

DETERMINACIÓN DE ESTRÓGENOS TOTALES EN HECES DE OVEJAS GESTANTES MEDIANTE UN KIT COMERCIAL DE RADIOINMUNOANÁLISIS

Alabart J.L., Fernández-Arias A., Sánchez P., Folch J.

Servicio de Investigación Agroalimentaria. Apdo. 727, 50080 Zaragoza

INTRODUCCIÓN

La determinación de estrógenos en plasma o leche se ha utilizado como diagnóstico de gestación y como indicador del bienestar fetal en diversas especies animales (1). El análisis de estrógenos en heces es especialmente útil cuando se aplica a animales salvajes, en los que es difícil realizar las tomas de sangre y además se estresan fácilmente.

El objetivo del presente trabajo es poner a punto el análisis de estrógenos totales en heces durante la gestación de las ovejas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron una total de 15 ovejas F1 (Romanov x Rasa) que fueron diagnosticadas como gestantes por progesterona plasmática (kit PROG-CTRIA, CIS España S.A.) en el día 17 tras la cubrición (>0.5 ng/ml). Las ovejas estuvieron encerradas en jaulas individuales durante la mayor parte de la gestación con el fin de facilitar la recogida de heces, que se realizó por las mañanas cada semana desde el día 21 de gestación hasta una semana después del parto (20 muestras/animal). Las heces se guardaron congeladas a -20 °C en bolsas de plástico hasta su análisis.

La extracción de los estrógenos se realizó mediante el método descrito a continuación (2). Se pesaron 0.5 g de heces húmedas en tubos de vidrio y se añadieron 1.5 ml de KOH 1 M y 0.5 ml de cloroformo:hexano 3:2 (v:v). Las muestras se disgregaron mediante una varilla de vidrio cuando fue preciso. Los tubos se agitaron mediante un agitador multi-vórtex durante 30 minutos, al cabo de los cuales se procedió a su centrifugación durante 15 minutos a 1500 g. Se tomaron 500 μ l de la capa superior (capa alcalina acuosa) y se depositaron en otro tubo desde el que se diluyeron convenientemente antes de la realización del radioinmunoanálisis (RIA) mediante un kit comercial (Immuchem™ DA Total Estrogens kit; ICN, Biolink 2000, España). Los calibradores son de 5, 10, 20, 50, 100 y 200 pg/ml, que equivalen a 0.015, 0.03, 0.06, 0.15, 0.3 y 0.6 ng/g de heces en un extracto sin diluir. Como las cantidades presentes en heces son mucho mayores, es preciso diluir el extracto. En un primer análisis se utilizaron 3 ovejas para determinar la dilución óptima. Se ensayaron las diluciones 1/100, 1/500 y 1/1000 en agua destilada, que equivaldrían a 1.5-60, 7.5-300 y 15-600 ng/g, concluyendo que la dilución óptima sería una intermedia, de 1/250, equivalente a 3.75-150 ng/g de heces que cubriría la mayor parte de los valores hallados en esas 3 ovejas a lo largo de la gestación. En un segundo análisis se determinaron los perfiles de las 12 ovejas restantes previa dilución del extracto 1/250, como se explica a continuación.

En un tubo de vidrio se añadieron 500 µl de los calibradores o de muestras (extractos diluidos 1/250), 100 µl del primer anticuerpo y 100 µl de estradiol marcado con yodo-125, se agitaron y se incubaron 90 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 100 µl del segundo anticuerpo y se incubaron durante 60 minutos también a temperatura ambiente, pasados los cuales se centrifugaron 15 minutos a 1500 g. Se decantó el sobrenadante y la radiactividad del precipitado se midió en un contador gamma. Los coeficientes de variación intra e Inter-análisis especificados por el fabricante son 5.7 y 17.4%. La reactividad cruzada del anticuerpo con la estrona y el 17β-estradiol son del 100%, con el estriol del 9% y con el 17α-estradiol del 7%. La reactividad cruzada con los andrógenos, progestágenos y corticoides más conocidos es menor del 0.01%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 60 muestras analizadas de 3 ovejas, sólo el 22% estuvieron dentro del rango de medida del kit cuando se diluyeron 1/1000. Estos porcentajes fueron 62% para la dilución 1/500 y 87% para la 1/100 (Fig. 1). En las muestras de las otras 12 ovejas analizadas previa dilución 1/250, el 80% se situaron dentro del rango de medida.

En 13 de las 15 ovejas se detectó el conocido pico de las proximidades del parto, de unos 170 ± 37 ng/g (rango de 54 a 418). Esta medida es aproximada, ya que algunas de esas muestras se hallan fuera del rango de medida del kit (>150 ng/g).

El diagnóstico de gestación podría realizarse a partir de los días 110 - 120 de gestación, considerando unos valores umbral de 8 y 10 ng/g, respectivamente (Fig. 2). Ninguna oveja gestante sobrepasó el nivel de 10 ng/g antes del día 55 de gestación.

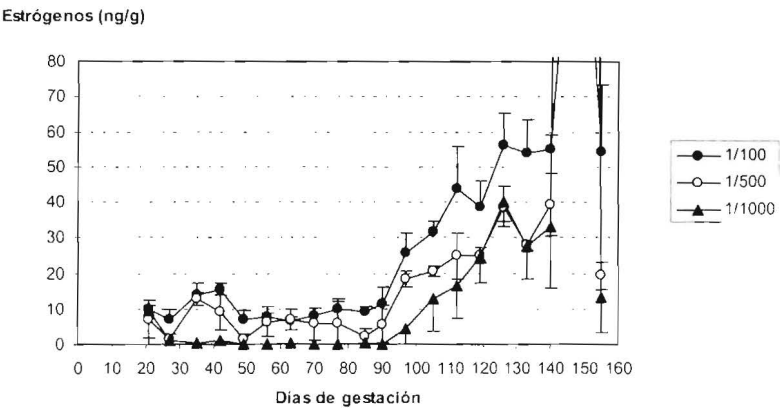


Figura 1. Valores de estrógenos totales en heces obtenidos a partir de 3 diluciones diferentes del extracto (medias de 3 ovejas $\pm$ error estándar).

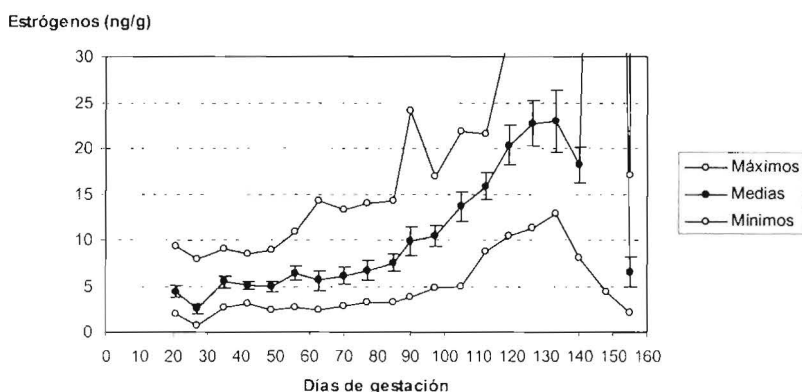


Figura 2. Perfil de estrógenos totales en heces obtenidos a partir de una dilución del extracto 1/250 (medias de 12 ovejas $\pm$ error estándar).

La utilidad de este método como diagnóstico de gestación en ovejas es bastante limitada en comparación con la ecografía abdominal o rectal, o la progesterona o PAG (Pregnancy-Associated Glycoprotein) plasmáticas, debido a que sólo puede hacerse en el último tercio de la gestación. Sin embargo, hay que tener también en cuenta que es más barato y cómodo obtener una muestra de heces que una de sangre, ya que no se necesitan tubos con vacío. Además, no hay que separar el plasma o suero, sino que basta con almacenar la muestra congelada. Esta técnica sería más útil para vigilar de una forma no invasiva el bienestar fetal a lo largo de la gestación de receptoras de embriones de alto valor, como p.ej., embriones selectos, o procedentes de FIV, transgénicos, clonados, etc.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Heap R.B. Method for monitoring pregnancy in milk-producing domestic animals. *UK-Patent-Application*. 1980, 2 040 043 A.
2. Möstl E., Meyer H.H.D., Bamberg E., Hegel G. Oestrogen determination in faeces of mares by enzyme immunoassay on microtitre plates. *Proc. Of the Symp. On the Analysis of Steroids*. Sopron, Hungary, 1987.

Financiado por INIA (proyectos SC97-020-C2-2 y SC00-051-C3-2) Agradecimientos: A Elías Echegoyen por el manejo de los animales.