstenodiol	ND

Pregnenolona	ND
Estradiol	ND
Testosterona	ND

ND = No detectable (<0,1 ng/mL)

XIV.REFERENCIAS

1. Miller WL: Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrin Rev* 9:295-318, 1988.
2. Nulsen JC, Peluso JJ: Regulation of ovarian steroid production. *Infertil Reproduct Med Clin North Amer* 3:43-58, 1992.
3. Metzger DA: Sex steroid effects on the endometrium. *Infertil Reproduct Med Clin North Amer* 3:163-186, 1992.
4. Hung W. *Clinical Pediatric Endocrinology*. Mosby Year Book, St Louis, 1992, pp 228-231.
5. McNeely MJ, Soules MR: The diagnosis of luteal phase deficiency: a critical review. *Fertil Steril* 50:1-15, 1988.
6. Yalow R, Berson, S: Introduction and general considerations. IN: Odell WD, Daughaday WH, eds. *Principles of Competitive Protein Binding Assays*. J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 1971, pp. 1-19.
7. Tietz *Textbook of Clinical Chemistry*, 2nd Ed. Burtis CA, Ashwood ER, eds. W.B. Saunders Company, 1994, p. 1868.