

# NIVELES PLASMÁTICOS DE PROGESTERONA EN RECEPTORAS DE EMBRIONES CONGELADOS DETERMINADOS POR ELISA-TEST

Leonardo J. De Luca, A. N. Macia, A. A. Vater, M. F. Miranda, J. Cuatrin, G. Iorio y E. Capaul. 2007.  
Prinem Argentina, Prácticas e Investigaciones Embrionarias, Bs. As., Argentina.

[www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)

Volver a: [Trasplantes](#)

## RESUMEN

El objetivo de ésta experiencia fue evaluar el Elisa test para determinación de progesterona, como un criterio adicional en la selección de receptoras en el momento de la transferencia embrionaria, con la finalidad de incrementar los índices de preñez.

## INTRODUCCIÓN

La transferencia de embriones bovinos (sean frescos o congelados), como biotecnología aplicada, reconoce varias etapas que se inician con la hembra dadora y finaliza con las receptoras.

Durante los últimos años se investiga con mayor énfasis la receptora y su influencia sobre el porcentaje de preñez, relacionándola con la raza, edad, estado sanitario, nivel nutricional y productivo (4, 9, 10, 11); por el momento los resultados son contradictorios.

También debe establecerse un perfil endocrinológico que asegure la potencial fertilidad de la receptora y el establecimiento satisfactorio de una preñez (12,13), por cuanto, luego de la transferencia, es decisivo un cuerpo lúteo (C.L.) funcional, que a su vez dependerá de las señales luteotróficas y antiluteolíticas del embrión. Aún no está definida la concentración de progesterona (P4) necesaria para que un embrión sobreviva durante la tercera semana post-implante; pero sí se han demostrado fallas en la concepción cuando la concentración de P4 es inferior a 1 ng/ml (12, 13, 14, 15,16).

Por otro lado numerosas publicaciones señalan que los mayores índices de preñez, se logran con concentraciones de P4 que oscilan entre 2 y 5 ng/ml (13,14, 16, 18,19, 20, 21).

Este trabajo se propone establecer las siguientes relaciones:

- ◆ Niveles plasmáticos de P4 y porcentaje de preñez.
- ◆ Concentración de P4 y calidad del cuerpo lúteo.
- ◆ Calidad del embrión, niveles plasmáticos de P4 y porcentaje de preñez.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el año 1986, en el Centro de Transferencia Embrionario "La Josefina", ubicado en San Antonio de Areco (Buenos Aires), fueron destinadas 163 vaquillonas Holando Argentino, (cuyas edades y pesos oscilaron entre 18 y 24 meses y 350 a 420 kg, respectivamente) a la transferencia de embriones congelados.

El programa de sincronización utilizado fue la doble aplicación de Cloprostenol 500 ug. (análogo de la prostaglandina F2 alfa), con un intervalo de 11 días.

Entre las 48-96 horas después de la última inyección, presentaron celo manifiesto un total de 146 vaquillonas (74,0%).

El día de la transferencia las vaquillonas fueron sometidas a tacto rectal a los fines de evaluar:

- a) presencia y tamaño del/los folículo/s;
- b) localización y calidad de cuerpo lúteo. Para determinar la calidad del cuerpo lúteo se estableció la siguiente escala subjetiva:

1 ó muy bueno: 15 a 25 mm de diámetro, con corona manifiesta.

2 ó bueno: 15 a 20 mm de diámetro, sin corona manifiesta.

3 ó regular: menos de 15 mm de diámetro, sin corona, con un folículo en cualquiera de los ovarios.

4 ó malo: cuerpo lúteo muy pequeño, acompañado de un folículo con un diámetro de 5 a 15 mm.

En base a esta escala se seleccionaron 111 animales (68,0%) con cuerpo lúteo de tipo 1 ó 2 para ser transferidos quirúrgicamente (5). Antes de la misma se extrajeron dos muestras de sangre en tubos con heparina, los cuales fueron centrifugados y el plasma resultante almacenado a -22 ° C hasta su procesamiento.

La concentración de P4 fue determinada por ensayo inmunoenzimático (Elisa) semicuantitativo (Ovucar) en los rangos de 0,5; 1,0 y 5.0 ng/ml.

Los embriones utilizados fueron clasificados, después de la descongelación, en calidad 1 ó excelente y calidad 2 ó buena, según técnica ya descripta (5,6).

Todas las vaquillonas transferidas se observaron dos veces al día para determinar el intervalo de tiempo transcurrido en retornar al celo, de aquellas que no quedaron preñadas. Según el mismo, el celo se clasificó como:

Fisiológico: 18 a 23 días

Prolongado: 24 a 36 días

Extenso: más de 37 días

La preñez fue diagnosticada por tacto rectal entre los días 45 y 60 posteriores a la transferencia. En el análisis estadístico se utilizó el Test X<sup>2</sup> (Ji cuadrado).

## RESULTADOS

Sobre un total de 111 receptoras seleccionadas y transferidas, 56 de ellas (50.45%) presentaron preñez positiva al tacto rectal.

Las receptoras fueron divididas en dos grupos, A y B, de acuerdo al análisis de P4 plasmática. El grupo A lo constituyeron todos los animales cuyo plasma fue positivo a los patrones de 1 y 5 ng/ml. El grupo B engloba a las receptoras negativas a todos los patrones, o positivas a 0.5 ng/ml.

Según Cuadro N° 1 dentro del grupo A, de las 78 vaquillonas (70.2%; 78/111) se obtuvo preñez en 53 de ellas (67.9%), mientras que para el grupo B, de 33 receptoras (29.7%; 33/111) sólo resultan preñados 3 animales (9.09%). El porcentaje de preñez entre ambos grupos, muestra diferencias altamente significativas ( $P < 0.01$ ).

El Cuadro N° 2 muestra el ordenamiento de las receptoras transferidas y los resultados de preñez en función de los niveles de P4 plasmáticos.

Los porcentajes de preñez para cada uno de los grupos fue: 0.0%, 14.3%, 66.6% y 69.0%. Las diferencias son altamente significativas ( $P < 0.01$ ) para cada uno de los niveles de P4.

El Cuadro N° 3 establece la relación entre la calidad del cuerpo lúteo, nivel plasmático de P4 receptoras transplantadas y preñadas. Como puede observarse no hay diferencias significativas con el parámetro calidad del cuerpo lúteo, pero sí la hay con los niveles de P4 plasmáticos.

Además, se observaron las 25 receptoras del grupo P4 mayor a 1 ng/ml que no quedaron preñadas; 17 de ellas (68.0%) retornaron al celo en un período fisiológico (18 a 23 días); 5 (20%) tuvieron celo en un intervalo prolongado (23 a 36 días); mientras 3 receptoras (12%) manifestaron un intervalo Inter.-estruo post-transferencia mayor de 37 días, posiblemente debido a mortalidad embrionaria.

Como puede observarse en el Cuadro N° 4, no existe significación estadística entre la calidad del embrión (excelente o bueno) y la preñez lograda; pero vuelve a ser, significativa la preñez versus el nivel plasmático de la progesterona.

Se analizó el grado de repetibilidad del Test Elisa, evaluando las muestras por radioinmunoensayo. El coeficiente de correlación (r) fue 0.87 (22).

Los resultados de Hirako y col. (23) concluyen que el Elisa test para P4 plasmático, posee la suficiente sensibilidad y precisión para ser usado "a campo"; con un coeficiente de correlación con el radioinmunoanálisis (R.I.A) de 0.97 ( $P < 0.001$ ).

CUADRO N° 1.- Relación, Porcentaje de preñez-nivel plasmático de progesterona.

Concentración de P4 plasmática	N° receptoras Transferidas. (%)	N° receptoras Preñadas
Grupo A (> 1ng /ml)	78 (70,2%)	53 (67.9%) <sup>a</sup>
Grupo B (< 1 ng/ml)	33 (29.8%)	3 (9.09%) <sup>b</sup>
TOTAL	111 (100%)	56

a-b: letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.01$ )

CUADRO N° 2.- Porcentajes de preñez para cada concentración de P4 plasmática el día de la transferencia.

Niveles de P4 plasmática	N° de receptoras transferidas. (%)	N° de receptoras preñadas (%)
Negativo	12 (10.8)	0 (0.0) <sup>a</sup>
Positivo a 0.5 ng/ml	21 (18.9)	3 (14.3) <sup>b</sup>
Positivo a 1.0 ng/ml	36 (32.4)	24 (66.6) <sup>c</sup>
Positivo a 5.0 ng/ml	42 (37.8)	29 (69.0) <sup>d</sup>
TOTAL	111 (100)	56 (50.2)

a, b,c, d: letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.01$ )

CUADRO N° 3.- Porcentajes de preñez según niveles plasmáticos de P4 y su relación con la calidad del cuerpo lúteo.

Calidad del Cuerpo Lúteo	Concentración de P4	N° receptoras transferidas	N° de Preñadas
1	mayor a 1 ng/ml	63 (80.7)	43 (68.2) a
2	mayor a 1 ng/ml	15 (19.3)	10 (66.6) a
TOTAL		78 (100)	53 (67.9) A
Calidad del Cuerpo Lúteo	Concentración de P4	N° receptoras transferidas	N° de Preñadas
1	mayor a 1 ng/ml	63 (80.7)	43 (68.2) a
2	mayor a 1 ng/ml	15 (19.3)	10 (66.6) a
TOTAL		78 (100)	53 (67.9) A

a,c y A,C: letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.01).

CUADRO N° 4 / Porcentaje de preñez según calidad del embrión y nivel de P4 en receptoras

Calidad del embrión	N° de embriones Transferidos	Progesterona en receptoras	N° de Preñadas
1 (excelente)	56	mayor a 1 ng/ml	43 (68.2) a
2 (bueno)	22	mayor a 1 ng/ml	10 (66.6) a
TOTAL	78	78 (100)	53 (67.9) A

Calidad del Cuerpo Lúteo	Concentración de P4	N° receptoras transferidas	N° de Preñadas
1	17	menor a 1 ng/ml	2 (11.7) b
2	11	menor a 1 ng/ml	1 (66.6) b
TOTAL	28		3 (10.7) B

a,b y A,B: letras diferentes indican diferencias significativas (<P0.01)

### COMENTARIO

El objetivo de ésta experiencia fue evaluar el Elisa test (P4) como un criterio adicional en la selección de receptoras al momento de la transferencia; con la idea de incrementar los índices de preñez.

Los resultados obtenidos coinciden con otras publicaciones, donde los mejores índices de preñez se logran en aquellas receptoras que presenten niveles de P4 plasmática entre 1 y 5 ng/ml (13, 16, 18, 19, 22). En nuestro caso llega al 67.9% (53/78).

La selección de una hembra receptora se rige, en primera instancia, por la observación de un celo manifiesto entre las 48 y 96 horas posteriores a la sincronización. Luego el diagnóstico de un cuerpo lúteo, clasificándolo en forma subjetiva, de acuerdo el tamaño, presencia de corona, elasticidad del tejido luteal, en sincronismo con el día del celo de referencia (20). Cualquier alteración en estos parámetros es suficiente para eliminar la receptora del programa. Lamentablemente, ninguno de éstos criterios permite abrir juicio sobre la secreción hormonal del cuerpo lúteo (Cuadro N° 3). No existe relación entre la calidad subjetiva del cuerpo lúteo y los niveles de P4, por cuanto el 29.2% de receptoras con cuerpo lúteo-calidad 1, registraron concentración de P4 inferior a 1 ng/ml, y el 31.8% de receptoras con calidad de cuerpo lúteo 2 también registraron concentración de P4 inferior a 1 ng/ml (Cuadro N° 3).

El ritmo de secreción de P4 por parte del cuerpo lúteo es importante por cuanto permite que exista una sincronización entre el medio intrauterino y el desarrollo del embrión (12,23). Un aumento prematuro de dicho esteroide durante el metaestro iniciaría un asincronismo entre ambos, similar a la situación que ocurre después de la transferencia de un embrión a una receptora que presentara celo 2 a 3 días antes que la donante (4,12, 24).

Es sabido que la sobrevivencia del embrión transferido es mayor cuando las concentraciones plasmáticas de P4 en el 7° al 8° día del ciclo son moderadas. Si bien no se conocen con exactitud los niveles mínimos que aseguran la viabilidad embrionaria, pueden considerarse adecuadas concentraciones de P4 entre los 2 y 5 ng/ml (12, 13, 14, 16, 18, 19, 20).

En éste estudio los porcentajes de preñez fueron 67.9% y 9.09% para aquellas receptoras con niveles de P4 entre 1 y 5 ng/ml, y menos de 1 ng/ml respectivamente (Cuadros N° 1 y N° 2).

La bibliografía cita que con una concentración de P4 menor a 2 ng/ml, los porcentajes de preñez oscilan entre el 8.3 al 35.3%, situación que se presenta en un 21% a 24% de las receptoras (14,18, 19, 20); no estableciéndose preñez alguna con niveles inferiores a 1 ng/ml (16,22).

Esto corresponde con nuestros resultados (Cuadros N°1 y N° 2).

Finalmente los niveles decisivamente altos (más de 6.0 ng/ml) no presentan una correlación positiva con el establecimiento de la preñez (12).

Esto puede deberse a una errónea observación del celo, especialmente cuando se maneja un gran número de hembras sincronizadas.

La calidad de los embriones también influye sobre los índices de preñez (2,3). No se establecieron diferencias significativas entre aquellos embriones de calidad excelente y buena, siempre que fueran transferidos a receptoras con P4 superiores a 1 ng/ml; pero si resultaron significativas para receptoras con P4 menores a 1 ng/ml (Cuadro N° 4).

## CONCLUSIONES

Reconocemos la utilidad de un test rápido para la determinación de la concentración de P4 en plasma el día de la transferencia, por cuanto:

- a) permitirá la selección de receptoras que brindarán mejores y mayores probabilidades de quedar preñadas.
- b) permitirá la reutilización de receptoras en breve plazo, con niveles hormonales inadecuados (hasta 35% sin esperar el retorno al celo o el diagnóstico de vacuidad después de la transferencia.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mazur, P.; 1980 9th International Congress on Animal Reproduction and A.I., Madrid p. 99.
2. J. F. Hasler; A. D. McCauley; W.F. Lathrop and R.H. Foot: 1987 Theriogenology 27, 139.
3. J. M. Wright;:1985 Theriogenology, 23,17.
4. I. Wilmut; D. I. Sales; C.J. Ashworth: 1985 Theriogenology, 23,107.
5. L. J. De Luca; E. Capaul; R. Chilan; J. Cuatrin; A. Maciá; M. Miranda; A. Vater: 1985 Proc. X Congreso Panamericano de Vet. y Zootecnia, Buenos Aires, p. 85.
6. De Luca, L; A. Maciá; M. Miranda; G. Iorio y A. Vater: 1988 Vet. Argent, 5, 45.
7. Seidel, J.R; G.E. Seidel and R. Bowen: 1980 Colorado State Univ. Exp. Stm; Gen. Ser. 975, 9.
8. Weaver, D.L. and J. Galland: 1986 J. of Dairy Sci., 69, 2711.
9. Mapletoff, R; C. Lindsell and V. Pawlshyn: 1986 Theriogenology, 25, 172.
10. Rosenberg, M; Z. Herz; M. Davidson and Y. Folman. 1977J. Reprod. Fert, 51, 363.
11. Wright, J.: 1981 Theriogenology, 15, 143.
12. Britt, J; L. Holt: 1988 Theriogenology, 29, 189.
13. Northey,D; F. Barnes; W. Eyestone and N. First: 1985 Theriogenology, 23, 214.
14. Niemann, H.; B. Sacher and F. Elsaesser: 1985 Theriogenology, 23, 631.
15. Rhodes, R.; R. Randel and C. Long: 1983 J. of An. Sci., 55, 159.
16. Hasler, S.; R. Bowen; L. Nelson and G. Jr. Seidel: 1980 J. Reprod. Fert. 58, 71.
17. De Luca: 1989 Comunicación personal.
18. Bierschwal, C. and C. Murphy: 1985 Embryo Transfer, 1, 37.
19. Remsen, L.; J. Rousell and A. Karihaloo: 1982 Theriogenology, 18, 365.
20. Sunagawa, M.; T. Kasahara; R. Tsunoda and S. Ohtsu: 1987 Jpn J. An. Rep. 33, 206
21. Ayelon, N.: 1978 J. Reprod. Fert. 54, 483.
22. Carou, N.: 1989 Com. Nacional de Energía Atómica, comunicación personal.
23. Hirako, M; T. Kariya; I. Domeki: 1987 Jpn. J. Anim. Reprod. 33 (3), 134.

Volver a: [Trasplantes](#)