

NIVELES DE PROGESTERONA EN LECHE DURANTE LOS PRIMEROS SEIS MESES DE LA GESTACIÓN DE BÚFALAS (*Bubalus bubalis*)

Progesterone Levels in Milk During the Six First Months of Pregnancy in Female Buffaloes (*Bubalus bubalis*)

Francisco Perozo Marín¹, Javier Goicochea¹, Néstor Montiel¹, Marcelo Gil¹, Jorge Zuleta² y Karina Madrigal²

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Apartado 15272. Maracaibo, Edo. Zulia, Venezuela.

²Asistente de investigación

RESUMEN

Con el objetivo de determinar y caracterizar los niveles de progesterona durante los primeros 193 días de la gestación en búfalas, se realizó una investigación en una finca comercial, ubicada en el municipio Mara del estado Zulia, Venezuela. La variable dependiente fue niveles de P₄ (NP₄), siendo las independientes producción láctea (PL) y sexo de la cría (SC). Se utilizaron 12 búfalas mestizas de tres y más partos y se realizaron 294 observaciones (muestras de leche). Los resultados fueron analizados por el Sistema de Análisis Estadístico (SAS) a través de un análisis de varianza por método de los mínimos cuadrados y el Procedimiento General Lineal Model (GLM). El valor promedio para la progesterona en este período fue de 3,41 ng/ml con una desviación estándar de 1,26. La PL presentó efectos significativos sobre NP₄ (P < 0,001) al igual que SC (P < 0,0281). Se concluye que con la información aportada por la presente investigación se puede configurar el perfil hormonal para la P₄ durante los dos primeros tercios de la gestación a través del análisis de leche descremada con la técnica de Radio Inmuno Análisis (RIA) Información ésta que pasa a formar parte de la base de datos sobre caracteres fisiológicos de la especie bubalina en el estado Zulia.

Palabras clave: Progesterona, niveles, búfalas, gestación, leche descremada.

ABSTRACT

In order to characterize and evaluate the progesterone levels (P₄) during the first 193 days of gestation, a research was

carried out in a commercial farm, located in the Mara county, Zulia state, Venezuela. The dependent variable was the progesterone level (P₄L); the independent variables were: milk production (MP) and sex of calf (SC). In this study 12 crossbred female buffaloes with three or more calvings from a herd of 110 buffaloes under production were used. 294 observations (milk samples) were taken and the analysis was done with the Statistical Analysis System (SAS) through the variance study minimum squares and general linear model (GLM) process. The mean values for progesterone during the study period was of 3.41 ng/ml ± 1.26. MP had a significant effect over the P₄L (P < 0.001) also the SC did (P < 0.0281). As conclusion the information of this study is useful for the establishment of the progesterone behaviour in the six first months of pregnancy and these values are affected by MP and SC. This can be done using fat free milk through the Radioimmunoanalysis technique (RIA). This result comes to be included in the data base of physiological information of *Bubalus bubalis* in the Zulia state.

Key words: Progesterone, levels, female buffaloes, pregnancy, fat free milk.

INTRODUCCIÓN

La fisiología básica, es siempre un tema interesante de estudio, más aún si se relaciona con la caracterización del comportamiento reproductivo de una especie con grandes ventajas en la producción animal y que aunque poco distribuida, se considera una alternativa provechosa para la producción agropecuaria venezolana.

El búfalo (*Bubalus bubalis*) es definido como un bóvido multipropósito debido a que es capaz de producir carne, leche y trabajo [5]. Una de las ventajas comparativas con respecto a

los otros bovinos es su alta resistencia a enfermedades y habilidad para sobrevivir en climas con alta humedad, elevada temperatura y con fuentes alimenticias de pobre calidad [13]. Las grandes potencialidades productivas de la especie se evidencian en los parámetros productivos mostrados en nuestro país donde el 85,6% de los promedios de producción de leche se ubican en el rango entre 4,00 y 7,99 kg/día y el promedio de ganancia de peso diario fluctúa entre 0,38 y 1,12 kg/día, sin los requerimientos nutricionales y de manejo necesarios para otras especies [18]. Un mejor aprovechamiento de las cifras antes expuestas justifica la investigación en el área, para con base cierta poder establecer prácticas de manejo idóneas a nuestro medio, pues la investigación realizada es muy escasa y se debe trabajar sobre la base de índices obtenidos en otros países.

La presente investigación persigue establecer el comportamiento de la progesterona (P_4) durante los dos primeros tercios de la gestación de búfalas determinada en leche descremada a través del método del Radio Inmuno Análisis (RIA) [17].

Investigaciones sobre los niveles de progesterona (P_4) durante la gestación, han sido reportadas con anterioridad, sin embargo todas son referidas a otros países [2, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 16]; en Venezuela se han realizado investigaciones relacionadas con el comportamiento reproductivo en el post parto, evaluado a través de los niveles de progesterona en leche [1], pero la gestación no ha sido evaluada. La determinación de los niveles de P_4 ha sido realizada en plasma [2, 12, 16], y en leche [3b, 4, 8, 9], generalmente entera cuyo contenido de grasa, muy marcado en la leche de búfala [18], distorsiona la determinación, por lo que se prefirió la utilización de leche descremada, también se ha realizado a todo lo largo de la gestación [6, 7, 12] y a distintos intervalos de la misma, primer tercio [2, 9] y mitad de la gestación [10].

La determinación de niveles de P_4 también es una herramienta útil para caracterizar el comportamiento reproductivo de las búfalas e inclusive para el diagnóstico precoz de la gestación [3, 11]. Los niveles de P_4 durante la gestación al igual que la mayoría de los parámetros reproductivos son afectados por una serie de factores ambientales y propios del individuo [15]. En consecuencia, para el presente estudio se tomó en cuenta el grado de asociación entre los niveles de P_4 , la producción de leche y el sexo de la cría en condiciones ambientales de bosque muy seco tropical [14].

Como una contribución al conocimiento de los niveles y variaciones de la progesterona durante los dos primeros tercios de la gestación se programó el presente estudio cuyos objetivos fueron los siguientes:

- Determinar los niveles de progesterona durante los dos primeros tercios de la gestación de búfalas bajo condiciones de trópico muy seco.
- Determinar el efecto de la producción de leche y el sexo de la cría sobre los niveles de progesterona durante los

dos primeros tercios de la gestación de búfalas bajo condiciones de trópico muy seco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio

La presente investigación se realizó en la hacienda Casa Blanca, localizada en los márgenes del río Limón del sector El Colorado, cercana a la población de Carrasquero, municipio Mara del estado Zulia, Venezuela, cuyas coordenadas son: 10° 30' latitud norte y 72° 03' longitud oeste. La región corresponde al área ecológica bosque muy seco tropical [14]. La temperatura media promedio anual es de 29°C y la precipitación 402 mm.

Unidades experimentales

Se utilizaron 12 búfalas adultas de predominio racial similar, mestizas Murrah, Nilli Ravi y Mediterráneo, con tres o más partos escogidas al azar de un rebaño de 110 hembras las cuales se incorporaron al ensayo en etapa de servicio cuando comenzó su muestreo cubriendo de esta manera los primeros días de la gestación.

Manejo de los animales

Las búfalas se incorporaron al ensayo mostrando celo y en compañía de los machos, y permanecieron en el estudio hasta que fueron secadas, situación que coincide con el sexto y con el séptimo mes de gestación en estas búfalas debido a que el intervalo parto-concepción es muy corto [1] y la curva de la lactación es muy buena. Las búfalas fueron ordeñadas una vez al día, el horario oscilaba entre las 5:00 a.m. y las 8:00 a.m. aproximadamente, luego salían a pastorear en potreros regados por inundación de pasto alemán (*Echinochloa polystachya*) sin suplementación hasta aproximadamente las 5:00 p.m.

Toma de muestras

Se tomaron muestras semanales de leche obtenidas previo apoyo por becerro del cuarto anterior derecho durante el único ordeño del día, en un tubo de ensayo contentivo de una pastilla de ázida sódica como preservador, las cuales fueron debidamente rotuladas y transportadas en refrigeración hasta los laboratorios de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia, donde fueron descremadas mediante centrifugación a 8.000 r.p.m. durante 20 minutos luego almacenadas en congelación hasta su posterior procesamiento, para determinar los niveles de progesterona, a través de la técnica de Radio Inmuno Análisis (RIA) [17], cuyos resultados ayudaron a monitorear el comportamiento de la progesterona durante los dos primeros tercios en la gestación.

VARIABLES ESTUDIADAS

- **Niveles de P₄ (NP₄).** La variable dependiente fue: niveles de progesterona durante la gestación, la cual mide los ng/ml de progesterona en cada uno de los muestreos.

Las variables independientes fueron:

- **Producción de leche (PL).** Se registró la producción de leche acumulada a los 120 días.
- **Sexo de la cría (SC).** Se registró el sexo de la cría producto de la gestación que se está estudiando.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó un análisis de varianza, analizado por el método de los mínimos cuadrados. La variable dependiente fue los niveles de P₄ durante los dos primeros tercios de la gestación (NP₄), las variables independientes fueron sexo de la cría (SC) y producción de la leche (PL). Los datos obtenidos se analizaron a través del modelo lineal generalizado (GLM) del sistema de análisis estadístico SAS [20]. El modelo estadístico utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ij\epsilon} = \mu + P_i + S_j + \epsilon_{ij}$$

donde:

- Y_{ijε}: Es la variable dependiente (NP₄).
- μ: Es la media general de la población.
- P_i: Es el efecto del i - ésima producción de leche.
- S_j: Es el efecto del j - ésimo sexo de la cría.
- ε_{ij}: Es el efecto asociado del error experimental.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Niveles de progesterona (P₄) durante los dos primeros tercios de la gestación (NP₄)

En un total de 294 observaciones en 12 búfalas mestizas Murrah, NilliRavi y Mediterráneo de 3 y más partos se determinó los niveles de progesterona durante los primeros dos tercios de la gestación detectándose una media de 3,41 ng/ml con una desviación estándar de 1,26.

Los resultados demuestran que los niveles de P₄ (NP₄) son menores a los reportados por Gupta y col. [8], para el primer tercio de la gestación (27,37 ± 3,47 ng/ml), por Pahwa y col [16], para la gestación temprana (17,16 ± 0,51) y por Batra y col. [4], para los primeros estadios de la gestación (24,8 ng/ml); esta diferencia tan marcada se explica por el uso de leche entera por parte de estos autores, los altos niveles de grasa presente en la leche de búfalo es aprovechada por la liposolubilidad del esteroide para aparecer en mayor cantidad, inclusive, esto justifica la diferencia de concentración a favor de los búfalos en

relación con los niveles de P₄ en el ganado vacuno, según Batra y col. [4].

En el presente estudio se utilizó leche descremada lo que permitió la obtención de valores más próximos a los reportados por los autores, cuyas determinaciones fueron realizadas en plasma. Eissa y col. [6] detectaron 3,5 ± 0,6 ng/ml como promedio para el período comprendido entre el segundo y el cuarto mes de gestación en plasma y reportaron que los valores se mantienen próximos a esta media inclusive hasta el último tercio de la gestación, cuando comienza a decrecer significativamente.

Kamopatana y col. [10] detectaron durante la mitad de la gestación un promedio de 3,28 ng/ml en plasma. El Sohby y col. [7] durante la gestación completa detectaron niveles de 3,79 ± 0,13 en plasma.

Dichos valores coinciden en alto grado, con los resultados obtenidos en la presente investigación, aun cuando la misma fue realizada en leche descremada, la correlación con leche entera de los niveles de P₄ ha sido estudiada por Kamboj y col. [7], quienes obtuvieron alta correlación en los momentos en que la actividad del cuerpo lúteo es variable como durante el ciclo estrual pero muy baja cuando la actividad del cuerpo lúteo se mantiene estable como en el caso de la preñez. La correlación entre la leche descremada y el plasma durante la preñez no ha sido reseñada en la literatura, pero los presentes resultados muestran una analogía digna de ser evaluada.

En la TABLA I se muestran las medias de los resultados obtenidos agrupados en quincenas como períodos de muestreo. Se reseñan niveles de P₄ que coinciden con lo expresado por varios autores [4, 6, 7, 10]; en lo se refiere a niveles bajos durante un primer período (primeros 15 días) que van progresivamente aumentando hasta alcanzar una meseta que aunque con variaciones, estas no son significativas durante los primeros 6 meses de la gestación. Esto se explica en el hecho de que en el primer período (primeros 15 días) se incluyen las determinaciones realizadas durante la primera fase del ciclo estrual donde los niveles de P₄ son bajos y van progresivamente ascendiendo hasta alcanzar un punto en el cual se mantienen si se confirma la gestación, caso contrario, comienzan a decrecer según lo expresado por Arora y col. [3].

En la FIG. 1 se grafica el comportamiento de los niveles de P₄ durante los primeros 6 meses de la gestación de las 12 búfalas estudiadas. La distribución de la curva coincide con lo expresado por Kamopatana y col. [10] quienes estudiaron la primera mitad de la gestación y reportaron que las búfalas preñadas alcanzaron rápidamente niveles superiores a los 2 ng/ml.

Partiendo de niveles basales para la primera agrupación de datos, a partir de la segunda quincena pasa a valores por encima de 4 ng/ml donde se mantienen hasta los dos primeros meses donde con excepción del valor de la sexta semana se mantiene la tendencia a un descenso leve pero sostenido has-

ta llegar en la décima tercera semana a una media de $2,71 \pm 0,73$ ng/ml.

Esta tendencia en el comportamiento de la curva coincide con lo expresado por Kamopatana y col. [10] para la primera mitad de la gestación y con la uniformidad entorno al valor medio de 3,5 ng/ml mostrada por la curva para la gestación completa determinada por Eissa y col [6].

Los grados de fluctuación presentes a lo largo de la curva son debidos principalmente a las variaciones presentes en

TABLA I
NIVELES GENERALES DE PROGESTERONA (ng/ml)
EN BÚFALAS DURANTE LOS DOS PRIMEROS TERCIOS
DE LA GESTACIÓN

Quincenas de Gestación	Número de Observaciones	Nivel de P4 (ng/ml) X ± DS
1	24	1,65 ± 1,53
2	24	4,24 ± 1,34
3	24	4,29 ± 1,46
4	24	3,97 ± 1,30
5	23	3,82 ± 1,26
6	24	4,14 ± 1,26
7	24	3,44 ± 1,14
8	24	3,43 ± 1,71
9	22	3,53 ± 1,55
10	22	3,13 ± 1,29
11	20	3,07 ± 1,10
12	18	2,97 ± 0,76
13	18	2,71 ± 0,73

los animales ya que en esta investigación se utilizaron búfalas de tres y más partos con diferentes mestizajes, sumado a factores ambientales donde la época, la temperatura, la alimentación y el manejo son determinantes para la respuesta de los animales [15].

Asociación entre los niveles de P4 (NP4) y la producción láctea (PL)

En la TABLA II se expresa el efecto de los promedios de producción láctea sobre los niveles de P₄ durante el estudio, donde se determinó que la cantidad de leche producida diariamente afectó significativamente los niveles de P₄ (P < 0,001). Se agruparon los animales para tres niveles de producción diaria, donde para los dos primeros niveles no existió diferencia significativa, no así para el tercer nivel que fue significativamente diferente (P < 0,05). Esto se explica en el fundamento de que las más altas producciones se ubican en los primeros estadios de la gestación y las búfalas de mayor producción acumulan en este período un alto número de los litros de la

TABLA II
NIVELES PROMEDIO DE PROGESTERONA DURANTE LA GESTACIÓN EN FUNCIÓN A LA PRODUCCIÓN LÁCTEA (PL)

Nº de Búfalas	Producción Lts / Diarios	Medias (*) ng / ml
3	0 - 3,0	3,152 ^A
5	3,1 - 5,3	3,233 ^A
4	5,4 - 7,4	2,715 ^B

(*) Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (P < 0,05).

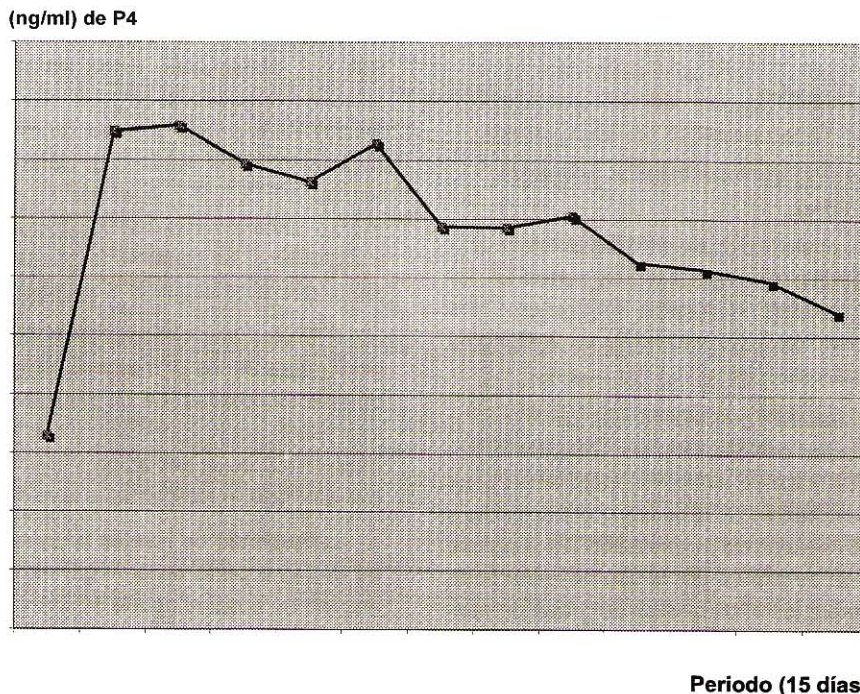


FIGURA 1. NIVELES DE P4 DURANTE LOS DOS PRIMEROS TERCIOS DE LA GESTACIÓN.

TABLA III

NIVELES PROMEDIO DE PROGESTERONA DURANTE LA GESTACIÓN EN FUNCIÓN AL SEXO DE LA CRÍA

Nº de Búfalas	Sexo	Medias (*) ng / ml
5	Machos	3,32 ^A
7	Hembras	2,86 ^B

(*) Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

producción total evaluada, mientras que las primeras quince semanas de muestreo promedian los valores más bajos de P_4 se puede inferir el porque los animales que más produjeron muestran niveles de P_4 menores.

Una segunda explicación se fundamenta también en los altos niveles de producción que generan una dilución en la relación soluto solvente de la solución de leche- P_4 , esta aseveración coincide con lo expresado por Suri y col. [19], quienes reportaron que el contenido de P_4 en la leche obtenida en el ordeño de la mañana era significativamente ($P < 0,05$) menor que la obtenida en el ordeño de la tarde (leche más concentrada).

Asociación entre los niveles de P_4 y el sexo de la cría

Un parámetro que siempre se ha intentado relacionar con los niveles hormonales de las hembras gestantes es el sexo de la cría, por lo que se tomó en cuenta el sexo del becerro sobre los niveles de progesterona durante el período de estudio obteniendo como resultado que es altamente significativo en el modelo aplicado ($P < 0,0281$).

Al evaluar la TABLA III se observa que las búfalas cuyas crías fueron machos mantuvieron durante la gestación promedios superiores a aquellos cuyas crías fueron hembras.

Factores hormonales endógenos propios de la interacción madre feto son los responsables de este efecto según lo expuesto por Lammoglia y col. [12] quienes determinaron en vacas Brahman que efectivamente existe un efecto significativo ($P < 0,01$) del sexo de la cría sobre los niveles de progesterona. Existen autores como Batra y col. [4] que refieren que no hay un efecto significativo sobre los niveles de P_4 por parte del sexo de la cría, inclusive no se observó efecto significativo del peso de la cría ni del número de partos de la madre sobre los niveles de P_4 variables estas que no fueron consideradas en el presente estudio.

CONCLUSIONES

El valor promedio de progesterona durante los primeros dos tercios de la gestación (NP_4) en leche descremada fue determinado en 3,41 ng/ml con una desviación estándar de 1,26, el número y secuencia de las observaciones permitieron establecer el perfil de la progesterona durante este período para búfalas mestizas de tres y más partos, en el medio bajo estudio.

Los niveles de progesterona durante los primeros dos tercios de la gestación (NP_4) en leche descremada se ven significativamente afectados por la producción láctea (PL) ($P < 0,001$).

Los niveles de progesterona durante los dos primeros tercios de la gestación (NP_4) en leche descremada se ven significativamente afectados por el sexo de la cría (SC) ($P < 0,0281$).

RECOMENDACIONES

Con la finalidad de establecer los parámetros fisiológicos básicos de la especie bubalina en el estado Zulia, para ser utilizados como herramienta en el mejor aprovechamiento de las bondades productivas de esta especie, que la convierte en una alternativa viable para la producción agropecuaria en nuestro país, se recomienda realizar estudios hasta completar un banco de datos propios del búfalo adaptado al medio ecológico venezolano.

Se recomienda también realizar una investigación que determine la correlación entre los niveles de progesterona en plasma y en leche descremada.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su agradecimiento a los propietarios de la Finca Casa Blanca y la Agencia Internacional de Energía Atómica por el apoyo prestado para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANGULO-CUBILLÁN, F.; MONTIEL-URDANETA, N.; ROJAS, N.; HERNÁNDEZ, A.; CAHUAO, N.; TORRES, I. Comportamiento Reproductivo pos parto en búfalas (*Bubalus bubalis*). *Revista Científica*. Facultad de Ciencias Veterinarias LUZ. Vol. IX (2): 116-123. 1999.
- [2] ARORA, R.C.; BACHALAU, N.K.; PRASAD, A. Plasma Progesterone levels in buffalo heifers during first trimester of pregnancy. *Indian Journal of Experimental Biology*. 17 (8): 832-833. 1979.
- [3] ARORA, R.C.; BATRA, S.K.; PAHWA, G.S.; JAIN, G.C.; PANDEY R.S. Milk progesterone levels to monitor Reproductive Status of Murrah Buffalo. *Theriogenology*. 13 (4): 249-255. 1980.
- [4] BATRA, S.K.; ARORA, R.C.; BACHALAU, N.K.; PANDEY, R.S. Blood and milk progesterone in pregnant and non pregnant buffalo. *Journal of Dairy Science*. 62: 1390-1393. 1979.
- [5] CARRERO, P.J.C. Búfalo de agua "El Oro Negro" de las zonas marginales venezolanas. *II Jornadas de Investi-*

gación en la Reproducción Animal. Maracaibo, Venezuela. 29-30. Noviembre: 1-27 1991.

- [6] EISSA, H.M.; BELELY, M.S.; GHONEIM, I.M.; EZZO, O.H. Plasma Progesterone, Oestradiol-17 beta, Oestrone Sulphate, Corticosteroides and metabolite of PGF2 alfa: evolution throughout pregnancy, before, during and after parturition in buffalo cows. **Vet. Res.** 26 (4): 310-318. 1995.
- [7] EL SOHBY, H.E.; KAHIL, F.A.; ABDENAAL, A.E. Progesterone profile in the Egyptian buffalo during ovulatory cycles and pregnancy using radioimmunoassay technique. **Animal Production.** 1: 12-21. 1987.
- [8] GUPTA, M.; PARAKASH, B.S. Milk progesterone determination in Buffaloes post insemination. **British Veterinary Journal.** 146 (6): 563-570. 1990.
- [9] KAMBOJ, M.; PRAKASH, B.S. Relationship of progesterone in plasma and whole milk of buffalos during cyclicity and early pregnancy. **Trop. Anim. Health.** Prod. 25 (3): 185-192. 1993.
- [10] KAMOPATANA, M.; PARNPAY, R.; NGRAMSURIYANOJ, C. Plasma progesterone, oestrone and oestrone sulphate levels during the first half of gestation in swamp buffaloes. **British Veterinary Journal.** 139 (3): 256-261. 1983.
- [11] LAMMING, G.E.; DARWASH A.O. The use of milk progesterone profiles to characterise components of subfertility in milked dairy cows. **Anim. Reprod. Sci.** 52 (3): 175-190. 1998.
- [12] LAMMOGLIA, M.A.; WILLARD, S.T.; OLDMAN, J.R.; RANDEL, R.D.; Effects of Dietary fat and season on steroid hormonal profiles before parturition and hormonal, cholesterol, triglycerides, follicular patterns, and post partum reproduction in Brahman cows. **Journal of Animal Science.** 74 (9): 2253-2262. 1996.
- [13] MC COOL, C. Buffalo and Bali cattle exploitation their reproductive behaviour and physiology. **Trop. Anim. Health. Prod.** 24: 165-172. 1992.
- [14] MINISTERIO DE AGRICULTURA Y CRIA (M.A.C.). **Zonas de Vida de Venezuela.** 2^{da} edición. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Caracas: 271. 1976.
- [15] NASIR, H.S.; WILLSENSE, A.H.; VAN DE WIEL, D.F.M.; ENGEL, B. Influence of season and Parity on several reproductive parameters in NILI-RAVI Buffaloes in Pakistan. **Animal. Rep. Sci.** 21: 177-190. 1989.
- [16] PAHWA, G.S.; PANDEY, R.S. Gonadal steroid hormone level in blood plasma and milk of primiparous and multiparous nonpregnant and pregnant buffaloes. **Theirogenology.** 19 (4): 491-505. 1983.
- [17] PLAIZIER, J.C.B. Validation of the FAO/IAEA RIA kit for the measurement of progesterone in skin milk and blood plasma. In: **Improving the productivity of indigeous african livestock.** IAEA-TEC DOC-708. Apendix 1: 151-156. 1993.
- [18] RÍOS, R.G.; REGETTI, J. Taller "Potencialidad del búfalo en Venezuela". **V Congreso Venezolano de Zootecnia.** San Cristóbal. 1-3 Marzo: 37-45. 1990.
- [19] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **Users Guide.** 6th Ed. SAS Institute Inc. Cary. University of North Carolina USA. Ver. 6.04. 584 pp. 1986.
- [20] SURI, A.K.; BATRA, S.K.; PAHWA, G.S.; PANDEY, R.S. Diurnal variation of progesterone in the milk of pregnant buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Journal of Dairy Reasearch.** 48 (3): 503-507. 1981.