

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL  
CUSCO**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE ZOOTECNIA**



**DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE HORMONAS ESTRADIOL Y  
PROGESTERONA POR EL MÉTODO DE ELISA EN VACAS EN EDAD  
REPRODUCTIVA, EN EL DISTRITO DE ANCAHUASI, PROVINCIA DE ANTA.**

**Tesis presentada por el BACHILLER en  
Ciencias Agrarias:**

JANDI AMÍLCAR PÉREZ DUEÑAS

**Para optar al título profesional de:**

INGENIERO ZOOTECNISTA

**ASESOR:**

M.V.Z. EDGAR ALBERTO VALDEZ  
GUTIÉRREZ.

**PATROCINADOR:** Proyecto de Evaluación de la Eficiencia Reproductiva en  
Vacas en la Pampa de Anta.

**CUSCO – 2020**

## **DEDICATORIA**

- El presente trabajo de investigación, dedico principalmente a Dios, por ser el inspirador y darme fuerzas para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados.
- A mis padres: Rosa y Arístides, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy.
- A mis hermanos: Joel y Cesar, por estar siempre presentes, acompañándome y por haberme brindado el apoyo moral a lo largo de esta etapa.
- A todas las personas que me han apoyado y han hecho que el presente trabajo de investigación se realice con éxito, en especial a aquellos que me abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos de manera desinteresada conmigo.

## AGRADECIMIENTOS

- Mi especial agradecimiento a mis estimados docentes de la Escuela profesional de Zootecnia de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de mi formación profesional, quienes me han guiado con su paciencia y rectitud como docente.
- Quiero expresar mi más grande y sincero agradecimiento a mi asesor de tesis: M.V.Z. Edgar Alberto Gutiérrez, quien, con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración, que permitió el desarrollo de este trabajo de investigación.
- Un especial reconocimiento al M.V.Z. Ignacio Atilio Pacheco Pacheco, por ser un docente ejemplo a seguir, quien con mucho esmero y dedicación me guio en la etapa de ejecución del presente trabajo de investigación.
- Mi reconocimiento al Proyecto: Evaluación de la Eficiencia Reproductiva en Vacas en la Pampa de Anta, por ser el patrocinador del presente trabajo de investigación.
- A mis amigos: Edward, Flor de María y Manuel, que me apoyaron de manera desinteresada en el logro de mis metas, gracias infinitas, por haber compartido conmigo la etapa universitaria.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA .....	I
AGRADECIMIENTOS .....	II
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	III
ÍNDICE DE TABLAS .....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VI
ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	VI
ÍNDICE DE ANEXOS .....	VII
GLOSARIO .....	IX
RESUMEN .....	XI
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPITULO I .....	4
PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACIÓN .....	4
CAPITULO II .....	5
OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN .....	5
2.1. OBJETIVOS .....	5
2.1.1. Objetivo general .....	5
2.1.2. Objetivos específicos .....	5
2.2. JUSTIFICACIÓN .....	6
CAPITULO III .....	7
MARCO TEÓRICO .....	7
3.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN .....	7
3.2. BASES TEÓRICAS .....	12
3.2.1. Sistema endocrino .....	12
3.2.1.1. Hormona .....	13
3.2.1.2. Glándulas endocrinas .....	13
3.2.1.2.1. Hipotálamo .....	13
3.2.1.2.2. Hipófisis .....	13
3.2.1.2.3. Ovario .....	14
3.2.1.2.4. Útero .....	15
3.2.1.3. Control Hormonal del Ciclo estral en Bovinos .....	15
3.2.1.4. Endocrinología y fisiología de la gestación .....	16
3.2.1.4.1. Reconocimiento materno de la gestación .....	17

3.2.1.4.2. Control endócrino de la gestación.....	17
3.2.1.5. Progesterona.....	18
3.2.1.5.1. Biosíntesis neural de la Progesterona.....	19
3.2.1.5.2. Mecanismo de Acción de la Progesterona .....	20
3.2.1.6. Estradiol .....	20
3.2.2. Técnicas de determinación Hormonal .....	21
3.2.2.1. Prueba ELISA .....	21
3.2.2.1.1. ELISA competitivo .....	22
3.2.3. Antígeno .....	23
3.2.4. Anticuerpo .....	23
3.2.5. Reacción antígeno – anticuerpo. ....	24
CAPITULO IV.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
4.1. ÁMBITO DE ESTUDIO .....	25
4.1.1. Ubicación política.....	25
4.1.2. Ubicación geográfica. ....	25
4.1.3. Clima. ....	26
4.2. MATERIALES DE ESTUDIO. ....	27
4.2.1. Población y muestra. ....	27
4.2.1.1. Tamaño de muestra. ....	27
4.2.2. Materiales, equipos, instrumentos y reactivos.....	28
4.2.2.1. Materiales .....	28
4.2.2.2. Equipos e Instrumentos .....	29
4.2.2.3. Reactivos para el análisis de Estradiol en el laboratorio. ....	30
4.2.2.4. Reactivos para el análisis de Progesterona en el laboratorio.....	30
4.3.    METODOLOGÍA .....	31
4.3.1. Toma de muestras de Sangre.....	31
4.3.2. Obtención del suero en Laboratorio. ....	31
4.3.3. Metodología de Laboratorio .....	33
4.3.3.1. Metodología de ELISA Competitivo para determinar niveles de Estradiol.	33
.....	33
4.3.3.1.1. Uso del Kit de ELISA para detección de Estradiol. ....	33
4.3.3.1.2. Principios de la prueba. ....	33
4.3.3.1.3. Preparación de muestras y Reactivos.....	34
4.3.3.1.4. Procedimiento de la prueba. ....	35
4.3.3.1.5. Cálculo de los resultados. ....	35
4.3.3.2. Metodología de ELISA Competitivo para determinar niveles de	36
progesterona. ....	36
4.3.3.2.1. Uso del Kit de ELISA para detección de progesterona. ....	36

4.3.3.2.2. Principios de prueba .....	36
4.3.3.2.3. Preparación de reactivos .....	37
4.3.3.2.4. Procedimiento de la prueba. ....	38
4.3.3.2.5. Cálculo de los resultados .....	38
CAPITULO V.....	42
RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	42
5.1. NIVELES HORMONALES DE ESTRADIOL EN VACUNOS EN EDAD REPRODUCTIVA, POR RAZAS Y EDADES.....	42
5.1.1. Determinación cuantitativa de los niveles de Estradiol en vacunos de en edad reproductiva del distrito de Ancahuasi. ....	42
5.2. NIVELES HORMONALES DE PROGESTERONA EN VACAS GESTANTES, POR RAZAS Y EDADES.....	48
5.2.1. Determinación cuantitativa de los niveles de progesterona en vacas gestantes del distrito de Ancahuasi. ....	48
CAPITULO VI.....	53
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	53
6.1. CONCLUSIONES .....	53
6.2. RECOMENDACIONES .....	54
BIBLIOGRAFÍA.....	55
ANEXOS .....	61

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 01.</b> Concentraciones plasmáticas de P4 en las vacas gestantes.....	18
<b>Tabla 02.</b> Distribución del tamaño de muestra para el distrito de Ancahuasi.....	28
<b>Tabla 03.</b> Distribución de la placa de ELISA para determinar los niveles de Estradiol en vacas del distrito de Ancahuasi.....	34
<b>Tabla 04.</b> Distribución de la placa de ELISA para determinar los niveles de Progesterona en vacas del distrito de Ancahuasi.....	37
<b>Tabla 05.</b> Niveles de estradiol (pg/ml) en vacas en edad reproductiva del distrito de Ancahuasi, por razas y edades.....	42
<b>Tabla 06.</b> Niveles de estradiol (pg/ml) en vacas en edad reproductiva del distrito de Ancahuasi, por razas.....	43
<b>Tabla 07.</b> Niveles de estradiol (pg/ml) en vacas en edad reproductiva del distrito de Ancahuasi, por Edades.....	44
<b>Tabla 08.</b> Niveles de progesterona (ng/ml) en vacas en edad reproductiva del distrito de Ancahuasi, por razas y edades .....	48
<b>Tabla 09.</b> Niveles de Progesterona (ng/ml) en vacas gestantes del distrito de Ancahuasi, por razas.....	49
<b>Tabla 10.</b> Niveles de Progesterona (ng/ml) en vacas gestantes del distrito de Ancahuasi, por Edades.....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 01.</b> Pasos de ELISA Competitivo .....	23
<b>Figura 02.</b> Mapa de ubicación distrital de Ancahuasi.....	26

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 01.</b> Flujograma de trabajo de la investigación.....	32
<b>Gráfico 02.</b> Niveles de estradiol en vacas en edad reproductiva, por razas .....	44
<b>Gráfico 03.</b> Niveles de estradiol en vacas, en edad reproductiva, por edades ....	45
<b>Gráfico 04.</b> Niveles de progesterona en vacas gestantes, por razas.....	50
<b>Gráfico 05.</b> Niveles de progesterona en vacas gestantes, por edades.....	51

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

<b>Fotografía 01.</b> Adición de muestras a los pocillos de la placa.....	39
<b>Fotografía 02.</b> Adición de los estándares a los pocillos de la placa.....	39
<b>Fotografía 03.</b> Adición de conjugado a los pocillos de la placa.....	40
<b>Fotografía 04.</b> Incubación de la placa.....	40
<b>Fotografía 05.</b> Lavado de los pocillos con solución de lavado.....	40
<b>Fotografía 06.</b> Adición de Sustrato a los pocillos de la placa.....	41
<b>Fotografía 07.</b> Adición de Solución Stop a los pocillos.....	41
<b>Fotografía 08.</b> Lectura de las densidades ópticas en un lector de microplacas.....	41
<b>Fotografía 09.</b> Toma de muestras de sangre de vacunos.....	63
<b>Fotografía 10.</b> Kit de Elisa, para detección de Estradiol, a temperatura ambiente, antes de iniciar la prueba de diagnóstico.....	63
<b>Fotografía 11.</b> Materiales utilizados para detección de Estradiol y progesterona, a temperatura ambiente, antes de iniciar la prueba de diagnóstico.....	64
<b>Fotografía 12.</b> Preparación de la solución de lavado para Estradiol y para Progesterona.....	64
<b>Fotografía 13.</b> Homogenización de las muestras de suero sanguíneo, antes de realizar la prueba de ELISA.....	65
<b>Fotografía 14.</b> Coloración de la Placa ELISA para Estradiol.....	65
<b>Fotografía 15.</b> Coloración de la Placa ELISA para progesterona.....	66

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 01.</b> Cálculos para determinar el tamaño de muestra del distrito de Ancahuasi.....	62
<b>Anexo 02.</b> Registro Fotográfico del trabajo de investigación .....	63
<b>Anexo 03.</b> Lectura de las Densidades ópticas para estradiol, distrito de Ancahuasi (placa I).....	66
<b>Anexo 04.</b> Lectura de las Densidades ópticas para estradiol, distrito de Ancahuasi (placa II).....	67



<b>Anexo 05.</b> Lectura de las Densidades ópticas para Progesterona, distrito de Ancahuasi.....	67
<b>Anexo 06.</b> Determinación de los niveles de estradiol fue a través del Software elisaanalysis.....	68
<b>Anexo 07.</b> Determinación de los niveles de progesterona fue a través del Software elisaanalysis.....	72
<b>Anexo 08.</b> Análisis estadístico de los niveles de concentración de estradiol de las vacas en edad reproductiva del distrito de Ancahuasi.....	75
<b>Anexo 09.</b> Comparación de medias de Fisher LSD para los niveles de estradiol en vacas en edad reproductiva, por edades.....	77
<b>Anexo 10.</b> Análisis estadístico de los niveles de concentración de estradiol de las vacas en edad reproductiva del distrito de Ancahuasi.....	77
<b>Anexo 11.</b> Comparación de medias de Fisher LSD para los niveles de progesterona en vacas gestantes, por edades.....	79
<b>Anexo 12.</b> Registro de Vacunos y resultados a la prueba de ELISA para determinar niveles de estradiol en vacas en edad reproductiva del distrito de Ancahuasi.....	80
<b>Anexo 13.</b> Registro de Vacunos y resultados a la prueba de ELISA para determinar niveles de progesterona en vacas gestantes del distrito de Ancahuasi.....	84

## GLOSARIO

- Ac : Anticuerpo
- CIDR : Controlled Internal Drug Release
- CL : Cuerpo Lúteo
- CLIA : Inmunoensayo de quimioluminiscencia
- CN : Ciclo normal
- CS : Ciclo silencioso
- DO : Densidad Óptica
- E2 : Estradiol
- ELISA : Ensayo por inmunoabsorción ligado a la enzima
- FF : Fase folicular
- FFf : Fase folicular final
- FLm : Fase luteal media
- FLtp : Fase luteal temprana
- FLtr : Fase luteal tardío
- FPI : Inmunoensayo de polarización fluorescente
- FSH : Hormona foliculoestimulante
- GnRH : Hormona liberadora de gonadotropina
- HCL : Cloruro de Hidrogeno
- HR : Hormona receptor
- Ig : Inmunoglobulina
- LH : Hormona luteinizante
- Mx : Maximo
- ng : Nanogramo

- nm : Nanómetros
- NP : Nivel de progesterona
- P4 : Progesterona
- pg : Picogramo
- PGF2 $\alpha$  : Prostaglandina
- R2 : Coeficiente de determinación
- RIA : Radioinmunoanálisis
- SD : Desviación Estándar
- SENAMHI : Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología
- TRFI : Inmunoensayo de fluorescencia con resolución temporal
- $\bar{x}$  : Media Aritmetica
- $\mu\text{g}$  : Microgramos

## RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar los niveles de hormonas estradiol y progesterona, por el método ELISA, en vacas en edad reproductiva del distrito de Ancahuasi, provincia de Anta. Se colectaron 150 muestras de sangre de vacunos, de los cuales 90 muestras correspondieron a vacas en edad reproductiva y 60 muestras a vacas gestantes. El diagnóstico se realizó en el laboratorio “Desarrollo y Validación de Pruebas Serológicas y Moleculares para la Investigación y Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas de la Escuela Profesional de Zootecnia, Área de Sanidad Animal-UNSAAC”; mediante el método de ELISA Competitivo, cuyo proceso consiste en captar una determinada cantidad de Estradiol o progesterona de los sueros problema (antígeno), consecuentemente realizar la lectura de las densidades ópticas(DO) para determinar los niveles sanguíneos de dichas hormonas. Los niveles medios de la hormona estradiol en vacas en edad reproductiva de las razas Híbrido, Holstein y Brown Swiss fue de: 61.51, 34.20 y 25.55 pg/ml respectivamente, no habiendo diferencias significativas ( $P>0.05$ ); asimismo, para las vacas en edad reproductiva de las edades de: 2-3, 3-4, 4-5, 5-6 y >6 años fue de 98.63, 21.93, 28.65, 39.25 y 13.64 pg/ml respectivamente, presentando diferencias significativas ( $P\leq 0.05$ ) entre edades, siendo los niveles de estradiol de las vacas de 2 a 3 años de edad superior frente a las otras edades evaluadas. Los niveles medios de la hormona progesterona en vacas gestantes de las razas Híbrido, Holstein y Brown Swiss fue de: 2.29, 2.89 y 2.17 ng/ml respectivamente; asimismo para las vacas gestantes de las edades de 2-3, 3-4, 4-5, 5-6 y >6 años fue de 2.50, 2.21, 2.68, 2.99 y 1.86 ng/ml respectivamente; no habiendo diferencias significativas ( $P>0.05$ ) entre razas y edades.

## INTRODUCCIÓN

La provincia de Anta forma parte de una de las cuencas lecheras más importantes, del departamento del Cusco. Es así que distrito de Ancahuasi posee una población de 4854 cabezas de ganado vacuno, de los cuales los vacunos hembras en edad reproductiva (vaquillonas y vacas), de las razas Holstein, Brown Swiss e Híbridos corresponden a 1480 (***Censo Nacional Agropecuario-INEI, 2012***). La ganadería lechera es una de las actividades económicas principales en dicho distrito, que contribuye en la seguridad alimentaria de los mismos, el cual se ve afectada por problemas reproductivos asociados a alteraciones hormonales.

Los problemas de fertilidad, debido a alteraciones hormonales, se pueden presentar en cualquier etapa del ciclo reproductivo en la hembra. Sin embargo, muchos de estos problemas, tales como el anestro prolongado, el estro persistente o la hiperplasia quística endometrial, son el resultado de un manejo inapropiado de la hembra (**Olson et al., 1982; Concannon, 1993**). La baja fertilidad también puede ser provocada por la lactancia como proceso fisiológico y por los cambios metabólicos que impone la producción de grandes volúmenes de leche y el inadecuado consumo de alimento. Así, las vacas lecheras después del parto caen en un balance energético negativo (SEN), lo cual significa que la suma de la energía necesaria para su propio mantenimiento y la que requieren para producir es mayor que la consumida, por lo que se ven obligadas a utilizar sus reservas corporales. El SEN afecta el control neuroendocrino de la reproducción, llevando a una baja fertilidad (**Butler, 2000**).

Los estrógenos son responsables del desarrollo de los órganos genitales durante la pubertad y de los caracteres sexuales secundarios (**Jewell, 2002**). Los estrógenos estimulan el crecimiento de los ductos mamarios, aumentan el estroma y la formación de grasa (**Tucker, 2000**). Durante el ciclo estral la concentración de estrógenos aumenta con el desarrollo folicular y la aparición del folículo dominante, pero con la ovulación la concentración disminuye a medida que aumenta la progesterona (**Ribeiro, 2009**). Durante la preñez la concentración de estradiol es alta con un aumento significativo en las últimas semanas antes del parto (**Ribeiro, 2009**), también induce los cambios que se presentan en el tracto genital para facilitar el transporte espermático, la fertilización y la futura implantación del embrión (**Fatet, 2011**). El estradiol es un esteroide secretado por la teca interna del folículo ovárico es responsable del comportamiento sexual, características sexuales secundarias y posee un efecto anabólico (**Gutiérrez, 2008**). Por lo tanto, es necesario que las concentraciones de estrógenos y progesterona se encuentren en niveles altos para provocar el desarrollo mamario durante la preñez (**Ribeiro, 2009**),

La progesterona es la hormona de la gestación, siendo su principal función en el aparato genital de la hembra el mantenimiento de las condiciones óptimas para el buen término de la misma. A su vez tiene un rol importante en la lactancia ya que junto con los estrógenos favorece el desarrollo lóbulo-alveolar de la glándula mamaria durante la preñez (**Jewell, 2002**). La progesterona es producida en el cuerpo lúteo del ciclo o de la gestación, aunque en algunas especies, se produce también en la placenta y en las glándulas adrenales. Su acción es mantener la gestación en las hembras preñadas (en la vaca casi durante toda la gestación, pues la placenta bovina secreta escasos niveles de progesterona). En una vaca cíclica,

su acción principal es regular la duración del ciclo gracias a su efecto inhibitor del celo y de la ovulación. La progesterona natural tiene una vida media muy corta, apenas entre 3-4 minutos (**Gutiérrez, 2008**).

La presente investigación tuvo como objetivo determinar los niveles de las hormonas estradiol y progesterona por el método de ELISA en vacas en edad reproductiva, en el distrito de Ancahuasi, provincia de Anta.

## **CAPITULO I**

### **PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACIÓN**

La ganadería lechera en el distrito de Ancahuasi, es una de las fuentes principales de ingresos económicos de los productores, el cual contribuye en la seguridad alimentaria de las mismas. Sin embargo, se ve afectada por problemas reproductivos, que repercuten en la rentabilidad del productor.

En el distrito de Ancahuasi, se tiene reportes de problemas reproductivos como infertilidad, celos silentes, anestro, abortos, mortalidad neonatal, mortalidad embrionaria, los cuales repercuten en la productividad de los hatos lecheros, ya que provoca la reducción en la producción de leche y disminuye la tasa de concepción. Estos problemas probablemente se deban a que existen alteraciones de los niveles sanguíneos del estradiol y la progesterona.

La progesterona juega un rol importante en el mantenimiento de la gestación, por ello es necesario conocer los niveles sanguíneos de esta hormona en vacas gestantes, para evitar pérdidas económicas, debido a muertes embrionarias y abortos. Las concentraciones de estradiol poseen una relación directa con el desarrollo folicular y la aparición del folículo dominante, por tal razón indican un buen funcionamiento del ovario en la formación de un ovulo. Los desbalances de estas hormonas causan perdidas en cuanto al intervalo entre partos, numero de crías obtenidas al año, debido a la ausencia de celo o a las pérdidas de crías por un déficit en la producción de dichas hormonas.



## **CAPITULO II**

### **OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN**

#### **2.1. OBJETIVOS**

##### **2.1.1. Objetivo general**

Determinar los niveles de hormonas estradiol y progesterona por el método de ELISA en vacas en edad reproductiva, en el distrito de Ancahuasi, provincia de Anta.

##### **2.1.2. Objetivos específicos**

- Determinar los niveles hormonales de estradiol en vacunos en edad reproductiva, por razas y por edades.
- Determinar los niveles hormonales de progesterona en vacas gestantes, por razas y edades.

## **2.2. JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad, uno de los mayores problemas que afecta la rentabilidad de los hatos lecheros, son los bajos índices reproductivos, relacionados a la alteración de niveles hormonales de estradiol y progesterona. En la cuenca lechera de Anta, particularmente en el distrito de Ancahuasi, no se han realizado estudios para determinar los niveles sanguíneos de hormonas como el estradiol y la progesterona, en vacas en etapa reproductiva.

En el presente trabajo de investigación se determinó los niveles sanguíneos de las hormonas estradiol y progesterona, por el método de ELISA competitivo en vacas en edad reproductiva, aparentemente sanas, cuyos resultados sirvieron para conocer el estado fisiológico en el que se encuentran y su relación con los problemas reproductivos existentes. Asimismo, nos permitió conocer los valores medios de dichas hormonas en la sangre en vacunos, de acuerdo a las razas y las edades en la zona de estudio. Nuestros resultados permitieron que los productores tomen conciencia de los principales factores que desencadenan los desbalances hormonales (tipo de alimentación, estado fisiológico, estado sanitario). De esta manera contribuimos en la toma de decisiones de los productores y profesionales competentes del distrito de Ancahuasi, provincia de Anta.

## CAPITULO III

### MARCO TEÓRICO

#### 3.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

En el estudio realizado por **(Báez, 2010)**, el objetivo fue realizar una descripción básica acerca de los fenómenos hormonales y foliculares durante el posparto en un grupo de vacas de la raza Sanmartinero, identificando posibles factores determinantes de la expresión de buena eficiencia reproductiva en individuos de esta raza. Se siguieron 18 vacas desde el día 7 posparto, tomando muestras de sangre tres veces por semana para determinar los niveles de progesterona y estradiol durante la reanudación de la actividad estral, haciendo seguimiento de los primeros ciclos estrales y la preñez temprana. Adicionalmente, se evaluó la condición corporal. Se evidenciaron ciclos de corta duración que preceden al establecimiento de la ciclicidad normal. Igualmente, se describieron los niveles de progesterona durante los primeros ciclos estrales y se establecieron algunas relaciones progesterona estradiol en el periodo periovulatorio. Los perfiles de estradiol permitieron confirmar la existencia de ondas de desarrollo folicular desde el inicio del periodo posparto, y el incremento de los niveles de estradiol hasta la primera ovulación. En conclusión, el restablecimiento de la ciclicidad estral luego del parto se presentó antes del día 80 en el 61% de los animales del estudio (11/18), y para el día 100 posparto, el 88.8% (16/18) de las vacas ya habían estabilizado sus ciclos. El promedio de duración del ciclo estral fue de  $20.95 \pm 1.99$  días, el nivel máximo de progesterona fue en promedio de 10.23 ng/ml, hacia el día 15 del ciclo estral. Los niveles de progesterona presentaron niveles basales sostenidos durante

la fase folicular. Durante la fase luteal, Se observó un patrón consistente de incremento de los niveles de progesterona hasta el día 12 del ciclo, un posterior descenso leve (aparente luteólisis funcional), seguido de un descenso fuerte (luteólisis estructural). La primera ovulación post parto ocurrió a los  $63.82 \pm 25.02$  días. En la mayoría de vacas de este estudio (16/17), se evidencio un ciclo de corta duración posterior a esta ovulación, con una duración de  $6.69 \pm 1.54$  días. Posterior a la presentación de este primer ciclo corto, los animales estabilizaron su ciclicidad estral. Los niveles de secreción de estradiol mostraron un incremento a lo largo del posparto, desde  $26.43 \pm 5.6$  pg/ml en la segunda semana después del parto, hasta  $43.76 \pm 6.5$  pg/ml en el momento de la primera ovulación ( $R^2=0.436$ ); posterior a esta, los niveles promedio de estradiol tendieron a estabilizarse.

En este estudio realizado (**Mateos *et al.*, 2002**), se evaluó la relación entre el tamaño folicular, las concentraciones de progesterona y estradiol en los días 12, 13 o 14 posinseminación, con el porcentaje de concepción (PC) de vacas Holstein. Los tratamientos hormonales que ocasionan la luteinización de los folículos en los días 12 a 14 posinseminación provocan un retraso de la luteólisis y se asocian con un aumento en el porcentaje de concepción. Se utilizaron 335 vacas de  $2,8 \pm 0,1$  partos y  $2,7 \pm 0,09$  servicios. En los días 12, 13 o 14 posinseminación, se realizaron estudios ultrasonográficos de los ovarios, midiéndose y registrándose el diámetro del folículo mayor. Asimismo, se obtuvieron muestras sanguíneas, en las cuales se determinaron las concentraciones de progesterona y estradiol por RIA. A través de un análisis de varianza, se evaluó la diferencia entre el diámetro folicular, concentraciones de progesterona y estradiol, entre vacas que resultaron gestantes y no gestantes. El PC fue similar ( $p > 0,05$ ) entre las vacas con diferente diámetro

folicular, sin embargo, al reagrupar a las vacas con folículos <15 y >15 mm las vacas con folículos <15 mm tuvieron un PC (49,7 p.100; 105/211) mayor que las vacas con folículos >5 mm (37,1 p.100; 46/ 124). Además, las vacas gestantes tuvieron un diámetro folicular menor ( $12,8 \pm 0,41$  mm) que las vacas no gestantes ( $14,1 \pm 0,38$  mm) ( $p < 0,05$ ). Las concentraciones de progesterona ( $5,9 \pm 0,23$  ng/ml) y estradiol ( $3,2 \pm 0,35$  pg/ml) fueron similares entre las vacas gestantes y las no gestantes ( $5,8 \pm 0,21$  ng/ml y  $3,3 \pm 0,32$  pg/ml, respectivamente) ( $p > 0,05$ ). En este estudio se observó una asociación entre el diámetro del folículo mayor en los días 12-14 posinseminación y el establecimiento de la gestación, ya que las vacas que gestaron tuvieron folículos de menor diámetro que las vacas que no gestaron.

En el trabajo de investigación realizado por (**Grajales et al., 2009**), determino la secuencia de cambios en los niveles de progesterona (NP) durante el Ciclo Normal (CN) y Ciclo Silencioso (CS). Se evaluó 94 Hembras de los grupos raciales Holstein x Cebú (HC), Simmental x Cebú (SC), Romosinuano (R) y Cebú (C), desde la pubertad y durante los tres primeros ciclos estrales. Se tomaron muestras de sangre para determinar las concentraciones de progesterona mediante Radioinmunoanálisis, se determinaron 184 perfiles de progesterona para CN y 153 para CS. Para el análisis de la información se utilizó el programa estadístico SAS. El grupo R presenta un patrón de variaciones de los NP a través de las fases del CN que tiene diferencias significativas con el comportamiento de los NP en las fases del CN de los grupos SC, HC y C. Los niveles de progesterona en cada fase del CS coinciden con una fase luteal con bajos niveles de progesterona. Solo se encontraron diferencias significativas en la fase luteal tardía al comparar el CN con el CS, sin embargo se presentan diferencias numéricas en todas las fases entre

estos dos tipos de ciclos. Las concentraciones de progesterona tienen un marcado efecto sobre la presentación del CS, no obstante, es difícil definir una concentración de progesterona que caracterice cada evento (CN o CS), sin embargo, es evidente que la progesterona influye sobre las probabilidades para que se dé una respuesta reproductiva favorable o desfavorable. Al hacer el análisis del comportamiento de los niveles de progesterona (NP) comparando entre los tipos de ciclos clasificados no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en las fases foliculares (FF), fase luteal temprana (FLtp) y fase luteal media (FLm) entre el ciclo normal (CN) con el ciclo silencioso (CS), en los que se observa que la actividad luteal inicia en un NP entre 0.243 y 0.266 ng/ml en la FF (día 0) y se ubicó en valores entre 4.914 y 5.227 ng/ml en la FLm, a partir de la cual se empezaron a notar cambios en el comportamiento de la actividad luteal con diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre estos mismos tipos de ciclos, en la FLtr y FFf (día 20), encontrando en los CS un cuerpo lúteo con baja actividad luteal (3.922 y 0.233 ng/ml) y en regresión, la que se produce de una manera más rápida y brusca que en los CN (6.006 y 0.516 ng/ml). El NP acumulado durante las fases del ciclo, representado por la suma de los valores de cada una de las fases evaluadas, puede llegar a ser un buen indicador de la variación de la actividad luteal, permitiendo hacer una clasificación exitosa del tipo de ciclicidad que se está presentando.

En el estudio realizado por **(Moreno et al., 2016)**, se determinaron las concentraciones séricas de progesterona en la inseminación y su efecto en la tasa de gestación en vacas lecheras. Adicionalmente, se evaluaron los efectos del número de partos, número de servicios, tipo de puerperio, raza del toro, técnico

inseminador y hato. Se obtuvieron muestras sanguíneas de 560 vacas de 25 hatos al momento de la inseminación y se determinaron las concentraciones de progesterona. El diagnóstico de gestación se realizó mediante palpación transrectal entre 40 y 50 días posinseminación. Se recolectaron muestras sanguíneas al momento de la inseminación. Por medio de regresión logística se determinó el efecto de la concentración de progesterona ( $\leq 0.5 \text{ ng/mL}$  vs.  $> 0.5 \text{ ng/mL}$ ), número de partos (primíparas vs. multíparas), número de servicios ( $< 4$  servicios vs.  $\geq 4$  servicios), raza del toro (Holstein vs. otras razas), puerperio (normal vs. anormal), técnico (1 vs. 2) y hato, en la tasa de gestación. La proporción de vacas con valores de progesterona  $> 0.5 \text{ ng/mL}$  fue de 5.9%. La tasa de gestación fue menor en las vacas que tuvieron concentraciones de progesterona  $> 0.5 \text{ ng/mL}$  (18.2%) que en las vacas con  $\leq 0.50 \text{ ng/mL}$  (32.8%) (Odds ratio =2.46;  $P < 0.05$ ). No se observó efecto ( $P > 0.05$ ) del número de partos, número de servicios, raza del toro, puerperio, técnico ni del hato. Se concluye que 5.9% de las vacas tuvieron concentraciones suprabasales de progesterona al momento de la inseminación, lo cual afectó negativamente la tasa de gestación.

En el estudio realizado por **(Pinto & Chacón, 2009)**, el objetivo del estudio fue determinar la concentración plasmática de P4 en vacas implantadas con dispositivos CIDRR nuevos o usados una vez o dos veces, y en vacas con dos a nueve meses de gestación. Se utilizaron 55 vacas Holstein, Pardo Suizo, Jersey y sus encastes. Los animales fueron distribuidos en tres tratamientos: CIDRR nuevo, usado una vez o dos veces con cinco vacas cada uno y cinco vacas por mes de gestación ente los dos y nueve meses. Las muestras de sangre fueron tomadas por punción de la vena caudal a partir del día -1 (día antes de colocar el implante)

durante 8 días hasta el día +1 (día después de retirado el implante) para un total de 10 muestras por vaca. Las muestras fueron analizadas con la prueba de Radio-Immuno-Análisis (RIA). Las vacas con los CIDRR nuevos presentaron valores entre 3.40 - 9.18ng/mL, mientras que con los usados una vez entre 0.57 - 15.00ng/mL y con los usados dos veces entre 1.05 – 6.80ng/mL. Las concentraciones de P4 en vacas gestantes oscilaron entre 7.87 – 20.30ng/mL, la media de P4 de vacas gestantes entre los dos y nueve meses y la media de las concentraciones de P4 de vacas sincronizadas con dispositivos CIDRR nuevos, usados una vez o dos veces fueron diferentes ( $P < 0.05$ ). Los niveles de P4 de las vacas implantadas siempre fueron inferiores a los de las vacas preñadas, en cualquier etapa de la gestación.

## **3.2. BASES TEÓRICAS**

### **3.2.1. Sistema endocrino**

La característica común que tienen las estructuras que forman el sistema endocrino es la producción de unas moléculas denominadas hormonas. Estas moléculas se liberan al medio extracelular y llegan al torrente sanguíneo, a través del cual se reparten por todo el organismo. Algunas hormonas, sin embargo, pueden actuar localmente (**Mejías et al., 2019**).

El sistema endocrino, desempeña un papel fundamental en la integración y desarrollo del organismo ante las etapas de crecimiento, el inicio y mantenimiento de las actividades reproductoras, metabólicas y las respuestas conductuales y ante variaciones del medio interno y externo. El sistema endocrino conjuntamente en el sistema nervioso interviene en respuestas de adaptación del animal ante cambios del ambiente (**Ramírez, 2006**).



### **3.2.1.1. Hormona**

Una hormona se puede definir como una molécula que desencadena una respuesta biológica en determinadas células diana. Cada una de ellas actúa sobre receptores específicos que se encuentran en las células diana. Estos receptores se pueden encontrar en la membrana plasmática, los cuales reconocen hormonas peptídicas y catecolaminas, y desencadenan cascadas de señalización en el interior celular **(Mejías *et al.*, 2019)**.

Las hormonas funcionan como señales químicas entre las células y desencadenan efectos muy variados dependiendo del tipo de hormona, de las células sobre las que actúen y del estado biológico del organismo. Las respuestas a las hormonas son generalmente más lentas y prolongadas, cuando se comparan con la velocidad de las respuestas que se producen en el sistema nervioso o en el músculo **(Mejías *et al.*, 2019)**.

### **3.2.1.2. Glándulas endocrinas**

#### **3.2.1.2.1. Hipotálamo**

Forma la base del cerebro, y sus neuronas producen la hormona liberadora de gonadotrofina o GnRH. El GnRH, en la eminencia media, difunde a los capilares del sistema porta hipofisiario y de aquí a las células de la adenohipófisis en donde su función es estimular la síntesis y secreción de las hormonas hipofisiarias, FSH y LH **(Sintex, 2005)**.

#### **3.2.1.2.2. Hipófisis**

Está formada por una parte anterior o adenohipófisis y una posterior o neurohipófisis. La adenohipófisis produce varios tipos de hormonas, de las cuales la FSH y LH cumplen un papel relevante en el control neuroendócrino del ciclo

estral. La FSH es la responsable del proceso de esteroideogénesis ovárica, crecimiento y maduración folicular, y la LH interviene en el proceso de esteroideogénesis ovárica, ovulación, formación y mantenimiento del cuerpo lúteo **(Sintex, 2005)**.

### **3.2.1.2.3. Ovario**

Son glándulas exocrinas (liberan óvulos) y endócrinas (secretan hormonas). Entre las hormonas que producen los ovarios podemos citar a los estrógenos, la progesterona y la inhibina **(Sintex, 2005)**. Los estrógenos, hormonas esteroideas, son producidos por el folículo ovárico y tienen acciones sobre los distintos órganos blanco como son las trompas de Falopio, el útero, la vagina, la vulva y el sistema nervioso central, en el cual estimulan la conducta de celo y el hipotálamo donde ejercen un "feed back" negativo sobre el centro tónico y positivo sobre el centro cíclico **(Sintex, 2005)**. La progesterona, hormona esteroidea, es producida por el cuerpo lúteo por acción de la LH. Los efectos de la progesterona se observan después que el tejido blanco ha estado expuesto durante cierto tiempo a la estimulación de los estrógenos. Esta preparación por los estrógenos conduce a un efecto sinérgico. Esta hormona prepara el útero para el implante del embrión y para mantener la gestación. A nivel hipotalámico ejerce un efecto feed back negativo sobre el centro tónico **(Sintex, 2005)**. La inhibina, hormona proteica, es producida por el folículo ovárico (células granulosas) e interviene en el mecanismo de regulación de la secreción de FSH. Ejerce un feed back negativo a nivel hipofisario, produciendo una menor secreción de FSH **(Sintex, 2005)**.

#### **3.2.1.2.4. Útero**

Produce la prostaglandina F2  $\alpha$  (PGF2  $\alpha$ ), la cual interviene en la regulación neuroendócrina del ciclo estral mediante su efecto luteolítico. Otras funciones son la de intervenir en los mecanismos de ovulación y del parto (**Sintex, 2005**).

#### **3.2.1.3. Control Hormonal del Ciclo estral en Bovinos**

Los bovinos son animales poliéstricos con ciclos estrales cada 21 días (rango 17-24 días) en promedio. El ciclo estral está regulado por las hormonas del hipotálamo (hormona liberadora de gonadotrofina, GnRH), la pituitaria anterior (hormona folículo estimulante, FSH y hormona luteinizante, LH), los ovarios (progesterona, P4; estradiol, E2 e inhibinas) y el útero (prostaglandina F2 $\alpha$ , PGF). Estas hormonas actúan a través de un sistema de retroalimentación positiva y negativa para gobernar el ciclo estral del bovino (**Stevenson, 2007**).

Durante la fase folicular del ciclo estral las concentraciones de P4 circulante son bajas debido a la regresión del cuerpo lúteo (CL). El aumento de las concentraciones de E2, proveniente del folículo dominante preovulatorio induce un pico de GnRH (a través de la Kisspeptina) y a su vez permite la visualización del comportamiento estral durante el cual las hembras son sexualmente receptivas y permiten ser montadas (**Stevenson, 2007**). Este pico preovulatorio de GnRH induce un pico de LH y FSH (**Nett et al., 1984**) y la ovulación ocurre en promedio a las 27 horas después del pico de LH o inicio del estro. La ovulación es seguida por la fase luteal del ciclo estral. Los primeros 3-4 días son conocidos como el Metaestro que es cuando toma parte la formación del CL (llamado en este momento cuerpo hemorrágico). En los días siguientes (diestro) la concentración de P4 en sangre

comienza a aumentar debido a la formación del CL en el que las células luteinizadas de la granulosa y la teca producen grandes cantidades de P4 en preparación para el establecimiento y mantenimiento de la preñez o la reanudación del ciclo estral **(Niswender et al., 2000)**. Durante el diestro hay crecimiento folicular en el ovario, pero como veremos más adelante estos folículos no ovulan ya que la P4 a través de una retroalimentación negativa sobre la GnRH, sólo permite la secreción de pulsos de LH de mayor amplitud, pero menor frecuencia (1 pulso cada 3-4 horas) que son inadecuados para la ovulación del folículo dominante **(Rahe et al., 1980)**. Después de un período de 12-14 días de exposición a altos niveles séricos de P4, el CL regresa en respuesta a la secreción de PGF del útero que llega al ovario a través de un mecanismo de contra-corriente **(Ginther, 1974)**, y da lugar al inicio del proestro. El proestro dura 2-3 días y es caracterizado por un incremento en la frecuencia de los pulsos de LH (1 pulso cada hora) que conducen a la maduración final del folículo ovulatorio y al incremento del E2 que desencadena el comportamiento sexual (estro) en el bovino **(Colazo & Mapletoft, 2014)**.

#### **3.2.1.4. Endocrinología y fisiología de la gestación**

La gestación comienza con la unión del ovocito y el espermatozoide en la ampolla del oviducto materno. La duración es de 283 días (243-316 días) y se la puede dividir en un período embrionario, que va desde la fertilización hasta los 45 días, y un período fetal, desde los 46 días hasta el parto. La duración de la gestación está influenciada por factores maternos, fetales, genéticos y ambientales. Las vaquillonas pueden tener una gestación más corta que las vacas adultas, y las gestaciones de fetos mellizos y de hembras duran menos que las de fetos machos.

También vacas subalimentadas o con estrés calórico acortan su gestación. Las razas índicas presentan gestaciones unos días más largas que las razas británicas. **(Bartolomé, 2009).**

#### **3.2.1.4.1. Reconocimiento materno de la gestación**

Se denomina así a la señal emitida por el embrión que permite el bloqueo de la luteólisis, la extensión de la vida del CL y la formación de la placenta para el desarrollo de la gestación. Esto incluye la inhibición de la liberación de PGF2 $\alpha$ , la modificación del ambiente uterino y los cambios que evitan el rechazo inmunológico del embrión. Las células mononucleares del trofoblasto secretan alrededor del día 16 el interferón- $\tau$ , que inhibe la síntesis de receptores para los estrógenos, receptores para la oxitocina y por lo tanto inhibe la secreción de PGF2 $\alpha$ , evitando la luteolisis y asegurando la permanencia del CL. El embrión también modifica el flujo sanguíneo y la permeabilidad vascular, el movimiento de fluidos, la respuesta del CL a las prostaglandinas, la actividad secretoria y metabólica del útero, la transferencia de nutrientes, la actividad inmune y el desarrollo de la glándula mamaria **(Bartolomé J., 2009).**

#### **3.2.1.4.2. Control endócrino de la gestación**

La progesterona secretada por el CL (6-15 ng/ml), que se mantiene activo desde la fecundación hasta el parto, es la encargada de mantener la gestación. No obstante la placenta también produce progesterona (1-4 ng/ml) a partir del día 120 y puede mantener la gestación en caso de producirse la luteólisis desde el día 150 en adelante **(Bartolomé, 2009).**

Se han realizado estudios de las concentraciones plasmáticas de la progesterona en las diferentes etapas de la gestación (ver tabla 01).

**Tabla 1.** *Concentraciones plasmáticas de P4 en las vacas gestantes.*

Días de la gestación	Contenido de P4	
	Vena Ovárica(ng/ml)	Vena Yugular(ng/ml)
14	4.5	26
21-22	3.2	20
51-52	2.7	30
103-106	3.5	35
123	2.9	28
172	2.3	28
204	1.8	30
232	1.8	28
262-264	2.9	30

**Fuente: (Erb et al., 1968).**

### 3.2.1.5. Progesterona

Producida en el cuerpo lúteo del ciclo o de la gestación, aunque en algunas especies, se produce también en la placenta y en las glándulas adrenales. Su acción es mantener la gestación en las hembras preñadas (en la vaca casi durante toda la gestación, pues la placenta bovina secreta escasos niveles de progesterona). En una vaca cíclica, su acción principal es regular la duración del ciclo gracias a su efecto inhibitor del celo y de la ovulación. La progesterona natural tiene una vida media muy corta, apenas entre 3-4 minutos, lo que implica la necesidad de utilizar altas dosis. Una alternativa es imitar la fase luteal del ciclo, utilizando progestágenos o análogos de la progesterona, los cuales requieren dosis menores, sin producir efectos secundarios **(Gutiérrez, 2008)**.

La P4 tiene como blanco, principalmente, el eje hipotálamo-hipofisiario y el tracto reproductivo **(Mann, 2009)**, donde actúa después de unirse a su receptor

intracelular específico (PR) (**Jenkin, 2004**). En los tejidos ováricos se han reportado PR, donde la P4 contribuye con la angiogénesis folicular esencial para el desarrollo del folículo preovulatorio (**Morris, 2008**). La P4 también promueve la proliferación de las células del endometrio para soportar la implantación del embrión y el desarrollo a término del feto (**Spencer, 2004**). La actividad luteal se confirma cuando dos o más muestras consecutivas de plasma presentan concentraciones de P4 superiores a 1 ng/mL en hembras bovinas y se determina como el fin de la actividad luteal, cuando se encuentra la primera muestra con la concentración por debajo de esta línea base (**Zarazaga, 2011**). Durante la preñez en hembras rumiantes domésticas, se observa que la concentración de P4 se mantiene entre 5 y 15 ng/mL, aproximadamente (**Menchaca, 2001**).

Se ha establecido un límite mínimo de 0.5 y 1.0 ng/ml de P4 para identificar un cuerpo lúteo funcional en vacas y novillas, respectivamente (**Perea et al., 1998**).

#### **3.2.1.5.1. Biosíntesis neural de la Progesterona**

La progesterona es un esteroide de 21 átomos de carbono que procede de la pregnenolona, la cual, a su vez, proviene del colesterol (**Robel & Baulieu, 1994**). En la biosíntesis esteroidea intervienen, fundamentalmente, el citocromo P450 scc (la enzima desramificante del colesterol), el citocromo P450 17- $\alpha$ -hidroxilasa, la P450 aromatasa y la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ HSD). Estas enzimas reguladoras participan en la conversión del colesterol en pregnenolona, de la pregnenolona en progesterona (**Mellón, 1994**).

### **3.2.1.5.2. Mecanismo de Acción de la Progesterona**

La progesterona es una hormona natural que se une a receptores específicos para inducir efectos progestacionales específicos. Como resultado de esta unión la progesterona es capaz de interferir con los sitios de unión de otros esteroides. Por lo tanto, la hormona natural presenta actividad antiestrogénica, antiandrogénica y también antimineralocorticoide. El mecanismo de acción es similar al de todos los esteroides a nivel celular. Para transporte por vía sanguínea se une a una globulina transportadora (SHBG) en receptores específicos de la célula blanco (se han descrito dos tipos de receptores: alfa y beta) y se acopla al receptor desencadenando un estímulo en el mecanismo de cascada de la fosforilación formando un complejo hormona-receptor (HR). Este HR activa los receptores nucleares de la adenilciclase nuclear, produciendo una defosforilación y traslocación a nivel nuclear, modificando las proteínas del ADN con activación de la ARN polimerasa, lo cual inicia el fenómeno de transcripción. El ADN activado por metilación desencadena la orden para que el ARN mensajero viaje hacia los ribosomas y produzca la respuesta deseada (**Daniel *et al.*, 2010; Rekawiecki, 2011**).

### **3.2.1.6. Estradiol**

Esteroides secretados por la teca interna del folículo ovárico es responsable del comportamiento sexual, características sexuales secundarias y posee un efecto anabólico. Los estrógenos derivan del ciclo-pentano-perhidro-fenantreno, poseen un núcleo esteroide formado de tres anillos con seis carbonos cada uno y un ciclo pentano. Existen diferentes preparados comerciales de estrógenos, que se



diferencian en cuanto a su efecto farmacológico principalmente a su vida media o duración. Esta respuesta debe ser considerada cuando se administran en combinación con progestágenos en los programas de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), ya que la respuesta en la dinámica folicular variará de acuerdo al tipo de estrógeno utilizado, la dosis aplicada y el momento de la aplicación (al comienzo o al fin del tratamiento) **(Gutiérrez, 2008)**.

### **3.2.2. Técnicas de determinación Hormonal**

Se han venido desarrollando múltiples técnicas de determinación como son el radioinmunoensayo (RIA), el inmunoensayo de quimioluminiscencia (CLIA), el inmunoensayo de fluorescencia con resolución temporal (TRFI), el inmunoensayo de polarización fluorescente (FPI) y el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) **(Basu et al., 2006)**. Estas técnicas emplean un aglutinante y un ligando, donde la cuantificación de una sustancia depende tanto de la saturación progresiva de un aglutinante específico para ella, como de la determinación de la distribución de sus fases unidas y libres **(Karir, 1965)**. Esto se realiza empleando un sistema indicador de la unión, ya sea por fluorescencia (inmunofluorescencia), radioactividad (RIA) o por enzimas (ELISA) **(Gómez et al., 2011)**. Aunque CLIA y TRFI son más sensibles, no son prácticos para su uso en diagnóstico clínico, por lo que las técnicas de ELISA y RIA son las más empleadas **(Basu et al., 2006)**.

#### **3.2.2.1. Prueba ELISA**

Las técnicas de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), que constituyen en la actualidad las técnicas inmunológicas más ampliamente utilizadas, se caracterizan por el empleo de marcadores enzimáticos para la detección y

amplificación de las reacciones antígeno-anticuerpo. En estas técnicas, uno de los elementos de la reacción inmunológica (antígeno o anticuerpo) se fija a un soporte sólido, generalmente placas de poliestireno, polivinilo, polipropileno o nylon, que permiten su adsorción pasiva y la eliminación de los compuestos libres mediante lavado. La interacción antígeno-anticuerpo se detecta mediante la reacción colorimétrica producida por una enzima (conjugada al antígeno o al anticuerpo) al degradar el sustrato correspondiente. La medida de la absorbancia en los pocillos de la placa de ELISA, permite cuantificar la reacción inmunológica **(Rodríguez , 2004).**

#### **3.2.2.1.1. ELISA competitivo**

Los anticuerpos o los antígenos son inmovilizados sobre la fase sólida y su unión con el conjugado antígeno-enzima o anticuerpo-enzima, es inhibida por la presencia de analito no marcado en la muestra. Las incubaciones entre muestras y conjugados pueden ser simultáneas o secuenciales. Esta última variante no es estrictamente competitiva, con ella se alcanza una mayor detectabilidad y es recomendada cuando se quieren detectar anticuerpos de baja afinidad **(Ochoa, 2012).**



**Figura 1.** Pasos ELISA competitivo: (A) Pocillos impregnados con antígeno en fase sólida. (2) Adición de muestras de suero con anticuerpos (C) adición del conjugado (complejo enzima-Ac) y posteriormente Sustrato TMB. En este caso, la ausencia del color significa una muestra positiva.

### 3.2.3. Antígeno

Molécula de procedencia exógena o endógena que resulta extraña al organismo. Puede ser específicamente unida por un anticuerpo (Ac) o por un receptor de célula T (TCR), pero no necesariamente genera una respuesta inmune (Vega, 2009).

### 3.2.4. Anticuerpo

Los anticuerpos (Ac) o inmunoglobulinas (Ig) son moléculas glicoproteínas (90% polipéptidos, 10% carbohidratos) que tienen la capacidad de combinarse específicamente con un antígeno o un inmunógeno. Reciben también el nombre de: anticuerpos, gammaglobulinas (debido a su migración electroforética), antitoxinas, aglutininas o precipitinas (Vega, 2009). Son productos de las células B, capaces de unirse de forma específica a un fragmento de antígeno (Gallastegui et al., 2002).

### **3.2.5. Reacción antígeno – anticuerpo.**

El antígeno es una porción de un microorganismo o parásito que contiene sitios específicos de reconocimiento humoral (anticuerpos) o celular (linfocitos) de la respuesta inmunitaria, a estos sitios se les denomina epitopes. Los denominados antígenos crudos por lo general son extractos solubles de los microorganismos o parásitos, se constituyen por una variedad de componentes tanto del agente como de las células en las cuales se alojan. En los antígenos crudos la mayor parte de los componentes son irrelevantes, pero pueden ser reconocidos por anticuerpos o linfocitos y dar reacciones falsas positivas o negativas, por lo tanto es deseable purificarlos (**Gallastegui et al., 2002**).

## CAPITULO IV

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1. ÁMBITO DE ESTUDIO

Para el presente trabajo de investigación, la toma de muestras se realizó en el distrito de Ancahuasi, ubicada en la provincia de Anta que se encuentra a 42 kilómetros al Noreste de la ciudad del cusco, el procesamiento de muestras se llevó a cabo en el laboratorio de “Desarrollo y Validación de Pruebas Serológicas y Moleculares para la Investigación y Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas de la Escuela Profesional de Zootecnia, Área de Sanidad Animal-UNSAAC”. El periodo de ejecución del trabajo de investigación fue en setiembre del 2017.

##### 4.1.1. Ubicación política.

- Región : Cusco.
- Departamento : Cusco.
- Provincia : Anta.
- Distrito : Ancahuasi.

##### 4.1.2. Ubicación geográfica.

- Latitud sur : 13°27'21”
- Longitud oeste : 72°18'02”
- Altitud : 3435m.
- Superficie : 123.58 km<sup>2</sup>.



Figura 02. Mapa de ubicación geográfica del distrito de Ancahuasi

#### 4.1.3. Clima.

- **Temperatura:** Cuenta con una temperatura promedio máximo de 21.5 °C y una temperatura promedio mínimo de 4.2 °C (SENAMHI, 2014).
- **Precipitación:** se considera una precipitación anual Acumulada de 660.7 mm (SENAMHI, 2014).

## 4.2. MATERIALES DE ESTUDIO.

### 4.2.1. Población y muestra.

El universo conformado por vacas de las razas Brown Swiss, Holstein e híbridos del distrito de Ancahuasi. Las muestras estuvieron constituidas por suero sanguíneo de vacas en edad reproductiva y gestantes.

#### 4.2.1.1. Tamaño de muestra.

El tamaño de muestra fue determinado teniendo en cuenta un nivel de confianza de 93% y error de precisión de 0.07, mediante el método no paramétrico de muestreo simple al azar. Considerando una población conocida base de vacunos en el distrito de Ancahuasi (*Vivanco, 2005*).

$$N = \frac{N * Z^2 * p * q}{(N - 1) * E^2 + Z^2 * (p * q)}$$

Dónde:

**N:** tamaño poblacional

**Z:** 1.81, nivel de confianza que se da a la muestra

**p:** animales positivos 0.5

**q:** animales negativos 0.5

**E:** error experimental 0.07

**Tabla 02.** *Distribución del tamaño de muestra para el distrito de Ancahuasi.*

<b>Distrito</b>	<b>Población Total</b>	<b>Hormona Evaluada</b>	<b>Tamaño de muestra</b>
		Estradiol	90
Ancahuasi	1480	Progesterona	60
	<b>Total</b>		<b>150</b>

En la tabla 02, se observa que el distrito de Ancahuasi tiene una población de 1480 vacunos (vacas en edad reproductiva) correspondientes a las razas Holstein, Brown Swiss e Híbridos, de las cuales se hizo un muestreo de 150 vacunos, de los cuales se tuvo 60 muestras de vacas en gestación, dichas muestras se evaluaron para determinar los niveles de progesterona. Asimismo, se tuvo que 90 muestras de vacas vacías (en edad reproductiva), las cuales se utilizaron para determinar los niveles de estradiol.

#### **4.2.2. Materiales, equipos, instrumentos y reactivos**

##### **4.2.2.1. Materiales**

- Agujas vacutainer
- Casquete para las agujas de vacutainer.
- Tubos vacutainer con separador de suero.
- Alcohol
- Algodón
- Etiquetas para rotular las muestras (plumón indeleble)
- Guantes descartables
- Fichero y registros



- Torundas de algodón.
- Gradillas.
- kuler refrigerante
- Mandil
- Gorros y barbijos
- Pipetas Pasteur desechables
- Viales criogénicos de 4.5 ml
- Etiquetas para rotular (plumón indeleble)
- Tips de 20, 200 y 1000  $\mu$ l
- Papel absorbente
- Parafilm
- Agua destilada o des ionizada
- Guantes

#### **4.2.2.2. Equipos e Instrumentos**

- Centrifuga (NF 200-nuve)
- Congeladora -20°C (LG)
- Estufa de incubación a 37 °C (Stat-Fax-2200)
- Refrigeradora (LG)
- Micropipetas de 30-300  $\mu$ l y 100-1000  $\mu$ l (Made by-LABMATE)
- Lector de microplacas ELISA (CHROMATE)
- Vortex u homogenizador (Scientific Industries-2 GENIE)
- Cabina de flujo laminar (Telstar Bio IIA)
- Probetas de 100-1000ml

- Cronometro

#### **4.2.2.3. Reactivos para el análisis de Estradiol en el laboratorio.**

- Suero sanguíneo 5µl para cada pocillo.
- Pocillos de microtitulación 96, recubiertas con anticuerpo secundario.
- Solución de conjugado de enzima: 12 ml.
- TMB Reactivo de color: 12 ml.
- Solución Stop (HCl 2 N): 6 ml.
- Tampón de lavado 20X: 20 ml.
- Diluyente de la muestra: 20 ml.
- E2 conjunto estándar: 10, 25, 100, 500, y 2500 10 000 pg /ml/0.5ml/vial.
- Control de calidad establecido QCI, (100 pg. / ml) y QC2, (500 pg. / ml.).

#### **4.2.2.4. Reactivos para el análisis de Progesterona en el laboratorio.**

- Suero sanguíneo 50µl para cada pocillo.
- Pocillos recubiertos con anticuerpo de progesterona (96 pozos).
- Conjugado enzimático, 12 ml.
- Progesterona conjunto estándar: 1,0, 2,5, 5,0, 10, 30, ng /ml.
- Reactivo TMB color, 12 ml.
- Solución de parada (2N HCL), 6 ml.
- Tampón de lavado 20X.

### **4.3. METODOLOGÍA**

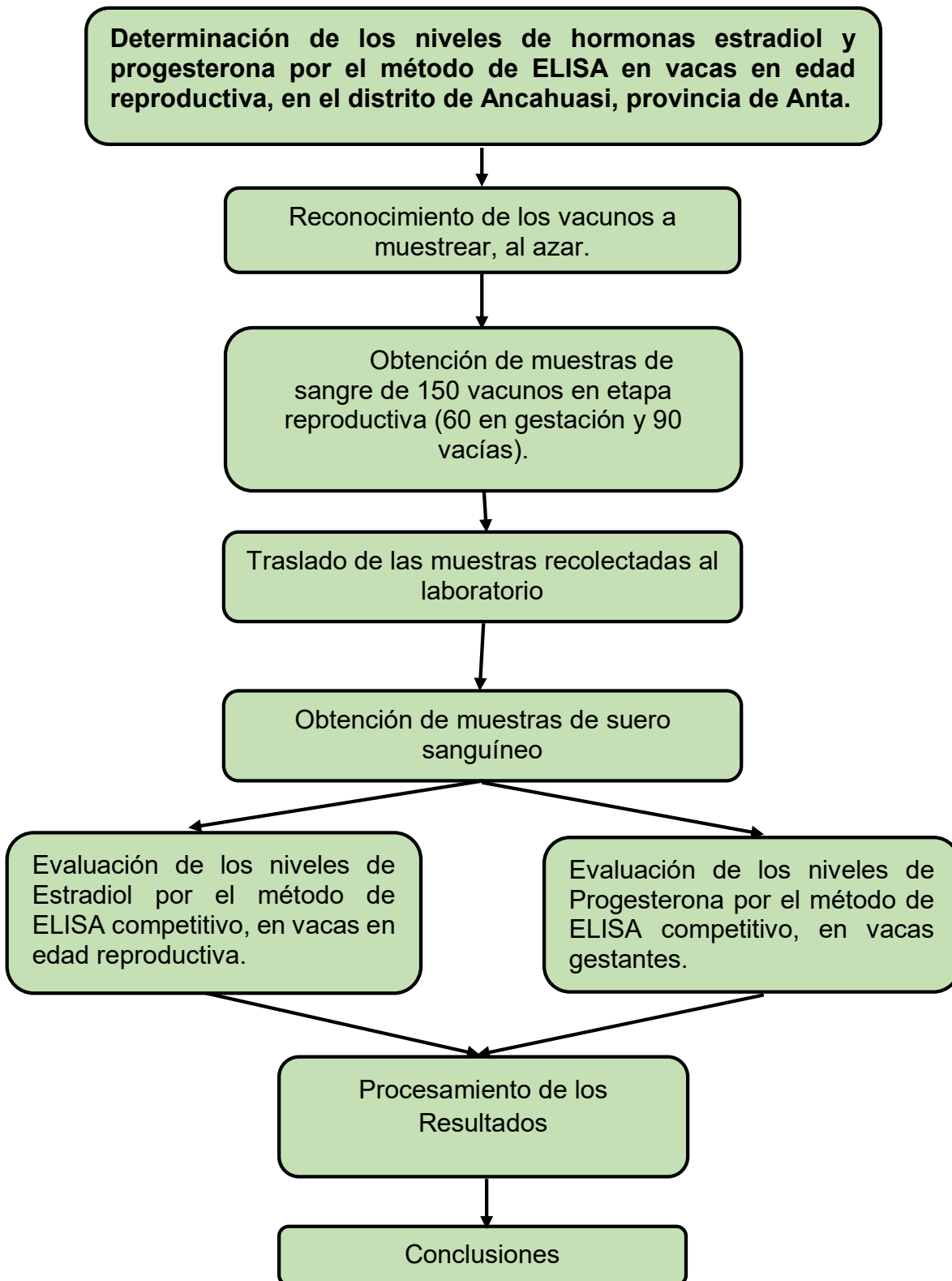
#### **4.3.1. Toma de muestras de Sangre**

Las muestras de sangre fueron colectadas de vacas en edad reproductiva y gestantes del distrito de Ancahuasi, provincia de Anta; por punción de la vena caudal (Anexo 02) previa desinfección con alcohol, para lo cual se utilizó tubos vacutainer de 10ml con separador de suero al vacío. Una vez obtenidas las muestras de sangre se rotulo con los datos de cada vaca muestreada (N° muestra, nombre, edad y raza), dichas muestras fueron depositadas en un kuler refrigerante para su conservación.

#### **4.3.2. Obtención del suero en Laboratorio.**

Para la obtención de suero se tuvo que esperar el paso de un mínimo de ocho horas para que el gel contenido el tubo vacutainer separe el suero de la sangre, posteriormente se colecto el suero en crioviales de 2.0 ml y se conservó en la congeladora de -20 °C hasta el momento del análisis serológico.

**Gráfico 01.** *Flujograma del trabajo de investigación*



### **4.3.3. Metodología de Laboratorio**

#### **4.3.3.1. Metodología de ELISA Competitivo para determinar niveles de Estradiol.**

##### **4.3.3.1.1. Uso del Kit de ELISA para detección de Estradiol.**

La prueba de ELISA de estradiol de micropocillos es un sistema de inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de los niveles de estradiol 17 beta en suero bovino, la prueba es el monitoreo de las condiciones relacionadas con los niveles séricos / plasmáticos de estradiol (**Endocrine Technologies, 2017**).

##### **4.3.3.1.2. Principios de la prueba.**

La prueba cuantitativa E2 se basa en un inmunoensayo enzimático en fase sólida basado en el método de unión competitiva. Una muestra (suero / plasma / orina) que contiene una cantidad desconocida de E2 a ensayar prueba (antígeno sin marcar) se añade a una cantidad estándar de un conjugado de E2 (antígeno marcado). Los antígenos marcados y no marcados se dejan para competir por los sitios de unión de alta afinidad de anticuerpo de E2 en una placa recubierta. Después de lavar el antígeno libre, la cantidad de antígeno marcado en la muestra es reversiblemente proporcional a la concentración del antígeno sin marcar. Las concentraciones reales en muestras desconocidas se obtienen por medio de una curva estándar sobre la base de una concentración conocida de antígeno sin marcar analizado en paralelo con lo desconocido. Después de lavar, se añade la solución de sustrato y se deja que la enzima reaccione durante un tiempo fijo antes de

que se terminó la reacción. Las absorbancias se midieron a 450 nm utilizando un lector de placas ELISA (Endocrine Technologies, 2017).

#### 4.3.3.1.3. Preparación de muestras y Reactivos

Preparar el buffer de lavado diluyendo 1 parte con 19 partes de agua destilada. Preparar una ficha de distribución de los estándares, blancos, muestras y controles, los cuales indicaran la ubicación de cada una en la microplaca de ELISA para detectar los niveles de la hormona estradiol (Ver tabla 03).

**Tabla 03.** Distribución de la placa de ELISA para determinar los niveles de Estradiol en vacas del distrito de Ancahuasi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>ST-1</b>	<b>ST-1</b>	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
<b>B</b>	<b>ST-2</b>	<b>ST-2</b>	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
<b>C</b>	<b>ST-3</b>	<b>ST-3</b>	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
<b>D</b>	<b>ST-4</b>	<b>ST-4</b>	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
<b>E</b>	<b>ST-5</b>	<b>ST-5</b>	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
<b>F</b>	<b>ST-6</b>	<b>ST-6</b>	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
<b>G</b>	<b>BL</b>	<b>BL</b>	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
<b>H</b>	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M

**Fuente:** Elaboración propia

**Dónde:**

- **BL = Blancos.**
- **ST (1,2,3,4,5 y 6) = Estándares con sus respectivas repeticiones**
- **M = Muestra de suero que corresponde a un vacuno por pocillo.**

#### **4.3.3.1.4. Procedimiento de la prueba.**

1. Permitir que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (18 -25 ° C) antes de su uso.
2. Pipetear 5 µl de estándares, muestras y blancos en los pozos de control de calidad adecuada.
3. Añadir 100 µl de solución de conjugado de enzima E2 a cada pocillo (excepto los establecidos para los espacios en blanco).
4. Incubar a 37 ° C durante 2 horas.
5. Deseche el contenido de los pocillos y lavar la placa 5 veces con solución de lavado (250-300 µl) por pocillo. Invierta la placa, toque firmemente contra el papel absorbente para eliminar cualquier humedad residual.
6. Añadir 100 µl solución sustrato TMB en cada pocillo (incluidos los espacios).
7. Incubar la placa durante 20 minutos a temperatura ambiente.
8. Añadir 50 µl de solución stop y mezclar suavemente.
9. Lea la absorbancia a 405 nm con un lector de microplacas.

#### **4.3.3.1.5. Cálculo de los resultados.**

La determinación de los niveles de estradiol fue a través del Software *elisaanalysis* que utiliza el modelo matemático de regresión logística (Logistic Regression) que convierte las DO en concentraciones (pg/ml) basado en los estándares contenidos en el kit.

#### **4.3.3.2. Metodología de ELISA Competitivo para determinar niveles de progesterona.**

##### **4.3.3.2.1. Uso del Kit de ELISA para detección de progesterona.**

El kit de ELISA de progesterona de micropocillos es un sistema de inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de los niveles de progesterona en suero / plasma de bovino y especies relacionadas. La prueba está diseñada para realizar el diagnóstico y seguimiento de las condiciones relacionadas con la progesterona sérica / plasmática **(Endocrine Technologies, 2017)**.

##### **4.3.3.2.2. Principios de prueba.**

La prueba cuantitativa de progesterona se basa en un ensayo inmunoenzimático en fase sólida basado en el método de unión competitiva. Una muestra (suero / plasma) que contiene una cantidad desconocida de la progesterona competirá con progesterona conjugada con enzima para los sitios de unión de alta afinidad en un número limitado de anticuerpos como recubrimiento sobre la placa. Tras un lavado que elimina el antígeno libre la cantidad de antígeno marcado en la muestra es reversible proporcional a la concentración del antígeno sin marcar. Las concentraciones reales en muestras desconocidas se obtienen por medio de una curva estándar de concentraciones conocidas de antígeno sin marcar antígeno analizado en paralelo con las incógnitas. Después del lavado, se añade solución de sustrato y la enzima se deja reaccionar durante un tiempo antes de que se termine la reacción. Absorbancias se midieron a 450 nm utilizando un lector de placas ELISA **(Endocrine Technologies, 2017)**.



#### 4.3.3.2.3. Preparación de reactivos

1. Preparar el tampón de lavado diluyendo 1 parte con 19 partes de agua destilada.
2. Diluir las muestras de alta concentración con el tampón de dilución y mezclar bien antes de su uso en el ensayo.
3. Preparar una ficha de distribución de los estándares, muestras y Blancos, los cuales indicaran la ubicación de cada una en la microplaca de ELISA para detectar los niveles de la hormona progesterona (Ver tabla 05).

**Tabla 04.** *Distribución de la placa de ELISA para determinar los niveles de Progesterona en vacas del distrito de Ancahuasi.*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>ST-1</b>	<b>ST-1</b>	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
<b>B</b>	<b>ST-2</b>	<b>ST-2</b>	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
<b>C</b>	<b>ST-3</b>	<b>ST-3</b>	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
<b>D</b>	<b>ST-4</b>	<b>ST-4</b>	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
<b>E</b>	<b>ST-5</b>	<b>ST-5</b>	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
<b>F</b>	<b>BL</b>	<b>BL</b>	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
<b>G</b>	<b>BL</b>	<b>BL</b>	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
<b>H</b>	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M

**Fuente:** Elaboración propia

**Dónde:**

- **BL = Blancos.**
- **ST (1,2,3,4 y 5) = Estándares con sus respectivas repeticiones**
- **M = Muestra de suero que corresponde a un vacuno por pocillo.**

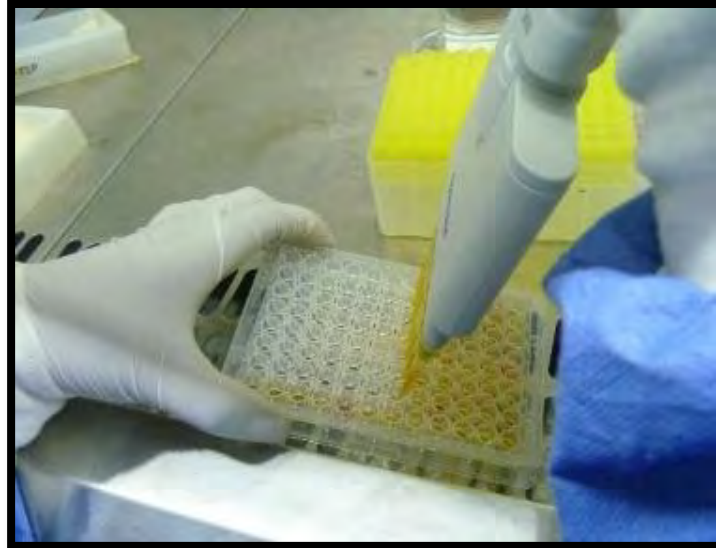
#### **4.3.3.2.4. Procedimiento de la prueba.**

1. Todos los reactivos deben alcanzar la temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso.
2. Añadir 50 µl de estándares, muestras y blancos en los pozos apropiados.
3. Añadir 100 µl de la solución de Enzima conjugada de progesterona a cada pocillo. Agite la placa durante 30 segundos. Y se incuba a 37°C durante 1 hora.
4. Desechar el contenido de los pocillos y lavar la placa 5 veces con solución de lavado (250-300 µl) por pocillo. Invierta la placa, toque firmemente contra el papel absorbente para eliminar cualquier humedad residual.
5. Añadir 100 µl de solución de sustrato TMB a todos los pocillos.
6. Incubar la placa a temperatura ambiente (18-28°C) durante 10 minutos sin agitación.
7. Detener la reacción añadiendo 50 µl de solución de parada a los pocillos en el mismo orden en que se añadió la solución de sustrato y la mezcla suavemente.
8. Lea la absorbancia a 450 nm con un lector de micro.

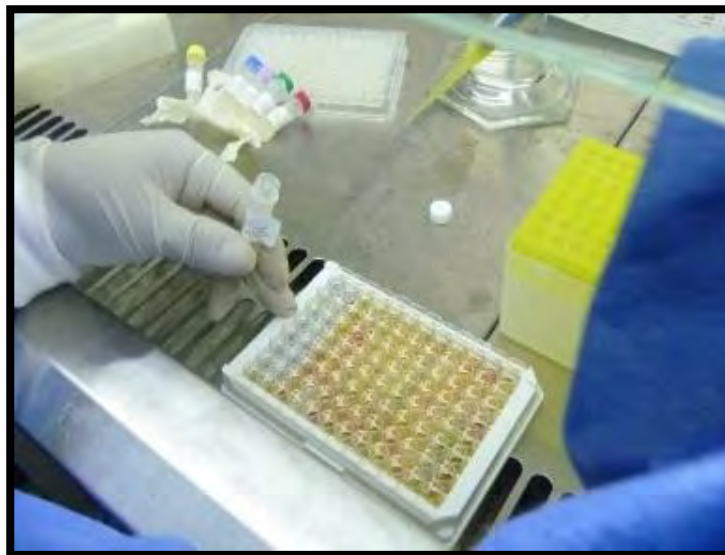
#### **4.3.3.2.5. Cálculo de los resultados**

La determinación de los niveles de progesterona fue a través del Software *elisaanalysis* que utiliza el modelo matemático de regresión logística (Logistic Regression) que convierte las DO en concentraciones (ng/ml) basado en los estándares contenidos en el kit.

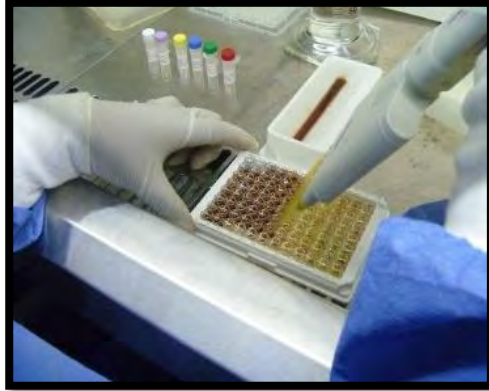
**Flujo de proceso de la Prueba ELISA competitivo para determinar niveles hormonales de Estradiol en vacas del distrito de Ancahuasi.**



**Fotografía 01.** Adición de 5  $\mu$ l de muestras a los pocillos de la placa.



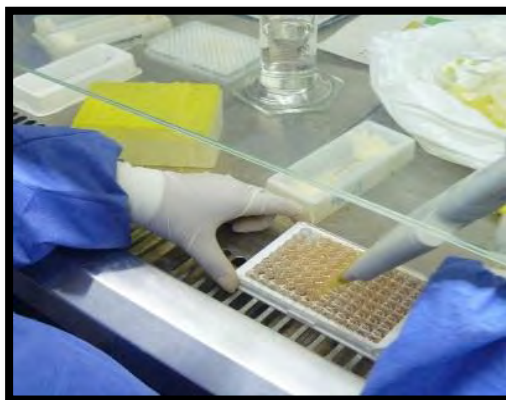
**Fotografía 02.** Adición de 5  $\mu$ l de los estándares a los pocillos de la placa.



**Fotografía 03.** Adición de 100  $\mu$ l de conjugado a los pocillos de la placa.



**Fotografía 04.** Incubación de la placa a 37°C por 2 horas.



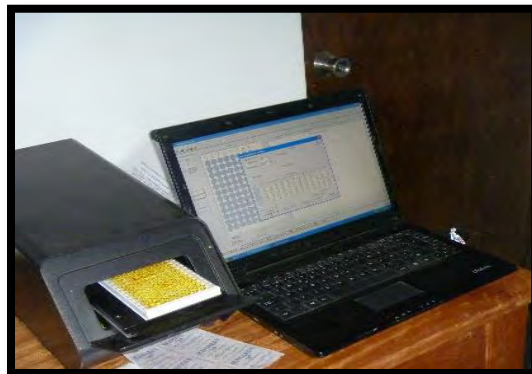
**Fotografía 05.** Lavado de los pocillos con 300  $\mu$ l de solución de lavado, por 5 veces



**Fotografía 06.** Adición de 100  $\mu$ l Sustrato a los pocillos de la placa



**Fotografía 07.** Adición de 50  $\mu$ l de Solución Stop a los pocillos.



**Fotografía 08.** Lectura de las densidades ópticas a 450nm en un lector de microplacas.

## CAPITULO V

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 5.1. NIVELES HORMONALES DE ESTRADIOL EN VACUNOS EN EDAD REPRODUCTIVA, POR RAZAS Y EDADES.

##### 5.1.1. Determinación cuantitativa de los niveles de Estradiol en vacunos de en edad reproductiva del distrito de Ancahuasi.

Al realizar el análisis de los niveles de estradiol en las muestras de suero sanguíneo de vacunos en edad reproductiva, se determinó los siguientes resultados (Tablas 05, 06 y 07).

**Tabla 05.** Niveles de estradiol (pg/ml) en vacas en edad reproductiva del distrito de Ancahuasi, por razas y edades.

Raza	Edad	n°	Mx	$\bar{x}$	SD
<b>Holstein</b>	2-3 años	6	279.11	84.99	129.06
	3-4 años	6	33.95	8.78	13.98
	4-5 años	6	141.75	30.52	54.69
	5-6 años	6	186.40	39.33	73.07
	> 6años	6	21.10	7.36	7.29
<b>Brown</b>	2-3 años	6	296.24	52.36	119.58
<b>Swiss</b>	3-4 años	6	80.57	14.10	32.57
	4-5 años	6	64.21	18.22	24.42
	5-6 años	6	104.66	38.43	38.00
	> 6años	6	9.72	4.65	3.60
<b>Hibrido</b>	2-3 años	6	449.96	158.55	185.61
	3-4 años	6	230.20	42.90	91.93
	4-5 años	6	98.45	37.20	36.83
	5-6 años	6	170.74	39.98	68.07
	> 6años	6	148.27	28.90	59.33

**Fuente:** Elaboración propia

Como se detalla en la tabla 05, los niveles de estradiol en vacas de la raza Holstein, correspondiente a edades de: 2-3, 3-4, 4-5, 5-6 y >6 años, presentaron valores medios de:  $84.99 \pm 129.06$ ,  $8.78 \pm 13.98$ ,  $30.52 \pm 54.69$ ,  $39.33 \pm 73.07$  y  $7.36 \pm 7.29$  pg/ml respectivamente. Para la raza Brown Swiss se registró valores medios de:  $52.36 \pm 119.58$ ,  $14.10 \pm 32.57$ ,  $18.22 \pm 24.42$ ,  $38.43 \pm 38.00$  y  $4.65 \pm 3.60$  pg/ml en vacas de: 2-3, 3-4, 4-5, 5-6 y >6 años de edad respectivamente. En los híbridos se registró valores medios de:  $158.55 \pm 185.61$ ,  $42.90 \pm 91.93$ ,  $37.20 \pm 36.83$ ,  $39.98 \pm 68.07$  y  $28.90 \pm 59.34$  pg/ml en vacas de: 2-3, 3-4, 4-5, 5-6 y >6 años de edad respectivamente.

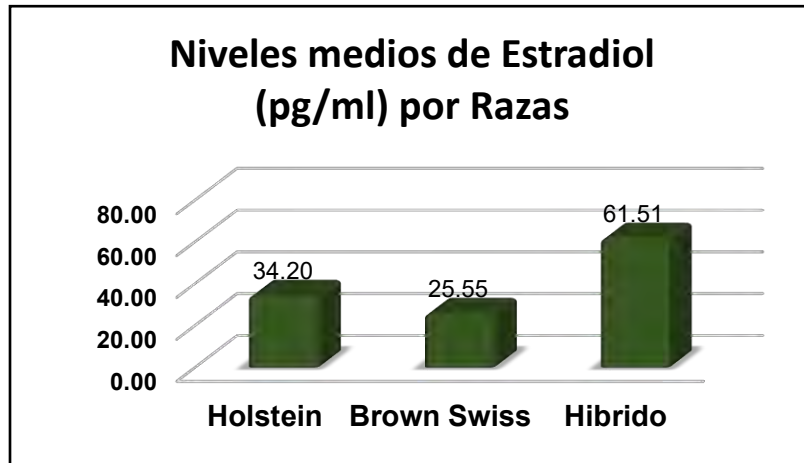
**Tabla 06.** Niveles de estradiol (pg/ml) en vacas en edad reproductiva del distrito de Ancahuasi, por razas.

Raza	n	Mx	$\bar{x}$	SD
Holstein	30	279.11	34.20	71.94
Brown Swiss	30	296.24	25.55	57.57
Hibrido	30	449.96	61.51	107.21

**Fuente:** Elaboración propia

En la tabla 06, podemos observar los valores medios de los niveles de estradiol en las diferentes razas de vacas del distrito de Ancahuasi. Es así que se registró valores medios de  $34.20 \pm 71.94$  pg/ml para la raza Holstein,  $25.55 \pm 57.57$  pg/ml para la raza Brown Swiss y  $61.51 \pm 107.21$  pg/ml para los Híbridos.

Las vacas de la raza Híbrido mostraron un nivel promedio de estradiol, superior a las vacas de las razas Holstein y Brown Swiss, lo cual correspondió a  $61.51$  pg /ml (ver gráfico 02).?



**Gráfico 02.** Niveles de estradiol en vacas en edad reproductiva, por razas.

**Tabla 07.** Niveles de estradiol (pg/ml) en vacas en edad reproductiva del distrito de Ancahuasi, por Edades.

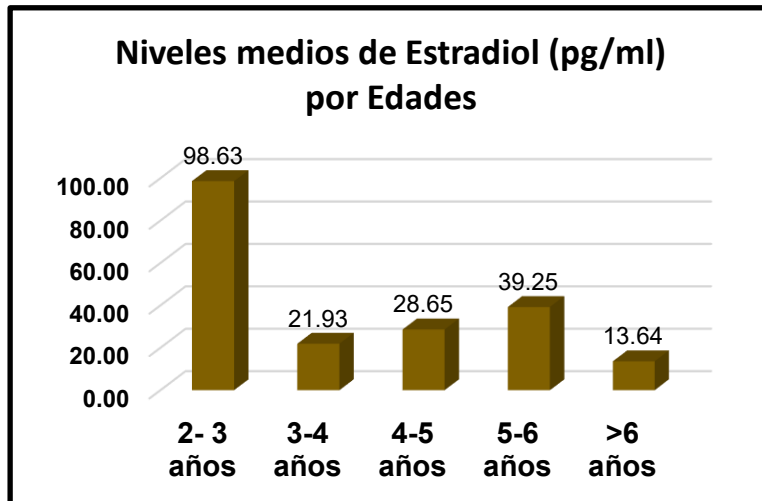
Edad	n	Mx	$\bar{x}$	SD
2-3 años	18	449.96	98.63	146.03
3-4 años	18	230.20	21.93	55.62
4-5 años	18	141.75	28.65	38.98
5-6 años	18	186.40	39.25	57.95
>6 años	18	148.27	13.64	34.34

**Fuente:** Elaboración propia

En la tabla 07, podemos observar los valores medios de los niveles de estradiol en las diferentes edades de vacas del distrito de Ancahuasi. Es así que se registró valores medios de  $98.63 \pm 146.03$  pg/ml para vacas de 2 a 3 años,  $21.93 \pm 55.62$  pg/ml para vacas de 3 a 4 años,  $28.65 \pm 38.98$  pg/ml para vacas de 4 a 5 años,  $39.25 \pm 57.95$  pg/ml para vacas de 5 a 6 años y  $13.64 \pm 34.34$  pg/ml para vacas >6 años.

Las vacas de 2 a 3 años mostraron un nivel promedio de estradiol, superior a las vacas de las otras edades, lo cual correspondió a  $98.63$  pg/ml (ver gráfico 03).





**Gráfico 03.** Niveles de estradiol en vacas, en edad reproductiva, por edades.

En el presente trabajo de investigación se determinó los niveles medios de estradiol en vacas en edad reproductiva del distrito de Ancahuasi por razas y por edades. Se obtuvo valores medios de 61.51 pg/ml, 34.20 pg/ml y 25.55 pg/ml para las razas Híbrido, Holstein y Brown Swiss respectivamente, no habiendo diferencias significativas ( $P > 0.05$ ). Para el factor edad sí hubo diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ), ya que el valor medio logrado para las vacas de 2 a 3 años de edad fue superior a los valores logrados para las otras edades evaluadas, teniendo un valor medio de 98.63 pg/ml, el cual es superior a los obtenidos para vacas de 3-4 años, 4-5 años, 5-6 años y >6 años con valores medios de estradiol de 21.93 pg/ml, 28.65 pg/ml, 39.25 pg/ml y 13.64 pg/ml respectivamente. Podemos observar que las vacas de 2 a 3 años de edad presentan un nivel de estradiol superior a las vacas de las otras edades; esto probablemente se deba a que las vacas son de primer parto, tal como indica **Hernández & Morales (2001)** que las vacas primíparas presentaron mayor concentración de  $17\beta$ -estradiol en leche que las múltiparas y esto puede ser debido a que, las múltiparas que tienen una mayor producción láctea

presentan mayor flujo hepático, lo cual se relaciona directamente con una mayor capacidad hepática para metabolizar las hormonas esteroideas permitiendo así eliminar más rápido las concentraciones de estradiol. Asimismo (**Perry et al., 1991**) realizó un estudio en vacas de carne amamantando se reportó que las concentraciones de  $17\beta$  estradiol presentaron una tendencia creciente durante el periodo posparto, hasta el momento de la primera ovulación. Estos estudios nos podrían indicar que las vacas 2 a 3 años de edad que presentaron niveles promedio de estradiol superior a las otras edades se encontraban próximos a la ovulación.

De otra parte (**Lenis et al., 2010**) concluyeron que “el consumo de plantas que contienen fitoestrógenos favorece la actividad farmacológica endógena cuyo efecto depende básicamente del tipo, la cantidad y de la especie que lo consuma. Los fitoestrógenos están ampliamente contenidos en gran variedad de plantas y forrajes, destinados al consumo animal, teniendo variabilidad de efectos adversos principalmente en el tracto reproductivo en la mayoría de especies animales. Debido a que muchos fitoestrógenos tienen la posibilidad de ser agonistas o antagonistas estrogénicos, los efectos varían desde la infertilidad hasta una sobre-respuesta estrogénica, aumentando así las secreciones del tracto reproductivo y alterando el comportamiento animal. Esto nos podría ser un factor que influye en los niveles de estradiol encontrados en las vacas evaluadas, ya que la alimentación de las vacas muestreadas fue variada.

Nuestros resultados se aproximan a los obtenidos por **Báez, G. (2010)**, quien determinó que los niveles de secreción de estradiol mostraron un incremento a lo largo del posparto, desde  $26.43 \pm 5.6$  pg/ml en la segunda semana después del parto, hasta  $43.76 \pm 6.5$  pg/ml en el momento de la primera ovulación; posterior a esta, los

niveles promedio de estradiol tendieron a estabilizarse. Sin embargo, no podemos comparar debido a que en nuestro estudio no consideramos en que día después del parto se tomó la muestra sanguínea.

Asimismo, realizaron estudios en leche, tal como **Erb & col (1976)** luego de inducir la lactancia mediante un protocolo de 7 días de  $17\beta$ -estradiol y progesterona administradas vía subcutánea, determinaron que la concentración de estrógenos en leche al 2do día de lactancia es de 310 pg/ml y luego desciende rápidamente al 4to día de iniciada la lactancia a 144 pg/ml.

## 5.2. NIVELES HORMONALES DE PROGESTERONA EN VACAS GESTANTES, POR RAZAS Y EDADES.

### 5.2.1. Determinación cuantitativa de los niveles de progesterona en vacas gestantes del distrito de Ancahuasi.

Al realizar el análisis de los niveles de progesterona en las muestras de suero sanguíneo de vacas gestantes aparentemente normales, se determinó los siguientes resultados (Tablas 08, 09 y 10).

**Tabla 08.** Niveles de progesterona (ng/ml) en vacas en edad reproductiva del distrito de Ancahuasi, por razas y edades.

Raza	Edad	n°	Mx	$\bar{x}$	SD
<b>Holstein</b>	2-3 años	4	3.15	2.37	0.64
	3-4 años	4	2.50	1.85	0.43
	4-5 años	4	4.84	2.55	1.54
	5-6 años	4	5.26	2.72	1.71
	> 6 años	4	2.19	1.95	0.26
<b>Brown</b>	2-3 años	4	4.00	2.78	1.15
<b>Swiss</b>	3-4 años	4	2.41	2.13	0.25
	4-5 años	4	7.61	3.56	2.73
	5-6 años	4	10.86	4.09	4.52
	> 6 años	4	2.58	1.87	0.48
<b>Hibrido</b>	2-3 años	4	2.52	2.34	0.14
	3-4 años	4	3.39	2.65	0.66
	4-5 años	4	2.19	1.94	0.28
	5-6 años	4	3.18	2.16	0.71
	> 6 años	4	2.25	1.77	0.32

**Fuente:** Elaboración propia

Como se detalla en la tabla 08, los niveles sanguíneos de la Hormona progesterona, para la raza Holstein en el distrito de Ancahuasi fueron:  $2.37 \pm 0.64$ ,

1.85 ± 0.43, 2.55 ± 1.54, 2.55 ± 1.54, 2.72 ± 1.71 y 1.95 ± 0.26 ng/ml para vacas de: 2-3 años, 3-4, 4-5, 5-6 y >6 años de edad respectivamente. Para la raza Brown Swiss se registró niveles de: 2.78 ± 1.15, 2.13 ± 0.25, 3.56 ± 2.73, 4.09 ± 4.52 y 1.87 ± 0.48 ng/ml para vacas de: 2-3, 3-4, 4-5, 5-6 y >6 años de edad respectivamente. En los híbridos se registró niveles de: 2.34 ± 0.14, 2.65 ± 0.66, 1.94 ± 0.28, 2.16 ± 0.71 y 1.77 ± 0.32 ng/ml para vacas de: 2-3, 3-4, 4-5, 5-6 y >6 años de edad respectivamente.

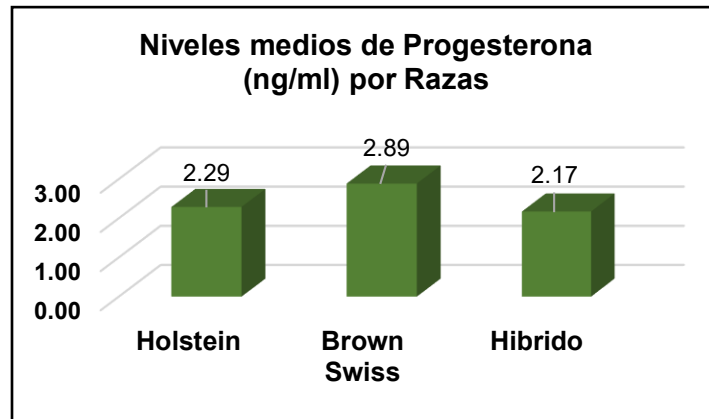
**Tabla 09.** Niveles de Progesterona (ng/ml) en vacas gestantes del distrito de Ancahuasi, por razas.

Raza	n°	Mx	$\bar{x}$	SD
Holstein	20	5.26	2.29	1.03
Brown Swiss	20	10.86	2.89	2.32
Hibrido	20	3.39	2.17	0.53

**Fuente:** Elaboración propia

En la tabla 09, podemos observar los valores medios de los niveles de progesterona en las diferentes razas de vacas del distrito de Ancahuasi. Es así que se registró valores medios de 2.29 ± 1.03 ng/ml para la raza Holstein, 2.89 ± 2.32 ng/ml para la raza Brown Swiss y 2.17 ± 0.53 ng/ml para los Híbridos.

Las vacas de la raza Brown Swiss mostraron un nivel promedio de progesterona, superior a las vacas de las razas Holstein e Hibrido, lo cual correspondió a 2.89 ng /ml (ver gráfico 04).



**Gráfico 04.** Niveles de progesterona en vacas gestantes, por razas.

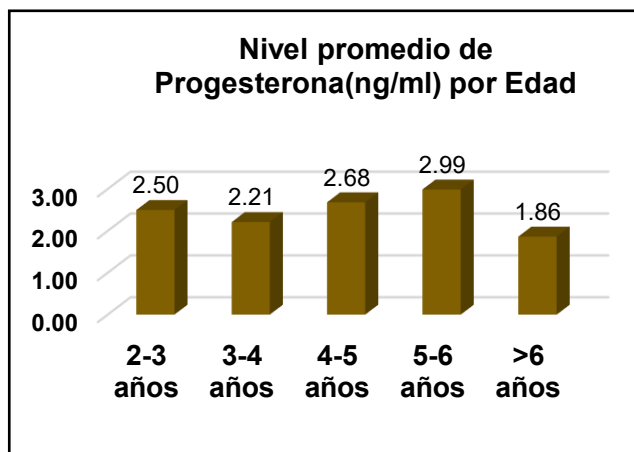
**Tabla 10.** Niveles de Progesterona (ng/ml) en vacas gestantes del distrito de Ancahuasi, por Edades.

Edad	n°	Mx	$\bar{x}$	SD
2-3 años	12	4.00	2.50	0.72
3-4 años	12	3.39	2.21	0.55
4-5 años	12	7.61	2.68	1.78
5-6 años	12	10.86	2.99	2.69
>6 años	12	2.58	1.86	0.34

**Fuente:** Elaboración propia

En la tabla 10, podemos observar los valores medios de los niveles de progesterona en las diferentes edades de vacas del distrito de Ancahuasi. Es así que se registró valores medios de  $2.50 \pm 0.72$  ng/ml para vacas de 2 a 3 años,  $2.21 \pm 0.55$  ng/ml para vacas de 3 a 4 años,  $2.68 \pm 1.78$  ng/ml para vacas de 4 a 5 años,  $2.99 \pm 2.69$  ng/ml para vacas de 5 a 6 años y  $1.86 \pm 0.34$  ng/ml para vacas >6 años.

Las vacas de 5 a 6 años mostraron un nivel promedio de progesterona, superior a las vacas de las otras edades, lo cual correspondió a 2.99 ng /ml (ver gráfico 05).



**Gráfico 05.** Niveles de progesterona en vacas gestantes, por edades.

En el presente trabajo de investigación se determinó los niveles medios de progesterona en vacas gestantes del distrito de Ancahuasi por razas y por edades. Se obtuvo valores medios de 2.29 ng/ml, 2.89 ng/ml y 2.17 ng/ml para las razas Híbrido, Holstein y Brown Swiss respectivamente, no habiendo diferencias significativas ( $P > 0.05$ ). De igual forma para el factor edad no hubo diferencias significativas ( $P > 0.05$ ), obteniendo valores medios de 2.50 ng/ml, 2.21 ng/ml, 2.68 ng/ml, 2.99 ng/ml y 1.86 ng/ml, para vacas de 2-3, 3-4, 4-5, 5-6 y >6 años respectivamente. Estos valores son inferiores a los obtenidos por **Mateos, A. (2010)**, quien al evaluar las concentraciones de progesterona en los días 12, 13 o 14 posinseminación, determinó concentraciones de progesterona ( $5,9 \pm 0,23$  ng/ml) fueron similares entre las vacas gestantes y las no gestantes ( $5,8 \pm 0,21$  ng/ml) ( $p > 0,05$ ). **Pinto & Chacón (2009)**. Indican que, en la vaca gestante, los valores de

progesterona en el plasma periférico, aumentan con el desarrollo del cuerpo lúteo hasta llegar a una concentración de 5-10ng/ml, en los días 15 a 20 después de la concepción, se cree que estas concentraciones permanecen constantes hasta algo antes del parto. Según **Holý, 1987**, estas variaciones se deben posiblemente, a que durante la gestación de la hembra bovina; otros órganos como la placenta y las glándulas suprarrenales producen P4, por lo que a medida que avanza la gestación los niveles de P4 periférica tienden a aumentar, mientras que en la vena ovárica disminuyen. **Grajales, H. (2009)** al hacer el análisis del comportamiento de los niveles de progesterona (NP) comparando entre los tipos de ciclos clasificados no se encontraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) en las fases foliculares(FF), fase luteal temprana(FLtp) y fase luteal media(FLm) entre el ciclo normal (CN) con el ciclo silencioso (CS), en los que se observa que la actividad luteal inicia en un NP entre 0.243 y 0.266 ng/ml en la FF (día 0) y se ubicó en valores entre 4.914 y 5.227 ng/ml en la FLm, a partir de la cual se empezaron a notar cambios en el comportamiento de la actividad luteal con diferencias significativas ( $p<0.01$ ) entre estos mismos tipos de ciclos, en la FLtr y FFf (día 20), encontrando en los CS un cuerpo lúteo con baja actividad luteal (3.922 y 0.233 ng/ml) y en regresión, la que se produce de una manera más rápida y brusca que en los CN (6.006 y 0.516 ng/ml).



## CAPITULO VI

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 6.1. CONCLUSIONES

1. Los niveles medios de la hormona estradiol, en vacas en edad reproductiva, de las razas Holstein, Brown Swiss e Híbrido fueron:  $34.20 \pm 71.94$ ,  $25.55 \pm 57.57$  y  $61.51 \pm 107.21$  pg. /ml respectivamente, no habiendo diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre razas. Sin embargo, en vacas de las edades de 2-3, 3-4, 4-5, 5-6 y  $> 6$  años, los niveles sanguíneos de estradiol fueron:  $98.63 \pm 146.03$ ,  $21.93 \pm 55.62$ ,  $28.65 \pm 38.98$ ,  $39.25 \pm 57.95$  y  $13.64 \pm 34.34$  pg/ml respectivamente, presentando diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ); siendo las vacas de 2 a 3 años de edad, las que presentaron niveles superiores frente a las otras edades evaluadas.
2. Los niveles medios de la hormona progesterona en vacas gestantes, de las razas Holstein, Brown Swiss e Híbrido fueron: de  $2.29 \pm 1.03$ ,  $2.89 \pm 2.32$  y  $2.17 \pm 0.53$  ng/ml respectivamente; no habiendo diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre razas. Asimismo, en vacas de las edades de 2-3, 3-4, 4-5, 5-6 y  $> 6$  años, los niveles medios fueron:  $2.50 \pm 0.72$ ,  $2.21 \pm 0.55$ ,  $2.68 \pm 1.78$ ,  $2.99 \pm 2.69$  y  $1.86 \pm 0.34$  ng/ml respectivamente, no presentando diferencias significativas ( $P > 0.05$ ). Concluyendo que la raza y la edad de las vacas, no influye en la concentración de la progesterona en la sangre.

## 6.2. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios para determinar niveles hormonales de progesterona en vacas gestantes considerando la etapa de gestación, la etapa de lactancia la que se encuentran, condición corporal y el tipo de alimentación que poseen.
- Realizar estudios para determinar niveles hormonales de estradiol en vacas edad reproductiva considerando la etapa del ciclo estral en la que se encuentran, condición corporal y el tipo de alimentación que poseen.
- La alimentación de las vacas lecheras se debe realizar de forma balanceada, ya que esta influye en la condición corporal de las vacas, por lo tanto en el tipo de balance energético que estas presenten, lo cual influye directamente en la producción de hormonas reproductivas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Báez S., Giovanni M. (2010).** *Relaciones hormonales y dinámica folicular durante el periodo posparto en vacas Sanmartinero.* Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Pg.57-60.
- Bartolome A., Julian (2009).** Endocrinología y fisiología de la gestación y el parto en bovino. *Journal of the Taurus.* Bs. As. 11(42) 20-28. Tandil. Provincia de Buenos Aires.
- Basu A.; Shrivastav T., G. & Maitra S., K. (2006).** A direct antigen heterologous enzyme immunoassay for measuring progesterone in serum without using displacer. *Journal of the Steroids;* 71:222-30.
- Butler W., R. (2000).** Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *In Rev of the Anim Reprod Sci;* 60-6: 449-457.
- Colazo, Marcos G. & Mapletoft, Reuben J. (2014).** Fisiología del ciclo estral bovino. *In Livestock Research Branch, Alberta Agriculture and Rural Development, Edmonton, Alberta, Canada.* Pg. 2-14.
- Concannon P., W. (1993).** Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. *In Rev. of the Reprod. Fert. (Suppl.)* 47: 3-27.
- Daniel A., R; Gaviglio A., L & Czaplicki L., M. (2010).** The progesterone receptor hinge region regulates the kinetics of transcriptional responses through acetylation, phosphorylation, and nuclear retention. *In Rev. of Mol Endocrinol;* 24(11): 2126-38.
- Endocrine Technogies. (2017).** Product profile and Instructions. *In Bovine Estradiol ELISA Kit.* Revised 1009.
- Endocrine Technogies. (2017).** Product profile and Instructions. *In Bovine Progesterone ELISA Kit.* Revised 1214.
- Erb, R.; Monk, E.; Mollett, T.; Malven, P. & Callahan, C. (1976).** Estrogen, Progesterone, Prolactin and Other Changes Associated with Bovine Lactation Induced with Estradiol-17 b and Progesterone, *Journal Anim Sci,* 42:644-654.

- Erb, R.E.; Estergree, V.L.; Gomes, V.L.; Plotka, E.D. & Frost, O.L. (1968).** Progesterin levels in corpora lutea and progesterone in ovarian venous and jugular vein blood plasma of the pregnant bovine. *Journal of Dairy Science* 3117: 1-10.
- Fatet, A.; Pellicer-Rubio M.T. & Leboeuf, B. (2011).** Reproductive cycle of goats. *In Rev of the Anim Reprod Sci*; 124:211-219.
- Gallastegui, C.; Bernardez, B.; Reguera, A.; Davila, C. & Leboeiro, B. (2002).** *Inmunología*. In Farmacia Hospitalaria (pp. 1078–1080).
- Ginther, O.J. (1974).** Internal regulation of physiological processes through local venoarterial pathways: a review. *Journal Anim Sci*; 39:550-564.
- Gómez, E.; Duato, L.; Domínguez, G.; Doménech, A.; Gómez, M. & Gutiérrez, B. (2011).** Compendio de guiones para clases teóricas en la asignatura Inmunología en Veterinaria III: técnicas inmunológicas. *In Rev. Reduca*; 3:94-121.
- Grajales L., Henry.; Hernández V., Aureliano. & Prieto, Esperanza. (2010).** Niveles de progesterona durante el ciclo normal y silencioso en bovinos en el trópico colombiano. *In Rev.MVZ Córdoba* 15(2):2060-2069.
- Gutiérrez A., Juan C. (2008).** *Hormonas de la reproducción bovina*. In Desarrollo Sostenible de Ganadería Doble Propósito. Pg. 517-521.
- Hernández, J. & Morales J., S. (2001).** Falla en la concepción en el ganado lechero: Evaluación de terapias hormonales. *In Rev. Vet. Mex*; 32(4):279-287.
- Holý, L. (1987).** *Introducción al proceso del examen de la fertilidad de la hembra y del macho*. In *Biología de la reproducción bovina*. 3ª Ed. Editorial Científico-Técnica, La Habana, Cuba. Pg. 172-173.
- Jenkin, G. & Young I., R. (2004).** Mechanisms responsible for parturition; the use of experimental models. *In Rev of Anim Reprod Sci*; 82-83:567-81.
- Jewell, T. (2002).** *Artificial induction of lactation in nonbreeder dairy cows*.

Disponible en: [www.scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-06242003-071849/unrestricted/final1.pdf](http://www.scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-06242003-071849/unrestricted/final1.pdf).

**Karir, T.; Samuel, G.; Sivaprasad, N. & Venkatesh, M. (2009).** Comparative evaluation of various solid phases for the development of coated tube assays for the estimation of progesterone in human serum, bovine serum and bovine milk. *In Rev. Appl Radiat Isot*, 67: 1965-73.

**Lenis S., Y. Y., Gutiérrez G., M. T., & Tarazona M., A. M. (2010).** Efectos de los Fitoestrógenos en la Reproducción Animal. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(2), 5555-5565.

**Mann G., E. (2009).** Corpus luteum size and plasma progesterone concentration in cows. *In Rev of Anim Reprod Sci*; 115:296-9.

**Mateos R., A.; Hernández C., J.; Morales R., J.S. & Rodríguez T., G. (2002).** Tamaño folicular, progesterona y estradiol plasmáticos en los días 12-14 posinseminación y porcentaje de concepción de vacas Holstein. *In Rev. Arch. Zootec.* 51: 327-334.

**Megias, Manuel.; Molist, Pilar. & Pombal, Manuel A. (2019).** *Órganos animales. Endocrino.* Atlas de la Universidad de Vigo. Pg. 1-10.

**Mellon, S. (1994).** Neurosteroids: biochemistry, modes of action and clinical relevance. *Journal Clin Endocrinol Meta.* 78(2):1003-1008.

**Menchaca, A. & Rubianes, E. (2001).** Relation between progesterone concentrations during the early luteal phase and follicular dynamics in goats. *In Rev of Theriogenology*; 57:1411-19.

**Moreno O., Patricia; Montaldo V., Hugo; García O., Carlos, Hernández C., Joel (2016).** Concentraciones séricas de progesterona al momento de la inseminación y tasa de gestación en vacas lecheras. *In Rev Abanico Veterinario* ISSN 2448-6132; 6(2):22-29.

**Morris, D. & Diskin, M. (2008).** Effect of progesterone on embryo survival. *In Rev of Animal.* 2:1112-19.

- Nett T., M.; Crowder M., E. & Wise M., E. (1984).** The role of estradiol in inducing an ovulatory-like surge of LH in sheep. *In Rev. Biol Reprod*; 30:1208-1215.
- Olson P., N.; Bowen R., A.; Behrendt, M.; Olson J., D. & Nett T., M. (1982).** Concentration of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus and estrus. *In Rev. of the Biol. Reprod*; 27: 1196-1206.
- Perea, F., Gonzalez, R., Cruz, R., Soto, E., Rincon, E., Gonzalez, C., y otros. (1998).** Evaluación Ultrasonográfica de la dinámica folicular en vacas y novillas mestizas. *En Revista Científica, FCV- Luz, VIII. (1), 14-24.*
- Pinto P., Marco T. & Chacón G., Mario R. (2009).** *Comparación de las concentraciones plasmáticas de Progesterona en vacas implantadas con dispositivos intravaginales y vacas gestantes.* Tesis. Universidad de Zamorano-Honduras. Pg. 20-21.
- Rahe C., H.; Owens R., E.; Fleeger J., L.; Newton H., J. & Harms P., G. (1980).** Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle. *In Rev. Endocrinology*; 107:498–503.
- Ramírez, Lilido. (2006).** El sistema endocrino de los animales domésticos. *In Rev. Mundo Pecuario*, Vol. II, N° 1, 11-15.
- Rekawiecki, R. & Kotwika K., J. (2011).** Nuclear progesterone receptor isoforms and their functions in the female reproductive tract. *Journal Vterin Scien*: 14(1): 149-58.
- Ribeiro, P. (2009).** *Inducao artificial de lactacao em bovinos.* Tesis de Maestría. UFMG- Escola de Veterinaria. Belo Horizonte, Brasil, 38p.
- Ríos Y., José M.; Mercadillo P., Patricia; Yuil de Ríos, Emma & Ríos C., Manuel. (2012).** ELISA y sus aplicaciones en dermatología. *In Rev. Dermatología CMQ*; 10(3): 212-222.
- Robel, O. & Baulieu E., E. (1994).** Neurosteroids: biosynthesis and function. *In Rev. Trends Endocrinol Metab*, 5:1-8.

- Rodriguez R., M. A. (2004).** Utilizacion de tecnicas geneticas (PCR Y PCR cuantitativo en tiempo real) e inmunologicas (ELISA), para la deteccion y cuantificacion de diferentes especies animales. *Manual of the Universidad Complutense de Madrid.* p. 37.
- SENAMHI(2014).**Datos meteorologicos del Cusco. Portal de transparencia de SENAMHI. In <https://www.senamhi.gob.pe/main.php?dp=cusco&p=descarga-datos hidrometeorologicos>.
- Sintex. (2005).** Fisiología reproductiva del bovino. *In Sitio Argentino de Producción Animal.* Pg. 1-4.
- Spencer T., E; Burghardt R., C.; Johnson G., A. & Bazer F., W. (2004).** Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *In Rev of Anim Reprod Sci.* 82-83:537-50.
- Stevenson J., S. (2007).** Clinical reproductive physiology. In: Youngquist RS, Threlfall WR editors. Large Animal Theriogenology 2. *In Rev. St. Louis, Missouri: Saunders:* 258-270.
- Stojilkovic S., S; Reinhart, J. & Catt K., J. (1994).** Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocrine Rev.* 15: 462-499.
- Tucker H., A. (2000).** Symposium: Hormonal Regulation of milk Synthesis. Hormones, Mammary Growth, and Lactation: a 41-year perspective. *Journal Dairy Sci,* 83:874-884.
- Vega R., G. B. (2009).** Antígenos e inmunógenos. *Rev Fac Med UNAM.,* 52(1), 41–42.
- Vivanco, Manuel.(2005).**Muestreo de poblaciones finitas. In Muestreo estadístico, diseño y aplicaciones.
- Zarazaga L., A; Gatica M., C; Celi, I.; Guzmán J., L & Malpoux, B. (2011).** Artificial long days and daily contact with bucks induce ovarian but not oestrous activity

during the non-breeding season in Mediterranean goat females. *In Rev of Anim Reprod Sci.* 125:81-7.



# **ANEXOS**

**ANEXO 01.** Cálculos para determinar el tamaño de muestra del distrito de Ancahuasi.

$$n = \frac{N * Z^2 p * q}{(N - 1) * E^2 + Z^2 (p * q)}$$

**Dónde:**

**N:** tamaño poblacional

**Z:** 1.81, nivel de confianza que se da a la muestra

**p:** animales positivos 0.5

**q:** animales negativos 0.5

**E:** error experimental 0.07

**n:** tamaño de muestra

$$n = \frac{1480 \times (1.81)^2 (0.5 \times 0.5)}{(1480 - 1)(0.07)^2 + (1.81)^2 (0.5 \times 0.5)}$$

$$n = \frac{1212.12}{8.07}$$

$$n = 150.20$$

$$n = 150$$

## ANEXO 02. Registro Fotográfico del trabajo de investigación



**Fotografía 09.** Toma de muestras de sangre de vacunos.



**Fotografía 10.** Kit de Elisa, para detección de Estradiol, a temperatura ambiente, antes de iniciar la prueba de diagnóstico.



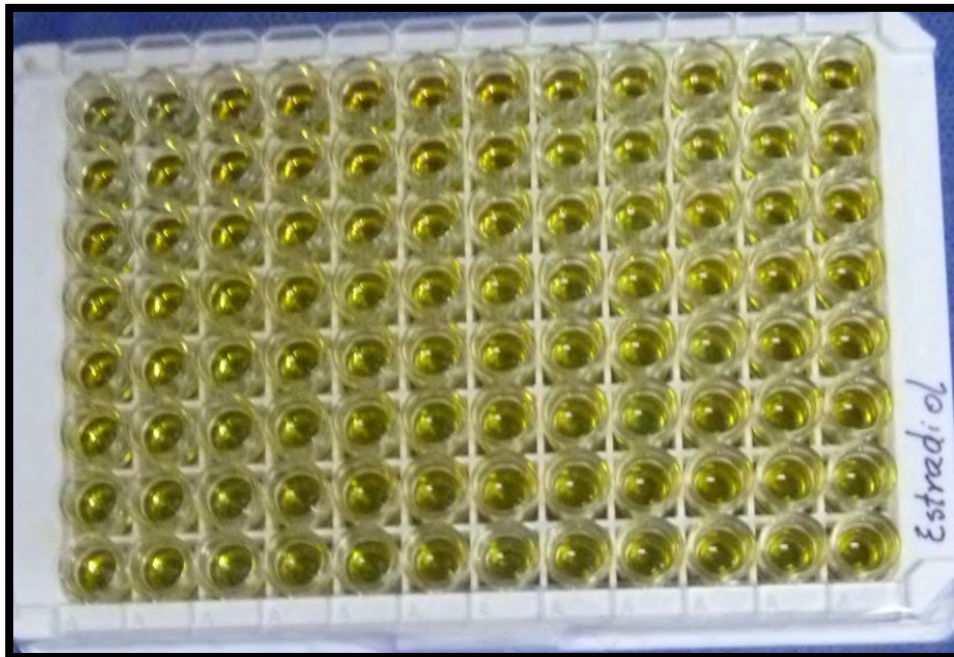
**Fotografía 11.** Materiales utilizados para detección de Estradiol y progesterona, a temperatura ambiente, antes de iniciar la prueba de diagnóstico.



**Fotografía 12.** Preparación de la solución de lavado para Estradiol y para Progesterona.



**Fotografía 13.** Homogenización de las muestras de suero sanguíneo, antes de realizar la prueba de ELISA.



**Fotografía 14.** Coloración de la Placa ELISA para Estradiol.



**Fotografía 15.** Coloración de la Placa ELISA para progesterona

**ANEXO 03.** Lectura de las Densidades ópticas para estradiol, distrito de Ancahuasi (placa I).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.569	0.523	2.974	3.114	2.704	2.929	3.63	2.938	3.605	3.396	3.543	3.514
B	1.131	1.013	2.986	2.742	2.605	3.162	1.94	2.128	2.936	2.491	3.495	1.863
C	1.793	1.357	2.812	2.489	2.904	3.051	2.434	2.057	3.054	3.147	1.839	3.322
D	2.284	2.144	2.512	3.079	3.114	3.039	2.111	2.886	2.607	3.371	3.385	3.545
E	2.813	2.817	2.481	2.793	2.786	2.687	2.94	2.932	2.732	3.152	3.528	3.352
F	2.828	2.82	1.957	2.916	2.917	2.844	2.262	2.023	3.207	3.199	3.351	3.504
G	3.95	3.568	1.89	2.831	2.955	3.056	2.994	3.189	3.014	3.314	3.465	3.44
H	1.946	1.669	2.879	2.409	2.953	2.851	3.01	3.158	3.012	3.375	3.462	2.332

Fuente: Elaboración propia

**ANEXO 04.** Lectura de las Densidades ópticas para estradiol, distrito de Ancahuasi (placa II).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>0.569</b>	<b>0.523</b>	3.551									
<b>B</b>	<b>1.131</b>	<b>1.013</b>	3.452									
<b>C</b>	<b>1.793</b>	<b>1.357</b>	3.511									
<b>D</b>	<b>2.284</b>	<b>2.144</b>	3.596									
<b>E</b>	<b>2.813</b>	<b>2.817</b>	3.602									
<b>F</b>	<b>2.828</b>	<b>2.82</b>	3.444									
<b>G</b>	<b>3.95</b>	<b>3.568</b>										
<b>H</b>	3.698	2.24										

Fuente: Elaboración propia

**ANEXO 05.** Lectura de las Densidades ópticas para Progesterona, distrito de Ancahuasi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>0.678</b>	<b>0.612</b>	0.326	0.3	0.321	0.326	0.284	0.312	0.331	0.282		
<b>B</b>	<b>0.531</b>	<b>0.489</b>	0.522	0.289	0.367	0.319	0.315	0.284	0.334	0.283		
<b>C</b>	<b>0.437</b>	<b>0.401</b>	0.327	0.286	0.424	0.286	0.289	0.287	0.413			
<b>D</b>	<b>0.341</b>	<b>0.317</b>	0.318	0.315	0.312	0.299	0.288	0.323	0.303			
<b>E</b>	<b>0.27</b>	<b>0.21</b>	0.332	0.305	0.359	0.297	0.316	0.282	0.283			
<b>F</b>	<b>0.29</b>	<b>0.19</b>	0.288	0.327	0.309	0.298	0.282	0.287	0.282			
<b>G</b>	<b>0.265</b>	<b>0.252</b>	0.474	0.323	0.388	0.298	0.285	0.286	0.288			
<b>H</b>	0.358	0.33	0.372	0.349	0.314	0.315	0.284	0.283	0.282			

Fuente: Elaboración propia

## ANEXO 06. Determinación de los niveles de estradiol fue a través del Software *elisaanalysis*

**elisaanalysis.com**

Assay ID	Kit Target	Kit Product Code	Created Date	Regression Algorithm
ESTRADIOL	ENDOCRINE TECHNOLOGIES	CA-94560	2019-10-11 07:39:07	4-Parameter Logistic Regression

» Find out more about the formulas (<http://elisaanalysis.com/knowledge-base/elisa-software-4-parameter-logistic-4pl-nonlinear-regression>)

**Regression Formula:**  $y = d + \frac{a-d}{1+(x/c)^b}$

**Inverse Formula:**  $x = c \left( \frac{a-d}{y-d} - 1 \right)^{\frac{1}{b}}$

Where:

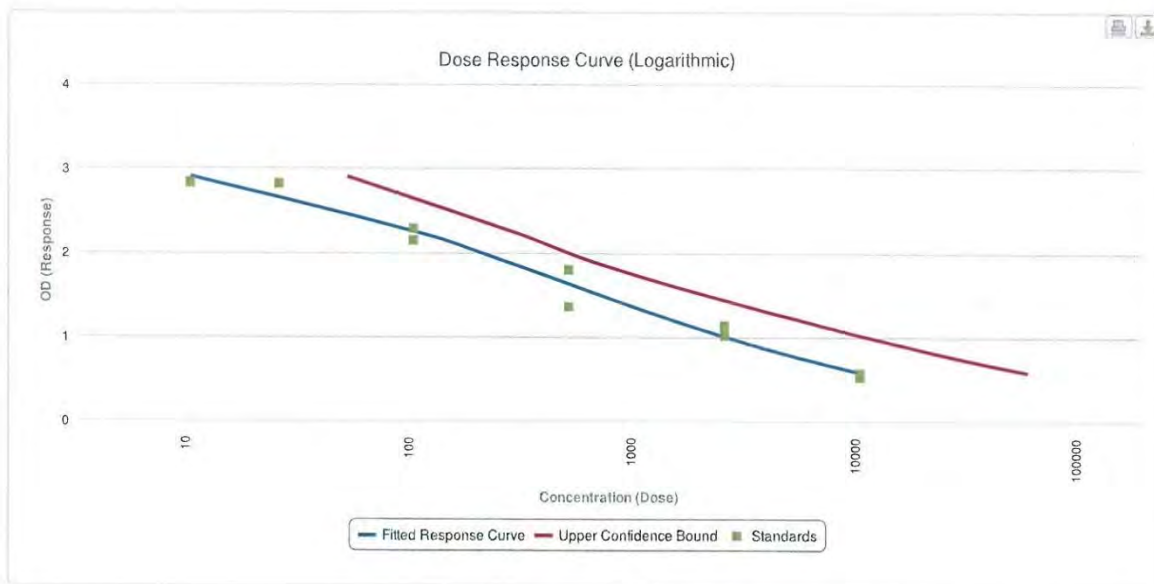
y = Response Value eg. OD

x = Dose Value eg. Concentration

and the constants/parameters are as follows:

a	b	c	d
3.3873939	0.468844	478.163175	-0.0990818

**R<sup>2</sup> value:** 0.9801208





Well Category	Well	Well Position	Well Optical Density	Mean Optical Density	Mean Concentration	Confidence Interval
Unknown	U1	H1	1.946	1.946	226.74	-102.762 - 556.242
Unknown	U2	H2	1.669	1.669	449.958	-300.823 - 1200.738
Unknown	U3	A3	2.974	2.974	6.628	-23.268 - 36.523
Unknown	U4	B3	2.986	2.986	6.173	-22.172 - 34.517
Unknown	U5	C3	2.812	2.812	15.06	-38.962 - 69.082
Unknown	U6	D3	2.512	2.512	46.48	-65.426 - 158.386
Unknown	U7	E3	2.481	2.481	51.353	-67.418 - 170.123
Unknown	U8	F3	1.957	1.957	220.528	-100.068 - 541.123
Unknown	U9	G3	1.887	1.887	262.909	-121.8 - 647.619
Unknown	U10	H3	2.879	2.879	11.017	-32.335 - 54.37
Unknown	U11	A4	3.114	3.114	2.495	-11.576 - 16.566
Unknown	U12	B4	2.742	2.742	20.263	-45.855 - 86.382
Unknown	U13	C4	2.489	2.489	50.059	-66.923 - 167.041
Unknown	U14	D4	3.079	3.079	3.302	-14.244 - 20.849
Unknown	U15	E4	2.793	2.793	16.367	-40.846 - 73.58
Unknown	U16	F4	2.916	2.916	9.133	-28.735 - 47.002
Unknown	U17	G4	2.831	2.831	13.826	-37.077 - 64.729
Unknown	U18	H4	2.409	2.409	64.207	-71.265 - 199.68
Unknown	U19	A5	2.704	2.704	23.56	-49.503 - 96.624
Unknown	U20	B5	2.605	2.605	33.947	-58.376 - 126.27
Unknown	U21	C5	2.904	2.904	9.719	-29.895 - 49.333
Unknown	U22	D5	3.114	3.114	2.495	-11.576 - 16.566
Unknown	U23	E5	2.786	2.786	16.868	-41.538 - 75.274
Unknown	U24	F5	2.917	2.917	9.086	-28.639 - 46.81
Unknown	U25	G5	2.955	2.955	7.392	-25.03 - 39.813
Unknown	U26	H5	2.953	2.953	7.475	-25.217 - 40.167
Unknown	U27	A6	2.929	2.929	8.526	-27.488 - 44.54
Unknown	U28	B6	3.162	3.162	1.601	-8.26 - 11.463
Unknown	U29	C6	3.051	3.051	4.051	-16.513 - 24.614
Unknown	U30	D6	3.039	3.039	4.401	-17.519 - 26.32
Unknown	U31	E6	2.687	2.687	25.152	-51.101 - 101.405
Unknown	U32	F6	2.844	2.844	13.022	-35.788 - 61.833
Unknown	U33	G6	3.056	3.056	3.91	-16.1 - 23.92
Unknown	U34	H6	2.851	2.851	12.603	-35.096 - 60.302
Unknown	U35	A7	3.63	3.63	0	No data
Unknown	U36	B7	1.94	1.94	230.196	-104.334 - 564.726
Unknown	U37	C7	2.434	2.434	59.487	-70.055 - 189.029
Unknown	U38	D7	2.111	2.111	148.266	-80.56 - 377.092
Unknown	U39	E7	2.94	2.94	8.033	-26.442 - 42.508
Unknown	U40	F7	2.262	2.262	98.445	-75.996 - 272.886
Unknown	U41	G7	2.994	2.994	5.881	-21.45 - 33.211

Unknown	U42	H7	3.01	3.01	5.323	-20.025 - 30.672
Unknown	U43	A8	2.938	2.938	8.121	-26.631 - 42.874
Unknown	U44	B8	2.128	2.128	141.75	-79.727 - 363.227
Unknown	U45	C8	2.057	2.057	170.741	-84.452 - 425.934
Unknown	U46	D8	2.886	2.886	10.643	-31.649 - 52.935
Unknown	U47	E8	2.932	2.932	8.39	-27.202 - 43.981
Unknown	U48	F8	2.023	2.023	186.396	-88.252 - 461.045
Unknown	U49	G8	3.189	3.189	1.199	-6.59 - 8.988
Unknown	U50	H8	3.158	3.158	1.667	-8.52 - 11.854
Unknown	U51	A9	3.605	3.605	0	No data
Unknown	U52	B9	2.936	2.936	8.21	-26.821 - 43.242
Unknown	U53	C9	3.054	3.054	3.966	-16.265 - 24.196
Unknown	U54	D9	2.607	2.607	33.709	-58.209 - 125.627
Unknown	U55	E9	2.732	2.732	21.097	-46.824 - 89.018
Unknown	U56	F9	3.207	3.207	0.967	-5.562 - 7.497
Unknown	U57	G9	3.014	3.014	5.189	-19.673 - 30.052
Unknown	U58	H9	3.012	3.012	5.256	-19.849 - 30.361
Unknown	U59	A10	3.396	3.396	0	No data
Unknown	U60	B10	2.491	2.491	49.74	-66.797 - 166.276
Unknown	U61	C10	3.147	3.147	1.856	-9.251 - 12.962
Unknown	U62	D10	3.371	3.371	0.005	-0.063 - 0.073
Unknown	U63	E10	3.152	3.152	1.768	-8.916 - 12.453
Unknown	U64	F10	3.199	3.199	1.066	-6.011 - 8.144
Unknown	U65	G10	3.314	3.314	0.133	-1.076 - 1.341
Unknown	U66	H10	3.375	3.375	0.003	-0.037 - 0.042
Unknown	U67	A11	3.543	3.543	0	No data
Unknown	U68	B11	3.495	3.495	0	No data
Unknown	U69	C11	1.839	1.839	296.236	-144.283 - 736.755
Unknown	U70	D11	3.385	3.385	0	-0.001 - 0.002
Unknown	U71	E11	3.528	3.528	0	No data
Unknown	U72	F11	3.351	3.351	0.029	-0.288 - 0.346
Unknown	U73	G11	3.465	3.465	0	No data
Unknown	U74	H11	3.462	3.462	0	No data
Unknown	U75	A12	3.514	3.514	0	No data
Unknown	U76	B12	1.863	1.863	279.105	-132.149 - 690.359
Unknown	U77	C12	3.322	3.322	0.103	-0.868 - 1.074
Unknown	U78	D12	3.545	3.545	0	No data
Unknown	U79	E12	3.352	3.352	0.027	-0.273 - 0.328
Unknown	U80	F12	3.504	3.504	0	No data
Unknown	U81	G12	3.44	3.44	0	No data
Unknown	U82	H12	2.332	2.332	80.657	-74.184 - 235.498
Standard	S1	A1,A2	0.569,0.523	0.546	10000	N/A
Standard	S2	B1,B2	1.131,1.013	1.072	2500	N/A
Standard	S3	C1,C2	1.793,1.357	1.575	500	N/A

Well Category	Well	Well Position	Well Optical Density	Mean Optical Density	Mean Concentration	Confidence Interval
Unknown	U1	H1	3.698	3.698	0	No data
Unknown	U2	H2	2.24	2.24	104.664	-76.481 - 285.81
Unknown	U3	A3	3.551	3.551	0	No data
Unknown	U4	B3	3.452	3.452	0	No data
Unknown	U5	C3	3.511	3.511	0	No data
Unknown	U6	D3	3.596	3.596	0	No data
Unknown	U7	E3	3.602	3.602	0	No data
Unknown	U8	F3	3.444	3.444	0	No data
Standard	S1	A1,A2	0.569,0.523	0.546	10000	N/A
Standard	S2	B1,B2	1.131,1.013	1.072	2500	N/A
Standard	S3	C1,C2	1.793,1.357	1.575	500	N/A
Standard	S4	D1,D2	2.284,2.144	2.214	100	N/A
Standard	S5	E1,E2	2.813,2.817	2.815	25	N/A
Standard	S6	F1,F2	2.828,2.82	2.824	10	N/A

**ANEXO 07.** Determinación de los niveles de progesterona fue a través del Software *elisaanalysis*.



Assay ID	Kit Target	Kit Product Code	Created Date	Regression Algorithm
PROGESTERONA	ENDOCRINE TECHNOLOGIES	CA-94560	2019-10-08 10:23:36	4-Parameter Logistic Regression

» Find out more about the formulas (<http://elisaanalysis.com/knowledge-base/elisa-software-4-parameter-logistic-4pl-nonlinear-regression>)

**Regression Formula:**  $y = d + \frac{a-d}{1+(x/c)^b}$

**Inverse Formula:**  $x = c\left(\frac{a-d}{y-d} - 1\right)^{\frac{1}{b}}$

Where:

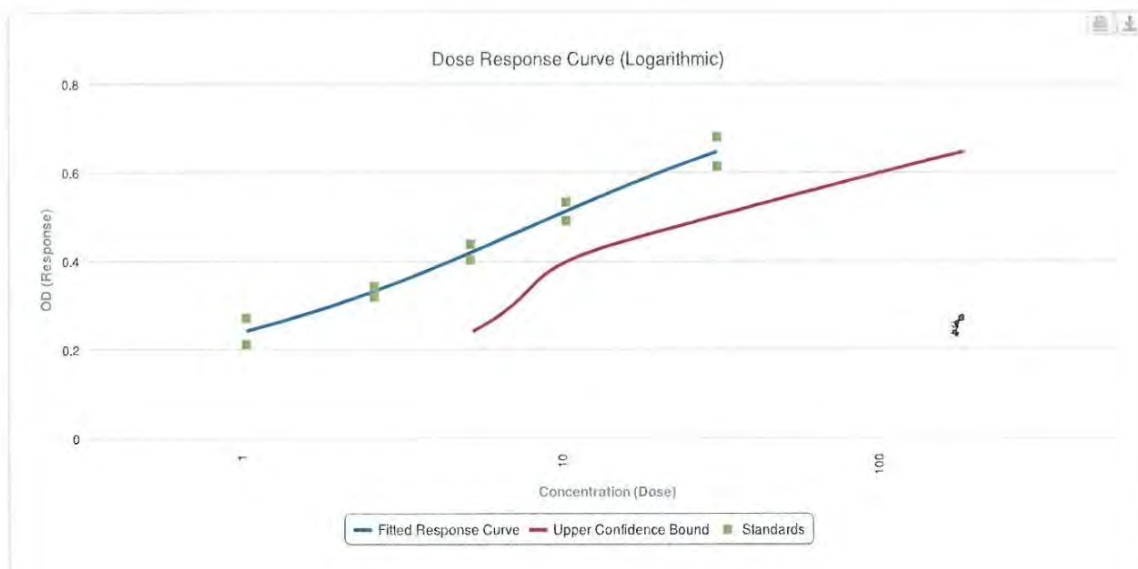
y = Response Value eg. OD

x = Dose Value eg. Concentration

and the constants/parameters are as follows:

a	b	c	d
0.8329809	-0.7498917	7.4010171	0.107446

**R<sup>2</sup> value:** 0.9715147



Well Category	Well	Well Position	Well Optical Density	Mean Optical Density	Mean Concentration	Confidence Interval
Unknown	U1	H1	0.358	0.358	3.154	-1.94 - 8.248
Unknown	U2	H2	0.33	0.33	2.495	-2.539 - 7.529
Unknown	U3	A3	0.326	0.326	2.41	-2.615 - 7.435
Unknown	U4	B3	0.522	0.522	10.859	-17.258 - 38.976
Unknown	U5	C3	0.327	0.327	2.431	-2.596 - 7.458
Unknown	U6	D3	0.318	0.318	2.246	-2.755 - 7.246
Unknown	U7	E3	0.332	0.332	2.538	-2.499 - 7.576
Unknown	U8	F3	0.288	0.288	1.696	-3.111 - 6.503
Unknown	U9	G3	0.474	0.474	7.61	-6.614 - 21.834
Unknown	U10	H3	0.372	0.372	3.529	-1.659 - 8.717
Unknown	U11	A4	0.3	0.3	1.904	-3.003 - 6.811
Unknown	U12	B4	0.289	0.289	1.713	-3.104 - 6.53
Unknown	U13	C4	0.286	0.286	1.663	-3.124 - 6.45
Unknown	U14	D4	0.315	0.315	2.186	-2.804 - 7.175
Unknown	U15	E4	0.305	0.305	1.995	-2.944 - 6.935
Unknown	U16	F4	0.327	0.327	2.431	-2.596 - 7.458
Unknown	U17	G4	0.323	0.323	2.347	-2.67 - 7.364
Unknown	U18	H4	0.349	0.349	2.93	-2.138 - 7.997
Unknown	U19	A5	0.321	0.321	2.306	-2.705 - 7.317
Unknown	U20	B5	0.367	0.367	3.391	-1.753 - 8.536
Unknown	U21	C5	0.424	0.424	5.259	-1.982 - 12.501
Unknown	U22	D5	0.312	0.312	2.127	-2.849 - 7.104
Unknown	U23	E5	0.359	0.359	3.18	-1.919 - 8.278
Unknown	U24	F5	0.309	0.309	2.07	-2.892 - 7.032
Unknown	U25	G5	0.388	0.388	4.001	-1.448 - 9.45
Unknown	U26	H5	0.314	0.314	2.166	-2.819 - 7.152
Unknown	U27	A6	0.326	0.326	2.41	-2.615 - 7.435
Unknown	U28	B6	0.319	0.319	2.266	-2.739 - 7.27
Unknown	U29	C6	0.286	0.286	1.663	-3.124 - 6.45
Unknown	U30	D6	0.299	0.299	1.886	-3.014 - 6.786
Unknown	U31	E6	0.297	0.297	1.851	-3.034 - 6.736
Unknown	U32	F6	0.298	0.298	1.868	-3.024 - 6.761
Unknown	U33	G6	0.298	0.298	1.868	-3.024 - 6.761
Unknown	U34	H6	0.315	0.315	2.186	-2.804 - 7.175
Unknown	U35	A7	0.284	0.284	1.63	-3.136 - 6.397
Unknown	U36	B7	0.315	0.315	2.186	-2.804 - 7.175
Unknown	U37	C7	0.289	0.289	1.713	-3.104 - 6.53
Unknown	U38	D7	0.288	0.288	1.696	-3.111 - 6.503
Unknown	U39	E7	0.316	0.316	2.206	-2.788 - 7.199
Unknown	U40	F7	0.282	0.282	1.598	-3.147 - 6.343
Unknown	U41	G7	0.285	0.285	1.647	-3.13 - 6.424

Unknown	U42	H7	0.284	0.284	1.63	-3.136 - 6.397
Unknown	U43	A8	0.312	0.312	2.127	-2.849 - 7.104
Unknown	U44	B8	0.284	0.284	1.63	-3.136 - 6.397
Unknown	U45	C8	0.287	0.287	1.68	-3.118 - 6.477
Unknown	U46	D8	0.323	0.323	2.347	-2.67 - 7.364
Unknown	U47	E8	0.282	0.282	1.598	-3.147 - 6.343
Unknown	U48	F8	0.287	0.287	1.68	-3.118 - 6.477
Unknown	U49	G8	0.286	0.286	1.663	-3.124 - 6.45
Unknown	U50	H8	0.283	0.283	1.614	-3.142 - 6.37
Unknown	U51	A9	0.331	0.331	2.517	-2.519 - 7.552
Unknown	U52	B9	0.334	0.334	2.582	-2.459 - 7.624
Unknown	U53	C9	0.413	0.413	4.843	-1.62 - 11.305
Unknown	U54	D9	0.303	0.303	1.958	-2.969 - 6.885
Unknown	U55	E9	0.283	0.283	1.614	-3.142 - 6.37
Unknown	U56	F9	0.282	0.282	1.598	-3.147 - 6.343
Unknown	U57	G9	0.288	0.288	1.696	-3.111 - 6.503
Unknown	U58	H9	0.282	0.282	1.598	-3.147 - 6.343
Unknown	U59	A10	0.282	0.282	1.598	-3.147 - 6.343
Unknown	U60	B10	0.283	0.283	1.614	-3.142 - 6.37
Standard	S1	A1,A2	0.678,0.612	0.645	30	N/A
Standard	S2	B1,B2	0.531,0.489	0.51	10	N/A
Standard	S3	C1,C2	0.437,0.401	0.419	5	N/A
Standard	S4	D1,D2	0.341,0.317	0.329	2.5	N/A
Standard	S5	E1,E2	0.27,0.21	0.24	1	N/A

**ANEXO 08.** Análisis estadístico de los niveles de concentración de estradiol de las vacas en edad reproductiva del distrito de Ancahuasi

Variable dependiente: ESTRADIOL (pg/ml)

Factores:

EDAD

RAZA

Número de casos completos: 90

**Análisis de Varianza para ESTRADIOL (pg/ml) - Suma de Cuadrados Tipo III**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>
EFFECTOS PRINCIPALES				
A:EDAD	82582.1	4	20645.5	3.26
B:RAZA	21132.1	2	10566.0	1.67
INTERACCIONES				
AB	21654.9	8	2706.86	0.43
RESIDUOS	475295.	75	6337.27	
TOTAL (CORREGIDO)	600664.	89		

<i>Fuente</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES	
A:EDAD	0.0161
B:RAZA	0.1957
INTERACCIONES	
AB	0.9013
RESIDUOS	
TOTAL (CORREGIDO)	

Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre ESTRADIOL (pg/ml) con un 95.0% de nivel de confianza.

**Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para ESTRADIOL (pg/ml) con intervalos de confianza del 95.0%**

			<i>Error</i>	<i>Límite</i>	<i>Límite</i>
<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Est.</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
MEDIA GLOBAL	90	40.4184			
EDAD					
1	18	98.6323	18.7635	61.2534	136.011
2	18	21.9269	18.7635	-15.452	59.3059
3	18	28.6469	18.7635	-8.73209	66.0259
4	18	39.2475	18.7635	1.86852	76.6265

5	18	13.6386	18.7635	-23.7404	51.0175
RAZA					
1	30	34.1966	14.5342	5.24294	63.1502
2	30	25.5525	14.5342	-3.4011	54.5062
3	30	61.5062	14.5342	32.5526	90.4599
EDAD por RAZA					
1,1	6	84.9868	32.4994	20.2445	149.729
1,2	6	52.3603	32.4994	-12.382	117.103
1,3	6	158.55	32.4994	93.8075	223.292
2,1	6	8.78183	32.4994	-55.9605	73.5241
2,2	6	14.0982	32.4994	-50.6441	78.8405
2,3	6	42.9008	32.4994	-21.8415	107.643
3,1	6	30.5197	32.4994	-34.2226	95.262
3,2	6	18.2205	32.4994	-46.5218	82.9628
3,3	6	37.2005	32.4994	-27.5418	101.943
4,1	6	39.334	32.4994	-25.4083	104.076
4,2	6	38.4315	32.4994	-26.3108	103.174
4,3	6	39.977	32.4994	-24.7653	104.719
5,1	6	7.3605	32.4994	-57.3818	72.1028
5,2	6	4.65217	32.4994	-60.0901	69.3945
5,3	6	28.903	32.4994	-35.8393	93.6453

### Pruebas de Múltiple Rangos para ESTRADIOL (pg/ml) por EDAD

Método: 95.0 porcentaje LSD

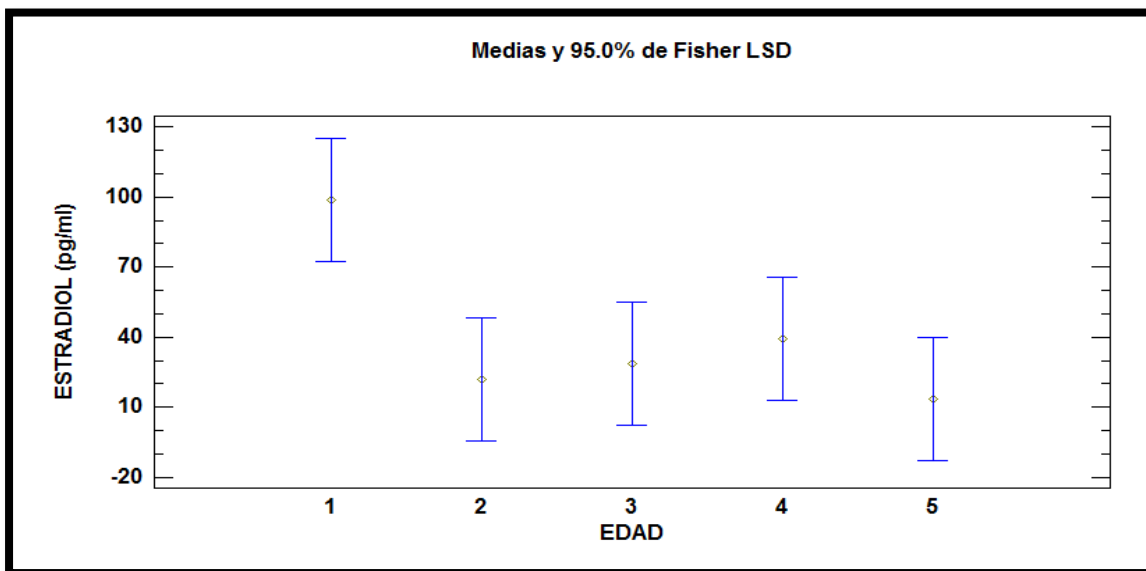
EDAD	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
5	18	13.6386	18.7635	X
2	18	21.9269	18.7635	X
3	18	28.6469	18.7635	X
4	18	39.2475	18.7635	X
1	18	98.6323	18.7635	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1 - 2	*	76.7054	52.8619
1 - 3	*	69.9854	52.8619
1 - 4	*	59.3848	52.8619
1 - 5	*	84.9938	52.8619
2 - 3		-6.71994	52.8619
2 - 4		-17.3206	52.8619
2 - 5		8.28839	52.8619
3 - 4		-10.6006	52.8619
3 - 5		15.0083	52.8619
4 - 5		25.6089	52.8619

\* indica una diferencia significativa.



**ANEXO 09.** Comparación de medias de Fisher LSD para los niveles de estradiol en vacas en edad reproductiva, por edades.



**ANEXO 10.** Análisis estadístico de los niveles de concentración de estradiol de las vacas en edad reproductiva del distrito de Ancahuasi.

Variable dependiente: PROGESTERONA (ng/ml)

Factores:

EDAD

RAZA

Número de casos completos: 60

**Análisis de Varianza para PROGESTERONA (ng/ml) - Suma de Cuadrados Tipo III**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>				
A:EDAD	8.99014	4	2.24754	0.92
B:RAZA	5.85655	2	2.92828	1.20
<b>INTERACCIONES</b>				
AB	9.27008	8	1.15876	0.48
RESIDUOS	109.707	45	2.43793	
TOTAL (CORREGIDO)	133.824	59		

<i>Fuente</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES	
A:EDAD	0.4596
B:RAZA	0.3103
INTERACCIONES	
AB	0.8671
RESIDUOS	
TOTAL (CORREGIDO)	

Puesto que ningún valor-P es menor que 0.05, ninguno de los factores o interacciones tiene un efecto estadísticamente significativo sobre el NIVEL DE PROGESTERONA (ng/ml) con un 95.0% de nivel de confianza.

**Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para PROGESTERONA (ng/ml) con intervalos de confianza del 95.0%**

			<i>Error</i>	<i>Límite</i>	<i>Límite</i>
<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Est.</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
MEDIA GLOBAL	60	2.44858			
EDAD					
1	12	2.49783	0.450733	1.59001	3.40566
2	12	2.21025	0.450733	1.30242	3.11808
3	12	2.68233	0.450733	1.77451	3.59016
4	12	2.98942	0.450733	2.08159	3.89724
5	12	1.86308	0.450733	0.955258	2.77091
RAZA					
1	20	2.2883	0.349137	1.5851	2.9915
2	20	2.8853	0.349137	2.1821	3.5885
3	20	2.17215	0.349137	1.46895	2.87535
EDAD por RAZA					
1,1	4	2.367	0.780693	0.7946	3.9394
1,2	4	2.78225	0.780693	1.20985	4.35465
1,3	4	2.34425	0.780693	0.77185	3.91665
2,1	4	1.8545	0.780693	0.2821	3.4269
2,2	4	2.1255	0.780693	0.5531	3.6979
2,3	4	2.65075	0.780693	1.07835	4.22315
3,1	4	2.54525	0.780693	0.97285	4.11765
3,2	4	3.5605	0.780693	1.9881	5.1329
3,3	4	1.94125	0.780693	0.36885	3.51365
4,1	4	2.722	0.780693	1.1496	4.2944
4,2	4	4.08975	0.780693	2.51735	5.66215
4,3	4	2.1565	0.780693	0.5841	3.7289
5,1	4	1.95275	0.780693	0.38035	3.52515
5,2	4	1.8685	0.780693	0.2961	3.4409
5,3	4	1.768	0.780693	0.1956	3.3404

### Pruebas de Múltiple Rangos para PROGESTERONA (ng/ml) por EDAD

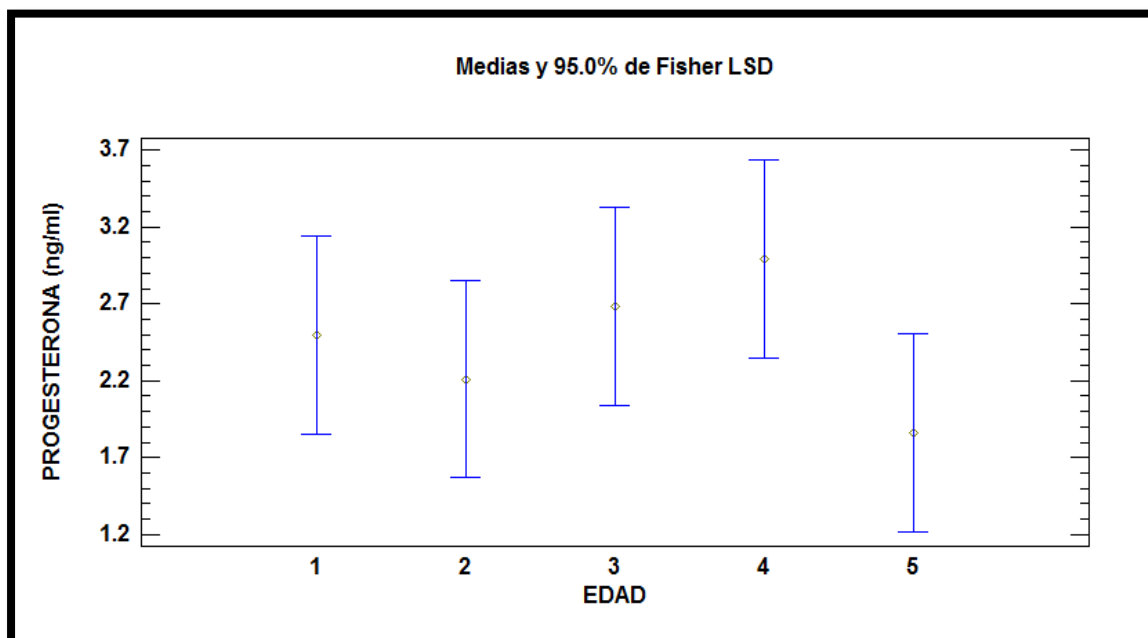
Método: 95.0 porcentaje LSD

EDAD	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
5	12	1.86308	0.450733	X
2	12	2.21025	0.450733	X
1	12	2.49783	0.450733	X
3	12	2.68233	0.450733	X
4	12	2.98942	0.450733	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1 - 2		0.287583	1.28386
1 - 3		-0.1845	1.28386
1 - 4		-0.491583	1.28386
1 - 5		0.63475	1.28386
2 - 3		-0.472083	1.28386
2 - 4		-0.779167	1.28386
2 - 5		0.347167	1.28386
3 - 4		-0.307083	1.28386
3 - 5		0.81925	1.28386
4 - 5		1.12633	1.28386

\* indica una diferencia significativa.

**ANEXO 11.** Comparación de medias de Fisher LSD para los niveles de progesterona en vacas gestantes, por edades.



**ANEXO 12.** Registro de Vacunos y resultados a la prueba de ELISA para determinar niveles de estradiol en vacas en edad reproductiva del distrito de Ancahuasi.

N°	Nombre/ Propietario	N° Muestra	Nombre / Animal	Raza	Edad	Densidad Optica	Nivel de Estradiol (Ng/ml)
1	Brigida Huarmilina	19	Rosita	Holstein	2-3 años	1.957	220.528
2	Pascual Gutierrez	70	Frorinda	Holstein	2-3 años	2.917	9.086
3	Castilla Rocca Mario	107	Lupita	Holstein	2-3 años	3.199	1.066
4	Valentin Kancha Lopez	#151	Tula	Holstein	2-3 años	3.314	0.133
5	Nicolas Valdez Huallpa	165	Valentina	Holstein	2-3 años	3.375	0.003
6	Johan Paucarmayta Becerra	#34	Princesa junior	Holstein	2-3 años	1.863	279.105
7	Fernando Pacoahuanca	43	Osmara	Holstein	3-4 años	2.605	33.947
8	Pizarro Huamantalla	65	Victoria	Holstein	3-4 años	2.786	16.868
9	Honorata Quispe Ttupa	224	Justina	Holstein	3-4 años	3.396	0.000
10	Vicentina Lopez	240	Paloma	Holstein	3-4 años	3.371	0.005
11	Juana Maria Quispe	245	Thalia	Holstein	3-4 años	3.152	1.768
12	Comunidad	16	Dalmata	Holstein	3-4 años	3.322	0.103
13	Justina Vargas	20	Ana Paola	Holstein	4-5 años	2.879	11.017
14	Hernan Cjumo	34	Yobana	Holstein	4-5 años	2.916	9.133
15	Susana Ccohua	40	Trudy	Holstein	4-5 años	2.831	13.826
16	Gumercinda Ticca	72	Tomasa	Holstein	4-5 años	2.955	7.392
17	Florencia Quispe Mayta	170	Dora	Holstein	4-5 años	2.128	141.750
18	Comunidad	19	Cachuda	Holstein	4-5 años	3.545	0.000
19	Martha Atausupa Huallpa	61	Paloma	Holstein	5-6 años	3.114	2.495
20	Franklin Ccancha	212	Paola	Holstein	5-6 años	2.607	33.709
21	Honorata Quispe Ttupa	223	Isabela	Holstein	5-6 años	3.012	5.256
22	Juana Huaman	166	Lucia	Holstein	5-6 años	2.938	8.121
23	Tomasa Quijia	191	Pamela	Holstein	5-6 años	2.023	186.396
24	Comunidad	30	5 pezones	Holstein	5-6 años	3.352	0.027
25	Catalino Pizarro	6	Dolores	Holstein	>6 años	2.986	6.173

N°	Nombre/ Propietario	N° Muestra	Nombre / Animal	Raza	Edad	Densidad Optica	Nivel de Estradiol (Ng/ml)
26	Victor Ccohua	82	Gloria	Holstein	>6 años	2.929	8.526
27	Virginia Saldivar	97	Florencia	Holstein	>6 años	3.039	4.401
28	Isabel Andia	211	Charo	Holstein	>6 años	3.054	3.966
29	Franklin Ccancha	213	Ignacia	Holstein	>6 años	2.732	21.097
30	Comunidad	32	La chata gorda	Holstein	>6 años	3.504	0.000
31	Yoni Mendoza A.	132	Sofia	Brown Swiss	2-3 años	3.01	5.323
32	Salome Surco Ccoa	104	Serafina	Brown Swiss	2-3 años	2.851	12.603
33	Ricardo Mantilla Huanaco	156	Flor	Brown Swiss	2-3 años	3.543	0.000
34	Florentina Lloclla de Chalco	#166	Miriam	Brown Swiss	2-3 años	3.495	0.000
35	Leon Salas Carlos	91	Jeb	Brown Swiss	2-3 años	1.839	296.236
36	Comunidad	18	Pezon blanco	Brown Swiss	2-3 años	3.440	0.000
37	Concepcion Contay Huari	221	Esperanza	Brown Swiss	3-4 años	3.207	0.967
38	Virgilio Huaman	151	Rocio	Brown Swiss	3-4 años	3.605	0.000
39	Angelica Huaman	196	Juanita	Brown Swiss	3-4 años	3.189	1.199
40	Viviana Cjumo	238	Anita	Brown Swiss	3-4 años	3.147	1.856
41	Hilario Cantoy Vargas	35	Luana	Brown Swiss	3-4 años	3.385	0.000
42	Juan Huamantalla Paucar	51	Maria	Brown Swiss	3-4 años	2.332	80.567
43	Abelina Pacohuanca	29	Bella	Brown Swiss	4-5 años	2.793	16.367
44	Fernando Pacohuanca	41	Flor	Brown Swiss	4-5 años	2.409	64.207
45	Fernando Pacohuanca	42	Uрпи	Brown Swiss	4-5 años	2.704	23.560
46	Concepcion Contay Huari	222	Estrella	Brown Swiss	4-5 años	3.014	5.189
47	Pacco Huanca Benigno	12	Carla	Brown Swiss	4-5 años	3.528	0.000
48	Silverio Huaman Chacon	69	Reyna	Brown Swiss	4-5 años	3.698	0.000
49	Catalino Pizarro	4	Gladis	Brown Swiss	5-6 años	2.974	6.628

N°	Nombre/ Propietario	N° Muestra	Nombre / Animal	Raza	Edad	Densidad Optica	Nivel de Estradiol (Ng/ml)
50	Seledonio Cjumo	10	Abencia	Brown Swiss	5-6 años	2.512	46.480
51	Francisco Cjumo	22	Rosita	Brown Swiss	5-6 años	3.114	2.495
52	Cirilo Huari	24	Lupe	Brown Swiss	5-6 años	2.742	20.263
53	Abelina Pacohuanca	27	Quilla	Brown Swiss	5-6 años	2.489	50.059
54	Johan Paucarmayta Becerra	6	Ingrid	Brown Swiss	5-6 años	2.24	104.664
55	Mariano Salome Surco	53	Kiara	Brown Swiss	>6 años	2.904	9.719
56	Gumercinda Ticca	74	Mamita	Brown Swiss	>6 años	2.953	7.475
57	Eulalia Huaman	89	Juana	Brown Swiss	>6 años	3.051	4.051
58	Willy Mendoza A.	126	Clariza	Brown Swiss	>6 años	2.994	5.001
59	Yoni Mendoza A.	133	Linda	Brown Swiss	>6 años	3.158	1.667
60	eliseo huallpa	10	juana	Brown Swiss	>6 años	3.551	0.000
61	Maxima Castro Chavez	186	Tomasa	Hibridos	2-3 años	2.932	8.390
62	Lucas Calderon Lenes	253	Marron oscuro	Hibridos	2-3 años	1.669	449.958
63	Manuel Tupo Chile	260	Linda	Hibridos	2-3 años	1.887	262.909
64	Cirila Huallparimachi	28	Justina	Hibridos	2-3 años	3.079	3.302
65	Toribio Castilla Corimanya	269	Araseli	Hibridos	2-3 años	1.946	226.740
66	Huaman Huaman Martina	103	Mora	Hibridos	2-3 años	3.452	0.000
67	Agripino Corahua	8	Rosita	Hibridos	3-4 años	2.812	15.060
68	Yeni Huamantica	202	Rosa	Hibridos	3-4 años	2.936	8.210
69	Salome Surco Ccoa	103	Negra	Hibridos	3-4 años	3.056	3.910
70	Aurelia Surco Ccoa	108	Teresa	Hibridos	3-4 años	1.94	230.196
71	Hilario Cantoy Vargas	36	Rosa	Hibridos	3-4 años	3.351	0.029
72	Jose Castilla Gamarra	206	Lomba menor	Hibridos	3-4 años	3.511	0.000
73	Justina Vargas	18	Rafaela	Hibridos	4-5 años	2.481	51.353
74	Maxima Castro Chavez	225	Sonia	Hibridos	4-5 años	2.491	49.740
75	Salome Surco Ccoa	102	Teresa	Hibridos	4-5 años	2.844	13.022

<b>N°</b>	<b>Nombre/ Propietario</b>	<b>N° Muestra</b>	<b>Nombre / Animal</b>	<b>Raza</b>	<b>Edad</b>	<b>Densidad Optica</b>	<b>Nivel de Estradiol (Ng/ml)</b>
76	Victoria Valencia	114	Rosita	Hibridos	4-5 años	2.262	98.445
77	Victoria Huamanguilla	181	Maria	Hibridos	4-5 años	2.886	10.643
78	Jose Castilla Gamarra	200	Sin cola	Hibridos	4-5 años	3.596	0.000
79	Valentin Mejia	86	Honorata	Hibridos	5-6 años	3.162	1.601
80	Victoria Huamanguilla	175	Rita	Hibridos	5-6 años	2.057	170.741
81	Gregorio Huari	106	Gringa	Hibridos	5-6 años	3.63	0.000
82	Aurelia Surco Ccoa	109	Nely	Hibridos	5-6 años	2.434	59.487
83	Victoria Valencia	113	Benancia	Hibridos	5-6 años	2.94	8.033
84	Martina Heredia de Leiva	214	Lunareja	Hibridos	5-6 años	3.602	0.000
85	Salome Surco Ccoa	101	Roja	Hibridos	>6 años	2.687	25.152
86	Aurelia Surco Ccoa	110	Fernanda	Hibridos	>6 años	2.111	148.266
87	Quispe Huaman Eulogia	1	Lomba	Hibridos	>6 años	3.465	0.000
88	Haite Huaman Juan	#24	Juana	Hibridos	>6 años	3.462	0.000
89	Haite Huaman Juan	#27	Libia	Hibridos	>6 años	3.514	0.000
90	Pillco Supa Miguel	28	Negrita	Hibridos	>6 años	3.444	0

**ANEXO 13.** Registro de Vacunos y resultados a la prueba de ELISA para determinar niveles de progesterona en vacas gestantes del distrito de Ancahuasi.

N°	Nombre/ Propietario	N° Muestra	Nombre / Animal	Raza	Edad	Densidad Optica	Nivel de Progesterona (Ng/ml)
1	Franklin Ccancha	217	Flora II	Holstein	2-3 años	0.321	2.306
2	Walter Curi La Torre	100	Bety	Holstein	2-3 años	0.282	1.598
3	Comunidad	22	Negra pura	Holstein	2-3 años	0.358	3.154
4	Comunidad	29	Cachuda rojisa	Holstein	2-3 años	0.326	2.41
5	Comunidad	25	Frente corazon	Holstein	3-4 años	0.33	2.495
6	Lorenzo Huamanguilla	302	Yaneth	Holstein	3-4 años	0.284	1.63
7	Hermelinda Castillo Bañares	282	Daniela	Holstein	3-4 años	0.286	1.663
8	Alberto Tapara Aguilar	163	Lia	Holstein	3-4 años	0.284	1.63
9	Hilario Cantoy Vargas	37	Bartola	Holstein	4-5 años	0.288	1.696
10	Johan Paucarmayta Becerra	8	Karla	Holstein	4-5 años	0.413	4.843
11	Alberto Tapara Aguilar	154	Julia	Holstein	4-5 años	0.285	1.647
12	Alberto Tapara Aguilar	155	Barbara	Holstein	4-5 años	0.305	1.995
13	Juana Maria Quispe	241	Dora	Holstein	5-6 años	0.424	5.259
14	Susana Ccohua	39	Irene	Holstein	5-6 años	0.3	1.904
15	Alberto Tapara Aguilar	156	Seres	Holstein	5-6 años	0.282	1.598
16	Alberto Tapara Aguilar	162	Carmen	Holstein	5-6 años	0.312	2.127
17	Catalino Pizarro	6	Dolores	Holstein	>6 años	0.298	1.868
18	Yoni Mendoza A.	135	Bety	Holstein	>6 años	0.315	2.186
19	Jacinta Sihua C.	#155	Cecilia	Holstein	>6 años	0.284	1.63
20	Alejandra Acosta	244	Lorena	Holstein	>6 años	0.312	2.127
21	Jesus Medina	279	Bella	Brown Swiss	2-3 años	0.388	4.001
22	Saturmina Ccohua	47	Valy	Brown Swiss	2-3 años	0.289	1.713
23	Santiago Lopez	368	Julia	Brown Swiss	2-3 años	0.299	1.886
24	Nicolasa Auquipuma	206	Tikay	Brown Swiss	2-3 años	0.372	3.529
25	Roxana Huaman	354	Ruth	Brown Swiss	3-4 años	0.319	2.266
26	Juana Lopez	311	Melisa	Brown Swiss	3-4 años	0.326	2.41
27	Lorenzo Huamanguilla	384	Martha	Brown Swiss	3-4 años	0.298	1.868
28	walter curi latorre	45	cria/sandra	Brown Swiss	3-4 años	0.303	1.958
29	Nicolasa Auquipuma	204	Rosa	Brown Swiss	4-5 años	0.327	2.431



N°	Nombre/ Propietario	N° Muestra	Nombre / Animal	Raza	Edad	Densidad Optica	Nivel de Progesterona (Ng/ml)
30	Roxana Huaman	356	Yaki	Brown Swiss	4-5 años	0.286	1.663
31	Pacco Huanca Benigno Rodrigues	11	Anita	Brown Swiss	4-5 años	0.332	2.538
32	Colegio J. Velasco Alvarado	53	Marcelina	Brown Swiss	4-5 años	0.474	7.61
33	Leon Salas Carlos	133	Chic	Brown Swiss	5-6 años	0.288	1.696
34	Castilla Rocca Mario	113	Tintina	Brown Swiss	5-6 años	0.522	10.859
35	Antonio Robles Meza	187	Candy	Brown Swiss	5-6 años	0.282	1.598
36	Manuel Sutta Huallpa	23	camila	Brown Swiss	5-6 años	0.316	2.206
37	Bertha Huanaco Rodriguez	111	Marina	Brown Swiss	>6 años	0.282	1.598
38	Johan Paucarmayta Becerra	7	China	Brown Swiss	>6 años	0.334	2.582
39	Ccoya Curi Florencia	60	Brown	Brown Swiss	>6 años	0.283	1.614
40	Lucio Lopez	262	Katy	Brown Swiss	>6 años	0.287	1.68
41	Elia Alvarado Cabrera	66	Vulva rota	Hibrido	2-3 años	0.331	2.517
42	Nicolasa Auquipuma	205	Paty	Hibrido	2-3 años	0.323	2.347
43	Ntonio Robles Meza	184	Linda	Hibrido	2-3 años	0.323	2.347
44	Pizarro Huamantalla	308	Victoria	Hibrido	2-3 años	0.314	2.166
45	Miguel Quispe	179	Negra	Hibrido	3-4 años	0.327	2.431
46	Jose Castilla Gamarra	#206	Lomba menor	Hibrido	3-4 años	0.349	2.93
47	Anastacio Surco	120	Rosa	Hibrido	3-4 años	0.297	1.851
48	Viviana Cjumo	235	Katy	Hibrido	3-4 años	0.367	3.391
49	Ccoya Curi Florencia	50B	Tania	Hibrido	4-5 años	0.315	2.186
50	Marcos Ccoa Surco	268	Elvira	Hibrido	4-5 años	0.315	2.186
51	Johan Paucarmayta Becerra	2	Bella	Hibrido	4-5 años	0.289	1.713
52	Marta Succno Quispe	174	Nancy	Hibrido	4-5 años	0.287	1.68
53	Gabino Pizarro Chile	55	Marcia	Hibrido	5-6 años	0.286	1.663
54	Saturmina Ccohua	47	Valy	Hibrido	5-6 años	0.289	1.713
55	Lucio Lopez	264	Maritza	Hibrido	5-6 años	0.359	3.18
56	Toribio Castillo Corimanya	267	Cintia	Hibrido	5-6 años	0.309	2.07
57	Quispe Huaman Eulogia	1	Lomba	Hibrido	6-BLL	0.318	2.246
58	Marecelina Apaza Pfuyo	41	Chuña	Hibrido	6-BLL	0.282	1.598
59	Juana Paula Succno Morrano	197	Flor	Hibrido	6-BLL	0.283	1.614
60	Rufino Apolinar Leva	19	carla	Hibrido	6-BLL	0.283	1.614