

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

USFQ

Colegio de Ciencias de la Salud

PERFILES DE PROGESTERONA Y ESTANDARIZACIÓN DE LA
PRUEBA DE ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA EN MUESTRAS DE
SANGRE DURANTE UN CICLO ESTRAL NATURAL Y SINCRONIZADO
EN BOVINOS PRODUCTORES DE LECHE EN EL PÁRAMO
ECUATORIANO

Ariel David Guagalango Amaña

Medicina Veterinaria

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito

para la obtención del título de

Médico Veterinario

Quito, 20 de julio de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias de la Salud

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**PERFILES DE PROGESTERONA Y ESTANDARIZACIÓN DE LA
PRUEBA DE ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA EN MUESTRAS DE
SANGRE DURANTE UN CICLO ESTRAL NATURAL Y SINCRONIZADO
EN BOVINOS PRODUCTORES DE LECHE EN EL PÁRAMO
ECUATORIANO**

Ariel David Guagalango Amaña



Nombre del profesor, Título académico

Eduardo Alfonso Díaz, PhD

Quito, 20 de julio de 2020

DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: Ariel David Guagalango Amaña

Código: 00132414

Cédula de identidad: 1755062435

Lugar y fecha: Quito, 20 de julio de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

Los objetivos del presente estudio fueron monitorear los perfiles de progesterona (P4) durante un ciclo estral (CE) natural y mediante la sincronización del estro, así como estandarizar la prueba de electroquimioluminiscencia (ELC) para medir las concentraciones de P4 durante un CE natural y mediante la sincronización del estro en la especie bovina (*Bos taurus*) en las tierras altas del Ecuador. En total, 15 vacas lecheras fueron divididas en 3 grupos en los Andes ecuatorianos a 3.5000 m.s.n.m. (metros sobre el nivel del mar). Grupo Prostaglandina (PGF2 α ; n = 5): estos animales recibieron una dosis luteolítica de prostaglandin F2 α (25 mg; Dinoprost; Lutalyse; Zoetis S.A.) después de confirmar la presencia de cuerpo lúteo (CL) por palpación rectal. Se tomaron muestras de sangre cada 2 días desde el día de la aplicación de PGF2 α (aproximadamente 45 días post-parto) hasta la finalización del CE. Grupo novillas (NOV; n = 6): animales que ya habían comenzado la pubertad fueron muestreados de la misma manera que el grupo PGF2 α . Grupo Control (CO; n = 4): vacas adultas de 45 días pos-parto (pp) aproximadamente fueron también muestreados cada 2 días pero a ellos no se aplicó PGF2 α . Para medir los niveles de P4 en las muestras de suero, la prueba de ELC fue el método de elección. Como se esperaba, el grupo PGF2 α mostró una disminución en los niveles de P4 en suero después de la aplicación de la inyección luteolítica, demostrando la lisis del CL. La media al inicio de la investigación fue 12.09 ng/ml, luego decreció a 0.46 ng/ml. Al final de la investigación, este incrementó a 10.40 ng/ml. En el grupo NOV, 2 animales no entraron a la pubertad antes de 370 kg, así que ellos no participaron en el experimento. Los 4 animales restantes comenzaron la pubertad antes de 370 kg y mostraron una curva de P4 similar a el grupo PGF2 α , con ligeras diferencias en los valores obtenidos. El promedio al principio fue 18.25 ng/ml y 0.92 ng/ml al extremo final de la curva; y 6.64 ng/ml al finalizar la investigación. Esto indica que los animales estuvieron al final de su primer CE, con la posible presencia de un CL cuando se tomaron las muestras de sangre. En base a esto, se sugiere que la falta de aumento de peso puede marcar un retraso en el inicio de la pubertad. Del grupo CO se obtuvo una curva típica de P4 en un CE normal. El punto de partida de la curva, el promedio fue de 0,35 ng / ml; 12,69 ng / ml en el punto más alto; y 7.16 ng / mL al final de la investigación. De manera interesante, los animales a esta altitud (3.500 m.s.n.m) no cambian su fisiología reproductiva, sugiriendo que el ganado lechero puede seguir un curso reproductivo natural a pesar de la altitud. La prueba de ELC fue esencial debido a su especificidad y sensibilidad, lo que nos permite tener confianza en sus resultados. En conclusión, los niveles séricos de P4 son consistentes con la fisiología reproductiva normal y están directamente relacionados a la presencia del CL. A grandes altitudes, se presume que la curva de P4 no varía de los valores obtenidos cerca del nivel del mar. El método de ELC demuestra ser confiable durante la cuantificación de los niveles hormonales debido a su alta sensibilidad y especificidad.

Palabras clave: Ciclo estral, cuantificación, electroquimioluminiscencia, progesterona, vacas lecheras.

ABSTRACT

The objectives of this present study were to monitor progesterone (P4) profiles during a natural estrous cycle (NEC) and during estrous synchronization (ES) and to standardize the electrochemiluminescence test in order to measure the concentration of this hormone in dairy cattle (*Bos taurus*) in the Ecuadorian highlands. In total, 15 dairy cows were divided into three groups in the Ecuadorian Andes at 3,500 m.a.s.l. (meters above sea level). Prostaglandin group (PG; n = 5): The animals received a luteolytic dose of prostaglandin F2 α (25 mg; Dinoprost; Lutalyse; Zoetis SA Ecuador) after confirming the presence of the corpus luteum by rectal palpation. Blood samples were taken every two days from the day of application of the PGF2 α (approximately 45 days postpartum) until the completion of the estrous cycle. Heifer group (HE; n = 6): Animals that had already begun puberty were sampled in the same way as the PG group. Control group (CO; n = 4): Adult cows of approximately 45 days postpartum (pp) were also sampled every two days but they were not applied PGF2 α . In order to measure progesterone levels in the serum samples, the electrochemiluminescence test was the method of choice. As expected, the PG group showed a decrease in serum P4 levels after the application of the luteolytic injection, demonstrating lysis of the corpus luteum. The average at the start of the investigation was 12.09 ng/mL, then it decreased to 0.46 ng/mL. At the end of the investigation, it increased to 10.40 ng/mL. In the HE group, two animals did not enter puberty before 370 kg, so they did not participate in the experiment. The remaining four animals started puberty before 370 kg and showed a progesterone curve similar to the PG group, with slight differences in the values obtained. The average at the beginning was 18.25 ng/mL and 0.92 ng/mL at the lower end of the curve; and 6.64 ng/mL at the end of the investigation. This indicates that the animals were at the end of their first estrous cycle, with the possible presence of a corpus luteum when the blood samples were taken. Based on this, it is suggested that the lack of weight gain may mark a delay in the onset of puberty. On the other hand, CO group produced a progesterone curve typical of a normal estrous cycle. At the starting point of the curve the average was 0.35 ng / mL; 12.69 ng / mL at the highest point; and 7.16 ng / mL at the end of the investigation. Interestingly, the animals at this altitude (3,500 m.a.s.l.) do not change their reproductive physiology, suggesting that dairy cattle can follow a natural reproductive course regardless of altitude. The electrochemiluminescence test was essential because of its specificity and sensitivity, which allows us to have confidence in its results. In conclusion, serum progesterone levels are consistent with normal reproductive physiology and are directly related to the presence of the corpus luteum. At high altitudes, it is assumed that the progesterone curve does not vary from the values obtained closer to sea level. The electrochemiluminescence method proves to be reliable during the quantification of hormone levels due to its high sensitivity and specificity.

Key words: Electrochemiluminescence, dairy cattle, oestrus cycle, progesterone, quantification.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	10
MATERIALES Y MÉTODOS	13
1. Localización de la hacienda	13
2. Animales en estudio	13
3. Extracción de muestra sanguínea	14
4. Medición de P4	14
5. Tabulación de datos	14
6. Análisis estadístico.....	14
RESULTADOS	15
1. Grupo CO.....	15
2. Grupo PGF2 α	15
3. Grupo NOV.....	16
DISCUSIÓN	18
CONCLUSIONES.....	21
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
Anexo A: Calendario para toma de muestra sanguínea del mes de agosto 2018	27
Anexo B: Calendario para toma de muestra sanguínea del mes de septiembre 2018	28
Anexo C: Calendario para toma de muestra sanguínea del mes de octubre 2018	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Peso inicial y peso final del grupo NOV.....	13
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Niveles de P4 desde los 45 días pp de vacas <i>Bos taurus</i> en el páramo ecuatoriano..	15
Figura 2. Niveles en suero de P4 después de una aplicación de la dosis luteolítica de prostaglandina-F2 α	16
Figura 3. Niveles en suero de P4 de vaquillas prepúberes que comenzaron la pubertad antes de los 330 kg de peso vivo	17
Figura 4. Niveles en suero de P4 de vaquillas prepúberes anéstricos que no expusieron un cuerpo lúteo funcioanl durante la investigación	17

INTRODUCCIÓN

La detección precisa del estro es un problema frecuente en la producción bovina. Hace algún tiempo, se estimaba que alrededor del 50.9% de los períodos estrales no se detectaban a tiempo, sin embargo, con la implementación de herramientas tecnológicas el valor que actualmente se encuentra es 41.5% (Pursley, Kosorok y Wiltbank, 1997; Valenza et al., 2012). Cuando existe ineficiencia en la detección del estro se presenta las siguientes consecuencias: generar un incremento de días abiertos, limitar el número de oportunidades a inseminar en la vaca y pérdidas económicas para el ganadero (Palmer, Olmos, Boyle y Mee, 2010). El método común para diagnosticar el celo es la observación en busca de signos comportamentales del estro, mientras que en producciones zootécnicas tecnificadas se utiliza pruebas diagnósticas para confirmar el estro (Kumar, Shankar Rao, Kumar, Chaurasia y Patel, 2013).

El ciclo estral (CE) es un patrón cíclico caracterizado por actividad ovárica, permitiendo la transición de las hembras que pasen desde un período reproductivo no receptivo a uno receptivo (Forde et al., 2011). En el CE interactúan diferentes hormonas: hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), hormona folículo estimulante (FSH), progesterona (P4), estradiol (E2), prostaglandina F2 α (PGF), entre otros (Lauderdale, 2009). La manifestación del estro puede estar afectado por algunos factores ambientales como: condiciones climáticas (lluvias y fuertes vientos), temperatura del ambiente (altas temperaturas), duración del día (fotoperiodo) y época del año (Galina y Orihuela, 2007; Grajales, Hernández y Prieto, 2010). Comprender las funciones de las hormonas y las etapas del CE en bovinos permite ejecutar protocolos de sincronización de estro e incrementar la tasa de preñez en vacas lecheras (Oztürk, Cirit, Baran y Ak, 2010). De la misma manera, en los años 90 se logró entender la finalidad de los esteroides (P4 y E2) y ejecutar métodos de cuantificación, como consecuencia es posible estimar el reinicio de la función ovárica postparto mediante la determinación de perfiles hormonales.

Igualmente, al determinar las concentraciones de los esteroides es posible valorar la eficiencia en la detección de celo y alteraciones pre y posparto (Yániz, Murugavel y López-Gatius, 2004).

Las técnicas de medición de P4 usadas comúnmente en CE son: radioinmunoensayo (RIA) y ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (El-Sheikh Ali et al., 2017). El primer test mencionado posee una sensibilidad adecuada y resultados confiables. No obstante, este procedimiento tiene algunas limitaciones: necesidad de equipos especializados, manejo estricto de material radioactivo, exposición constante del técnico a radiación, tiempo de incubación alta y la producción final de residuos radioactivos (Srivastava, 2002; Hershlag, Zinger, Lesser, Scholl y Bjornson, 2000). Por otra parte, ELISA es utilizado en forma rutinaria debido a su presentación en kit. El procedimiento de este método es simple y fácil, no requiere instalaciones de laboratorio y el tiempo de respuesta es rápido. Sin embargo, el test presenta algunas desventajas: baja especificidad, menor precisión y alta posibilidad de falsos positivos/negativos (Sakamoto et al., 2018). Según Chapwanva, Clegg, Stanley y Vaughan (2008) la desventaja principal para el médico veterinario es cuando el resultado proporcionado es semicualitativo o cualitativo, por este motivo es menos confiable para predecir con precisión la ovulación. Estos escenarios resaltan la importancia de encontrar un ensayo alternativo.

En base a lo mencionado, en los últimos años se prefiere evaluar esta hormona con métodos no isotópicos, así como la electroquimioluminiscencia (ELC), que en términos generales: es una forma de quimioluminiscencia en el cual una reacción quimioluminiscente emisora de luz es precedida por una reacción electroquímica (Ayad, Ouada y Benbarek, 2014). El procedimiento ELC posee las mismas ventajas que la quimioluminiscencia, por ejemplo: sensibilidad mejorada, especificidad adecuada y amplia gama de aplicaciones (Chen, Jie, Chen, Jie y Huang-Xian, 2012; Kulmala y Kankare, 2013). Los métodos inmunoensayos tradicionales necesitan un largo tiempo de incubación, requiere reactivos específicos y mano de obra especializada, por lo cual su rendimiento y rango de aplicación son limitados (Chen et al.,

2012). Por estas razones, el test de ELC presenta más beneficios a comparación de los inmunoensayos tradicionales (Yang et al., 2013).

Ayad, Ouada y Benbarek (2014) utilizaron la técnica ELC con un kit específico de P4 humana para determinar la P4 plasmática de bovinos. Se realizó inseminación artificial y se tomó la muestra de sangre correspondiente con una repetición al día 90 post-inseminación. Los resultados obtenidos demostraron que las concentraciones de P4 en todas las vacas eran fisiológicas, concluyendo que el kit de humanos es útil para la medición de P4 en plasma bovino. Según Ayala et al. (2017) realizó una investigación en Ecuador, determinó el tamaño del folículo preovulatorio del cuerpo lúteo y los niveles sanguíneos de P4 en los días 6 y 12 post-ovulación en vaquillas prepúberes (vp) de 3 razas distintas a través del método ELC. Se encontró que los niveles sanguíneos de P4 en los días 6 y 12 post-ovulación en las vp Criollas fue más alto a comparación de las otras razas. Grajales, Hernández y Prieto (2009) realizaron un trabajo de investigación en la zona trópico cálido-húmedo de Colombia a 20 msnm, determinaron los cambios en los niveles de P4 en un celo normal y silencioso en 4 grupos raciales. Concluyeron que las concentraciones de P4 tienen efecto en la presentación del celo silencioso.

Según hemos podido revisar no hemos encontrado información previa sobre los valores de P4 durante un ciclo estral natural en vp. Tampoco existen investigaciones donde se haya evaluado el CE en grupos distintos (natural y posparto), ni la medición de P4 luego de una aplicación de dosis luteolítica (PGF2 α) en bovinos. Por tales motivos, el presente trabajo tiene como objetivo monitorear los perfiles sanguíneos de los niveles de P4 durante un CE natural y mediante la sincronización del estro asimismo, pretendemos estandarizar la prueba de ELC para medir las concentraciones de P4 durante un CE natural o mediante la sincronización del estro en la especie bovina (*Bos taurus*).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Localización de la hacienda

El estudio se llevó a cabo en el mes de agosto de 2018 en la hacienda “San Fernando de Palugillo” (0°16'19.7"S y 78°15'17.4"O) situada a 3500 msnm en la parroquia Pifo del cantón Quito. El cantón registra una temperatura anual promedio de 16,2°C con una precipitación anual de 1081,5 mm y promedio de humedad relativa anual de 63% (INAMHI, 2015).

2. Animales en estudio

Se utilizaron 15 vacas *Bos taurus*, divididas en tres grupos. El grupo Control (CO; n = 4) compuesto por vacas ciclando a las cuales, en el día 45 posparto (pp), se les extrajo una muestra sanguínea cada dos días durante un ciclo estral completo. Se ejecutó el protocolo de palpación rectal para confirmar la presencia de cuerpo lúteo (CL) (Rangel et al., 2009). El segundo grupo es Prostaglandina (PGF2 α ; n = 5) conformado por vacas ciclando a las cuales se les administró una dosis luteolítica de prostaglandina-F2 α (25 mg; Dinoprost; Lutalyse; Zoetis S.A.). Al igual que el grupo CO se les extrajo muestras de sangre y se aplicó el protocolo mencionado anteriormente para comprobar la presencia del CL. Finalmente, el tercer grupo Novillas (NOV; n = 6) constituido por vp que sobrepasen los 370 kg de peso vivo como se presenta en la Tabla 1. De este grupo se extrajo una muestra sanguínea cada dos días hasta completar el ciclo estral del grupo CO.

Tabla 1. Peso inicial y final del grupo NOV

Novillas identificación	Peso inicial (kg)	Peso final (kg)
	31/8/18	15/9/18
852	444	444
843	403	435
844	405	444
854	340	370
850	330	343
841	405	421

3. Extracción de muestra sanguínea

A todos los animales del estudio se les extrajo 10 ml de sangre por punción de los vasos coccígeos, se utilizaron tubos al vacío tapa roja de 10 ml sin anticoagulante, agujas vacutainer 21G x 1-1/4 pulgadas de largo y porta tubos vacutainer®. Se realizó el procedimiento “extracción de sangre con sistema de vacío” (Figueiredo, Pompei y Martini, 2017). Las muestras sanguíneas fueron centrifugadas a 6000 rpm durante 15 minutos, se separó el suero en tubos alícuotas con su correspondiente identificación. Finalmente, los tubos alícuotas se preservaron a -20°C hasta su análisis por ELC para evaluar las concentraciones de P4.

4. Medición de P4

Las 105 muestras de suero que se obtuvieron en el trabajo fueron remitidas al laboratorio “LAB VET” en Quito, el cual cuenta con certificado del organismo de control nacional “Agrocalidad” (CDL-2018-000052-OF). Cada muestra fue procesada por el método de ELC con los reactivos PRG y la máquina utilizada fue MAGLUMI™ serie 800, los resultados obtenidos de P4 fueron determinados en ng/ml. La sensibilidad fue de 0,13 ng/ml (Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., Ltd, 2019).

5. Tabulación de datos

Con los resultados obtenidos en el laboratorio, se realizó una base de datos y se tabuló en el programa Microsoft® Excel paquete Microsoft 365.

6. Análisis estadístico

Se evaluaron las medidas de tendencia central para los niveles sanguíneos de P4 en los tres grupos. Se utilizó el programa Microsoft® Excel paquete Microsoft 365.

RESULTADOS

1. Grupo CO

En el grupo CO, se determinó que los bovinos se encontraban en diferentes etapas del CE al inicio de la toma de muestra sanguínea a los 45 días pp. Se organizaron los resultados obtenidos, de tal manera que permitió obtener una curva típica de P4 en un CE normal. El valor promedio al inicio de la curva fue 0.35 ng/ml, este coincide con el valor mínimo. El punto más alto llegó a 12.69 ng/ml. Al final del trabajo el valor obtenido fue 7,16 ng/ml. Los datos adquiridos se observan en la Figura 1.

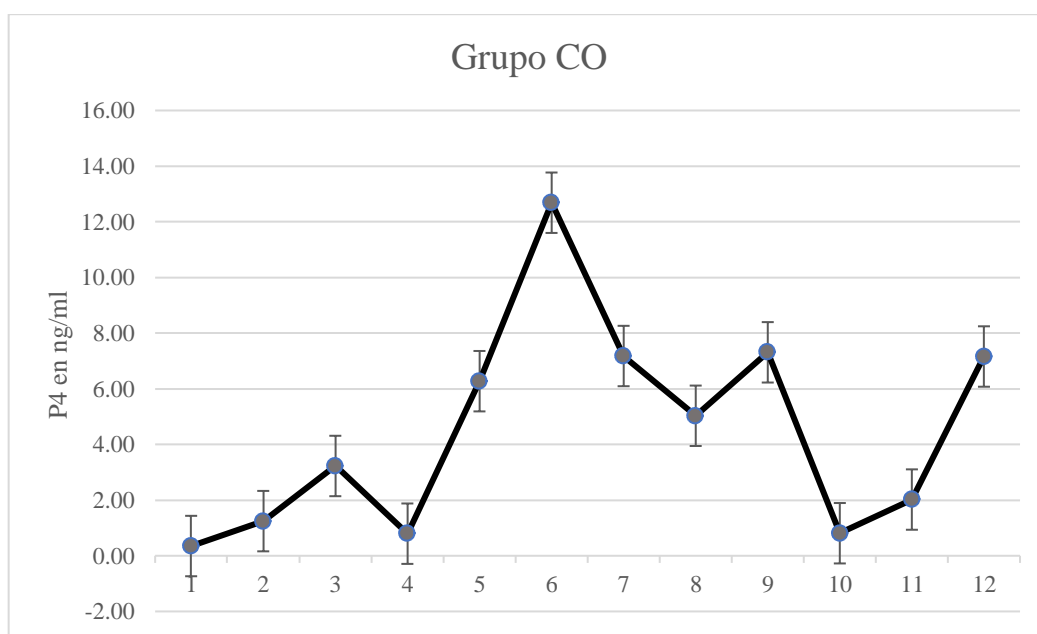


Figura 1. Niveles de P4 desde los 45 días pp de vacas *Bos taurus* en el páramo ecuatoriano

2. Grupo PGF2 α

El grupo PGF2 α demostró una disminución de los niveles P4 en el suero posterior a una administración de inyección luteolítica, demostrando la lisis o destrucción del cuerpo lúteo. El valor promedio al inicio del estudio fue 12.09 ng/ml, luego el valor disminuyó a 0,46 ng/ml; el punto más alto fue 12.88 ng/ml. Al final de la investigación, el valor obtenido fue 10.40 ng/ml. Los datos obtenidos se observan en la Figura 2

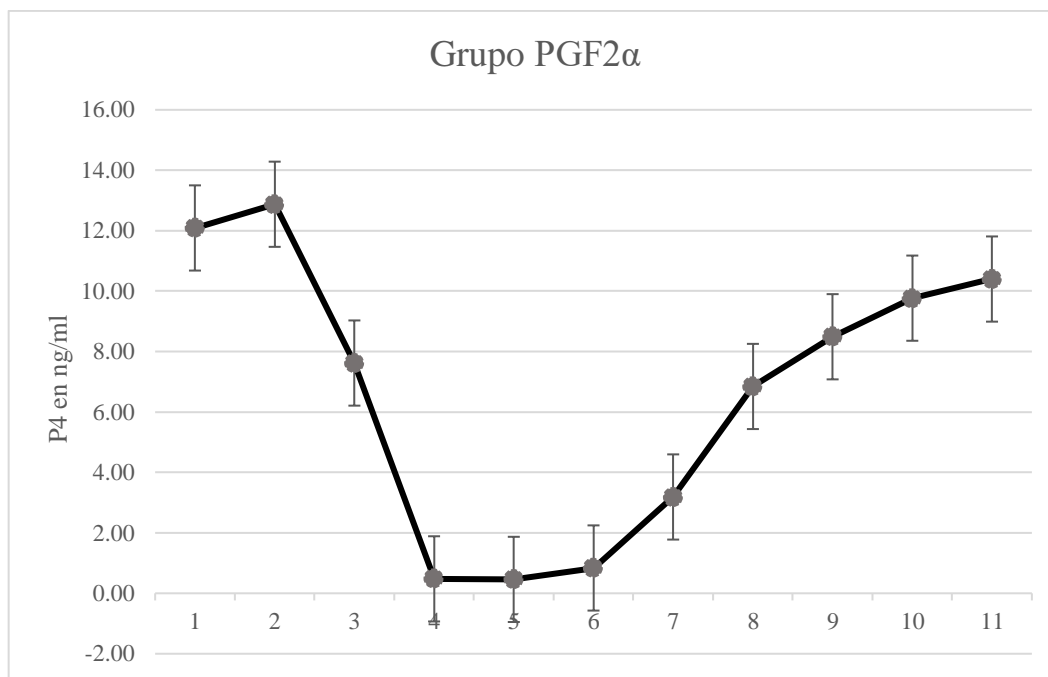


Figura 2. Niveles en suero de P4 después de una aplicación de la dosis luteolítica de prostaglandina-F2 α

3. Grupo NOV

En el grupo NOV, cuatro animales comenzaron la pubertad antes de 370 kg y presentaron una curva similar al grupo PGF2 α como se exhibe en la Figura 3; existieron algunas diferencias en los valores obtenidos. El valor promedio al inicio fue 18.25 ng/ml, coincidiendo con el valor máximo. El valor límite inferior fue 0.92 ng/ml; al culminar el estudio el valor obtenido fue 6.64 ng/ml. Cabe recalcar, que dos vp no empezaron la pubertad antes de los 370 kg, por tal motivo estos animales no participaron en el estudio; la gráfica obtenida se observa en la Figura 4.

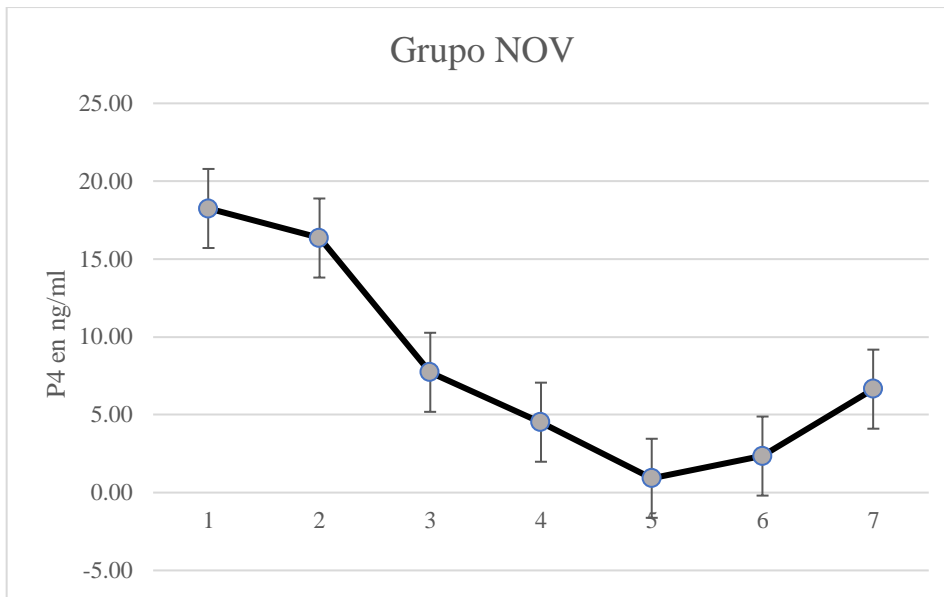


Figura 3. Niveles en suero de P4 de vaquillas prepúberes que comenzaron la pubertad antes de los 370 kg de peso vivo

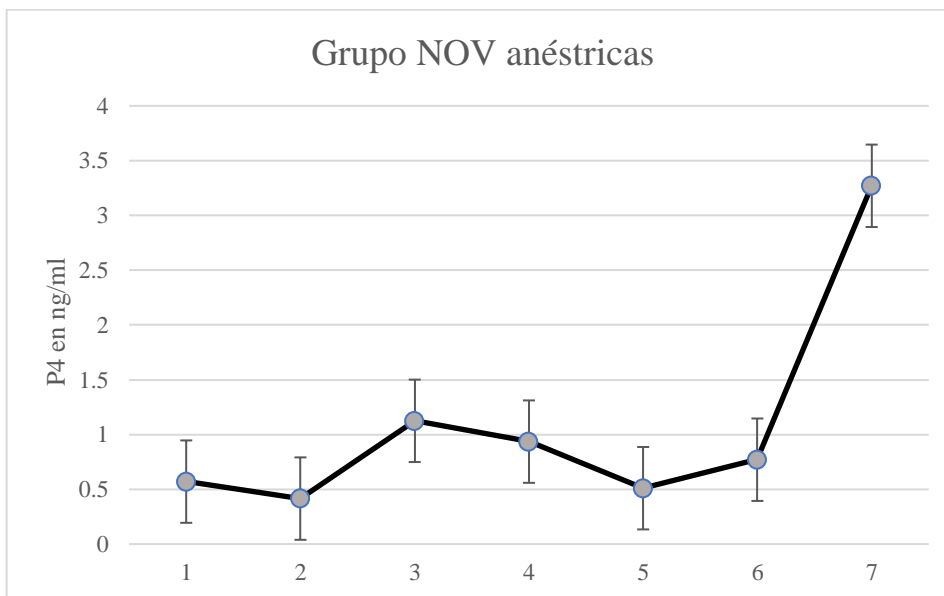


Figura 4. Niveles en suero de P4 de vaquillas prepúberes anéstricas que no expusieron un cuerpo lúteo funcional durante la investigación

DISCUSIÓN

En el presente proyecto de investigación, se presume que el método de ELC es una herramienta útil para la determinación de P4 en suero de bovinos durante un CE. Los grupos sometidos al estudio presentaron valores diferentes en las etapas que constituyen el CE normal y posterior a una aplicación de PGF2 α . Estos resultados guardan semejanza con publicaciones anteriores donde se utilizó el método de RIA, se determinó en vacas lecheras y vp los valores de P4 en un CE (Wettemann, Hafs, Edgerton y Swanson, 1972; Dieleman, Bevers, Van Tol y Willemse, 1986).

En varios reportes anteriores se detalló mediante la técnica de RIA los niveles de P4 en un CE completo, en el presente trabajo se halló semejanzas en el grupo CO (Christensen, Hopwood y Wiltbank, 1974) Todos los animales se encontraban en diferentes etapas del CE, por lo expresado, se encontró distintos niveles de P4. En términos fisiológicos reproductivos: el proceso de luteinización es posterior a la ovulación y en consecuencia las concentraciones de P4 incrementan (Wettemann, Hafs, Edgerton y Swanson, 1972; Naik, Kumar, Bramhaiah, Ravi y Chakravarthi, 2013). Este proceso donde actúa el CL y su relación con los niveles de P4, se conoce desde hace tiempo (Stabenfeldt, Ewing y McDonald, 1969). El grupo CO es el conjunto de vacas que no recibió ningún tratamiento, también se lo puede denominar como “grupo testigo”, por todo lo mencionado se logró observar valores normales de P4 en el CE. En esta agrupación de vacas se encontró los valores frecuentes que la fisiología reproductiva indica como normales, en otras palabras una curva típica de P4, donde existe una regresión del CL y después nuevamente un desarrollo del CL.

En investigaciones anteriores en el cual se evalúa la aplicación exógena PGF2 α y la respuesta fisiológica reproductiva del bovino, se detalló que la administración intramuscular e intrauterina de PGF2 α ocasiona la destrucción del CL (Thatcher y Chenault, 1976; Ginther, Araujo, Palhão, Rodrigues y Beg, 2009). Por lo tanto, los niveles de P4 descienden. La

recurrencia de ondas foliculares es un proceso fisiológico reproductivo normal, al no haber presencia de CL se desarrollará un folículo dominante y nuevamente sucederá la ovulación (Forde et al., 2011). De la misma manera, en otro informe anterior donde se evaluó el efecto de la aplicación de PGF2 α en vp, el diámetro del CL y se empleó la técnica de RIA, se determinó que a partir del día 1 post-aplicación de PGF2 α los valores de P4 comienzan a descender a la vez el diámetro del CL disminuye (Louis, Hafs y Seguin, 1973). Por estos motivos, se entiende que al aplicar PGF2 α se ocasiona el proceso de luteólisis y por consiguiente hay un nuevo CE. Por lo tanto, la inclinación de la curva P4 en el presente trabajo y el posterior incremento, indica que ocurrió la ovulación y luego se desarrolló el nuevo CL.

En el grupo NOV, se lograron obtener los resultados de P4 en 4 vp. Estos animales son los que presentaron mayor peso vivo al inicio del estudio. En estas vp se pudo especificar mediante los valores generados por el laboratorio que el primer CE ya había ocurrido antes de la primera extracción de muestra sanguínea. En base a la literatura, la expresión del primer estro está correlacionado con el peso vivo del animal; no obstante, la presentación del estro puede retrasarse hasta los 14 o 16 meses cuando no ha existido una correcta alimentación (Hernández, 2012). Reportes anteriores han indicado que la ganancia de peso se relaciona con una exhibición temprana del primer estro (Michael, Baruselli & Campanile, 2019). Esta relación entre la ganancia de peso y una precoz manifestación del estro, ya se ha conocido desde hace mucho tiempo (Short & Bellows, 1971; Frisch, 1984). En otras palabras, cuando hay una buena alimentación desde el destete hasta sus primeros años de vida, existe un desarrollo adecuado y maduración apropiada del tejido adiposo, este tejido secreta leptina al sistema circulatorio y cuando llega a un umbral considerable, permite activar el eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal; principalmente las hormonas GnRH y después LH (Barb y Kraeling, 2004). En vp se reveló que el incremento de los niveles de leptina inician antes de la primera presentación del CE (García et al., 2002). Esto quiere decir, que la manifestación del primer

celo en las vp está mas relacionado a la alimentación que se comienza a partir del destete, y no presenta relación específica con la edad; sin embargo, como se mencionó antes el estro puede retrarse (Cohen, Garden y Langlands, 1980). De cualquier forma, se presume que el método de ELC se debe tener en cuenta para la cuantificación de P4 en la primera manifestación del CE.

Por otro lado, los otros 2 integrantes del grupo NOV fueron los que presentaron menos peso al comienzo de la investigación. Por lo cual, se puede sospechar en base a investigaciones anteriores que estas vp no presentaron el CE a comparación de los otros animales sometidos al experimento (Michael, Baruselli & Campanile, 2019). Por este motivo, es factible suponer que no tuvieron una ganancia de peso adecuada al momento que inicio el experimento, por esta razón no hubo presencia del estro, ni tampoco niveles de P4 altos, como consecuencia salieron del análisis final del trabajo.

Además, es importante mencionar un estudio realizado en Colombia (Grajales, Hernández y Prieto, 2010) donde se calculó las concentraciones de P4 en celo normal y silencioso mediante RIA a 20 mnsm en el llano trópico. Los resultados del anterior estudio son similares con los del presente estudio, por lo cual se puede presumir que estos animales en el altiplano no cambian sus niveles de P4. Sin embargo, es necesario mas investigaciones en este campo para corroborar los resultados obtenidos en la investigación presente.

CONCLUSIONES

1. Los niveles en suero de P4 son consistentes con la fisiología reproductiva normal para la especie estudiante y están directamente relacionados con la presencia de el CL.
2. A grandes altitudes, se presume que la curva de P4 no varía de los valores obtenidos cerca del nivel del mar.
3. El método de ELC demuestra ser confiable para la cuantificación de los niveles hormonales debido a su alta sensibilidad y especificidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ayad, A., Ouada, M. I., y Benbarek, H. (2014). Electrochemiluminescence immunoassay for progesterone by using a heterologous system in plasma bovine. *Veterinary World*, 7(8), pp.610-613. doi: 10.14202/vetworld/2014.610-613
- Ayala, L., et al. (2017). Tamaño del folículo ovulatorio, cuerpo lúteo y progesterona sanguínea en vaquillas receptoras de embriones de tres razas en pastoreo en Ecuador. *Rev. prod. anim*, 29(2), pp.65-72. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2224-79202017000200009&lng=es&nrm=iso
- Barb, R., y Kraeling, R. (2004). Role of leptin in the regulation of gonadotropin secretion in farm animals. *Animal Reproduction Science*, 82, pp. 155-167. doi: 10.1016/j.anireprosci.2004.04.032
- Chapwanya, A., Clegg, T., Stanley, P. y Vaughan, L. (2008). Comparison of the Immulite and RIA assay methods for measuring peripheral blood progesterone levels in Greyhound bitches. *Theriogenology*, 70(5), pp.795-799. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.05.047
- Chen, W., Jie, W., Chen, Z., Jie, X. y Huang-Xian, J. (2012). Chemiluminescent immunoassay and its applications. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 40(1), pp.3-10. doi: 10.1016/S1872-2040(11)60518-5
- Christensen, S., Hopwood, L. y Wiltbank, N. (1974). Levels of hormones in the serum of cycling beef cows. *J Anim Sci*. 38(3), pp. 577-583. doi:10.2527/jas1974.383577x
- Cohen, R., Garden, D. y Langlands, J. (1980). A note on the relationship between live weight and the incidence of oestrus in Hereford heifers. *Animal Production*, 31, pp 221-222 doi:10.1017/ S0003356100024508
- Dieleman, S., Bevers, M., Van Tol, M. y Willemse, A. H. (1986). Peripheral plasma concentrations of oestradiol, progesterone, cortisol, LH and prolactin during the

- oestrous cycle in the cow, with emphasis on the peri-oestrous period. *Animal Reproduction Science*, 10(4), pp. 275-292. doi: 10.1016/0378-4320(86)90003-5
- El-Sheikh Ali, H., et al. (2017). Plasma anti-Müllerian hormone profile in heifers from birth through puberty and relationship with puberty onset. *Biol Reprod*, 97(1), pp.153-161. doi:10.1093/biolre/iox069
- Figueiredo, G., Pompei, C., & Martini, M. (2017). Rumiantes, Equinos y Porcinos. En *Manual Veterinario de Toma y Envío de Muestras*. (pp. 35 – 142). Rio de Janeiro (BR): Panaftosa-OPS/OMS.
- Forde, N., et al. (2011). Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim Reprod Sci*, 124, pp.163-169. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.08.025
- Frisch, E. (1984). Body fat, puberty and fertility. *Biol. Rev.* 59, pp. 161–188. doi: 10.1111/j.1469-185X.1984.tb00406.x
- Galina, S. y Orihuela, A. (2007). The detection of estrus in cattle raised under tropical conditions: what we know and what we need to know. *Horm Behav.* 52(1), pp.:32-38. doi:10.1016/j.yhbeh.2007.03.025
- García, R., et al. (2002). Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. *Journal of animal science*, 80 (8), pp.2158-67. Doi: 10.2527/2002.8082158x
- Ginther, J., Araujo, R., Palhão, P., Rodrigues, L. y Beg A. (2009). Necessity of sequential pulses of prostaglandin F2alpha for complete physiologic luteolysis in cattle. *Biol Reprod.* 80(4), pp. 641-648. doi:10.1095/biolreprod.108.072769
- Grajales, H., Hernández, A. y Prieto, E. (2010). Niveles de progesterona durante el ciclo normal y silencioso en bovinos en el trópico colombiano. *Revista MVZ Córdoba.* 15(2), pp. 2060-2069. <https://revistamvz.unicordoba.edu.co/article/view/316>

- Hernández, J. H. (2012). Fisiología clínica de la reproducción de bovinos lecheros. México, DF: Copias Gráficas SA.
- Hershlag, A., Zinger, M., Lesser, M., Scholl, G. y Bjornson, L. (2000). Is chemiluminescent immunoassay an appropriate substitution for radioimmunoassay in monitoring estradiol levels?. *Fertil Steril*, 73(6), pp.1174-1178. doi:10.1016/s0015-0282(00)00514-8
- Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI). (2015). Anuario Meteorológico Nro. 52-2012. Quito, Ecuador.
- Kulmala, S. y Kankare, J. (2013). Chemiluminescence | Electrogenated. En *Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. E.E.U.U.: Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.00064-0
- Kumar, P., Shankar Rao, T., Kumar, N., Chaurasia, S. y Patel, N. (2013). Heat detection techniques in cattle and buffalo. *Veterinary World*, 6(6), pp. 363-369. doi: 10.5455/vetworld.2013.363-369
- Larson, L. L. y Ball, P. J. (1992). Regulation of Estrous Cycles in Dairy Cattle: A Review. *Theriogenology*, 38(2), pp.255-67. doi: 10.1016/0093-691X(92)90234-I
- Lauderdale, J. (2009). ASAS centennial paper: Contributions in the Journal of Animal Science to the development of protocols for breeding management of cattle through synchronization of estrus and ovulation. *J Anim Sci*, 87(2), pp.801-812. doi:10.2527/jas.2008-1407
- Louis, M., Hafs, D. y Seguin, E. (1973). Progesterone, LH, Estrus and Ovulation after Prostaglandin F₂ α in Heifers. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 143(1), pp.152–155. Doi: 10.3181/00379727-143-37274
- Michael, D., Baruselli, S. y Campanile, G. (2019). Influence of nutrition, body condition, and metabolicus on reproduction in female beef cattle: A review. *Theriogenology*, 125, pp. 277-284. doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.11.010

- Naik, B., Kumar, S., Bramhaiah, V., Ravi, A. y Chakravarthi, P. (2013). Estrogen and progesterone hormone levels in Punganur cattle. *IOSR. J. Agric. Vet. Sci*, 2, pp. 50-53. https://www.researchgate.net/profile/Praveen_Veeraraghavulu/publication/268937528_Estrogen_and_Progesterone_hormone_levels_in_Punganur_Cattle/links/564c372c08aeab8ed5e7b892/Estrogen-and-Progesterone-hormone-levels-in-Punganur-Cattle.pdf
- Oztürk, O., Cirit, U., Baran, A. y Ak, K. (2010). Is Doublesynch protocol a new alternative for timed artificial insemination in anestrous dairy cows. *Theriogenology*, 73(5), pp.568-576. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.10.012
- Palmer, M.A., Olmos, G., Boyle, L.A. y Mee, J.F. (2010). Estrus detection and estrus characteristics in housed and pastured Holstein-Friesian cows. *Theriogenology*, 74(2), pp.255-264. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.02.009
- Pursley, R., Kosorok, M. y Wiltbank, M. (1997). Reproductive Management of Lactating Dairy Cows Using Synchronization of Ovulation. *Journal of Dairy Science*, 80(2), pp.301-306. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(97)75938-1.
- Rangel, L., et al. (2009). Examen del Aparato Reproductor de la Vaca. En Porras, L. y Páramo, R. (Eds.), *Manual de Prácticas de Reproducción Animal* (pp. 31 – 48). México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sakamoto, S., et al. (2018). Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J Nat Med*, 72(1), pp.32-42. doi:10.1007/s11418-017-1144-z
- Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., Ltd. (2019). MAGLUMI™ PRG (CLIA). [pdf]. Recuperado el 02 de julio de 2020 de: <http://www.diasystem.se/uploads/9/6/6/7/9667782/130202009m-prg-v1.0-en-20120222.pdf>

- Short, R. y Bellows, R. (1971). Relationships among Weight Gains, Age at Puberty and Reproductive Performance in Heifers, *Journal of Animal Science*, 3(1), pp. 127–131.
Doi: 10.2527/jas1971.321127x
- Srivastava, L. (2002). General features of plant hormones, their analysis, and quantitation. En *Plant growth and development: hormones and environment*. (pp. 141-153). Canada: Elsevier.
- Stabenfeldt H., Ewing L. y McDonald E. (1969). Peripheral plasma progesterone levels during the bovine oestrous cycle. *J Reprod Fertil.* 19(3), pp. 433-442.
doi:10.1530/jrf.0.0190433
- Thatcher, W. y Chenault, R. (1976). Reproductive physiological responses of cattle to exogenous prostaglandin F₂alpha. *J Dairy Sci.* 59(7), pp.1366-1375.
doi:10.3168/jds.S0022-0302(76)84369-X
- Valenza, A., et al. (2012). Assessment of an accelerometer system for detection of estrus and treatment with gonadotropin-releasing hormone at the time of insemination in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 95(12), pp.7115-7127. doi:10.3168/jds.2012-5639
- Wettemann, R., Hafs, H., Edgerton, L. y Swanson, L. (1972). Estradiol and Progesterone in Blood Serum during the Bovine Estrous Cycle. *Journal of Animal Science*, 34(6), pp. 1020–1024. doi: 10.2527/jas1972.3461020x
- Yang, J., et al. (2013). Development of an Ultra-sensitive Chemiluminescence Enzyme Immunoassay for the Determination of Diethylstilbestrol in Seafood. *Analytical Letters*, 46(14), pp.2189-2202. doi: 10.1080/00032719.2013.798794
- Yániz, J.L., Murugavel, K. y López-Gatius, F. (2004). Recent developments in oestrous synchronization of postpartum dairy cows with and without ovarian disorders. *Reprod Domest Anim*,9(2), pp.86-93. doi:10.1111/j.1439-0531.2004.00483.x

Anexo A: Calendario para toma de muestra sanguínea del mes de agosto 2018

agosto 2018						
L	M	X	J	V	S	D
		1	2	3	4	5
6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19
20	21	22	23	24	25	26
27	28	29	30	31		
o Aplicación de PGF2α				Palpación de CL. 1era toma de muestra vacas: 620,630,625 y novillas.		

Anexo B: Calendario para toma de muestra sanguínea del mes de septiembre 2018

septiembre 2018						
L	M	X	J	V	S	D
					1	2
3	4	5	6	7	8	9
2da toma de muestra vacas 620,630,625 y novillas.			3era toma de muestra vacas 620,630,625 y novillas.		4ta toma de muestra vacas 620,630,625 y novillas.	
10	11	12	13	14	15	16
5ta toma de muestra vacas 620,630,625 y novillas.		6ta toma de muestra vacas 620,630,625 y novillas.		7ma toma de muestra vacas 620,630,625 y novillas (pesaje final).		
17	18	19	20	21	22	23
		Palpación de CL. 1era toma de muestra vacas 747 y 631		2da toma de muestra vacas 747 y 631		
24	25	26	27	28	29	30
3ra toma de muestra vacas 747 y 631		4ta toma de muestra vacas 747 y 631		5ta toma de muestra vacas 747 y 631. Palpación de CL. 1era toma de muestra vacas 760 y 827		
oAplicación de PGF2α						

Anexo C: Calendario para toma de muestra sanguínea del mes de octubre 2018

octubre 2018						
L	M	X	J	V	S	D
1	2	3	4	5	6	7
6ta toma de muestra vacas 747 y 631. 2da toma de muestra vacas 760 y 827		7ta toma de muestra vacas 747 y 631. 3era toma de muestra vacas 760 y 827		4ta toma de muestra vacas 760 y 827. Palpación de CL. 1era toma de muestra vacas 502		
8	9	10	11	12	13	14
5ta toma de muestra vacas 760 y 827. 2da toma de muestra vacas 502		6ta toma de muestra vacas 760 y 827. 3ra toma de muestra vacas 502		7ma toma de muestra vacas 760 y 827. 4ta toma de muestra vacas 502. Palpación de CL. 1era toma de muestra vacas 217		
15	16	17	18	19	20	21
5ta toma de muestra vacas 502. 2da toma de muestra vacas 217		6ta toma de muestra vacas 502. 3ra toma de muestra vacas 217		7ma toma de muestra vacas 502. 4ta toma de muestra vacas 217		
22	23	24	25	26	27	28
5ta toma de muestra vacas 217		6ta toma de muestra vacas 217				
29	30	31				
oAplicación de PGF2α						