

## Efecto de la ovariectomía sobre los niveles plasmáticos de progesterona, estrona libre y conjugada en ovejas gestantes

M. Esteva, S. Mañes, M. A. del Palacio y A. López-Sebastián\*

Departamento de Reproducción Animal  
C.I.T. - I.N.I.A.  
Avda. Puerta de Hierro, km 5,9  
28040 Madrid (España)

(Recibido el 29 de abril de 1987)

M. ESTEVA, S. MAÑES, M. A. DEL PALACIO and A. LOPEZ-SEBASTIAN. *Progesterone, Free and Conjugated Estrone Plasma Levels in Ovariectomized Pregnant Ewes*. Rev. esp. Fisiol., 44 (2), 197-204, 1988.

Progesterone, free and conjugated estrone were determined in peripheral plasma from ovariectomized and control pregnant ewes in order to observe the ovary contribution to these hormonal levels. Progesterone levels during pregnancy were lower in the ovariectomized ewes than in control, although the differences were significant only until the 120th day of pregnancy. From the 130th day to the 3rd-5th day prepartum, an increase in the hormone levels was observed in both groups of ewes indicating a placental contribution. Very similar patterns were followed by the free and conjugated estrone concentrations, their levels not being significantly different in either group. Production of conjugated estrone both preceded and reached higher values than that of free estrone. Both hormones showed an abrupt increase in concentration two days before the parturition, decreasing after that. Parturition mechanisms, foetus viability and the length of pregnancy were not affected by ovariectomy.

**Key words:** Ewe, Ovariectomy, Pregnancy, Progesterone, Free estrone, Conjugated estrone.

El parto en la oveja está precedido por múltiples y complejos cambios en las concentraciones plasmáticas de algunas hormonas esteroides que, aunque han sido estudiados, tanto en la oveja (6, 24) como en otras especies (19, 20, 23), aún no se ha construido un modelo que explique satisfactoriamente todos los cambios endocrinos que acontecen en el parto. Por otra parte, se sabe que los prostá-

genos son fundamentales para el mantenimiento de la gestación en todas las especies (3). En algunas como cabra, cerdo y vaca, el ovario es el principal órgano secretor de progesterona a lo largo de la gestación. Sin embargo, en la oveja existe una contribución importante de la unidad fetoplacentaria en la secreción de esta hormona durante el último tercio de la gestación (7).

La evidencia sugiere que el aumento repentino de estrógenos circulantes y la caída de progesterona actúan como inicia-

\* A quien debe dirigirse la correspondencia.

dores del parto (3, 25). Teniendo en cuenta que los estrógenos libres pueden detectarse en plasma periférico aproximadamente a partir del día 100 de gestación (4), y que su síntesis parece estar controlada por los niveles de glucocorticoides secretados por las glándulas adrenales del feto (7, 13, 27), sería el concepto quien controlaría el momento del parto en la oveja. No obstante, algunos autores sostienen que el cuerpo lúteo mantiene su capacidad de secreción de esteroides a lo largo de toda la gestación (5, 8), y según esto parecería cuestionable negar al ovario algún tipo de participación como desencadenante del parto.

Los objetivos de este trabajo eran comprobar si las hembras ovariectomizadas tenían parámetros endocrinos alterados respecto a las testigo a lo largo de la gestación y en el parto, así como evaluar los posibles efectos que la falta de ovarios provocaba en su mecanismo.

### Material y Métodos

*Animales.* — Se asignaron aleatoriamente nueve ovejas de raza manchega a dos grupos de tratamiento; 4 de ellas fueron ovariectomizadas y 5 constituyeron un grupo control. Las ovariectomías se realizaron entre los 30-40 días de gestación. Desde este momento, la gestación se mantuvo en este grupo mediante la colocación, cada 14 días, de esponjas intravaginales impregnadas con 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP). Se prescindió del tratamiento con progestágenos a partir del día 90 de gestación.

*Muestras de sangre.* — La toma de muestras comenzó el mismo día en que se efectuaron las ovariectomías, siendo realizada dos veces por semana hasta los 135 días de gestación, y diariamente desde este momento, y hasta pasados 5 días del parto. La sangre se obtuvo de la vena yugular mediante tubos Vacutainer hepa-

rinizados. Una vez obtenida, era centrifugada a 3.500 r.p.m. durante 15 min, y el plasma recogido y congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del análisis.

*Análisis hormonales. Estrona libre.* — Las concentraciones de estrona libre se determinaron mediante un método radioinmunológico precedido de extracción con dietil-éter anhidro. Después de separar las fases orgánica y acuosa, la primera se evaporó en corriente de nitrógeno. El producto de la extracción se redisolvió con tampón Tris-HCl 0,05 M (pH=8,0),  $^3\text{H}$ -estrona (Nuclear Ibérica, actividad 110 Ci/mmol) y suero anti-estrona (Anti-estrona-6-tiroglobulina, Miles Martin). Las muestras se mantuvieron en incubación a  $4^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Posteriormente, se añadió a cada tubo una solución de carbón activo-dextrano (0,24 % carbón activo Norit A, 0,012 % dextrano T-70), centrifugándose inmediatamente a 4.000 r.p.m. durante 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se tomaron 900  $\mu\text{l}$  del sobrenadante a los que se añadieron 6 ml de líquido de centelleo, para medir la radiactividad en la fracción ligada.

Para cada análisis se contruyó una curva estándar con concentraciones de estrona libre desde 6,25 pg/ml hasta 800 pg/ml disuelta en plasma tratado con carbón, que seguían el mismo proceso que el resto de las muestras. Esta curva se procesó por el método Logit  $B/B_0$  construyéndose una recta patrón a la que se referían todas las muestras. La sensibilidad del análisis era de 10 pg/tubo, los coeficientes de variación intra e interanálisis eran de 5,4 % y 8,9 % respectivamente, y la reacción cruzada del anticuerpo era del 100 % para estrona < 0,1 % para estradiol y < 0,01 % para testosterona, progesterona, dihidrotestosterona, androstenediona, y 17-hidroxiprogesterona.

*Estrona conjugada.* — La valoración se realizó hidrolizando la estrona en su

forma conjugada, principalmente sulfatos y glucuronatos, a su forma libre. Para ello, se añadió al plasma un extracto de *Helix pomatia* disuelto al 5 % en tampón acetato de pH = 4,8 (2 M ácido acético, 2 M acetato sódico anhidro). Se mantuvieron en incubación 24 h a 37° C, tiempo en el que la mayor parte de los estrógenos conjugados pasaron a la forma libre, operándose igual que en el caso anterior. La diferencia entre los valores obtenidos en este análisis y los detectados con la técnica de estrona libre, proporcionaron los niveles de estrona conjugada.

Como en el caso de la estrona libre, en cada análisis se construyó una curva patrón disolviendo concentraciones de estrona libre en plasma tratado con carbón activo. Para la estrona conjugada, se utilizaron concentraciones que iban desde 6,25 pg/ml hasta 6,4 ng/ml. El procesamiento de las muestras se realizó de la misma forma que en el caso de estrona libre. La sensibilidad del análisis era también de 10 pg/tubo y los coeficientes de variación intra e interanálisis eran de 15,3 y 20,4 % respectivamente.

**Progesterona.** — La determinación de los niveles de progesterona se realizó según el método descrito por LÓPEZ-SEBASTIÁN *et al.* (10). La curva estándar se construyó con concentraciones que variaban desde 0,125 hasta 8 ng/ml. El procesamiento de las muestras fue similar al de los casos anteriores.

**Análisis estadístico.** — Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza jerárquico doble, en el que el número de grupos lo constituían los lotes de tratamiento y los subgrupos cada una de las ovejas objeto de comparación.

### Resultados

Las ovejas utilizadas en este experimento parieron normalmente hacia los

150 días de gestación. Entre las que llegaron a término de ambos grupos, hubo un parto triple, otro doble y el resto parieron un solo cordero, todos ellos vivos. El desarrollo de los corderos nacidos fue normal durante todo el periodo de crecimiento.

**Evolución de la progesterona en plasma.** — Los niveles medios de progesterona de dos ovejas control y tres ovariectomizadas desde el momento en que se realizó la ovariectomía, fueron siempre más altos en el lote control, aunque la diferencia fue significativa únicamente hasta el día 120 de gestación ( $F = 15,1$ ;  $P < 0,001$ ) (fig. 1).

En cuanto al patrón de distribución, se diferenciaron tres etapas: Una primera desde la ovariectomía hasta unos 60 días antes del parto, en la que los niveles de progesterona se incrementaron desde  $2,2 \pm 0,49$  ng/ml hasta  $3,02 \pm 1,17$  ng/ml y desde  $0,35 \pm 0,14$  ng/ml hasta  $1,25 \pm 0,35$  ng/ml en los lotes de ovejas control y ovariectomizadas respectivamente. Du-

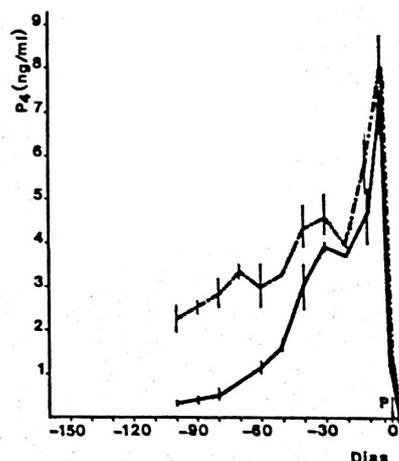


Fig. 1. Niveles medios y desviación estándar de progesterona en plasma de ovejas ovariectomizadas (—) y testigos (— · —) a partir de los tres meses de gestación.

Se considera día 0 el día del parto.

rante todo este periodo, la gestación se mantuvo con esponjas impregnadas de progestágeno en el lote de ovejas ovariectomizadas, cuya concentración no era detectada en el análisis dada la especificidad del anticuerpo.

La segunda etapa ocupa desde los 60 hasta los 20 días antes del parto, y se caracteriza porque los niveles de progesterona tienden a igualarse entre ambos grupos. El incremento de dichos niveles fue mayor en el grupo de ovejas ovariectomizadas, desde  $1,7 \pm 0,14$  ng/ml hasta  $3,72 \pm 0,17$  ng/ml, que en el de ovejas control, desde  $3,25 \pm 0,007$  ng/ml hasta  $3,75 \pm 0,21$  ng/ml.

En la tercera fase, que comprende los últimos 20 días de gestación, hay un aumento brusco en los niveles de progesterona en ambos grupos hasta, aproximadamente, 3-5 días antes del parto, alcanzando valores de  $7,6 \pm 1,62$  ng/ml y  $6,85 \pm 1,27$  ng/ml en ovejas control y ovariectomizadas respectivamente. A partir de este momento, descendieron bruscamente los niveles hasta  $1,22 \pm 0,38$  y  $0,5 \pm 0,07$  ng/ml el día del parto para ovejas control y ovariectomizadas respectivamente, llegando a ser basales 3 días después del mismo.

#### *Evolución de la estrona libre en plasma.*

— Los niveles medios de estrona de dos ovejas control y dos ovariectomizadas a partir de los tres meses de gestación, permanecieron basales hasta aproximadamente los 100 días de la gestación, y a partir de este momento aumentaron gradualmente (fig. 2). Se observan descargas episódicas a lo largo de la gestación, aunque están generalizadas entre los días 130-140 de gestación ( $65,75 \pm 28,5$  pg/ml y  $69,82 \pm 32,82$  pg/ml,  $n = 2$ ). Un tercer pico de mayor intensidad apareció justo el día del parto ( $238,67 \pm 120,5$  pg/ml,  $n = 4$ ).

El patrón de distribución es similar en el lote de ovejas ovariectomizadas, siendo los valores de los picos antes menciona-

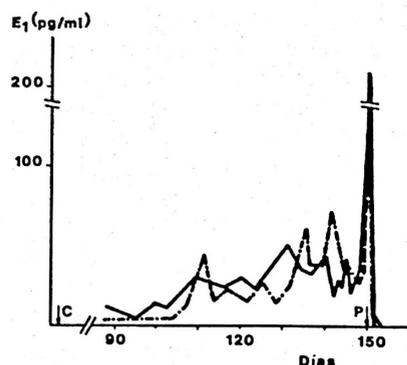


Fig. 2. Niveles medios de estrona libre en plasma de ovejas ovariectomizadas (—) y testigos (- · -) a partir de los tres meses de gestación. «C» representa el día de cubrición y «P» representa el día del parto. Las curvas están ajustadas al pico de estrona libre.

dos  $52,77 \pm 9,58$  pg/ml ( $n = 2$ ),  $45,47 \pm 21,88$  pg/ml ( $n = 2$ ) y  $236 \pm 114,55$  pg/ml ( $n = 3$ ), para los 130, 140 días y parto respectivamente.

Al comparar los niveles de estrona libre desde el día 100 de gestación hasta el día anterior al parto, no se observaron diferencias significativas entre ambos lotes de ovejas ( $F = 0,23$ ;  $P < 0,1$ ), aunque lo eran dentro de cada grupo ( $F = 5,65$ ;  $P < 0,025$ ).

*Evolución de la estrona conjugada en plasma.* — En la figura 3, aparecen representados los niveles medios de estrona conjugada en dos ovejas control y dos ovariectomizadas a partir de los tres meses de gestación. El patrón de las curvas es bastante similar al de la estrona libre, aunque los valores son 20-30 veces más altos. Los niveles de estrona conjugada permanecieron bajos ( $< 100$  pg/ml) hasta aproximadamente los 90 días de gestación y a partir de este momento aumentaron con algunas interrupciones hasta el día del parto. Se observa que las descargas episódicas de la estrona libre hasta el día 130 de gestación, se corresponden con depresiones en los niveles de estrona conjugada

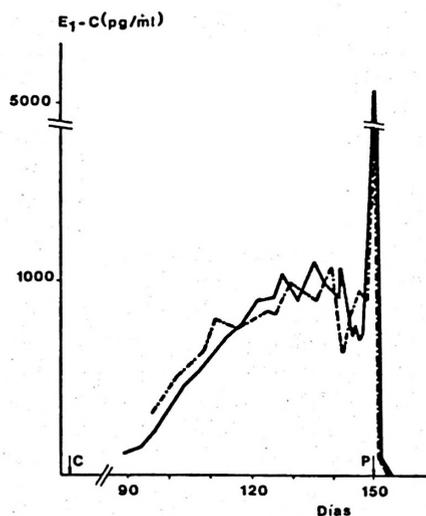


Fig. 3. Niveles medios de estrona conjugada de plasma de ovejas ovariectomizadas (—) y testigos (---) a partir de los tres meses de gestación. Leyenda como en la fig. 2.

y que los picos en esta última hormona preceden temporalmente a los observados en la estrona libre. Este mismo patrón se puede observar en las ovejas ovariectomizadas.

Los niveles de estrona conjugada aumentaron bruscamente dos días antes del parto en ambos lotes de ovejas, alcanzando un máximo el día del parto con niveles de  $5.205 \pm 1.319$  pg/ml ( $n = 4$ ) y  $5.663 \pm 493$  pg/ml ( $n = 3$ ), en ovejas control y ovariectomizadas respectivamente. Al comparar los niveles de estrona conjugada desde el día 90 de gestación hasta el día anterior al parto, al igual que en el caso de estrona libre, no se observaron diferencias significativas entre ambos lotes de ovejas ( $F = 0,15$ ;  $P < 0,1$ ), aunque sí las había dentro de cada grupo ( $F = 6,51$ ;  $P < 0,025$ ).

### Discusión

La gestación en la oveja puede mantenerse sin ovarios a partir del último tercio

de la misma (8). Según los resultados obtenidos, la contribución ovárica parece ser importante únicamente para mantener elevados los niveles de progesterona hasta aproximadamente el día 100 de gestación, ya que su secreción durante este periodo puede ser sustituida por el tratamiento con progestágenos. Posteriormente, este papel sería asumido por la placenta; si bien en este experimento la concentración media de progesterona a lo largo de la gestación era más baja en el lote de ovejas ovariectomizadas que en el control (5, 8), el patrón de la curva en ambos lotes era bastante parecido, lo que no coincide con los autores antes citados.

Desde el día 90 y hasta el día 120 de gestación, los niveles de progesterona tienden a igualarse entre ambos lotes. Las observaciones histológicas de CATON *et al.* (5), indican que hasta este momento, la vascularización del ovario y la presencia de células luteales se asemejan a las condiciones de un cuerpo lúteo activo, y los presentes resultados señalan diferencias significativas entre ambos tratamientos hasta el día 120 de gestación. Entre los días 120-130 de gestación hay una disminución en los niveles de progesterona, que es mucho más acusada en el lote de ovejas control. Esto también está en concordancia con las observaciones de CATON *et al.* (5) sobre una regresión temprana del cuerpo lúteo a partir del día 120. Desde el día 130 hasta 3-5 días antes del parto, hay una fuerte subida de los niveles de progesterona, probablemente de origen placentario, ya que aparece en ambos lotes de ovejas. Por lo tanto, aunque nuestros resultados apoyen la idea de que la síntesis de progesterona ocurre mayoritariamente en la placenta durante la gestación tardía (3, 24, 25), también sugieren que el ovario es una fuente continua de dicha hormona a lo largo de la gestación (5, 8). A esta misma conclusión se ha llegado en otras especies como el cobaya (2).

El hecho de que los niveles de estrona

libre y conjugada no fueran detectables en plasma materno hasta pasado el primer tercio de la gestación, indican la ausencia de contribución ovárica para dichos estrógenos. Estas observaciones concuerdan con resultados obtenidos en oveja (4), vaca (20) y cabra (23). Hay que destacar la aparición de descargas episódicas de ambas formas de estrona, especialmente importantes 15-25 días antes del parto. Estas descargas también han sido descritas por otros autores (5, 27), aunque su significado fisiológico es desconocido. Teniendo en cuenta que el aumento de cortisol en el feto ocurre en los últimos 20 días de gestación (7, 25), y que esta hormona acelera la conversión de progesterona o precursores de ésta a estrógenos (13, 27), dichas descargas podrían estar íntimamente relacionadas con el descenso en los niveles de progesterona observados en ambos lotes hacia el día 130 de gestación, y ser un mecanismo de preparación temprana para el parto.

Los presentes resultados apoyan la idea de que la estrona conjugada actuaría como precursor de la estrona libre, ya que las descargas episódicas de la forma conjugada precedían en el tiempo a las de la forma libre. NATHANIELSZ *et al.* (13), midiendo la concentración de ambas hormonas en el lado fetal y materno de la placenta, encontraron que al final de la gestación el cociente entre los niveles hormonales del feto y de la madre se incrementaba para la estrona libre, mientras que disminuía bruscamente para la estrona conjugada. Además, se ha demostrado la existencia de una fuerte actividad sulfoquinasa en el feto (21) y de una actividad sulfatasa en el miometrio (22). Por tanto, la estrona conjugada pasaría desde el feto a los tejidos maternos bien directamente, bien vía circulación materna, justificando la elevación de su concentración en plasma periférico.

El repentino aumento en la concentración de estrógenos puede actuar como desencadenante del parto (24-26). Te-

niendo en cuenta que la duración de este aumento es menor de 24 h y que la toma de muestras era diaria, se consideró que la comparación estadística entre los niveles alcanzados en dicho punto carecía de significación biológica. Está bien establecido que los estrógenos, o más concretamente su forma biológicamente activa  $17\beta$ -estradiol, son capaces de estimular la síntesis de proteínas contráctiles en el miometrio, reducir el umbral excitatorio del útero a agonistas de oxitocina y activar la síntesis y secreción de prostaglandinas, y PORTER y LYE (18) demostraron que el  $17\beta$ -estradiol podía actuar directamente sobre la contractibilidad uterina. No obstante, la acción de los estrógenos parece ser dependiente de la caída brusca de los niveles de progesterona al final de la gestación (24, 25). Se ha observado, por otra parte, que altos niveles de progesterona inhiben reversiblemente la actividad miometrial en una acción no mediada por prostaglandinas (12). Sin embargo, LIGGINS *et al.* (9) encontraron que el parto llegó a término en ovejas con altos niveles de progesterona en el miometrio. Por tanto, los estrógenos podrían actuar como señal para el parto, contrarrestando el ambiente de dominancia de progesterona o facilitando la acción de otras hormonas como la oxitocina (1) o las prostaglandinas (11).

Dado que la ovariectomía no afectó significativamente los niveles de progesterona y estrógenos durante la última fase de la gestación, ni modificó significativamente la duración de la misma respecto a la media de la raza (15), se puede concluir que el ovario no tiene una actuación directa sobre los mecanismos del parto en la oveja. En los últimos años, algunos autores han prestado un especial interés a la relaxina, hormona de naturaleza proteica, que parece inhibir la actividad miometrial en la oveja (17) y en la rata (16) por antagonismo con la prostaglandina  $F_{2\alpha}$ . Esta hormona sólo es secretada por el ovario en especies sin contribución pla-

centaria de progesterona. En la oveja aún no se ha localizado el lugar de síntesis de relaxina, aunque sí se ha observado que el miometrio ovino es sensible a la relaxina porcina (17). El hecho de que las ovejas ovariectomizadas tengan un periodo de gestación similar a las ovejas no castradas, sugiere que esta hormona podría sintetizarse en glándulas del endometrio, como se ha demostrado recientemente en el cobaya (14).

### Resumen

Se determinan los niveles de progesterona, estrona libre y conjugada en plasma periférico de ovejas gestantes ovariectomizadas y testigos, con el fin de estimar la contribución ovárica a dichos niveles hormonales. Los niveles de progesterona son menores a lo largo de la gestación en el grupo de ovejas ovariectomizadas, aunque estas diferencias sólo son significativas hasta el día 120 de gestación. Desde el día 130 hasta 3-5 días preparto, se observa un aumento en los niveles de esta hormona en ambos lotes de ovejas, indicando una contribución placentaria de la misma. Las concentraciones de estrona libre y conjugada siguen patrones muy similares y sus niveles no son significativamente diferentes en los grupos estudiados. La estrona conjugada precede en el tiempo y alcanza valores más altos que la estrona libre. Ambas hormonas aumentan bruscamente dos días antes del parto, cayendo después de éste. La ovariectomía no afecta a la duración de la gestación, a los mecanismos del parto ni a la viabilidad de los fetos.

**Palabras clave:** Oveja, Ovariectomía, Gestación, Progesterona, Estrona libre, Estrona conjugada.

### Bibliografía

- Alexandrova, M. y Soloff, M.: *Endocrinology*, 106, 730-735, 1980.
- Batra, S. y Thobert, G.: *Acta Endocrinol.*, 98, 302-307, 1981.
- Bedford, C., Challis, J., Harrison, F. y Heap, R.: *J. Reprod. Fert.*, Suppl. 16, 1-23, 1972.
- Carnegie, J. y Robertson, H.: *Biol. Reprod.*, 19, 202-211, 1978.
- Caton, D., Kalra, P., Wilcox, C. y Henderson, D.: *Biol. Reprod.*, 24, 557-564, 1981.
- Challis, J., Harrison, F., Heap, R.: *J. Reprod. Fert.*, 25, 306-307, 1971.
- Elsner, C., Magyar, D., Fridshal, D., Eliot, J., Klein, A., Glatz, T., Nathanielsz, P. y Buster, J.: *Endocrinology*, 107, 801-808, 1980.
- Fylling, P.: *Acta Endocrinol.*, 65, 273-283, 1970.
- Liggins, G., Grieves, S., Kendall, J. y Knox, B.: *J. Reprod. Fert.*, Suppl. 16, 85-103, 1972.
- López-Sebastián, A., Gómez, A. e Inskip, K.: *J. Anim. Sci.*, 59, 277-283, 1984.
- Lye, S. y Challis, J.: *J. Reprod. Fert.*, 66, 311-315, 1982.
- Lye, S. y Porter, D.: *J. Reprod. Fert.*, 52, 87-94, 1978.
- Nathanielsz, P., Elsner, C., Magyar, D., Fridshal, D., Freeman, A. y Buster, J.: *Endocrinology*, 110, 1402-1407, 1982.
- Pardo, R. y Larkin, L.: *Am. J. Anat.*, 164, 79-90, 1982.
- Pérez García, T., Serna, J. y López Sebastián, A.: *IX Inter. Cong. Anim. Reprod. A. I.*, 4, 178-181, 1980.
- Porter, D., Downing, S. y Bradshaw, J.: *J. Reprod.*, 83, 183-192, 1979.
- Porter, D., Lye, S., Bradshaw, J. y Kendall, J.: *J. Reprod. Fert.*, 61, 409-414, 1981.
- Porter, D. y Lye, S.: *J. Reprod. Fert.*, 67, 227-234, 1983.
- Robertson, H. y King, G.: *J. Reprod. Fert.*, 40, 133-141, 1974.
- Robertson, H. y King, G.: *J. Reprod. Fert.*, 55, 463-470, 1979.
- Rosenfeld, Ch., Worley, R., Milewich, L., Grant, N. y Parker, C.: *Endocrinology*, 106, 1971-1979, 1980.
- Rossier, G. y Pierrepont, C. G.: *J. Reprod. Fert.*, 37, 43-49, 1974.
- Tamanini, C., Chiesa, F., Prandi, A. y Galeati, G.: *Anim. Reprod. Sci.*, 11, 35-42, 1986.
- Thompson, F. y Wagner, W.: *J. Reprod. Fert.*, 41, 57-66, 1974.
- Thorburn, G., Nicol, D., Basset, J., Shutt, D. y Cox, R.: *J. Reprod. Fert.*, Suppl. 16, 61-84, 1972.
- Tsang, Ch.: *Steroids*, 23, 855-868, 1974.
- Yu, H., Cabalum, T., Jansen, C., Buster, J. y Nathanielsz, P.: *Endocrinology*, 113, 2216-2220, 1983.

