

**EFFECTO DEL DIÁMETRO DEL FOLÍCULO OVULATORIO, TAMAÑO DEL  
CUERPO LÚTEO Y PERFILES DE PROGESTERONA SOBRE LA TASA DE  
PREÑEZ EN LA HEMBRA RECEPTORA DE EMBRIONES BOVINOS**

**ARTURO DUICA AMAYA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA  
MAESTRIA EN SALUD ANIMAL  
BOGOTÁ D.C.  
2010**

**EFFECTO DEL DIÁMETRO DEL FOLÍCULO OVULATORIO, TAMAÑO DEL  
CUERPO LÚTEO Y PERFILES DE PROGESTERONA SOBRE LA TASA DE  
PREÑEZ EN LA HEMBRA RECEPTORA DE EMBRIONES BOVINOS**

**ARTURO DUICA AMAYA  
Código 780174**

**Trabajo de grado presentado para optar al título de:**

**Maestro en Ciencias**

**Director**

**Henry Alberto Grajales Lombana. PhD. Profesor Asociado. UN**

**Codirector**

**Juan José Molina. MSc. Investigador Industria privada**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA  
MAESTRIA EN SALUD ANIMAL  
BOGOTÁ D.C.  
2010**

## **DECLARATORIA DE ORIGINALIDAD Y RECONOCIMIENTO**

Declaro que la investigación reportada en este documento fue llevada a cabo con recursos de la Universidad Nacional de Colombia, la empresa privada y propios del autor.

El trabajo de toma de muestras sanguíneas fue realizado por el autor, con la colaboración del personal de la empresa privada y de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

Las determinaciones de las concentraciones de progesterona plasmática fueron realizadas por el autor en el Laboratorio de Hormonas de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

---

Arturo Duica Amaya.

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION.	13
REFERENCIAS.	18
REVISION DE LITERATURA.	20
1.1. Factores que afectan la eficiencia reproductiva en programas de TE en Bovinos.	20
1.1.1. Ventajas y desventajas tras la aplicación de la técnica de TE.	21
1.2. Aspectos asociados a la eficiencia en TE relacionados con las hembras donantes.	23
1.2.1. Selección de las hembras donantes en programas de TE.	23
1.3. Aspectos asociados a la eficiencia en TE relacionados con la aplicación de la técnica.	26
1.3.1. Mecanismos para colecta de los embriones.	26
1.3.2. Clasificación y manipulación de embriones.	28
1.4. Aspectos asociados a la eficiencia en TE relacionados con las hembras receptoras.	29
1.4.1. Selección de hembras receptoras de embriones en un programa de TE.	30
1.4.2. Importancia de la evaluación de estructuras ováricas en hembras receptoras de embriones.	32
1.5. Elementos referenciales del ciclo estral, desarrollo embrionario y reconocimiento materno de la preñez en hembras receptoras de embriones.	33
1.5.1. Desarrollo folicular.	44
1.5.2. Mecanismo de ovulación.	61
1.5.3. Formación y consolidación del cuerpo lúteo.	64
1.5.4. Reconocimiento materno post-TE y activación de mecanismos luteotrópicos.	69

	Pág.
1.5.5. Mecanismo de implantación embrionaria.	77
1.5.6. Activación de mecanismos luteolíticos.	81
1.6. Factores que afectan la eficiencia reproductiva en la hembra receptora en un programa de TE.	90
1.7. Mecanismos de control del ciclo estral en un programa de TE: Aplicación de terapias hormonales.	98
1.8. Uso de la ultrasonografía y del radioinmunoanálisis (RIA) como herramientas en el técnica de TE.	105
REFERENCIAS	109
CAPITULO II. Relación entre diámetro folicular ovulatorio, volumen luteál y niveles de progesterona sobre la tasa de preñez en hembras receptoras de embriones en la Sabana de Bogotá.	116
RESUMEN	116
INTRODUCCIÓN	118
2.1.1. Hipótesis de trabajo.	119
2.1.2. Objetivo.	120
2.1.3. Objetivos Específicos.	120
MATERIALES Y MÉTODOS.	121
2.2.1. Tipo de estudio.	121
2.2.2. Localización.	121
2.2.3. Grupo evaluado.	121
2.2.3.1. Descripción del grupo evaluado.	122
2.2.4. Condiciones de manejo.	123
2.2.5. Tratamiento para el control del ciclo estral de hembras receptoras	123
2.2.6. Aval del comité de ética para la experimentación animal.	127
2.2.7. Muestras sanguíneas y análisis ultrasonográficos.	128
2.2.8. Medición de variables.	129
2.2.9. Análisis estadístico de los datos.	130
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	133

2.3.1. Variables respuesta durante el primer muestreo (día 5 con respecto Al inicio del protocolo de sincronización).	133
2.3.1.1. Diámetro folicular.	133
2.3.1.2. Volumen de cuerpo lúteo y niveles de progesterona.	136
2.3.2. Variables de respuesta durante el segundo muestreo (día 9 con respecto al inicio del protocolo de sincronización).	137
2.3.2.1. Diámetro folicular.	137
2.3.2.2. Volumen del cuerpo lúteo y niveles de progesterona.	141
2.3.3. Variables de respuesta durante el tercer muestreo (día 17 con respecto al inicio del protocolo de sincronización).	143
2.3.3.1. Diámetro folicular.	144
2.3.3.2. Volumen del cuerpo lúteo y niveles de progesterona.	146
2.3.4. Niveles de progesterona durante el ciclo estral sincronizado.	150
2.3.5. Relación entre estructuras ováricas, perfiles de progesterona y porcentaje de preñez.	160
2.3.5.1. Efecto del diámetro del folículo sobre el volumen del cuerpo lúteo	160
2.3.5.2. Efecto del volumen del cuerpo lúteo sobre la concentración de progesterona plasmática.	161
2.3.5.3. Efecto del DF, VCL y concentraciones de progesterona plasmática sobre el evento de presentación de la gestación.	164
2.3.5.4. Porcentajes de preñez.	169
2.3.6. Patrón de comportamiento de las estructuras ováricas, niveles plasmáticos de progesterona y su relación con la gestación.	170
CONCLUSIONES.	172
RECOMENDACIONES.	173
REFERENCIAS.	174

## LISTADO DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Edad, peso y condición corporal de la muestra total.	123
Tabla 2. Número y tamaño de las estructuras ováricas durante el primer muestreo (día 5).	135
Tabla 3. Número y tamaño de las estructuras ováricas durante el segundo muestreo (día 9).	141
Tabla 4. Número y tamaño de las estructuras ováricas durante el tercer muestreo (día 17).	146
Tabla 5. Tabla de contrastes entre perfiles de progesterona plasmática día 17 y probabilidad de gestación día (52).	169

## LISTADO DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Modelo de los patrones de desarrollo folicular, luteal y perfiles de progesterona durante el ciclo estral bovino.	45
Figura 2. Modelo de la dinámica folicular durante el ciclo estral bovino.	47
Figura 3. Modelo en el que se relaciona los incrementos transitorios de FSH durante un ciclo estral bovino en el que se presentan tres ondas de desarrollo folicular.	48
Figura 4. Modelo de la producción de progesterona en las células luteales grandes y pequeñas.	68
Figura 5. Modelo de biosíntesis de progesterona en una célula luteal.	69
Figura 6. Protocolo de sincronización, seguimiento ultrasonográfico y obtención de muestras sanguíneas aplicadas al grupo de trabajo	124
Figura 7. Niveles plasmáticos de progesterona del total de los animales durante los tres muestreos (días 5, 9 y 17).	152
Figura 8. Niveles plasmáticos de progesterona promedio en los animales durante los tres muestreos (días 5, 9 y 17).	156
Figura 9. Comparación de los perfiles plasmáticos promedio de progesterona durante el segundo y tercer muestreo (días 9 y 17) de los animales preñados y no preñados.	159
Figura 10. Relación estimada del nivel plasmático de progesterona en función del volumen del cuerpo lúteo.	164



Figura 11. Relación estimada para el diagnóstico de preñez positivo en función de la concentración plasmática de progesterona	166
Figura 12. Concentración plasmática de progesterona del grupo de hembras no gestantes, durante el día 17 (tercer muestreo)	168
Figura 13. Comparación entre grupos gestante y no gestante en cuanto a diámetro folicular (día 9), volumen del cuerpo lúteo (día 17) y nivel de progesterona (día 17).	171

## INTRODUCCION

Los sistemas productivos pecuarios se basan en la producción eficiente de derivados de origen animal, que buscan satisfacer las necesidades nutricionales de la población mundial. En este contexto, se ha trabajado intensamente para que los procesos productivos sean eficientes en los diferentes tipos de empresas ganaderas; el desarrollo de la mejora genética, que busca que los individuos expresen al máximo su potencial genético, en la medida que se les ofrece un entorno adecuado, es la base para lograr un aumento real de la productividad ganadera. Bajo estas consideraciones, la implementación de procedimientos biotecnológicos, para avanzar en la mejora genética, se ha constituido en una herramienta que puede dar lugar a avances significativos en la capacidad productiva de los sistemas ganaderos. No obstante, la aplicación de estos procedimientos biotecnológicos aún requiere conocer más profundamente sobre las condiciones y mecanismos de acción dentro de los diferentes procesos fisiológicos reproductivos, para alcanzar mayores niveles de eficiencia.

La biotecnología es la aplicación de principios científicos biológicos con fines industriales (Gorlach, 1999); al ser aplicada a la reproducción se convierte en una importante herramienta que permite aumentar la eficiencia reproductiva de los animales, con el propósito de cumplir con los cometidos del uso eficiente y la racionalización de los recursos (Palma, 2001).

Si bien, con la biotecnología reproductiva se ha avanzado en cuanto a las mejoras productivas de los animales, es necesario determinar y conocer los factores que afectan la eficiencia tras la aplicación de cada una de estas técnicas. En Colombia se ha producido un avance importante hacia la utilización de las biotecnologías, asociadas a la reproducción animal, con la difusión de la inseminación artificial bovina; esta es una de las biotecnologías básicas, pero al ser utilizada en las empresas ganaderas permite iniciar un mejoramiento genético importante debido a que se ofrece al productor la posibilidad de contar con material seminal proveniente de toros de excelente calidad, mejorando así las características de la progenie en las diferentes empresas ganaderas, para obtener una mayor eficiencia de los animales en los diferentes medios (Baruselli, 2005; Vasconcelos, 2006).

La técnica de TE está ampliamente difundida alrededor del mundo. En Colombia, como en otros países del mundo, en donde la demanda de fuentes de proteína de origen animal cada vez es mayor, se ha incrementado la aplicación de éste tipo de técnicas biotecnológicas que mejoran de una manera ágil las características productivas en determinados rebaños. Esto se ve reflejado por el aumento de importaciones de embriones bovinos al país; para el año 2005 el número de embriones bovinos importados y declarados ante el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), para el primer semestre fue de 46 unidades, mientras que para el 2006 se incrementó notablemente este número de importaciones declaradas, llegando a 1467 unidades (ICA, 2006).

La TE es una técnica biotecnológica, que permite aumentar la descendencia de animales de alto valor genético (Bó, 1996; Vasconcelos, 2006). La conciencia de poder hacer un mejoramiento ganadero está teniendo una difusión importante entre los productores del medio, que buscan mediante la aplicación de estas técnicas, mejorar las características productivas de los animales, para así ofrecer productos de mejor calidad al mercado por medio del cruzamiento de los animales comerciales que se encuentran en las empresas ganadera con animales genéticamente superiores. Los resultados positivos, representados en el número gestaciones tras la aplicación de dicha técnica, se ven afectados por la deficiente selección de las hembras receptoras, las cuales van a recibir un embrión alogénico en su útero desempeñándose como “hembras vientre” para permitir el desarrollo embrionario hasta que la preñez llegue a término. Además de una serie de parámetros que deben ser evaluados en este tipo de hembras, es de gran importancia hacer un seguimiento de las estructuras presentes en el ovario durante la etapa previa a la transferencia del embrión, así como durante el control del ciclo estral (sincronización del estro). En el ovario, un buen desarrollo folicular va a ser determinante para permitir la formación de un cuerpo lúteo que genere unas concentraciones plasmáticas de progesterona suficientes para ofrecer un medio ambiente uterino adecuado y de esta forma favorecer el desarrollo embrionario (Kastelic, 1990; Vasconcelos, 2001; Sartori, 2002; Gonella, 2010).

Al encontrar el embrión un medio uterino adecuado va a eclosionar de la zona pelúcida que lo protege, iniciándose la síntesis y secreción de una proteína

sintetizada por las células trofoblásticas denominada Interferón Tau; esta es la señal que informa a la hembra de la presencia del embrión, lo que va a producir que se bloquee la activación de los mecanismos luteolíticos que dan paso a un nuevo ciclo estral (Rodina, 2009). De esta manera se va a permitir que el embrión se adhiera a las paredes endometriales y se produzca el desarrollo gestacional (Gordon, 1999; Palma, 2001; Spencer, 2007).

Además de la selección de los animales que ingresan a un programa de TE como receptoras, los resultados óptimos tras la aplicación de la técnica son afectados por la raza de los animales a utilizarse, la selección de la hembra donante, el manejo de las hembras, la respuesta de los animales a los tratamientos de control del ciclo estral (sincronización), la técnica para realizar la TE, el día en que se efectúe la transferencia del embrión, la calidad del embrión, la respuesta de la receptora al embrión transferido y la interacción embrión – hembra receptora, entre otros. Estos factores han sido estudiados y se han tratado de estandarizar para obtener mejores resultados una vez aplicada esta técnica (Bó, 1996; Gordon, 1999; Gorch, 1999; Spell, 2001; Barreto, 2002; Nigro, 2002; Baruselli, 2001; Hasler, 2001; Merton, 2003; Gouveira, 2004; Lequarre, 2004; Leroy, 2005). Pero sin duda uno de los factores de importancia, que afecta la obtención de resultados positivos, representados en preñeces y nacimientos, tras la aplicación de la TE, es la óptima selección de la hembra receptora de embriones, de tal manera que pueda brindarle unas condiciones que permitan su supervivencia, implantación y desarrollo embrionario (Spell, 2001; Vasconcelos, 2006). Por este motivo, es

importante conocer los cambios que ocurren durante el ciclo estral y en las primeras fases del desarrollo embrionario, para así determinar claramente los factores que van a incidir de una manera directa sobre la eficiencia en un programa de TE (Bó, 2003).

Los resultados obtenidos una vez aplicada la técnica de TE se ven afectados de manera directa cuando en las hembras receptoras de embriones no se analizan detenidamente algunos factores de importancia para esta práctica biotecnológica. El tamaño del folículo ovulatorio (Diámetro Folicular), el desarrollo del cuerpo lúteo (Volumen del Cuerpo Lúteo) y la secreción de progesterona, son factores relacionados al establecimiento y mantenimiento de la preñez, lo que va a incidir directamente en la eficiencia o no del procedimiento de TE (Baruselli, 2003; Mann, 2007), afectando el porcentaje de preñez (Bridges, 2000; Spell, 2001; Vasconcelos, 2001; Lequarre, 2004; Nogueira, 2003; Green, 2005).

El objetivo del presente trabajo fue generar información acerca de la relación entre las estructuras ováricas y los niveles de progesterona plasmática, sobre el porcentaje de preñez en un grupo de novillas receptoras de embriones bovinos, de la raza Holstein Friesian, ubicadas en la Sabana de Bogotá; el fin fue realizar acercamientos hacia una selección eficiente de novillas que ingresan a un programa de TE, permitiendo incrementar los porcentajes de preñez en las hembras a las que se aplican este tipo de biotecnologías reproductivas, para buscar algún incremento en la eficiencia tras la aplicación de la técnica de transferencia de embriones.

## REFERENCIAS

- Barreto, A. and MacManus C. 2002. The effect of progesterone CIDR device on pregnancy rates in bovine embryo transfer recipients. *Theriogenology*. 57: 1974-1989.
- Baruselli, P., Marques, M., Madureira, E., Costa Neto, W., Gradinette, R., Bó, G. 2001. Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with CIDR-B devices. *Theriogenology*. 55: Abstract 55 – 355.
- Baruselli, P., Bó, G., Reis, E., Marques, M., de Sá Filho, M. 2005. Introducción de la IATF en el manejo reproductivo de rebaños de Ganado de engorde en Brasil. Memorias, congreso internacional de reproducción bovina. Laboratorio Intervet, Bogotá Colombia: 121-137.
- Baruselli, P., de Sá Filho, M., Martins, C., Reis, E., Nasser, L., Bó, G. 2005. Nuevos avances en los tratamiento de súper ovulación en donadoras de embriones. Memorias, Congreso internacional de reproducción bovina. Laboratorio Intervet, Bogotá Colombia: 139-154.
- Bó, G., Berfegfet, D., Mapletoft, R. 1996. Manipulación de la dinámica folicular en ganado bovino: Su aplicación en programas de Transferencia de embriones. Memorias, II Simposio internacional de reproducción animal. Cordoba, Argentina: 53-68.
- Bó, G., Moreno, D., Cuaita, L., Caccia, M. 2003. Factores que afectan los porcentajes de preñez en los programas de transferencia de embriones. Memorias IV Seminario Internacional de reproducción en grandes animales, CGR Biotecnología Reproductiva. Bogotá, Colombia: 102-119.
- Bridges, P., Wright, D., Buford, W., Ahmad, N., Hernandez, H., McCormick, M., Schrick, F., Dailey, R., Lewis, P., Inskoop, E. 2000. Ability of induced corpora lutea to maintain pregnancy in beef cows. *Journal of American Science*. 78, 11: 2942-2949.
- Gonella, A., Grajales, H., Hernández, A. 2010. Ambiente receptivo uterino: control materno, control embrionario, muerte embrionaria. *Rev. MVZ. Córdoba*. 15, 1: 1976-1984.
- Gordon I. 1999. Reproducción controlada del ganado vacuno y búfalos. Zaragoza España. Ed. Acribia.
- Gorlach A. 1999. Transferencia de embriones en el ganado vacuno. Zaragoza España. Ed. Acribia.
- Gouveira, M., Melo, D., Carvalho, L., Fuck, E., Trinca, L., Moraes, C. 2004. Do high progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo recipients synchronized with PGF2 $\alpha$  and eCG. *Theriogenology*. 61, 7-8: 1283-1290.
- Hasler J. 2001. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*. 56, 9: 1401-1415.
- ICA. 2006. Estadísticas segundo semestre. Cartilla Instituto Colombiano Agropecuario ICA.
- Kastelic, J., Bergfelt, D., Ginther, O. 1990. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology*. 33, 6: 1269-1278.
- Lequarre, A., Vigneron, C., Ribaucour, F., Holm, P., Donnay, I., Dalbies-Tran, R., Callesen, H., Mermillod, P. 2004. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology*. 63, 3: 841-859.
- Leroy, J., Opsomer, G., Vlieghe, S., Vanholder, T., Groossens, L., Geldhof, A., Bols, P., Kruijff, A., Van Soom, A. 2005. Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. *Theriogenology*. 64, 9: 2022-2036.
- Mann, G., Robinson R. and Hunter, M. 2007. Corpus luteum size and function following single and double ovulations in non-lactating dairy cows. *Theriogenology*. 67, 7: 1256-1261.
- Merton, J., Roos, A., Mullaart, E., Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P. and Dieleman, S. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in cattle breeding industry. *Theriogenology*. 59, 2: 651-674.
- Nigro, M., Burry, E., Villata, M. and Bó, G. 2002. Effect of different estrogen and progesterone treatments on superovulatory response in beef and dairy cattle. *Theriogenology*. 57: 769.
- Palma, G. 2001. Biotecnología de la reproducción. Buenos Aires, Argentina. Ed. INTA, Balcaré.
- Rodina, T., Cooke, F., Hansen, P. and Ealy, A. 2009. Oxygen tension and medium type actions on blastocyst development and interferon-tau secretion in cattle. *Animal Reproduction Science*. 111, 2-4: 173-188.
- Sartori, R., Rosa, G and Wiltbank, M. 2002. Ovarian Structures and Circulating Steroids in Heifers and Lactating Cows in Summer and Lactating and Dry Cows in Winter. *Journal of Dairy Science*. 85:2813-2822.
- Spell, A., Beal, W., Corah, L., Lamb, G. 2001. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*. 56, 2: 287-297.
- Spencer, T., Johnson, G, Bazer, F., Burghardt, R. and Palmirani, M. 2007. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants:

- roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reproduction Fertility and Development*, 19: 65-78.
- Vasconcelos, J., Demétrio, D., Santos, R., Chiari, J., Rodrigues, C., Sá Filho, O. 2006. Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. *Theriogenology*. 65: 192-200.
- Vasconcelos, J., Sartori, R., Oliveira, H., Guenther, J. Wiltbank, M. 2001. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*. 56, 2: 307-314.



## REVISIÓN DE LITERATURA

### **1.1. Factores que afectan la eficiencia reproductiva en programas de TE en Bovinos.**

La TE es una técnica que consiste en seleccionar una hembra donante genéticamente superior, en la que se realiza un control del ciclo estral, por medio de tratamientos hormonales. A continuación se induce una multiovulación, mediante el uso de gonadotropinas exógenas, procedimiento que permite el desarrollo de varios folículos hasta el estado ovulatorio, para obtener un mayor número de oocitos viables. Se considera que existió respuesta al tratamiento multiovulatorio cuando se producen más de dos ovulaciones efectivas (Tribulo, 2002); estos oocitos son fecundados por medio de inseminación artificial (IA); proceso en el que se pueden realizar dos o tres IA, según el protocolo de superovulación o multiovulación (Baruselli, 2003). Finalmente los embriones son recuperados del útero el día 7 post inseminación, cuando aun no se han adosado a la superficie uterina (Gorlach, 1999; Stingfellow, 2000). Una vez colectados estos embriones deben pasar por un proceso de clasificación en el que se evalúa su estadio y calidad. Estas estructuras pueden ser transferidas a hembras receptoras que reciben el embrión en el útero, las cuales van a servir como madres substitutas ó vientre durante el periodo gestacional; pero también el embrión puede ser sometido a conservación criogénica para ser preservado de

una manera segura (Gordon, 1999; Palma, 2001). Las hembras que van a recibir un embrión en su útero, deben estar en el mismo periodo fisiológico, post-estro, que las hembras de las que se obtuvieron los embriones, por lo que se hace necesario ejercer un control efectivo del ciclo estral en la hembra receptora, para que también se encuentre en el día siete post ovulación; esta sincronía junto con ciertas características, sanitarias y de manejo, permiten obtener buenos resultados después de efectuar la transferencia del embrión a la hembra receptora (González, 2001).

Antes de tener en cuenta cada uno de los factores de importancia en la técnica de TE, es importante conocer los diferentes cambios que se presentan en la hembra bovina a nivel reproductivo y entender como se produce el control hormonal que desencadena el ciclo estral, así como la dinámica folicular, formación, desarrollo, consolidación y regresión del cuerpo lúteo, además de tener claridad de cómo transcurre la etapa temprana de desarrollo embrionario y los factores que afectan la supervivencia del embrión. (Duica, 2007)

#### **1.1.1. Ventajas y desventajas tras la aplicación de la técnica de TE.**

En el procedimiento de TE se presentan ventajas y desventajas como en cualquier otro procedimiento biotecnológico. Las ventajas de esta técnica son básicamente la obtención de una descendencia genéticamente superior (Vasconcelos, 2006), la disminución del riesgo de contagio de enfermedades infecciosas, el mejoramiento genético de un grupo de animales a corto plazo, la multiplicación de las

características productivas deseables en determinada prole, el rescate genético de animales accidentados o enfermos permanentes de los que se pudieran obtener embriones antes de que el animal muera, el chequeo genético ágil de un animal al que se le extrae material seminal probando éste en varias hembras superovuladas para así evaluar su descendencia, la facilitación del movimiento nacional e internacional de embriones de animales de alto valor genético (importación y exportación), la maximización del uso de material seminal de alto valor, la mejor planificación de los cruzamientos, además de la producción de gemelos por micro manipulación, entre otras (Tribulo, 2002).

De la misma forma en que se puede obtener prole con características deseables, también pueden ser multiplicadas fácilmente las características indeseables de animales que no son aptos para introducir en un programa de TE, por eso es de suma importancia al aplicar este tipo de técnicas, contar con la asesoría de personal idóneo para efectuar estos procedimientos. Dentro de las desventajas que deben ser evaluadas antes de la aplicación de esta técnica, se tiene la variabilidad que se presenta en materia de resultados, la poca disponibilidad de hembras receptoras, ya que existen pocas empresas ganaderas especializadas en la producción de éste tipo de animales en el país lo que incrementa substancialmente los costos. Otro factor limitante se debe a los altos costos de los insumos, en particular de las hormonas utilizadas para ejercer control sobre el ciclo estral y multiovulación de las hembras durante estos procesos; es importante también, contar con personal técnico altamente calificado

para evitar malos resultados, ya que se pueden presentar diferencias en la efectividad de la técnica entre equipos de trabajo (Bó, 2003). La variabilidad en la calidad de los embriones es otra de las desventajas que acarrea la aplicación de esta técnica; es importante tener en cuenta que entre un 20 y 30% de hembras donadoras de embriones no responden a los tratamientos hormonales, haciendo que no se pueda recuperar ningún embrión transferible; esta variabilidad en la respuesta puede depender de los factores individuales asociados a la dinámica folicular en estos animales (Baruselli, 2003). Una gran parte de las desventajas asociadas a la técnica de TE se presentan por el poco control o el desconocimiento de los fenómenos fisiológicos asociados con las estructuras ováricas y la producción de hormonas que determinan el ambiente uterino requerido para el adecuado desarrollo del embrión a transferir; el interrogante ¿es cómo se dan estos fenómenos en la hembra receptora que logra satisfactoriamente el establecimiento de la preñez temprana? (Gordon, 1999; Gorlach, 1999).

## **1.2. Aspectos asociados a la eficiencia en TE relacionados con las hembras donantes.**

La hembra donante de embriones ha sido uno de los puntos mas estudiados en los programas de TE. Gran número de investigaciones e importantes avances en materia de selección de este tipo de animales se han realizado, así como en el control del ciclo estral, las técnicas de multiovulación y la IA a tiempo fijo (IATF).

### **1.2.1. Selección de las hembras donantes en programas de TE.**

Es importante hacer una adecuada selección de la hembra donante ya que ésta interviene directamente en los resultados obtenidos tras la aplicación de la técnica. Además de la superioridad genética en las donantes, se deben tener en cuenta factores como ciclos estrales regulares, precocidad reproductiva, si la vaca ha tenido uno o dos servicios por concepción en gestaciones anteriores, comportamiento individual superior a la media del grupo en características de importancia productiva (peso al destete, al año y a los dieciocho meses, etc.), que produzca crías superiores a la media del hato, especialmente comparado con las hermanas de la hembra (descendientes del mismo toro), ningún problema al parto, ninguna irregularidad reproductiva, así como ningún defecto genético o de conformación detectable (Bó, 2002).

Las hembras donantes deben ser incluidas en un programa de nutrición balanceada antes de efectuar el proceso de superovulación, donde se debe procurar administrar forrajes que brinden al animal los nutrientes necesarios para que se cumplan las funciones reproductivas, además de la incorporación de productos que den al animal adecuados niveles energéticos en la dieta así, como es el caso de suplementos vitamínicos y minerales (Gordon, 1999; Gonzáles, 2001).

En la TE se debe evitar el uso de animales obesos como donantes, ya que esta condición puede manifestarse directamente sobre la producción de los embriones

(Palma, 2001). Todos estos factores acompañados de un excelente manejo sanitario, permiten la obtención de óptimos resultados al realizar la colecta de los embriones.

Así mismo, es necesario determinar qué tipo enfermedades están presentes en la hembra ya que los embriones además de transportar una valiosa información genética, también pueden ser una fuente importante de diseminación de enfermedades reproductivas tales como las producidas por el herpes virus bovino Tipo 1 (Rinotraqueitis Infecciosa Bovina IBR), el virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB), la Leucosis Viral Bovina; agentes bacterianos como *Brucella abortus*, *Campylobacter foetus* Sub. *Venerealis* y *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* y de otras bacterias como *Streptococcus agalactiae*, *Actinomyces pyogenes* y *E. coli*, ya que el agente infeccioso va a estar presente en las células embrionarias o puede estar asociado con la zona pelúcida (Stringfellow, 2000). En los mamíferos, la zona pelúcida se constituye como una matriz extracelular o “cubierta externa” que rodea a los ovocitos pre y ovulatorios, y a los embriones jóvenes hasta la fase de blastocisto cuando inicia la eclosión, momento en el cual se fracciona esta barrera, permitiendo que el embrión junto con sus membranas asociadas entren en contacto directo con el endometrio uterino, proceso que ocurre entre los ocho y los nueve días de edad (Apelo, 1989; Gordon, 1999; Jiménez, 2005).

Además de estos puntos a tener en cuenta, debe verificarse también que a la hembra donante se le brinde un periodo de descanso post-parto mínimo de 60 días, para garantizar una efectiva involución uterina, acompañada por una buena

ciclicidad reproductiva (González, 2001). Es importante retirar el ternero lactante de la madre, para que así el estímulo producido por la cría no afecte el desempeño reproductivo de ésta, logrando un mayor rendimiento de la hembra en este proceso biotecnológico (Palma, 2001).

Gran parte de las investigaciones se han dirigido al estudio de factores como el tipo de gonadotropina a ser utilizada en el protocolo de apoyo hormonal, evaluando cuál es más efectivo para producir ovulaciones múltiples con oocitos de buena calidad que generen un embrión excelente después de la fecundación. Un factor importante en una superovulación exitosa es el desarrollo y el número de los folículos presentes en el ovario al momento de la evaluación de la respuesta de la hembra donadora al tratamiento hormonal (Bó, 2003), por eso es de gran importancia hacer evaluaciones y seguimiento de los tamaños de las estructuras ováricas a lo largo de las diferentes etapas de la técnica de TE.

### **1.3. Aspectos asociados a la eficiencia en TE relacionados con la aplicación de la técnica.**

El equipo técnico encargado de realizar los diferentes procedimientos durante cada etapa de la técnica, interviene directamente en la obtención de buenos resultados tras la aplicación de esta biotecnología; por esto es de gran importancia que esté compuesto por un personal idóneo. En un trabajo realizado por Bó (2003), se evidencian diferencias en tasa de preñez ( $P < 0.05$ ), después de la aplicación TE por cuatro diferentes operarios que aplicaron esta técnica, teniendo

en cuenta, adicionalmente, la calificación de la transferencia (buena, regular, mala) en un grupo experimental compuesto por 867 animales. De esta manera se evidencia que la aplicación de la técnica puede incidir en la eficiencia, representada en preñeces, en un programa de TE (Bó, 2003).

### **1.3.1. Mecanismos para colecta de los embriones.**

Después de treinta horas de llevarse a cabo la IA comienzan a producirse los primeros clivajes del cigoto. Durante estas primeras horas de desarrollo, el embrión utiliza el oxalacetato y el piruvato como sustratos para su mantenimiento. Después de transcurridas cerca de cien horas post-inseminación, se encuentran 16 células aproximadamente en el interior del embrión, momento en el que comienza la migración. El día seis el embrión presenta ya entre 16 y 32 células aproximadamente en su interior y utiliza como fuente energética la glucosa (Palma, 2001). Una vez transcurridos seis días, el embrión se dirige hacia el útero, y comienza a sufrir la compactación de las células presentes en su interior; este estadio recibe el nombre de mórula temprana. Durante esta etapa de compactación aumenta la presión entre las células lo que permite la formación de uniones fuertes entre éstas, para actuar conjuntamente como un organismo. La acumulación de líquido proveniente del metabolismo celular que hace que se desplace el paquete celular para formarse un espacio al interior del embrión llamado blastocelo (Hernández, 2008), este espacio permite observar una capa celular interna y una externa que reciben el nombre de embrioblasto y trofoblasto respectivamente. En este estadio comienzan a presentarse las anomalías de



tipo cromosómico las cuales pueden desencadenar pérdida embrionaria (Hernández, 1995). Para el día siete el embrión se encuentra ubicado en el cuerno uterino y se encuentra en el estado evolutivo correspondiente a blastocisto (Lequarre, 2004; Araujo, 2005).

Al obtener los embriones provenientes de una hembra donante se espera que estos se encuentren en la fase evolutiva correspondiente a los seis días y medio o siete días de desarrollo, en estadio de mórula, mórula compacta o blastocisto temprano (conservando aun su zona pelúcida intacta), este es el momento adecuado para realizar la colecta de estas estructuras (Stingfellow, 2000).

Las técnicas para coleccionar los embriones se basan en realizar un lavado de los cuernos uterinos para de esta forma poder coleccionar en un medio nutritivo los embriones, ya que éstos todavía no se han adosado al endometrio, esta práctica se efectúa por vía vaginal, introduciendo un catéter, mediante el que se instila un medio enriquecido que es recuperado posteriormente por sifonaje en donde se encuentran los embriones (Tribulo, 2002). Es importante la no manipulación excesiva de los tejidos uterinos ya que cualquier imprecisión en el manejo de estos causaría disminuciones en la obtención de buenos resultados debidos a la liberación de prostaglandinas a nivel uterino (Bó, 2003).

### **1.3.2. Clasificación y manipulación de embriones.**

Después de la obtención de los embriones son clasificados para descartar estructuras que demuestren degeneramiento, que no coincidan con la edad, o

ambos, lo que indicaría que en algún momento del ciclo evolutivo se detuvo el desarrollo (Bó, 2003). La evaluación visual de los embriones no es una ciencia exacta sino una técnica subjetiva utilizada para evaluar un sistema biológico en desarrollo (Gorlach, 1999). En ese sentido, para obtener los mejores resultados en la técnica es importante tener en cuenta el sistema de clasificación basado en la calidad y el estado de desarrollo del embrión que va a ser transferido. Según la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS), los estados de desarrollo están clasificados así: 1. No fecundado; 2. Dos a doce células; 3. Mórula temprana; 4. Mórula; 5. Blastocisto temprano; 6. Blastocisto; 7. Blastocisto expandido; 8. Blastocisto eclosionado; 9. Blastocisto eclosionado expandido. Por calidad los embriones son clasificados así: Código 1. Excelente o bueno; Código 2. Regular; Código 3. Malo; y Código 4. Muerto / degenerado (Stingfellow, 2000).

Después de ser clasificados, los embriones son criopreservados, utilizando un medio que favorezca este proceso. En el estado de criopreservación los embriones son almacenados durante largo tiempo, desde que se cumplan ciertas exigencias en cuanto a la temperatura de almacenamiento, la cual debe ser cercana a los  $-197^{\circ}\text{C}$ , mediante nitrógeno líquido. Los embriones también pueden ser transferidos sin ser criopreservados (en fresco) a una hembra receptora previamente seleccionada, a la que ha realizado un efectivo control del ciclo estral, la cual debe encontrarse en el día siete post-celo para que coincida con la edad cronológica del embrión que va a alojar en el útero (Gorlach, 1999); ya que la asincronía entre las hembras donante y receptora afecta los resultados tras la

aplicación de esta técnica (Bó, 2003).

La técnica de transferencia de embriones se basa en la liberación de un embrión en la curvatura mayor del útero del cuerno ipsilateral al ovario que presente el cuerpo lúteo de mayor tamaño; tratando de ejercer la menor manipulación posible a el útero, para así evitar la liberación de prostaglandinas que afectarían la viabilidad del embrión durante este proceso (Gordon, 1999; Gorlach, 1999; Gonzáles, 2001).

#### **1.4. Aspectos asociados a la eficiencia en TE relacionados con las hembras receptoras.**

Gran parte de la atención en la investigación ha sido enfocado a la hembra donante de embriones, a la que se han aplicado un sin número de protocolos de control del ciclo estral por medio de diferentes apoyos hormonales, técnicas de obtención, manipulación y preservación de los embriones, así como de protocolos de multiovulación en los que se han utilizado varios tipos de hormonas que desencadenan este efecto mediante el cual se obtienen ovulaciones múltiples (hormona folículoestimulante FSH). Pero al obtener un embrión después de realizar la clasificación de éste, uno de los puntos de gran importancia que afecta la eficiencia de esta técnica, está asociado a todo el ambiente embriotrófico presente en la hembra que va a recibir a éste en el útero (hembra receptora) permitiendo el desarrollo; por esta razón es importante realizar una excelente selección de ésta. La eficiencia tras la aplicación de este tipo de programas se ha

visto afectada debido a la utilización de hembras receptoras con deficiencias de tipo nutricional, sanitarias, de manejo, reproductivas, comportamentales, etiológicas entre otras (Vasconcelos, 2006); que hacía que los resultados obtenidos no fueran los mejores. Pero actualmente el criterio de selección de estas hembras, que van a ser tenidas en cuenta en un programa de TE, es más estricto por parte de los profesionales que ponen en práctica ésta técnica biotecnológica, para así poder obtener mejores resultados (Palma, 2001; Duica, 2007).

#### **1.4.1. Selección de hembras receptoras de embriones en un programa de TE.**

En el éxito de un programa de transferencia de embriones influyen muchos factores, uno de los más importantes es la selección de las novillas receptoras (González, 2001; Chagas, 2002; Sartori, 2004); éstas deben ser saludables y reproductivamente sanas (Huertas, 1991), verificando la presencia de estructuras que demuestren ciclicidad ovárica. El objeto de la exploración y valoración clínico-reproductiva es rechazar animales con anomalías reproductivas (órganos sexuales juveniles, hermafroditismo, ninfomanía, infecciones uterinas, entre otros) descartando también novillas que presenten sobrepeso (Gordon, 1999). Es importante realizar un análisis sanguíneo en busca de evidencia serológica de las enfermedades infectocontagiosas desencadenadas por las mismas etiologías que en las hembras donantes, ya que éstos son factores que afectan directamente el desempeño reproductivo en la hembra receptora de embriones (Hafez, 2000; Stringfellow, 2000; Jiménez, 2005).

Las hembras que están ciclando no deben ser expuestas a los toros y se debe contar con un sistema de identificación de los animales que sea simple, efectivo y permanente, que permita llevar a cabo una de detección eficiente de calores (Gordon, 1999).

Además de los factores individuales que afectan la efectividad en las novillas utilizadas en un programa de TE, la nutrición y los niveles energéticos en la dieta tanto de la donadora como de la receptora son puntos importantes para tener en cuenta (Lopez, 2005). En Colombia, para obtener buenos resultados ante el tratamiento hormonal, en vacas y novillas de la raza Holstein Friesian, se deben satisfacer las necesidades nutricionales para mantener los niveles de glucosa en sangre entre 70 y 90 mg/dl (Schroeder, 2005).

#### **1.4.2. Importancia de la evaluación de estructuras ováricas en hembras receptoras de embriones.**

En la evaluación de las estructuras ováricas en las hembras receptoras de embriones, por medio de ultrasonografía trans-rectal, se ha podido determinar que la estructura del folículo preovulatorio afecta de manera directa el subsecuente tamaño del cuerpo lúteo, observando que un folículo preovulatorio de 1.3 cm da paso a un cuerpo lúteo que el día siete mide 5 milímetros de diámetro y produce niveles de progesterona plasmáticos de 1.22 ng/ml y el día 14 el mismo cuerpo lúteo mide 6 milímetros de diámetro y genera concentraciones plasmáticas de progesterona de 2.48 ng/ml. Así mismo un folículo preovulatorio de mayor tamaño (1.6 cms) ha dado paso a un cuerpo lúteo que el día siete mide 6 milímetros de diámetro y produce unos niveles de progesterona plasmáticos de 1.61 ng/ml y el día 14 el cuerpo lúteo mide 9 milímetros de diámetro y genera unas concentraciones sanguíneas de 3.05 ng/ml ( $P < 0.05$ ). Al haber una mayor producción de progesterona plasmática se esperaría generar unas condiciones uterinas más favorables para el desarrollo embrionario temprano (Kastelic, 1990; Bridges, 2000; Vasconcelos, 2001; Sartori, 2002). Por eso es importante determinar el tamaño de las estructuras ováricas antes de realizar la transferencia del embrión a la hembra receptora, lo cual permite la obtención de mejores resultados después de la aplicación de la técnica de TE (Duica, 2007). Kastelic en un estudio realizado en 1990 reporta que el tejido luteal y los niveles plasmáticos de progesterona están altamente correlacionados, afirmando que el análisis del

tamaño del cuerpo lúteo es una herramienta viable para predecir las concentraciones en sangre de progesterona. Baruselli, 2001, en estudios realizados reportó que al realizar ultrasonografía ovárica a un grupo de 140 animales, los cuerpos lúteos de más de dos centímetros de diámetro produjeron niveles de progesterona circulantes de 2.44 ng/ml, y una tasa de concepción del 58% en hembras a las que se le transplanto un embrión el día siete post-estro; las hembras en las que se evidenciaron cuerpos lúteos de 1.55 centímetros de diámetro produjeron niveles de progesterona circulantes de 1.75 ng/ml, y tuvieron una tasa de concepción del 41%; mientras que en las hembras que presentaron cuerpos lúteos menores de 1.5 centímetros de diámetro se evidenciaron niveles de progesterona circulantes de 1.19 ng/ml, y tuvieron una tasa de concepción del 31% ( $P < 0.05$ ). Spell, 2001, reporta que con un tamaño de cuerpo lúteo de 2.36 centímetros se evidenció una concentración plasmática de 4.2 ng/ml con una tasa de preñez del setenta por ciento, en hembras receptoras de embriones a las que se les fue transferido el embrión el día siete post-celo.

### **1.5. Elementos referenciales del ciclo estral, desarrollo embrionario y reconocimiento materno de la preñez en hembras receptoras de embriones.**

Para comprender lo que ocurre dentro del ciclo estral sincronizado por medio de la utilización de terapias hormonales, es necesario comprender las diferentes etapas y fases involucradas dentro de un ciclo estral en condiciones no controladas. Por ese motivo se hace un acercamiento a los diferentes aspectos que enmarcan el ciclo.

El desarrollo reproductivo en el animal inicia en la fase fetal en la que se produce la formación de los órganos reproductivos; pero éstos van a iniciar su actividad completa hasta que el organismo presente un estado de desarrollo corporal (madurez) que permita iniciar la pubertad. Durante el periodo pre y puberal comienzan a desencadenarse una serie de cambios iniciados por acción hormonal, que tienen como finalidad producir la primera ovulación efectiva, evidenciando así externamente el comportamiento sexual de la hembra bovina, con el incremento de la concentración sanguínea de hormonas gonadotrópicas y su factor liberador (Hernández, 2001). Esta etapa del desarrollo reproductivo del animal depende de una serie de factores que lo afectan, como son la raza, el estado nutricional, temperatura ambiental, la humedad relativa, el fotoperiodo, el peso del animal, entre otros (Gordon, 1999; Gorchach, 1999; Hafez, 2000; Gonzáles, 2001; Palma, 2001; Baruselli, 2005). Durante el periodo prepuberal el animal experimenta un bloqueo en la liberación de gonadotropinas hipofisarias, en donde los pulsos de estas hormonas son de baja amplitud y baja frecuencia. La inhibición es producida, principalmente, por la acción de los estrógenos, que generan un bloqueo en el eje hipotálamo-hipofisario; a medida que el animal se acerca a la etapa puberal, esta sensibilidad hacia los estrógenos va disminuyendo progresivamente ya que el número de receptores para estradiol en el hipotálamo disminuye durante la pubertad. A continuación, se inicia la liberación de las gonadotropinas hipofisarias, permitiendo que se aumenten tanto la frecuencia como la amplitud en los incrementos transitorios de liberación de estas hormonas (Hernández, 2008). Los estrógenos también actúan estimulando la liberación de



sustancias de características opioideas como las endorfinas- $\beta$  las cuales suprimen la liberación del factor liberador de gonadotropinas, incrementando el bloqueo hormonal durante la etapa prepuberal (Hernández, 2001).

El control reproductivo neuroendocrino en la hembra bovina se produce por la suma de varios factores que intervienen en el comportamiento y el desencadenamiento de las etapas del ciclo estral. El ciclo estral es el conjunto de sucesos ocurridos en la hembra bovina entre dos estros, el cual tiene una duración 18 a 21 días (Hafez, 2000; Senger, 2003; Hernández, 2008).

Inicialmente el entorno juega un papel importante ya que va a tener un impacto directo sobre la actividad estral de la hembra bovina (Bridges, 2000; Maldonado, 2005). Normalmente la hembra bovina presenta ciclos estrales en forma continua durante todo el año, razón por la que se clasifica como poliéstrica continua (Hafez, 2000).

Otro factor que incide de manera directa sobre el comportamiento reproductivo en el animal, está asociado con la nutrición, ya que al brindarle una alimentación balanceada a éste, va a expresar de manera efectiva su potencial genético; sin desconocer la importancia adicional de mantener un excelente status sanitario y un excelente manejo en las empresas ganaderas. La unión de éstos factores va a permitir que el animal presente un comportamiento reproductivo regular (Gorlach, 1999).

El ciclo estral de la hembra bovina está dividido en dos fases, la folicular y la

luteal; en cada una de las fases se encuentran presentes en el ovario estructuras características como el folículo y el cuerpo lúteo respectivamente. A su vez el ciclo presenta cuatro estados, en los que el útero y los ovarios presentan una serie de cambios característicos, estos son el proestro, el estro, el metaestro y el diestro (Senger, 2003). Todos los cambios presentes en las estructuras ováricas y uterinas, son controlados por mecanismos neuroendocrinos, que se desencadenan en el encéfalo ya que el cerebro recibe señales nerviosas del ambiente que rodea al animal; estos estímulos son enviados por los órganos sensitivos que transforman la información obtenida en impulsos nerviosos, los cuales son dirigidos a varias zonas del cerebro, en donde son codificados y retransmitidos al hipotálamo, que integra el sistema neuro-endocrino. El hipotálamo es una estructura altamente especializada, ubicada entre el quiasma óptico y los cuerpos mamilares; a la que se dirigen estímulos del cerebro y envía señales de tipo hormonal y nervioso a una glándula bilobulada denominada hipófisis. La comunicación entre estas dos estructuras se lleva a cabo por medio del eje hipotálamo hipofisiario, por medio de hormonas encargadas de controlar un gran número de actividades fisiológicas en el organismo (Rivera, 1992), las cuales intervienen en cada una de las diferentes etapas del ciclo estral.

Dentro de las etapas del ciclo se encuentra el proestro, el cual es influenciado por la acción de los estrógenos procedentes de los folículos en desarrollo, este incremento en los niveles desencadenan el aumento en la turgencia de las paredes del útero, mientras que en la vagina se produce un mayor aporte

sanguíneo produciendo en las mucosas una coloración rosa; así mismo comienza a evidenciarse la presencia de moco cervical (Hafez, 2000); esta etapa tiene una duración cercana a tres días; al iniciar este estado se encuentra el animal en el final de la regresión del cuerpo lúteo del ciclo anterior, el cual está bajo influencia de la PGF2 $\alpha$  de origen uterino, que es un importante y potente agente luteolítico (Niswender, 1994); también intervienen en este proceso otras hormonas como los estrógenos, la oxitocina, la LH y la misma progesterona, además de péptidos como la endotelina 1, proteínas como el factor de necrosis tumoral y células del sistema inmune, entre otros; de esta forma, el cuerpo lúteo sufre una la regresión funcional en la que experimenta una rápida disminución de peso y tamaño de las células que lo forman (Zeng, 1994). La liberación de progesterona desciende al inicio del estado de proestro, debido a la regresión estructural determinada por la degradación de las células que conforman el cuerpo lúteo, (luteolisis) (Pate, 1994), desencadenada por el aumento de la concentración del Calcio intracelular, que estimula las enzimas endonucleasas fragmentadoras del DNA (Niswender, 1994). La regresión del cuerpo lúteo finalmente va a generar una estructura cicatrizal no funcional llamada cuerpo albicans. Con la disminución de los niveles de progesterona se desactiva el efecto de retroalimentación negativa ejercido en el encéfalo, permitiendo el aumento en la producción y liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en el hipotálamo; esto hace que se liberen las gonadotropinas de síntesis hipofisiaria, produciendo un aumento en la frecuencia de la liberación pulsátil de LH y de FSH (Palma, 2001; Ineskeep, 2004). Al aumentar la producción de GnRH la adenohipófisis se sensibiliza cada vez

más aumentando la respuesta ante la acción de la hormona liberadora, lo que va a permitir que se liberen mas hormonas hipofisiarias durante la fase folicular, favoreciendo el desarrollo de las ondas de desarrollo folicular en el ovario (Kinder, 1991). A medida que se produce el desarrollo del folículo, este aumenta la producción de estradiol, el cual va actuar en el encéfalo, generando una mayor producción de hormonas hipofisiarias, especialmente LH, pero también actúa sobre el tracto reproductivo, preparando a la hembra para el periodo del estro (Palma, 2001).

El estro es un estado en el cual hay una fuerte influencia estrogénica; presenta una duración entre 4 y 24 horas (Senger, 2003). Durante esta etapa el estradiol circulante produce cambios en el tracto reproductivo, encontrándose una marcada turgencia a nivel uterino. La mucosa vaginal se va a encontrar altamente irrigada, motivo por el cual se encuentra edematizada, congestionada y de color rojizo. Dentro de los cambios presentes en el útero, en el cérvix se evidencia una marcada dilatación de esta estructura, y su zona externa se encuentra expuesta hacia la mucosa vaginal; esta serie de cambios son regulados por la acción de la oxitocina (Fuchs, 1996), la progesterona y la prostaglandina E2 durante el proestro y el estro (Shemesh, 1997).

La producción de moco cervical es también influenciada por acción estrogénica, haciendo que se aumente la producción, desencadenando la descarga hacia el exterior del sistema reproductivo. El moco se torna menos viscoso, hialino, cristalino y se producen cambios en su conformación ya que el sistema de

arborización del moco al encontrarse bajo la influencia estrogénica, permite que las moléculas de glucoproteína que lo conforman, abran espacios entre las fibras permitiendo el paso de los espermatozoides, para el momento en que es depositado el material seminal por parte del macho (Hafez, 2000).

El estro está acompañado por una serie de conductas en la hembra como la disposición de ésta a recibir el macho, permitir que otras hembras la monten, está inquieta, levanta la cola, brama con frecuencia, disminuye su apetito, está ansiosa. En ese momento es inducido un mecanismo de retroalimentación positiva que estimula al hipotálamo para que se produzca la liberación de GnRH, desencadenando la liberación de FSH y LH aumentando la amplitud y frecuencia de los pulsos de estas hormonas (Palma, 2001). La liberación de la hormona luteinizante, continua incrementándose, hasta que se produce un aumento transitorio (pico) en su liberación, antes del evento de la ovulación, que ocurre entre el estro y el metaestro, denominado como pico preovulatorio (Bó, 2002; Gong, 1995).

El siguiente periodo del ciclo estral una vez terminado el periodo de estro es el metaestro, que tiene una duración aproximadamente de seis días, durante el cual los niveles estrogénicos caen de una manera abrupta, mientras que los niveles progestágenos comienzan a incrementarse; al inicio de este periodo se lleva a cabo un importante evento en el ciclo estral de la hembra bovina, en el que el folículo se rompe liberando el líquido folicular y un oocito, el cual ha estado adosado a la superficie interna del folículo por el *cumulus oophorus*; Al producirse

la ovulación, que ocurre 10 a 20 horas después de terminado el estro en el caso de la hembra bovina, un oocito es liberado para su próxima fecundación (Rodríguez, 2001).

A lo largo del ciclo estral la liberación de hormonas presenta un comportamiento a manera de elevaciones transitorias o picos, los cuales varían en amplitud y frecuencia; al inicio del metaestro se produce un incremento en la liberación de hormona luteinizante (LH), llamado pico preovulatorio, mediante el cual va a desencadenarse un incremento en la irrigación sanguínea que se dirige al ovario generando un proceso inflamatorio en el folículo preovulatorio que es favorecido por la acción de agentes vasoactivos (Espey, 1994); desencadenando un proceso de edematización en las células que conforman los estratos celulares de la teca interna y externa folicular; aumentándose la presión intrafolicular y favoreciendo el mecanismo de ovulación.

La liberación de LH preovulatoria también genera una señal que actúa sobre la membrana plasmática de varios tipos de células presentes en el folículo maduro, produciendo su despolarización; lo cual altera la concentración de líquidos intra y extracelulares, propiciando la disminución del espesor de la pared del folículo (Espey, 1994). Este paso de líquidos al interior del folículo favorece la degradación del tejido conectivo presente en la pared externa folicular, induciendo la formación de un área de adelgazamiento de esta pared que recibe el nombre de estigma folicular y se convierte en el sitio exacto para el rompimiento del folículo produciendo la ovulación. Este proceso también es mediado por la acción de la

hormona prostaglandina  $F2\alpha$ , ya que ingresa a las células foliculares y produce el rompimiento de los lisosomas de estas células, liberando enzimas que favorecen a la formación del área de ovulación en la pared folicular externa, la  $PGF2\alpha$  genera la contracción de toda la estructura folicular desencadenando la liberación del folículo por el incremento de la presión intrafolicular, el cual queda libre en el espacio periovárico en donde es captado por las fimbrias, las que por acción hormonal en el momento de la ovulación están dispuestas hacia el ovario captando el oocito y lo direccionan hacia el interior del oviducto (Senger, 2003).

A lo largo del metaestro, se incrementan los niveles de progesterona circulante; después de la ovulación y mediante la ayuda de esta hormona se genera una disminución de la acción inflamatoria que se presentaba en el folículo preovulatorio (Espey, 1994). Al liberarse el oocito y el líquido folicular que ejercían una gran presión dentro de esta estructura; el gran espacio presente en la superficie ovárica es llenado rápidamente de sangre, recibiendo el nombre de cuerpo hemorrágico; en este momento (en este punto) comienza a formarse una intrincada red de capilares que invaden esta zona. A continuación, las células de la teca inician un proceso de hipertrofia, hiperplasia y migración hacia las células de la granulosa; este conjunto de células aumentan el número de receptores de membrana para hormonas hipofisiarias, pero en mayor número para receptores de LH. Las células que estaban presentes en el folículo comienzan a transformarse morfológica, endocrina y bioquímicamente, para convertirse en células luteales desarrollando así, siete días después de presentado el celo, un cuerpo lúteo

totalmente funcional (Kastelic, 1990; Niswendender, 1994; Smith, 1994; Chabbert-Buffet, 2000).

Estructuralmente el cuerpo lúteo presenta dos tipos de células, las células luteales grandes, que provienen de las células de la granulosa del folículo y las células luteales pequeñas, derivadas de las células de la teca interna (Rivera, 1992; Smith, 1994; Palma, 2001).

Una vez formado un cuerpo lúteo totalmente desarrollado, consolidado y funcional el animal alcanza el estado de diestro que tiene una duración entre 10 y 14 días. El diestro se encuentra bajo la influencia del cuerpo lúteo y la hormona que presenta una mayor actividad en esta etapa es la progesterona. La anterior hormona actúa sobre el útero favoreciendo el desarrollo embrionario temprano ya que permite un ambiente uterino adecuado (Grygar, 1997; Bridges, 2000; Chabbert-Buffet, 2000). El útero presenta una disminución de la tonicidad miometrial, característica de esta etapa, que favorece la fijación del *conceptus* para así prevenir pérdidas embrionarias tempranas (Ineskeep, 2004; Green, 2005). La mucosa vaginal se encuentra pálida y seca, mientras que el cervix está contraído y sellado por un moco cervical que es escaso, denso en ocasiones amarillento que tiene como función aislar el interior del útero del ambiente externo (Hafez, 2000; Senger, 2003).

Durante el diestro se presenta una gran liberación de progesterona, por parte de las células luteales grandes y las células luteales pequeñas debido a la activación



del AMP cíclico y la proteinquinasa A, proceso en el que interviene la hormona LH que al llegar a las células luteales grandes permite la expresión del mRNA que codifica para el factor I de crecimiento similar a la insulina (IGF – I) (Niswender, 2002); de la misma forma se aumenta la síntesis de receptores para este factor de crecimiento, desencadenando el aumento en la producción de progesterona (Chabbert-Buffet, 2000). En el mecanismo de aumento de liberación de la progesterona también intervienen la PGI<sub>2</sub>, que estimula las células luteales grandes, al incrementar el aporte sanguíneo que se dirige al ovario, desencadenando así un estímulo positivo sobre la síntesis y secreción de progesterona (Rivera, 1992).

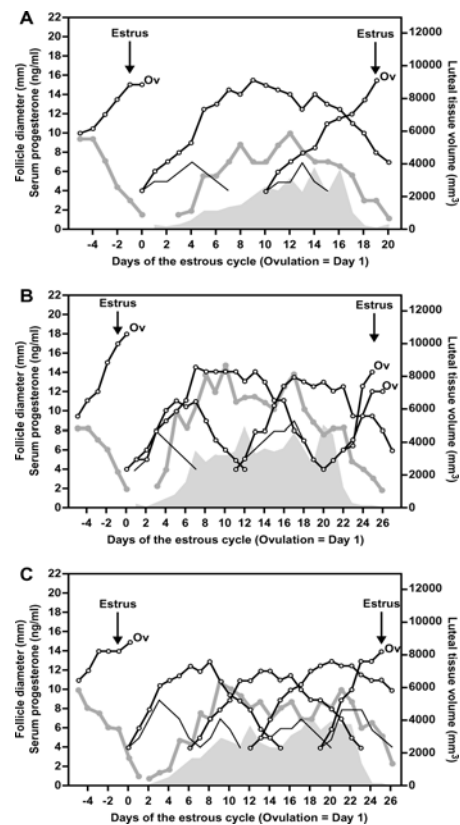
Otra de las sustancias que intervienen en el proceso de secreción de progesterona es la noradrenalina, que al llegar al cuerpo lúteo, estimula los  $\beta$ -adrenoreceptores que se encuentran en las células luteales pequeñas, permitiendo la liberación de la hormona (Pesta, 1994). Si no fue fecundado el oocito y por ende no se encuentra un embrión viable en el útero, entre los días 16 a 19 del ciclo estral se desencadena la activación de los mecanismos luteolíticos, generando una disminución de los niveles de progesterona, mientras que los pulsos de LH comienzan a aumentar su frecuencia (Hernández, 2000; Palma, 2001). Una vez iniciado el proceso de luteolisis se produce la estimulación del epitelio luminal glandular del útero (Pate, 1994), desencadenando la liberación del principal agente luteolítico como es la prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  (Gordon, 1999). Durante el diestro la progesterona hace que se aumenten las reservas de fosfolípidos y la actividad de la enzima prostaglandina sintetasa, necesaria para convertir el ácido

araquidónico en prostaglandina F<sub>2α</sub>, ya que la presencia de progesterona en los primeros días de dominancia luteal además de preparar el útero para una posible preñez (Ineskeep, 2004), también activa los mecanismos para la producción endometrial de prostaglandina F<sub>2α</sub>. La PGF<sub>2α</sub> llega finalmente al cuerpo lúteo haciendo contacto con los receptores de las células luteales y genera la disminución de la producción de progesterona a través de una serie de eventos intracelulares en los que se induce a la muerte celular o apoptosis, permitiendo la regresión del cuerpo lúteo presente para dar paso al inicio de un nuevo ciclo estral (Rodríguez, 2001).

#### **1.5.1. Desarrollo folicular.**

Desde hace más de 35 años se está investigando en el patrón de desarrollo folicular en la hembra bovina. Inicialmente se informó que la dinámica folicular se presentaba en dos ondas de desarrollo, la primera iniciando el día 3 y decreciendo en la mitad del ciclo (día 12), presentando un desarrollo y una subsiguiente regresión; la segunda onda se iniciaba en la mitad del ciclo (día 10 al 13) y terminaba en una ovulación efectiva (Gordon, 1999). Con la ayuda de las técnicas de ultrasonografía se avanzó en el entendimiento del desarrollo folicular ovárico durante el ciclo estral bovino, evidenciándose que pueden presentar dos, tres y rara vez cuatro ondas de crecimiento (Sirois, 1990; Fortune, 1993) este comportamiento ha sido ampliamente estudiado por varios autores pero es claramente evidenciado en trabajos realizados por Sartori, 2004 en donde realizó un completo seguimiento de la dinámica folicular en novillas Holstein (Figura 1).

**Figura 1. Modelo de los patrones de desarrollo folicular, luteal y perfiles de progesterona durante el ciclo estral bovino.**



Línea negra con puntos blancos: Folículos dominantes. Línea gris con puntos: Desarrollo luteal. Área gris: Concentración plasmática de progesterona. A: Ciclo estral con 2 ondas de desarrollo folicular y ovulación sencilla. B: Ciclo estral con 3 ondas de desarrollo folicular y doble ovulación. C: Ciclo estral con 4 ondas de desarrollo folicular y doble ovulación.

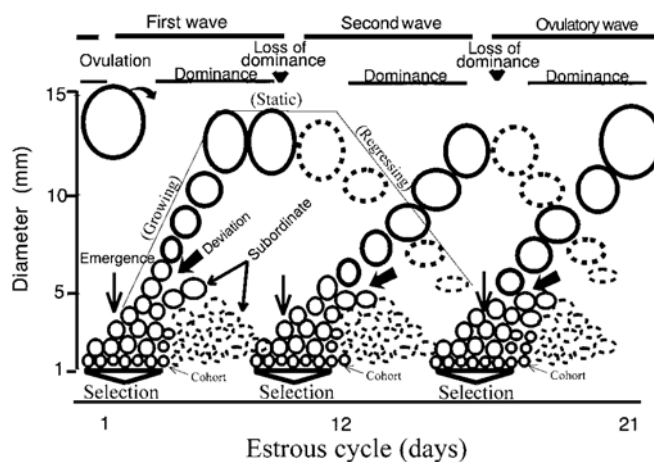
**Fuente: Tomado de Sartori, R. 2004.**

En cada onda de crecimiento folicular se presentan varias etapas. En la primera

un grupo de folículos comienzan a desarrollarse bajo la influencia de las hormonas hipofisarias (Crowe, 2008), llamada fase de reclutamiento, a continuación se describe una segunda etapa en la que el folículo dominante comienza a crecer más que los otros folículos de su grupo, los cuales se subordinan y recibe el nombre de dominancia (Lopez, 2005); así el folículo dominante que es el de mayor tamaño, en esta etapa presenta un diámetro de 10 o más milímetros, inhibe el crecimiento de los folículos de la cohorte folicular que se encuentran en desarrollo (Hafez, 2000, Sartori, 2004). En este folículo se produce una mayor síntesis de mRNA que codifica para receptores de hormona FSH, motivo por el que se aumenta la densidad de estos receptores en la superficie de las células del folículo (Rodgers, 1999), permitiendo un mayor desarrollo del folículo dominante. Los niveles circulantes de esta hormona disminuyen y de esta manera se ve afectado el crecimiento de los folículos subordinados pero no del folículo dominante. Adicionalmente, durante este periodo se produce el incremento de la síntesis de mRNA para la producción de receptores para LH en la superficie del folículo dominante lo que permite que este continúe con su desarrollo hasta la etapa de folículo ovulatorio (Ineskeep, 2004; Webb, 2004). Es importante tener en cuenta que en estados iniciales del desarrollo folicular, cuando los folículos miden menos de 4 milímetros, no dependen del soporte gonadotrópico de origen hipofisario, mientras que los folículos mayores de 4 milímetros necesitan de la acción de la hormona FSH para continuar con su desarrollo y de los pulsos de LH que son necesarios para continuar con el crecimiento del folículo de mas de 9 milímetros de diámetro; al desarrollarse completamente el folículo dominante se encarga de

gran parte de la secreción de estrógeno ovárico durante el estro, esta secreción disminuye rápidamente al presentarse el pico de LH (Gong, 1995; Crowe, 2008) (Figura 2).

**Figura 2. Modelo de la dinámica folicular durante el ciclo estral bovino.**

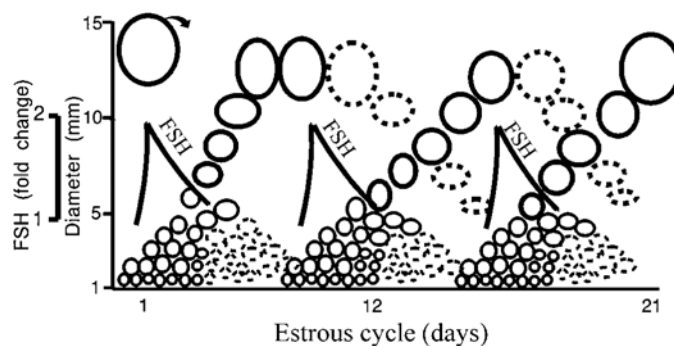


**Fuente: Tomada de Ireland, J. 2000.**

Las ondas de desarrollo folicular son relacionadas estrechamente con la producción y secreción de hormona folículo estimulante, ya que se presenta una elevación en los niveles de esta hormona entre dos y tres días antes de la emergencia de una nueva onda de desarrollo folicular (Adams, 1992; Ireland, 2000). El patrón de crecimiento folicular durante el ciclo estral, comienza con el desarrollo de un grupo o cohorte de folículos (3 a 6 folículos) después uno de estos alcanza el estado de folículo dominante, haciendo que los demás folículos se subordinen, sufriendo atresia folicular, pero únicamente en la última onda del ciclo el folículo dominante continúa su desarrollo hacia la ovulación (González,

2001; Lopez, 2005; Rosales, 2008). El inicio de las ondas se presenta entre los días 1 a 4 y 9 a 12 para los ciclos de dos ondas, mientras que en los ciclos de tres ondas, la tercera inicia hacia el día 16. (Hernández, 2000) (Figura 3).

**Figura 3. Modelo en el que se relaciona los incrementos transitorios de FSH durante un ciclo estral bovino en el que se presentan tres ondas de desarrollo folicular.**



**Fuente: Tomada de Ireland, J. 2000.**

El sistema de desarrollo folicular se encuentra bajo el control del sistema endocrino y paracrino en el que intervienen las hormonas gonadotrópicas, las citoquinas que actúan como mensajeros químicos, los factores de crecimiento (que favorecen varios procesos como la proliferación celular), los esteroides y otras moléculas reguladoras (Gordon, 1999). El folículo ovárico experimenta una rápida proliferación celular durante su crecimiento temprano, el cual aparentemente es independiente de las gonadotropinas circulantes, pero es susceptible a la acción de los factores de crecimiento; es posible que los agentes

ováricos autocrinos y paracrinos regulen el crecimiento folicular (De Moraes, 1997). Los factores de crecimiento son sustancias de origen protéico que actúan por mecanismos autocrinos y paracrinos interviniendo en la actividad mitótica de la célula, desencadenando una proliferación y reorganización de los tejidos, como ocurre en las estructuras transitorias presentes en el ovario. Estos factores pueden clasificarse en grupos. Dentro del primer grupo están los factores que promueven la división y desarrollo celular, el factor I de crecimiento similar a la insulina (IGF – I), el factor de crecimiento nervioso (NGF), factores de crecimiento epidérmicos (EGF), las Inhibinas y las activinas. Dentro del segundo grupo se encuentran las citoquinas, las cuales son producidas por los macrófagos y linfocitos, ayudando a la regulación del sistema inmune (Knight, 2001).

El desarrollo folicular inicia desde los folículos primordiales. Estos son formados en el ovario durante la etapa del desarrollo fetal, en donde se encuentran aproximadamente 150.000 folículos primordiales en el momento del nacimiento, pero únicamente logran madurar aproximadamente 100 durante toda la vida de la hembra, los demás son degenerados mediante el proceso de atresia folicular (Gordon, 1999; Rosales, 2008).

En el desarrollo embrionario los folículos primordiales se establecen en el ovario durante la vida fetal de la hembra; estos están compuestos por un oocito rodeado de un estrato celular que forma el epitelio folicular escamoso, todos provenientes de la especialización de las células germinales primordiales que proliferan por medio del mecanismo de replicación celular ó mitosis. Grupos de células se ubican

en el interior de estroma ovárico formando un grupo de reserva de folículos, que desarrollan un intrincado sistema de comunicación intercelular, formado por proteínas (conexinas C32, C37, C43 y C45) las que permiten el paso de señales, aminoácidos, glucosa, metabolitos y nucleótidos entre el oocito y las células que lo rodean (Webb, 2004). Inmediatamente después del nacimiento gran parte de los oocitos se estabilizan, una vez han pasado por los diferentes estadios de desarrollo comprendidos dentro de la profase meiótica (preleptoteno, leptoteno, zigoteno, paquiteno y diploteno), para así entrar en un periodo de arresto meiótico (Fair, 2003). Los oocitos son rodeados por varias capas de células de la granulosa (4-8 capas), que provienen de las células mesonéfricas ó de origen mesotelial; una vez alcanzado este nivel de desarrollo toma el nombre de folículo primordial (Fortune, 2003). El proceso de formación del folículo primordial es mediado por la expresión un grupo de genes, como el *c-kit* y el *Figla* entre otros, que codifican para la formación de factores de crecimiento intraováricos entre los que se encuentran la familia de factores de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), proteínas morfogénica del hueso (BMPs) y miembros de la familia de células-B linfoma/leucemia -2 (*bcl-2*) (Fair, 2003). También se presenta la interacción neuroendocrina por medio de las neurotropinas y sus receptores, que favorecen el desarrollo folicular en las primeras etapas, ya que en estudios realizados al tomar ovarios que presentan folículos en desarrollo se encuentra incrementado el mRNA que codifica para nuerotropinas (NGF, NT-3, NT-4/5, BDNF), como de sus receptores (*p75*, *trkA*, *trkB*) (Fortune, 2003).



Una vez se produce la proliferación de las células de la granulosa del folículo primordial, se inicia la activación de éste, permitiendo la síntesis de mRNA que codifica para la expresión de la proteína morfogénica del hueso 7 (BMP-7) y el factor de crecimiento de queranocitos (KGF), promoviendo la división y proliferación de las células de la granulosa (Lee, 2001); también es mediada por la acción del IGF-I, EGF, el factor de crecimiento básico del fibroblasto (bFGF), el factor inhibidor de la leucemia (LIF) y la BMP-15, permitiendo así la transición del folículo primordial a folículo primario (Fair, 2003; Crowe, 2008; Rosales, 2008). Como el folículo que pasa de primordial a primario aumenta su tamaño, es desplazado hacia la zona central del ovario, momento en el que se produce una diferenciación de las células que forman el estrato celular que rodea al oocito; esta etapa es influenciada por la acción de el factor de crecimiento y diferenciación-9 (GDF-9), que hace parte de la familia del factor transformador de crecimiento tipo  $\beta$  (TGF  $\beta$ ), y por la proteína morfogénica del hueso; esta acción es mediada por el receptor de la BMP-2 (BMPRII) (Rodgers, 1999). Se ha propuesto que una de las principales acciones del GDF-9 es promover el progreso de los folículos primarios a las etapas de folículos preantrales tardíos, ya que va a desencadenar la estimulación en la expresión de ligandos en las células de la granulosa, para este factor, regulando el desarrollo folicular durante esta etapa (Fortune, 2003). Una vez iniciada la activación del crecimiento folicular, las células de la granulosa, presentes en la periferia del oocito presentan una morfología cuboidal (Hernández, 2008); en el interior de estas células se presenta un incremento del volumen mitocondrial y de los retículos endoplasmáticos lisos y rugosos para permitir

incrementar las reservas energéticas, así supliendo las demandas del oocito (Fair, 2003).

El estadio de folículo secundario es caracterizado por la formación de nuevos estratos celulares, así como por la aparición de un material de origen proteico denso que rodea al oocito, denominado zona pelúcida; además de la formación de gránulos corticales en el citoplasma del oocito. A partir de este momento los folículos aumentan su sensibilidad de manera gradual a la estimulación de las gonadotropinas de origen hipotalámico, ya que inicia la síntesis de RNA por parte del oocito (Fortune, 2004). La liberación de gonadotropinas hipofisarias, es dependiente de la secreción pulsátil de la GnRH en el hipotálamo, así como de la cantidad de receptores de GnRH presentes en la superficie de los gonadotropos y de los efectos moduladores de los esteroides gonadales (estrógenos y progesterona) y péptidos (activina, inhibina y folistatina) (Padmanabhan, 2001).

La GnRH es liberada por un grupo de células especializadas ubicadas en el núcleo arqueado del hipotálamo basal medio. Al producirse la llegada de la hormona al sistema portal hipofisario, ésta es conducida a la hipófisis, en donde se une a sus receptores ubicados en la superficie de los gonadotropos de la adenohipófisis (Palma 2001; Senger, 2003). El receptor para GnRH pertenece al grupo de receptores del tipo rodopsina acoplados a proteína-G (GPCR), que en su estructura presentan siete hélices transmembranales expandidas, con extremo amino-terminal extracelular, que pueden ser fácilmente glicosilados. En el citoplasma de los gonadotropos se encuentran los extremo carboxi-terminales,

estas estructuras están asociadas a la formación de ligandos, debido a la acción de los aminoácidos presentes en éstas, que favorecen la interacción con diferentes substratos intracelulares, como las proteínas G, las cuales actúan como reguladores del proceso gonadotrópico (Padmanabhan, 2001). La GnRH al unirse a su receptor permite la activación de múltiples señales de transducción por la activación de la fosfolipasa C $\beta$  (PLC $\beta$ ), para producir la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato unido a la membrana (PIP2) a inositol 1,4,5-trifosfatado (IP3) y diacilglicerol; estas moléculas permiten la movilización intracelular de Calcio y activan a la proteinquinasa-C (PK-C), estimulando así la biosíntesis y secreción de las hormonas folículoestimulante (FSH) y luteinizante (LH), ya que se expresa el mRNA que codifica para la expresión del gen LH $\alpha$  y  $\beta$ , FSH $\beta$  y subunidades  $\alpha$  de gonadotropinas, estas proteínas son transportadas al aparato de Golgi de las células L $\beta$ T2, en donde se produce la liberación al citoplasma de la FSH y LH, para después por mecanismos de exocitosis pasar al espacio inter-celular y alcanzar finalmente a la circulación sanguínea por medio de la que se dirige a su órgano blanco. Esta cascada de eventos también favorece el incremento en el número de receptores de membrana para GnRH, por la expresión el gen que codifica para la síntesis de estos receptores (Adam, 2005).

Una vez liberadas, las hormonas gonadotropinas son transportadas por la circulación y llegan al ovario en donde se encuentran los folículos en desarrollo, los cuales inician gradualmente su sensibilidad a la acción de estas hormonas; en estos folículos se distingue un oocito rodeado por la zona pelúcida y en la periferia

varios estratos de células de la granulosa ya desarrollados, los cuales comienzan a avanzar a la etapa terciaria temprana del desarrollo folicular. En este momento el oocito presenta un núcleo completamente activo con la capacidad de realizar el proceso de transcripción, debido al desarrollo completo del retículo fibro-granular nuclear. Este estadio es alcanzado por la acción de la FSH, que junto a la acción de los factores de crecimiento, presentes también durante las etapas anteriores, favorecen la mitosis de las células de la granulosa folicular. Durante esta etapa ocurre una proliferación, diferenciación y especialización de las células que rodean el oocito, permitiendo evidenciar claramente las células de la teca interna, externa, lámina basal y células del cumulus. Adicionalmente se genera un espacio por el aumento de presión ejercida por el líquido folicular, ya que el plasma periférico al folículo comienza a ingresar por mecanismos de transudación a través de su lámina basal, haciendo que se aumente la presión intrafolicular; este espacio recibe el nombre de antro folicular, cuya formación es mediada por la FSH, el EGF y el IGF-I, entre otros (Fair, 2003; Crowe, 2008). Este es un criterio de clasificación de los folículos ováricos, en preantrales y antrales (Hernández, 2008). El líquido folicular es un transudado sérico, constituido por un serie de sustancias importantes para el desarrollo del folículo, como lo son las proteínas (albúmina, globulinas, inmunoglobulinas, fibrinógeno, lipoproteínas y péptidos), aminoácidos (Aspargina, treonina, glutamina, glutámico, alanina y glicina), carbohidratos (glucosa, fructosa, mucosa, galactosa y manosa), gonadotropinas (FSH, LH), esteroides (colesterol, andrógenos, progestinas, estrógenos), prostaglandinas (E, I y F2 $\alpha$ ), minerales y sales (Na, K, Mg, Zn, Cu, Ca, S, Cl, P),

inmunoglobulinas (IgA, IgG) (Webb, 2004). Los folículos mas grandes, (mayores de 9 mm) también acumulan en el liquido folicular sustancias no esteroideas como el inhibidor de la maduración de los oocitos, inhibidor de la luteinización, relaxina e inhibina. El líquido folicular favorece la maduración nuclear y citoplasmática del oocito, regulando las funciones de las células de la granulosa, favoreciendo el crecimiento folicular y el proceso de esteroideogenesis, además de intervenir en la ovulación y el transporte del ovulo al útero y se une con secreciones uterinas para favorecer el ambiente de capacitación espermática y desarrollo embrionario temprano, además de preparar el folículo para la posterior formación del cuerpo lúteo (Hafez, 2000).

La etapa preantral del desarrollo folicular puede dividirse en tres estados, la activación de los folículos primordiales, la transición de folículo primario a secundario y el desarrollo del folículo secundario hacia la etapa periantral. Durante la etapa antral del desarrollo folicular se evidencia una cohorte de folículos en crecimiento, que es regulada por los mecanismos de selección, dominancia y atresia folicular (Fortune, 2003).

Es importante tener en cuenta que estos folículos son completamente funcionales ya que producen estrógenos, necesarios para inducir la liberación hipotalámica de GnRH, desencadenando la secreción de FSH y LH (Ineskeep, 2004), necesarias para continuar con el desarrollo folicular, así como otros productos que intervienen en el desarrollo como son la activina, inhibina, folistatina, entre otras; el incremento en la secreción de estrógenos de origen ovárico es decisivo para

permitir el desarrollo folicular y la ovulación (Markström, 2002).

La síntesis de esteroides ováricos requiere la coordinación entre las células ováricas y de sustancias como gonadotropinas, que activan una cascada de reacciones intracelulares, que tienen como finalidad la secreción de estrógenos. Los folículos antrales de gran tamaño, presentan el aumento de mRNA que codifica para los receptores de LH (LHr) en las células de la teca y de la granulosa folicular (Webb, 2004), permitiendo así un incremento en los receptores membranales para gonadotropinas en estas células. Al llegar la LH y hacer contacto con su receptor de membrana ubicado en la superficie de las células de la teca folicular, activa la adinil-ciclasa para la producción de AMPcíclico, que permite la reacción en la que el colesterol, unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL), es metabolizado en progesterona, y luego a andrógenos (androstenediona y testosterona) debido a la activación de la señal de transducción de la proteína-quinasa A, así como del aumento en el mRNA que codifica para la enzima P450-17 $\alpha$ -hidroxilasa (P450 17 $\alpha$ -OH) y la 3 $\beta$ -hidroesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD), encargadas de esta biotransformación. Los andrógenos liberados a partir de las células de la teca se difunden por las uniones intercelulares a las células de la granulosa del folículo; en estas células se ha presentado incrementos importantes en la síntesis de mRNA que codifica para receptores de LH y FSH, lo que permite que estas células presenten un número mayor de receptores para gonadotropinas en las células de la granulosa y de la teca en los folículos seleccionados. Una vez la FSH y la LH hacen contacto con sus receptores en las células de la granulosa

se desencadena la síntesis de mRNA que codifica para la enzima P450aromatasa y para la proteína de regulación esteroideogénica (StAR). Estas convierten los andrógenos, que ingresaron a las células de la granulosa, a estradiol gracias a la aromatización de esta molécula; actividad mediada por la FSH; utilizando adenosín monofosfato cíclico (cAMP) como sustrato, previa activación de la adenilciclase (Rosenfeld, 2001; Fortune, 2004). En el folículo también es inducida la síntesis de sustancias como la activina, la cual está compuesta por las subunidades  $\beta A$  y  $\beta B$  que se combinan para originar activina A, B ó AB. Esta presenta actividad intraovárica que favorece el crecimiento de los folículos en etapas tempranas. Al aumentar el desarrollo de los folículos, la activina se sinergiza con la hormona folículoestimulante y el TGF- $\beta$ , favoreciendo el incremento del tamaño folicular y la secreción de estradiol e inhibina la cual bloquea los efectos estimulantes producidos por la FSH en los folículos de menor tamaño (subordinados). Se presenta entonces la dominancia folicular, proceso en el que se selecciona un solo folículo que será dominante, y se afecta el desarrollo de los folículos de menor tamaño (folículos subordinados), por la disminución en los niveles de la FSH y por la acción de la inhibina que es producida en mayor cantidad por el folículo dominante (Fortune, 2004; Crowe, 2008). Es importante tener en cuenta que durante las diferentes etapas del desarrollo folicular los factores de crecimiento, gonadotropinas, y demás sustancias que interviene en éste proceso no dejan de expresarse, lo que ocurre es que se presenta mayor síntesis de las sustancias en determinados momentos para favorecer cada una de las etapas mencionadas (Palma, 2001).

La dominancia folicular es el proceso por el cual uno de los folículos de la cohorte, que están presentando un desarrollo similar, aumenta su tamaño, convirtiéndose en dominante con respecto a los otros folículos que pasan a ser subordinados (folículos que sufren regresión); incluso los folículos dominantes de las ondas previas se subordinan ante la presencia del folículo dominante de la última onda de desarrollo folicular, que continua su diferenciación y crecimiento, hasta llegar a ser folículo ovulatorio (Ineskeep, 2004; Sartori, 2004). Este folículo presenta una mayor densidad de receptores de gonadotropinas (FSHr y LHr) en la superficie de las células de la granulosa, mayor producción de enzimas y proteínas que intervienen en la esteroideogénesis, así como la mayor concentración de estradiol en el fluido folicular, motivo por el cual hay un incremento en el desarrollo del folículo dominante con respecto a los folículos subordinados, también mediado por los factores de crecimiento (Sánchez, 1993; Fortune, 2003). Uno de los principales agentes asociados al proceso de dominancia folicular es el sistema del IGF, compuesto por los dos ligandos IGF-I e IGF-II, los receptores tipo I y II, y las proteínas de unión denominadas IGFBP-I, II, III, IV, V y VI. Los IGFs favorecen la estimulación de la proliferación celular y al actuar de manera sinérgica con las gonadotropinas promueven la diferenciación de las células foliculares, favoreciendo el desarrollo para dar paso a la dominancia folicular (Webb, 2004; Crowe, 2008).

Los folículos subordinados inician el camino hacia la regresión, en la que interviene el mecanismo de apoptosis celular, que es necesario para la



homeostasis tisular y ocurre en todas las células de los organismos multicelulares como un proceso fisiológico. En los folículos en crecimiento la apoptosis puede presentarse durante cualquiera de las etapas de desarrollo, en las que se presentan cambios substanciales celulares en el citoplasma (sin un aumento importante en el volumen citoplasmático, ni la subsiguiente lisis, como se aprecia en la necrosis) y en el núcleo (compactación de la cromatina) (Markström, 2002).

El inicio del proceso de apoptosis es desencadenado en respuesta a la activación de genes proapoptóticos; estos codifican para las caspasas (procaspasas), que son enzimas con una fuerte actividad proteolítica, y los genes de la familia Bcl-2, dentro de los que se encuentran Bcl-XL, Bcl-w, Bid, Bax, Bik, Bcl-Xs. Las caspasas están activadas en forma de zimógenos que se encuentran inactivos y deben ser activadas para actuar; por medio de la activación de una caspasa por otra, por la unión de cofactores y coenzimas que producen la activación; ó por la activación generada por los receptores de muerte celular. De esta forma se desencadena la actividad de un grupo de enzimas que degradan el DNA, conocidas como DNAsas, las cuales son endonucleasas que producen una defragmentación internucleosomal del DNA, haciéndolo perder su patrón característico (Flores, 2005; Rosales, 2008).

Se han propuesto tres mecanismos de regulación de la apoptosis. El mecanismo hormonal (gonadotrópico y esteroide) que junto con los factores locales ó tróficos (EGF, FGF, IGF e insulina); cumplen un papel importante en la regulación de la apoptosis ya que favorecen la supervivencia celular, actuando como mecanismo

anti-apoptótico, el cual es totalmente dependiente de la expresión de los receptores, para estos factores en las células (Hacker, 2000; Markström, 2002; Johnson, 2003). El segundo mecanismo de regulación de apoptosis es dependiente del gen p53, el cual es inducido por alteraciones y daños presentes en el DNA, que desencadena la activación de los genes proapoptóticos como el Bax, desencadenando la cascada de de reacciones apoptóticas (Burns, 1999; Slot, 2006). Un tercer mecanismo de inducción de la muerte celular por apoptosis se da por la inducción de la vía Fas, la que hace parte de una serie de mecanismos de tipo inmunológico, ya que al hacer contacto el Fas con su receptor de membrana celular, permite la activación de de los genes pro-apoptóticos pertenecientes a la familia Bcl-2 (Porter, 2001; Johnson, 2002; Flores, 2005; Slot, 2006).

De esta manera se conocen agentes pro-apoptóticos y anti-apoptóticos, los cuales median de manera efectiva en la decisión celular a iniciar ó no el proceso de muerte celular programada; al no presentarse una concentración adecuada de receptores de membrana de agentes anti-apoptóticos como tirosinquinasa, hormona de crecimiento, gonadotropinas, proteína G, hormonas esteroideas acopladas a sus receptores nucleares, EGF, bFGF, IGF e insulina, acoplados a sus receptores va a producirse la activación alguno de los genes pro-apoptóticos (familia Bcl-2), estos ya activados al interior de la célula van a dirigirse a la mitocondria generando la liberación de agentes pro-apoptóticos, entre ellos, citocromo-C en el citosol celular; el cual va a unirse a la proteasa apoptótica

activadora de factor 1 (APAF-1) y a la pro-caspasa 9 formando el complejo proapoptosoma, el cual permite la activación de la pro-caspasa 3 en caspasa 3 (Fenwick, 2002). Otra forma de desencadenar el mecanismo apoptótico se da mediante la activación de los receptores celulares para muerte celular (como CD95, Fas, Factor de necrosis tumoral y sus receptores, entre otros) los cuales al internarse en la célula permiten la activación del complejo de muerte inducida (DISC), produciendo el reclutamiento de moléculas de pro-caspasa 8, las que van a ser activadas a caspasa 8, con la ayuda de la unión del DISC con la proteína Fas-asociada para muerte celular (FADD) (Hacker, 2000; Slot, 2006; Rosales, 2008). Al estar activada la caspasa 8 en el citosol celular, va a producirse la activación de la procaspasa 3 en caspasa 3; esta molécula permite la exposición extramembranal de la fosfatidil-serina, que debido al reducido espacio intercelular va a permitir el contacto con otras células desencadenando el proceso de apoptosis en las células vecinas que presenten receptores para muerte celular programada. Motivo por el cual se produce el desencadenamiento de una apoptosis masiva, acompañada por la presencia de núcleos picnóticos y cariorexis en las células de la granulosa y de la teca en los folículos atrésicos (Markström, 2002; Johnson, 2003). Una vez activada la caspasa 3 genera la desestabilización del complejo caspasa-activadorDNasa (CAD) y su factor inhibidor (Subunidad inhibidora de caspasa-activadorDNasa ICAD), permitiendo la expresión de las enzimas con actividad DNasa (endonucleasas), generando la defragmentación internucleosomal del DNA (Fenwick, 2002). En la activación de las caspasas participan más de 100 substratos que participan en cada una de las reacciones así

como en la desnaturalización de las proteínas estructurales y del citoesqueleto, generando encogimiento del núcleo y alteración en la morfología celular (Markström, 2002).

### **1.5.2. Mecanismo de ovulación.**

Una vez el folículo dominante presenta sus componentes completamente desarrollados y libera las cantidades de estradiol necesarias para sus funciones (estrógeno-activo), pasa a la etapa de folículo preovulatorio, que es la etapa en la que se prepara para el fenómeno de la ovulación ó liberación del oocito.

La maduración del folículo preovulatorio depende de la interacción de sustancias como las gonadotropinas, hormonas esteroides, factores de crecimiento, entre otros. Los incrementos plasmáticos de estradiol, preceden al incremento transitorio en la liberación de LH (Sánchez, 1993); como los folículos preovulatorios presentan un incremento en el número de receptores para LH, éstos van a ser susceptibles de esta elevación transitoria en la concentración de LH en sangre, proceso por el cual se produce la activación de la adenilciclase para producir AMPcíclico (AMPc) intracelular, activando la señal de transducción para la proteína quinasa A (PKA). Además los receptores de LH ya conjugados con la LH pueden utilizar un segundo mensajero como el inositoltrifosfatado y el Calcio para producir la activación de la proteinquinasa C (Rosenfeld, 2001). El incremento transitorio de LH (pico preovulatorio de LH), genera el incremento en la síntesis de mRNA que codifica para los receptores de progesterona, ciclooxigenasa-2 (COX-

2) y factor regulador de crecimiento temprano (Egr-1) los cuales son indispensables en el proceso de ovulación, favoreciendo el rompimiento del folículo por un área específica y la extrusión del oocito maduro (Richards, 2005; Crowe, 2008). En la superficie del folículo, en donde se produce la ovulación, pueden distinguirse varios estratos celulares, caracterizados por una capa superficial simple de epitelio ovárico, la túnica albugínea (compuesta por tejido conectivo) y la teca externa envuelta por una red colágena que provee firmeza a la pared folicular, la teca interna y finalmente la capa de células de la granulosa separada por la lamina basal del complejo cumulus-oocito (Ohnishi, 2005).

En el folículo se inicia la expansión del complejo cumulus-oocito debido a la acción de glicosaminoglicanos (ácido- $\beta$ 1,3-N-acetilglucosamina  $\beta$ -1,4-glucurónico) producidos en las células del cumulus y que tienen como función aumentar la presión intrafolicular (Richards, 2005). Además se desencadena la síntesis de mRNA que codifica para el factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , que permite la activación de una serie de proteinasas desencadenantes de los mecanismos proteolíticos en la matriz extracelular (Hunter, 2004). Las proteinasas que intervienen en los procesos proteolíticos son clasificadas así: el primer grupo, está compuesto por las pertenecientes a la matriz de metaloproteinasas (MMPs) (aprox. 23 MMP); el segundo grupo, está conformado por serinas como es el caso del activador del plasminógeno y la plasmina; el tercer grupo, está compuesto por desintegrinas y trombospondinas; finalmente, está el grupo de la proteína morfogénica del hueso-1, la catepsina-L y las proteínas plasmáticas asociadas a la preñez (Ohnishi,

2005). Al activarse, éstas proteinasas van a actuar sobre los estratos celulares y la red colágena que brinda soporte a los tejidos de la pared folicular, causando su adelgazamiento y pérdida la tensión. La activación de las proteinasas que componen la matriz de metaloperoxidasas entre ellas MMP-2, MMP-14 y MMP-23, sintetizadas en las células de teca, producen la liberación de colagenasas y gelatinasas la cuales desencadenan el efecto proteolítico generando la ruptura de la pared (Richards, 2005), esto sumado al proceso inflamatorio agudo que genera un aumento en la despolarización en las células del folículo y los cambios en la concentración en el citosol celular del calcio van a favorecer el proceso de ovulación (Spey, 2006).

Una vez se produce la ruptura del folículo el oocito es liberado y es captado por las fimbrias del oviducto, las cuales se encuentran dispuestas hacia el ovario, gracias a la acción estrogénica. En el ovario, el espacio vacío del folículo ovulado llenado rápidamente de sangre, originando una estructura transitoria denominada cuerpo hemorrágico, como preámbulo a la formación y consolidación del cuerpo lúteo (Hunter, 2004).

### **1.5.3. Formación y consolidación del cuerpo lúteo.**

El cuerpo lúteo funciona a manera de una glándula endocrina transitoria, altamente irrigada, cuya principal acción es la producción de la hormona progesterona, la que favorece la formación de un adecuado medio ambiente uterino, permitiendo que ocurran las primeras etapas del desarrollo embrionario y después desencadenar el reconocimiento materno de la gestación (Kastelic, 1990; Grygar, 1997; Bridges, 2000; Schams, 2004); al no producirse ésta interacción entre la madre y el embrión, se da paso a un nuevo ciclo estral debido a la activación de los mecanismos luteolíticos, que generan la involución tanto estructural como funcional del cuerpo lúteo, permitiendo una nueva etapa de dominancia folicular así como la siguiente ovulación (Starbuck, 2004; Hernández, 2008).

Una vez liberado el oocito y el líquido que se encontraban en el antro folicular, se inicia una llegada masiva de sangre al sitio de ovulación; estos cambios hemodinámicos locales intervienen en la remodelación que ocurre durante la transición de estructuras ováricas, ya que al formarse un cuerpo lúteo va a producirse una importante neovascularización (angiogénesis) y una diferenciación de las células que estaban presentes en el folículo (luteinización), durante el pico de LH y la formación temprana del cuerpo lúteo (Schams, 2004). Al inicio de la luteinización las células de la teca folicular sufren un proceso de hiperplasia e hipertrofia, para generar las células luteales pequeñas; mientras que las células de la granulosa folicular van a dar paso a las células luteales grandes, disminuyendo

así la capacidad para producir andrógenos y estrógenos al disminuir la síntesis de mRNA que codifica para las enzimas P450 17 $\alpha$ -hidroxilasa (17 $\alpha$ -OH) y la 3 $\beta$ -hidroesteroide-deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD) (Acosta, 2003).

El cuerpo lúteo bovino está compuesto por células luteales grandes, pequeñas, varios tipos de células endoteliales, musculatura lisa, macrófagos, leucocitos y ocasionalmente algunas células plasmáticas, cuya función es la secreción de progesterona, y en pequeñas cantidades, estradiol, prostaglandinas y hormonas peptídicas, como relaxina, oxitocina, neurofisina-I, vasopresina e inhibina (Grygar, 1997; Niswender, 2002; Sangha, 2002). El mecanismo por el cual se produce la remodelación del componente celular folicular, incluye hipertrofia de las células foliculares, hiperplasia de los fibroblastos que componen el tejido conectivo y aumentos en el aporte sanguíneo. Está también acompañado por cambios en la matriz extracelular, diferenciación, mitosis y migración celular; controlados por la expresión de genes que codifican para dos familias de proteínas involucradas en cada uno de estos procesos y factores de crecimiento como el EGF, bFGF, IGF, el factor de crecimiento angiogénico (AGF), entre otros (Schams, 2004). Esta remodelación funcional y estructural de la matriz extracelular es claramente influenciada por la acción de las metaloproteinasas y del plasminógeno activador de plasmina, activados por la disminución en la síntesis de mRNA que codifica para las proteasas inhibitoras de estos factores, como la TIMP y la  $\alpha$ 2-macroglobulina, una vez ocurrida la ruptura folicular (Acosta, 2004). Durante la etapa final del desarrollo folicular se generan cambios hemodinámicos que



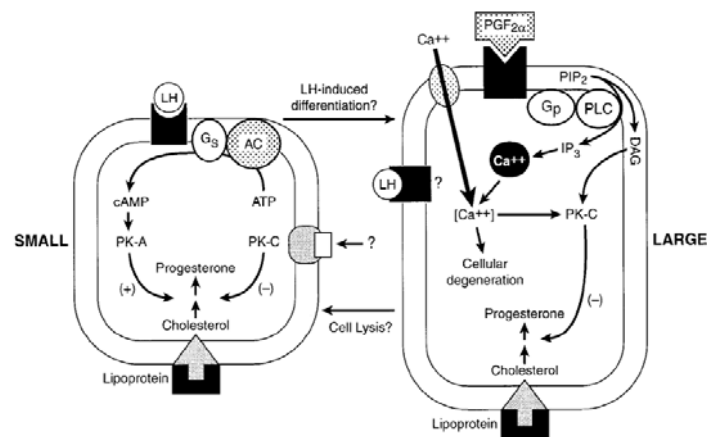
disminuyen el aporte sanguíneo ovárico pos-ovulación; entre 2 y 5 días después de la ovulación el flujo sanguíneo se incrementa notoriamente correlacionándose con el aumento del volumen lútea y las concentraciones sanguíneas de progesterona debido a la angiogénesis que se está produciendo en el cuerpo lúteo, lo que genera la diferenciación de las foliculares en células luteales (Schams, 2004).

Una vez establecidas las células luteales grandes y pequeñas se crean uniones intercelulares que permiten el intercambio de elementos entre las células, importantes para la regulación del crecimiento, diferenciación y regresión luteal; estos canales son inducidos por la acción de las gonadotropinas hipofisarias (FSH y LH), así como de sus receptores (Chabbert-Buffet, 2000). Las células luteales ya formadas, incrementan su contenido de lípidos, colesterol y esteroides; pero también incrementan la actividad de las enzimas 5- $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa, así como de la succinato deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, isocitrato-deshidrogenasa, malato-deshidrogenasa y fosfatasa, para poder efectuar la biosíntesis hormonal durante la fase luteal (Kotwica, 2002; Niswender, 2002; Acosta, 2004).

De esta manera, la LH llega por vía circulatoria al cuerpo lúteo que se encuentra altamente irrigado. Las células luteales previamente han incrementado la síntesis de mRNA que codifica para los LHr, para así poder ser estimulados por esta molécula; al llegar la LH y unirse a sus receptores ubicados en la membrana plasmática de las células luteales, generan la activación de la adenil-ciclase y la

proteína G, produciendo biosíntesis de AMPcíclico a partir de ATP, que es utilizado en las reacciones como sustrato (Figura 4); de esta manera las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y de baja densidad (LDL) provenientes de la circulación, así como los esteres de colesterol hidrolizados y las moléculas de acetato son biotransformadas en colesterol (1, 2 y 3 Figura 5) que es direccionado a la mitocondria (Niswender, 1994; 2000). Al producirse la activación de la proteinquinasa A (PKA) y el AMPcíclico favorecen el transporte de las moléculas de colesterol al interior de la mitocondria de las células luteales, de esta manera se genera un incremento en el mRNA que codifica para la producción de la enzima citocromo P450 clivasa de la cadena lateral (P-450scc) la que permite la liberación de pregnenolona en el citosol celular; una vez liberada la pregnenolona es transportada al retículo endoplasmático liso en donde se produce la biosíntesis a progesterona mediante la acción de la enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD). Previamente se ha producido un incremento en la síntesis de mRNA que codifica para la enzima (3 $\beta$ -HSD) produciéndose su liberación en el citosol de la célula luteal esta enzima es direccionada hacia el retículo endoplasmático liso para participar en este proceso de biosíntesis de progesterona (Niswender, 1994; 2000; 2002), (4 y 5 Gráfica 5).

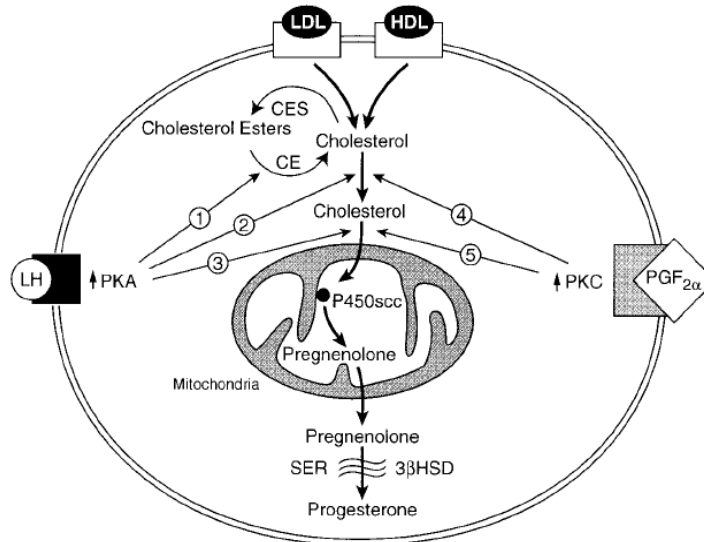
**Figura 4. Modelo de la producción de progesterona en las células luteales grandes y pequeñas.**



**Fuente: Tomada de Niswender, G. 2000.**

Durante este proceso continúa sintetizándose mRNA que codifica para los receptores de LH y por medio de gránulos secretorios son transportados a la membrana plasmática por medio de exocitosis, permitiendo así que la LH continúe haciendo contacto con los receptores para LH, desencadenando la producción de progesterona (Niswender, 2002; Sangha, 2002).

**Figura 5. Modelo de biosíntesis de progesterona en una célula luteal.**



**Fuente: Tomada de Niswender, G. 2000.**

#### **1.5.4. Reconocimiento materno post-trasplante y activación de mecanismos luteotrópicos.**

La eficiencia en la técnica de TE, se ve afectada por muchos factores, entre ellos los que están asociados a la hembra receptora de embriones, por este motivo es muy importante hacer un control eficaz de los factores que puedan causar variabilidad en los resultados positivos tras la aplicación de esta técnica, representados en preñeces (Kastelic, 1990; González, 2001; Spell, 2001; Vasconcelos, 2006). Es importante hacer un seguimiento de las estructuras ováricas presentes en la hembra durante el protocolo de sincronización, ya que evaluando los tamaños del folículo y del cuerpo lúteo, previos a TE, puede tenerse

una idea clara de los niveles de producción de progesterona para de esta forma poder hacer una selección de las hembras que van a ofrecer un óptimo medio uterino al embrión que van a recibir (Kastelic, 1990; Bridges, 2000; Vasconcelos, 2001; Baruselli 2001; Spell, 2001; Sartori, 2002; Duica, 2007; Gonella, 2010).

Después de ser transferido el embrión, éste va a encontrar un ambiente uterino que favorece su desarrollo o va a afectarlo de una forma directa; es entonces cuando en el embrión, que se encuentra en estadio de mórula, debido a factores de crecimiento (TGF- $\alpha$  y  $\beta$ , y PDGF, entre otros) y a los sustratos empleados por el embrión (piruvato y oxalacetato) se estimula la mitosis generando una compactación de las células ubicadas al interior del embrión, etapa en la cual se crean uniones intercelulares estrechas que permiten el paso de elementos entre éstas actuando como un organismo (Bilodeau, 2006; Demmers, 2001). Las células que rodean el paquete celular interno embrionario presentan un mecanismo activo para el transporte de moléculas denominado bomba sodio-potasio ATPasa, la cual en esta etapa genera un transporte iónico estableciendo un paso de sustancias de un gradiente a otro, permitiendo el ingreso de líquidos provenientes del metabolismo celular (mitocondrial), para formar un espacio intra-embionario que recibe el nombre de blastocele. Este aumento de presión hace que las células se ubiquen en la zona externa que conformarán el trofoblasto y se forme un paquete celular interno que recibirá el nombre de embrioblasto; ésta etapa del desarrollo embrionario es denominado blastocisto (Spell, 2001; Hernández, 2008). A lo largo de esta etapa, el blastocisto continua con su desarrollo, en el que intervienen, de

manera importante, los niveles de progesterona generados por el cuerpo lúteo y vertidos a la circulación sanguínea, ya que al llegar esta hormona a las células del epitelio luminal y glandular endometrial desencadena la síntesis de la histotropina; esta proteína interviene en el crecimiento de manera directa, durante esta etapa del desarrollo embrionario (Demmers, 2001).

Durante la etapa embrionaria temprana (antes de la implantación del conceptus) el embrión migra a lo largo de la luz uterina, por lo que es importante que el epitelio uterino no permita el adosamiento embrionario antes de tiempo; de esta manera, desencadena la síntesis de mRNA que codifica para las proteínas antiadherentes en las células del epitelio luminal uterino, así se produce la expresión de las glicoproteínas mucinas entre las que presentan una mayor acción las MUC-1 y MUC-4, estas proteínas van a estar presentes en la superficie luminal uterina hasta los días 15-16 cuando los niveles de estas inician su descenso para permitir que inicie la etapa de implantación. Las mucinas 1 y 4 recubre las células de la pared uterina para bloquear la unión temprana entre el trofoectodermo y los receptores de las proteínas de múltiple adhesión como las integrinas, evitando que se genere una implantación temprana (Spencer, 2007).

Los mecanismos de mitosis celular ocurridos en las células, así como el aumento de la presión ejercida por el fluido contenido en el blastocele y la acción de las enzimas que desnaturalizan la zona pelúcida (barrera protectora embrionaria), permiten que el blastocisto eclosione; es entonces cuando el conceptus (embrión con sus membranas asociadas) comienza a tener contacto directo con el medio

uterino, el cual es un periodo crítico (Starbuck, 2004), ya que del día 8 al 17 ocurre aproximadamente un 30-40% de las pérdidas embrionarias (Thatcher, 1994). El establecimiento satisfactorio del embrión es producto de la interacción entre éste con sus membranas asociadas y el endometrio de la hembra receptora, logrado mediante el proceso denominado reconocimiento materno de la preñez, el cual es indispensable para el subsecuente mantenimiento de la gestación; de lo contrario, la madre rechazaría el embrión. El reconocimiento materno de la preñez se evidencia como el periodo crítico en el que el embrión “envía señales” de su presencia a la madre antes de iniciarse el proceso de regresión del cuerpo lúteo, para así mantener la integridad funcional y estructural del mismo, desencadenando una serie de cambios uterinos que favorecen el establecimiento de la gestación, este mecanismo es generado por la síntesis y secreción de interferón Tau por parte del embrión, lo cual es considerado como un importante factor luteotrópico (Rodríguez, 2001; Rodina, 2009; Tovia, 2010).

La supervivencia embrionaria temprana depende de la no reacción de rechazo inmunológico por parte de la madre al conceptus, de un medio ambiente uterino favorable para el desarrollo embrionario, de la programación genética intrínseca de embrión (Hernández, 2008; Tovia, 2010) y también es de gran importancia la no presencia de microorganismos en el medio uterino que puedan generar mortalidad embrionaria durante las diferentes etapas del desarrollo embrionario (Jiménez, 2005; Tovia, 2010). Una vez eclosionado de su zona pelúcida el embrión junto a todas sus membranas sufren un desarrollo vertiginoso, en el que

se elongan, ocupando gran parte de la superficie uterina, mecanismo que es dependiente de una serie de factores de crecimiento entre los cuales se resalta el TGF- $\beta$  y el VEGF (Hernández, 2008). Al tener contacto el conceptus, con el fluido uterino presente en el espacio luminal uterino, compuesto por derivados del suero sanguíneo que aporta electrolitos, sustratos energéticos y productos específicos que permiten aumentar la posibilidad de supervivencia del embrión durante la etapa inicial del desarrollo embrionario (Hernández, 1995); va a iniciarse la producción de la señal primaria por parte del conceptus hacia la madre, que va a tener un papel decisivo en el mecanismo del reconocimiento materno de la preñez. Al llegar el conceptus al día décimo del desarrollo las células del trofoblasto inician la secreción la proteína trofoblastica bovina (Spencer, 2004), denominada también Interferón Tau (Apelo, 1989), presentando una máxima producción entre los días 13 al 23 (Roberts, 2008).

Esta señal embrionaria genera un efecto antiluteolítico paracrino en el endometrio que bloquea la transcripción del gen que codifica para los receptores estrógenos- $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) en el epitelio glandular superficial y luminal, para así inhibir la expresión del gen ESR-1, afectando la síntesis de los receptores de oxitocina. Se inhibe la síntesis de prostaglandina F $2\alpha$ , ya que afecta la expresión del gen PTGS-2 que codifica para la producción de ciclooxigenasa-2 (COX-2); además se incrementa la producción de ácido linoleico, que actúa como inhibidor competitivo del ácido araquidónico al unirse a la ciclooxigenasa-2 (COX-2), afectando de manera importante la producción de la PGF $2\alpha$ . De esta manera se favorece el



mantenimiento del cuerpo lúteo y la continuidad de la secreción de progesterona (Bilodeau, 2006; Hernández, 2008), que es la principal promotora del establecimiento y mantenimiento de la gestación en mamíferos (Chabbert-Buffet, 2000; Spencer, 2004); además, el Interferón Tau favorece la síntesis de proteínas uterinas durante la fase inicial de la gestación, inhibiendo el desencadenamiento del mecanismo luteolítico (Fazleabas, 1994).

El interferón Tau es una sustancia clasificada por la Sociedad Internacional de Interferones, como perteneciente a la familia de los interferones tipo I; es una proteína de característica ácida de 19.5 kDa, con una cadena de 172 aminoácidos, con propiedades antiproliferativas, antivirales e inmunomoduladoras (Spencer, 1996; Hernández, 2008). La expresión de interferón Tau por las células del trofoectodermo es controlada por dos regiones promotoras específicas. La primera está situada distal al sitio de inicio de transcripción, aproximadamente a -358 a -322 pares de bases (pb) y la segunda está situada en la región proximal a aproximadamente -91 a -69 pb, identificadas mediante electroforesis (Bazer, 1997). Al activarse el mecanismo de transcripción para la producción de los genes estimuladores de interferones (entre éstos el gen estimulante de interferones-15) se produce la síntesis de éstos y por acción de la 2',5' oligoadenilato-sintetasa (OAS), se desencadena la expresión de los receptores para los factores de crecimiento, tirosin-quinasa y proteína-G presentes en las secreciones uterinas. Estos factores al unirse a los receptores de membrana de las células del trofoectodermo, permiten la activación del proceso de transducción para la

expresión de genes que codifican para la producción de interferón Tau y juegan un papel importante en la diferenciación endometrial (Rodina, 2009). Una vez activado el proceso de transducción se genera la combinación y activación de las proteínas promotoras de expresión Ets2 y Dlx3 en las células del trofoectodermo, esta activación es influenciada directamente por los niveles de progesterona en el suero materno, por esto es de gran importancia que el cuerpo lúteo genere niveles apropiados de progesterona, para así favorecer la secreción del interferón Tau por parte del conceptus (Roberts, 2008). Al presentarse la activación de las proteínas promotoras de expresión en las células del trofoectodermo, se produce la liberación de interferón Tau al líquido endometrial, que interviene en el reconocimiento por parte de la madre al conceptus; el interferón al llegar a las células del epitelio luminal endometrial, estimulan la síntesis de mRNA que codifica para las proteínas Galectina 15 (LGALS-15), Catepsina-L y Cistatina-C que son vertidas al líquido luminal, interviniendo de manera directa en la regulación del desarrollo del conceptus y en el mecanismo de implantación (Demmers, 2001; Spencer, 2007).

Es importante que se produzca una elongación del conceptus para que se presente el reconocimiento materno, ya que al haber una mayor superficie trofoblástica, un número mayor de células van a sintetizar una mayor cantidad de interferón por acción de los genes para la síntesis de interferón (ISGs). De esta manera, al desarrollarse el conceptus se incrementa la síntesis de mRNA que codifica para interferón Tau, el cual hace contacto con los receptores para

interferón (IFANAR) presentes en las células del epitelio glandular y luminal uterino (Rodina, 2009) generando la fosforilación cruzada y activación de quinasas, que producen la activación para señal de transducción y activación de transcripción 1 y 2 (STAT 1 y 2); por otra parte la estimulación producida por la unión del interferón Tau a su receptor, interviene directamente en la expresión del factor estimulante de transcripción de interferón  $3\gamma$  (ISGF  $3\gamma$ ), que favorece para la síntesis e hiper-activación de los elementos que responden a la estimulación del interferón (ISRE), como STAT1, STAT2, ISGF3G, B2M, ISG15, MIC, OAS, los cuales intervienen en la síntesis de las proteínas que favorecen el mecanismo de implantación del conceptus (Roberts, 1999; Spencer, 2007).

Una vez ocurrida la fecundación del oocito y activada la cascada de los mecanismos luteotrópicos del útero, se produce un aumento en la capilaridad asociado a la producción de progesterona; esto estimula a las células del epitelio luminal y glandular endometrial para sintetizar varios tipos de moléculas, como enzimas, factores de crecimiento, citoquinas, linfoquinas, hormonas, proteínas transportadoras y otras sustancias histotóxicas (Spencer, 2004); entre las que se evidencian los TGF- $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3, PDGF, IGF tipo I y II, factor endotelial de crecimiento vascular (VEGF), factor estimulador de colonias (CSGF), EGF, FGF, TNGF- $\alpha$ , interleuquina 1,3,6 (IL-1,3,6,), factor inhibidor de la leucemia, además de un gran número de proteínas como la proteína con reactividad cruzada con la ubiquitina (PRC-U), la proteína 2 quimiotáctica granulocítica, proteínas de la leche uterina (UTMP), serpinas uterinas (US), osteopontinas (OPN), entre otras,

(Demmers, 2001). Así, los factores de crecimiento van a unirse al Heparán Sulfato Proteoglicán (HSPG) en el glicocáliz del epitelio uterino para brindar unas características adecuadas a éste, que permiten favorecer un adecuado desarrollo embrionario, reconocimiento por parte de la madre, implantación, y mantenimiento de la gestación (Hernández, 2008). Así mismo, por acción hormonal se disminuye el tono de la musculatura lisa uterina que facilita la adherencia del embrión, previniendo pérdidas embrionarias tempranas (Bowen, 2000).

### **1.5.5. Mecanismo de implantación embrionaria.**

Una vez dadas las condiciones uterinas y hormonales (que integran las señales endocrinas y paracrinas) generadas por la madre y el conceptus, que favorecen la activación de los mecanismos luteotrópicos; y después de producirse la elongación de la estructura embrionaria, con la subsiguiente liberación de la proteína trofoblástica bovina (sin generarse rechazo inmunológico materno, ni expresarse alteraciones genéticas embrionarias), se inicia el mecanismo de implantación embrionaria que termina con el adosamiento del conceptus al epitelio uterino materno, generándose una comunicación recíproca entre éstos (Denker, 1993; Guillomot, 1995).

Al producirse el acercamiento entre el trofoectodermo y la pared luminal uterina, se desencadena el mecanismo de implantación, en el cual se distinguen claramente cinco eventos que terminan con la unión entre estas estructuras (Spencer, 2007). Durante la primera etapa se produce la eclosión del blastocisto de la zona pelúcida la cual se produce aproximadamente el día 8 post-fertilización. Inmediatamente después (días 9-11), se genera el precontacto y orientación del blastocisto, en esta etapa se produce un cambio importante en la morfología del conceptus, ya que cambia de forma esférica a tubular y migra hacia la región media del cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo; por lo cual es de gran importancia la acción de las glicoproteínas antiadherentes mucina 1 y 4 (MUC-1 y MUC-4), durante esta etapa. Ya para el día 11, inicia la disminución en la secreción de las mucinas, dando paso a la aposición del trofoblasto elongado, a la

pared uterina. Una vez producido el adosamiento entre estas estructuras, inicia la síntesis de mRNA que codifica para la síntesis de las integrinas, las cuales son sustancias de origen protéico producidas en las células del epitelio uterino y en las células del trofoectodermo que tienen por función facilitar el proceso de implantación embrionaria (Bowen, 2000). Entre los días 15 y 16 se inicia la cuarta etapa del mecanismo de adhesión del conceptus al epitelio endometrial; durante este periodo se inicia el proceso de transcripción de los genes que codifican para las proteínas de múltiple adhesión en las células del epitelio glandular endometrial, entre las que presentan una mayor acción la molécula glicosilada para la adhesión celular-1 (GLYCAM-1), la galectina- 15 (LGALS-15) y la fosfoproteína-1 (SPP-1) también denominada osteopontina, CTS1, CTS3, CTSL, STC1, fibronectina de unión, fibronectina oncofetal, vitronectina, tenascina, factores de Von Willebrand y las serpinas, entre otras. La producción de estas proteínas está directamente influenciada por acción progestágena, las cuales se unen a sus receptores de membrana pertenecientes al grupo de integrinas y glicoconjugados presentes en el extremo apical de las células del trofoectodermo y de las células del epitelio luminal uterino, para facilitar la adhesión de estas estructuras, además de regular el desarrollo del conceptus durante la fase de implantación; las integrinas presentes durante las etapas del proceso de implantación presentan varias subunidades como la  $\beta 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$  y  $\alpha \nu \beta 3$ , entre otras, que intervienen favoreciendo el adosamiento (conceptus-útero) (Bowen, 2000; Spencer, 2007).

Una vez ocurrida esta etapa, hacia el día 20 a 25, se desencadena la quinta fase

del mecanismo de implantación, en la que se evidencia la invasión celular endometrial, así como la estimulación de las células mononucleares del trofoblasto para especializarse formando las células binucleadas gigantes, las cuales migran y se fusionan con las células del epitelio luminal, transformando el estrato simple del epitelio luminal endometrial en una placa sincitial de células híbridas feto-maternas trinucleadas. Estas pueden unirse en grupos celulares, por medio de uniones estrechas, para desarrollar los sitios de unión feto-maternas, permitiendo el crecimiento del cotiledón en los placentomas, los cuales son indispensables para el paso de sangre oxigenada, sustancias y nutrientes de la madre al feto pero también para drenar del feto las sustancias de desecho (Spencer, 2007; Hernández, 2008).

Durante esta fase, llamada de invasión endometrial, las células experimentan una serie de transformaciones, mediadas por la síntesis de mRNA que codifica para las sustancias activadoras de cada uno de estos cambios estructurales, entre las que toma una gran importancia la hialuronidasa-2 (HYAL-2), intra y extra celular, la cual es una proteína glicosilfosfatidilinositol de anclaje, que intracelularmente interviene en la diferenciación de las células trofoblasticas binucleadas, pero en el componente extracelular se ubica en la superficie celular permitiendo la unión celular durante la fase de implantación embrionaria (Bowen, 2000; Spencer, 2007).

Las células binucleadas además de la formación de los puntos de unión feto-maternas, también se encargan de sintetizar y secretar proteínas y hormonas esteroideas como la hormona somatomotropa coriónica-1 (CSH-1), también

conocido como lactógeno placentario, las glicoproteínas asociadas a la preñez (PAGs) y la progesterona, las cuales se unen a sus receptores y a los receptores de prolactina ubicados en las glándulas uterinas estimulando el crecimiento y diferenciación celular durante la gestación (Spencer, 2004). A continuación de este proceso se sintetiza una mayor cantidad de receptores para prolactina en las células del epitelio glandular endometrial, en las que al hacer contacto con el respectivo ligando y bajo la acción de hormonas lactogénicas y somatogénicas, se inicia un proceso de hipertrofia y diferenciación de las células endometriales, acompañado por la expresión de los genes para la producción de proteínas presentes en la leche endometrial, como el  $\alpha\beta 3$  que codifica para una serie de integrinas (heterodimeros), entre las que se encuentran la fibronectina de unión, fibronectina oncofetal, vitronectina, osteopontina, tenascina y factores de Von Willebrand, entre otros estos que favorecen el crecimiento del conceptus, su desarrollo e implantación. De la misma forma una de las proteínas de mayor secreción uterina durante esta etapa es la osteopontina, la cual es una fosfoproteína sintetizada por las células del epitelio glandular, gracias a la estimulación ejercida por la progesterona (Spencer, 2007); al ser liberada en el lumen uterino, va a ubicarse en la superficie apical del epitelio luminal endometrial, del epitelio glandular y también en la superficie del trofoectodermo. La osteopontina se une a las integrinas presentes en la superficie del trofoectodermo y también a las de la superficie de las células del epitelio luminal uterino produciendo la unión entre éstas; además, la osteopontina puede formar puentes bi-funcionales con las integrinas utilizando otros receptores superficiales en las



células del epitelio uterino y del trofoectodermo, los cuales se estabilizan por medio de la transglutaminación de estas proteínas, consolidando la unión entre el útero y el conceptus (Bowen, 2000). En este proceso también interviene de manera importante la molécula glicosilada para la adhesión celular-1 (GLYCAM-1), la cual pertenece al grupo de las mucinas, actuando como mediador en la adhesión celular endotelial; ya que actúa como ligando específico en los receptores ubicados en las células del epitelio uterino y del trofoectodermo, desencadenando la activación de las proteínas de adhesión (integrinas), produciendo una unión estable conceptus-epitelio uterino (Spencer, 2007).

#### **1.5.6. Activación de mecanismos luteolíticos.**

Al no desencadenarse la cascada de mecanismos luteotrópicos, mediados por el interferón Tau, se inicia la activación de los mecanismos luteolíticos que tienen como finalidad la regresión funcional y estructural del cuerpo lúteo. La interacción entre la progesterona, los estrógenos y la oxitocina, así como de sus respectivos receptores, entre otros factores, permiten que el epitelio endometrial sintetice el principal agente inductor de la lisis del cuerpo lúteo, que es la prostaglandina F2 $\alpha$ . Esta se dirige por vía circulatoria al cuerpo lúteo, para generar la acción luteolítica, que consiste en desencadenar la apoptosis ó muerte celular controlada de las células que componen esta estructura (Barnea, 2000).

La acción de la progesterona en el endometrio durante el ciclo estral, es necesaria para la producción uterina de la prostaglandina F2 $\alpha$ , ya que al disminuir las

concentraciones plasmáticas de progesterona, se induce un aumento en los niveles de fosfolípidos, así como el incremento en la síntesis de la prostaglandina sintetasa que es una de las enzimas que intervienen en la transformación del ácido araquidónico en prostaglandina F<sub>2</sub>α (Schams, 2004). También el estradiol y la oxitocina juegan papeles decisivos en la síntesis y liberación de prostaglandina (Hernández, 2008). El mecanismo por el que se produce la síntesis y liberación de prostaglandina F<sub>2</sub>α por el epitelio uterino depende de la interacción entre el cuerpo lúteo, los folículos ováricos, el útero, el encéfalo, así como de una serie de productos, entre los que se encuentran las hormonas, los factores de crecimiento, entre otros (Hernández Cerón, 1998).

La regresión del cuerpo lúteo se inicia con la disminución en la síntesis de progesterona, la cual recibe el nombre de regresión funcional. Durante el inicio de esta etapa no se evidencian aún las alteraciones morfológicas de las células luteales que ocurren durante la etapa de la regresión estructural del cuerpo lúteo. Hacia los días 16 a 17 del ciclo estral, al no haber un estímulo luteotrópico de origen embrionario, van a desencadenarse una sumatoria de factores que favorecen la secreción de PGF<sub>2</sub>α, produciendo la regresión estructural del cuerpo lúteo (luteolisis), dando paso a un nuevo ciclo estral (Schams, 2004); dichos factores se encontraban controlados, ya que la progesterona sintetizada y liberada por el cuerpo lúteo generaba un efecto inhibitorio sobre la secreción de PGF<sub>2</sub>α, que afectaba la síntesis del mRNA que codifica para la síntesis de los receptores de oxitocina (Hernández Cerón, 1998; Goff, 2004).

Por otra parte las ondas de desarrollo folicular continúan a lo largo de la etapa luteal. Así, para esta etapa del ciclo estral los folículos en crecimiento sintetizan y liberan estradiol, el cual hace contacto con sus receptores hipotalámicos, ubicados en el núcleo supraóptico, produciendo la síntesis de la hormona oxitocina; esta viaja por el eje hipotálamo-hipofisario para ser almacenada en la neurohipófisis, en donde es liberada bajo la influencia del estradiol. Así mismo el estradiol estimula la síntesis de mRNA que codifica para receptores de oxitocina en las células que componen el epitelio uterino, generando un incremento en el número de los receptores a este nivel, los cuales hacen contacto con su ligando para permitir la síntesis de prostaglandina. Sumado a esto, el incremento en los niveles de estradiol estimula las células del epitelio glandular y luminal uterino para la síntesis de enzimas como la fosfolipasa A, C y ciclooxigenasas, que tienen un efecto primordial en la síntesis de la prostaglandina  $F2\alpha$ . Al producirse la fosforilación enzimática ejercida por la proteinquinasa C de las proteínas que hacen parte del citoesqueleto, se genera la remodelación de éste generando el desplazamiento de gránulos de oxitocina hacia la membrana celular, con la subsiguiente liberación de oxitocina, la cual favorece la síntesis de  $PGF2\alpha$  (Olivera, 2007).

Las prostaglandinas son moléculas de tipo eicosanoide, que presentan en su estructura cadenas de 20 carbonos y ácidos grasos polinsaturados, las cuales se producen a partir de los fosfolípidos presentes en la membrana de las células. La liberación de prostaglandina se produce a manera de incrementos transitorios

progresivos, que van a estimular la secreción de la oxitocina de origen ovárico, generando así la franca regresión luteal (Hernández, 2008).

Las enzimas fosfolipasas producen la hidrolización de los fosfolípidos de membrana. Este grupo de enzimas comprende las fosfolipasas A2 pequeñas que son inducidas por la acción de las citoquinas proinflamatorias como la interleuquina-1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y las fosfolipasas A-2 del citosol. Estas se encargan de la regulación de mediadores lipídicos una vez producida la activación celular, la translocación y la unión de los fosfolípidos a la enzima con el Calcio ( $\text{Ca}^{+}$ ); necesarios para la iniciación de la síntesis del ácido araquidónico en el retículo endoplasmático y alrededor del núcleo de las células. Una vez liberado el ácido araquidónico, se desencadena la síntesis de la enzima prostaglandina G/H sintetasa (PGHS), también conocida como ciclooxigenasa (COX), en la superficie luminal del retículo endoplasmático y en el interior y el exterior de las membranas que rodean el núcleo, la cual transforma al ácido araquidónico en prostaglandina G2 (PGG2). Esta prostaglandina sufre un proceso de oxidación por acción de peroxidasas para biotransformarse en varios prostanoídes, como prostaglandina D2 (PGD2), prostaglandina E2 (PGE2) y prostaglandina H2 (PGH2). Estos procesos son mediados por la ciclooxigenasa y sus isoformas ciclooxigenasas 1 y 2 (COX 1 y 2) (Goff, 2004; Hernández, 2008).

Al sintetizarse y liberarse la prostaglandina D2, rápidamente actúa sobre esta la enzima prostaglandina-D11-ketorreductasa, que permite la formación de la enzima prostaglandina F sintetasa, la cual cataliza la reducción del grupo de

endoperóxidos  $9\alpha$ - $11\alpha$  y en presencia de NADPH se produce la síntesis de la hormona  $PGF2\alpha$ . Otra vía para la producción de la prostaglandina- $F2\alpha$  se produce al sintetizarse la prostaglandina E2, por medio de la enzima prostaglandina E-sintetasa; una vez liberada la PGE2, se genera la reacción enzimática mediada por la prostaglandina E2 9-ketoreductasa que favorece la síntesis final de prostaglandina  $F2\alpha$ , siempre en presencia de NADPH (Goff, 2004).

Una vez es sintetizada y liberada la  $PGF2\alpha$  de origen uterino, pasa a la circulación venosa, pero alcanza rápidamente la arteria ovárica ipsilateral al cuerpo lúteo, gracias a un intercambio de contracorriente; de esta manera además del aporte sanguíneo que se dirige al cuerpo lúteo, es conducida la prostaglandina  $F2\alpha$ . Dicha hormona genera inicialmente un efecto constrictor de la vasculatura ovárica y una marcada reducción de la densidad capilar, produciendo una disminución de la tasa de perfusión ovárica. Al producirse la reducción en el flujo sanguíneo que se dirige al ovario, en el que se encuentra el cuerpo lúteo, se estimula el mRNA que codifica para la expresión de endotelina-1, la que genera una importante vasoconstricción arteriolar que conlleva a una hipoxia; produciendo de esta manera la reducción de la progesterona circulante, además de la disminución de la capacidad esteroideogénica en las células luteales y la degeneración de las células luteales endoteliales, lo que abre paso la activación del mecanismo de apoptosis celular, así como la regresión estructural luteal (Schams, 2004). El aporte sanguíneo ovárico luteal está directamente relacionado con los niveles periféricos de progesterona durante la regresión luteal (Niswender, 2000; Goff,

2004).

La  $\text{PGF}_2\alpha$  se une a sus receptores que se encuentran presentes en la superficie de las células esteroideogénicas luteales grandes, los cuales pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G. Al producirse la unión entre éstos y su ligando ( $\text{PGF}_2\alpha$ ), se activa la fosfolipasa C por medio de la proteína G, permitiendo que ésta catalice la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato en inositol 1,4,5 trifosfatado (IP3) y 1,2-diacilglicerol. Al incrementarse la producción IP3, se une a los receptores presentes en el retículo endoplasmático liso desencadenando la liberación de Calcio intracelular, que estimula la actividad catalítica de la proteinquinasa C, dependiente del Calcio, la cual genera una acción antiesteroideogénica por la modificación postransicional de las proteínas celulares que intervienen en la esteroideogénesis. También se afecta la biodisponibilidad de colesterol intracelular y se altera la matriz extracelular de las células luteales (Niswender, 2000). Así mismo, al unirse la  $\text{PGF}_2\alpha$  con su receptor puede activar la proteinquinasa C, por medio de esteres de forbol, desencadenando la serie de reacciones luteolíticas que es mediada por las fosforilaciones secuenciales de proteinquinasa activada por mitógenos, que finaliza con la inhibición de la transcripción del mRNA para la proteína reguladora de la esteroideogénesis, afectando la señalización para la producción de progesterona (Olivera, 2007).

Los cambios estructurales en las células luteales grandes y pequeñas comienzan a evidenciarse después de 24 a 36 horas de la exposición luteal a la

prostaglandina, pero ya para esta etapa la actividad esterioideogénica está ampliamente reducida; así mismo las células endoteliales que conforman la intrincada red de capilares del cuerpo lúteo, son las primeras que presentan importantes alteraciones morfológicas, produciendo la activación del fenómeno de apoptosis celular (Goff, 2004).

La apoptosis, también conocida como “muerte celular programada” se produce por una serie de cambios bioquímicos y morfológicos. Durante el proceso de apoptosis se evidencia el encogimiento de la célula con presencia de fraccionamientos citoplasmáticos y la aparición de secciones nucleares que contienen cromatina degenerada. Las fracciones citoplasmáticas, también llamadas cuerpos apoptóticos son rápidamente degradados por la acción de las células fagocíticas del sistema inmune (Stocco, 2007).

La iniciación del proceso apoptótico es mediado por la coordinación de un grupo de genes que se activan, los que codifican para las procaspasas y caspasas (enzimas con una fuerte actividad proteolítica) y por los genes de la familia Bcl-2, mediados por el Calcio (Niswender, 2000), dentro de los que se encuentran Bcl-XL, Bcl-w, Bid, Bax, Bik, Bcl-Xs (Rosales, 2008). Las caspasas están presentes intracelularmente en forma de zimógenos que se encuentran inactivos y deben ser activadas por medio de otra caspasa por otra, por la unión de cofactores y coenzimas que producen la activación ó por la activación generada por los receptores de muerte celular, de esta forma de desencadena la actividad de un grupo de enzimas que degradan el DNA, conocidas como DNAsas; las cuales son

endonucleasas que producen una defragmentación internucleosomal del DNA, haciéndolo perder el patrón característico de éste (Flores, 2005).

En el mecanismo de apoptosis también intervienen de manera directa varios factores, entre los que se cuentan las hormonas (gonadotrópicas y esteroidales) y los factores locales ó tróficos; estas sustancias cumplen un papel importante en la regulación de la apoptosis, ya que favorecen la supervivencia celular, actuando como mecanismo anti-apoptótico, que es totalmente dependiente de la expresión de los receptores, para cada uno de éstos en las células. Así mismo el proceso apoptótico es regulado por la expresión de algunos genes de importancia en este proceso. Es así como el gen p53, que es inducido por alteraciones y daños presentes en el DNA, favorece la activación de los genes proapoptóticos como el Bax, desencadenando la cascada de de reacciones apoptóticas. La inducción de la vía Fas, permite la activación de mecanismos inmunológicos que al hacer contacto con su receptor de membrana celular, genera la activación de de los genes pro-apoptóticos pertenecientes a la familia Bcl-2 (Markstörn, 2002; Flores, 2005; Slot, 2006; Rosales, 2008).

Los agentes pro-apoptóticos y anti-apoptóticos, median de manera efectiva en la decisión celular al iniciar ó no este proceso. Al no presentarse una concentración adecuada de receptores de membrana de agentes anti-apoptóticos como tirosinquinasa, hormona de crecimiento, gonadotropinas, proteína G, hormonas esteroideas acopladas a sus receptores nucleares, EGF, EGF, IGF e insulina, acoplados a sus receptores, va a producirse la activación de los genes pro-



apoptóticos (familia Bcl-2); éstos ya activados al interior de la célula van a dirigirse a la mitocondria generando la liberación de agentes pro-apoptóticos, como es el caso del citocromo-C en el citosol celular; el cual va a unirse a la proteasa apoptótica activadora de factor 1 (APAF-1) y a la pro-caspasa 9 formando el complejo proapoptosoma, los que permiten la activación de la pro-caspasa 3 en caspasa 3 (Olivera, 2007).

El mecanismo apoptotico también puede ser desencadenado mediante la activación de los receptores celulares para muerte celular (como CD95, Fas, Factor de necrosis tumoral y sus receptores, entre otros) los cuales al internalizarse en la célula permiten la activación del complejo de muerte inducida (DISC), produciendo el reclutamiento de moléculas de pro-caspasa 8, las que van a ser activadas a caspasa 8 con la ayuda de la unión del DISC con la proteína Fas-asociada para muerte celular (FADD). Al estar activada la caspasa 8 en el citosol celular, va a producirse la activación de la procaspasa 3 en caspasa 3 (paso anterior); esta molécula permite la exposición extramembranal de la fosfatidil-serina, que debido al reducido espacio intercelular va a permitir el contacto con otras células desencadenando el proceso de apoptosis en las células vecinas. Una vez activada la caspasa 3, se genera la desestabilización del complejo caspasa-activadorDNasa (CAD) y su factor inhibidor (Subunidad inhibidora de caspasa-activadorDNasa ICAD), permitiendo la expresión de las enzimas con actividad DNasa (endonucleasas), generando la defragmentación internucleosomal del DNA. En la activación de las caspasas participan más de 100

substratos que participan en cada una de las reacciones de activación, así como en la desnaturalización de las proteínas estructurales y del citoesqueleto, generando encogimiento del núcleo y alteración en la morfología celular (Markström, 2002). Durante la etapa final de la luteolisis la invasión del cuerpo lúteo por células del tipo polimorfonucleares, macrófagos, es debida a la acción de una sustancia quimiotáctica para los monocitos (proteína 1 quimioatrayente de los monocitos) y es regulada por el factor inhibitorio de la migración (Hernández, 2008).

Una vez ocurrido el proceso de regresión funcional y estructural del cuerpo lúteo, sobre la superficie ovárica, exactamente en donde se encontraba la estructura luteal se forma un cuerpo cicatrizal ó vestigial que también recibe el nombre de cuerpo albicans.

#### **1.6. Factores que afectan la eficiencia reproductiva en la hembra receptora en un programa de TE.**

Existen una serie de causas que afectan la eficiencia reproductiva al aplicar biotecnologías asociadas a la reproducción durante la etapa embrionaria temprana. Actualmente se estima que el porcentaje de pérdidas embrionarias ocurridas antes del día 17 es de aproximadamente entre el 30 y 40% (Araujo, 2005), en condiciones naturales, por eso puede pensarse que al intervenir en estos procesos estas pérdidas pueden ser mayores. Las pérdidas embrionarias deben ser identificadas y diferenciadas de las muertes embrionarias que ocurren después del día 17 de gestación, ya que al ocurrir la pérdida embrionaria, antes

del reconocimiento materno, la hembra retornará al estro en la misma fecha que se espera que se presente el próximo estro, en ausencia de la gestación (Starbuck, 2004); mientras que las pérdidas embrionarias que se producen después de producirse el reconocimiento materno van a hacer que el estro se presente después del día 25 post-IA. Esto permite pensar que el embrión o parte del trofoblasto estaban vivos el día del reconocimiento de la gestación (Hernández, 2003).

Dentro de las causas de mortalidad embrionaria, también deben tenerse en cuenta factores de tipo genético, los que pueden deberse a la presencia de defectos heredados, alteraciones durante la meiosis celular, problemas durante la fertilización, alteraciones cromosómicas, que se constituyen como causas de pérdida embrionaria, ya que en hembras superovuladas se considera que el 10% de estadíos de mórula y blastocistos presentan este tipo de anomalías citogenéticas, siendo esta una causa directa de pérdida embrionaria (King, 1990; Tovo, 2010).

Existe una serie de moléculas asociadas al proceso de implantación que participan activamente en este proceso (Martal, 1997). De esta manera cualquier alteración en los procesos de replicación de la información genética va desencadenar falla en la síntesis de proteínas, causando alteraciones en el desarrollo óptimo del embrión y el éxito de la implantación, produciendo una subsecuente pérdida embrionaria en cualquiera de las etapas (Kawarsky, 1996).

La heredabilidad es muy importante en la aparición de algunos desórdenes reproductivos en vacas lecheras. Entre ellos se encuentran la retención placentaria, la presencia de locus anormales, endometritis, anestro y ovarios quísticos. Todos estos factores, al no ser controlados, van a causar alteraciones reproductivas que van a afectar directamente el desempeño reproductivo del animal (Hernández, 2003).

Es importante también tener en cuenta los factores de tipo ambiental, ya que estos van a afectar directamente las condiciones de confort de la hembra bovina afectando así el desempeño de ésta (Sartori, 2004). Es así como el control de la temperatura corporal en el animal, es un proceso integrado, regulado por mecanismos fisiológicos en el hipotálamo; los principales efectos del estrés calórico se observan en la vaca de leche, ya que es poco eficiente en mantener la temperatura corporal debido a que la pérdida de calor depende de la evaporación por vía respiratoria y en menor grado por la sudoración, afectando de manera directa el desempeño productivo y reproductivo de ésta (Ahmad, 1995; Vasconcelos, 2006). La exposición del animal a temperaturas elevadas induce a que se presente mortalidad embrionaria, ya que experimenta un importante incremento de la temperatura uterina de la hembra gestante, especialmente en zonas tropicales (Ineskeep, 2004; Tovio, 2010). Los efectos del estrés térmico sobre el embrión joven no son apreciables sino hasta las fases finales de su desarrollo, lo cual se evidencia al someter embriones a temperaturas elevadas, *in vitro*, ya que estos se alteran pero continúan con su desarrollo, produciéndose una

pérdida embrionaria posterior durante la etapa de implantación (Rizzo, 2007; Tovia, 2010).

Existen razas que presentan una mayor adaptabilidad a condiciones de calor extremo, como es el caso de los animales *Bos indicus* y sus cruces, en los que se evidencia esta marcada resistencia a los efectos producidos por el estrés calórico (Ineskeep, 2004; Torres, 2008). Diskin y Sreenan en 1980, sometieron un grupo de hembras bovinas a temperaturas de 32°C por un espacio de 72 horas inmediatamente después de la IA, al hacer la evaluación se obtuvo un índice de fertilidad de 0%, en comparación con un grupo control que fue sometido a un rango de temperatura entre 7 y 21°C, encontrándose una tasa de concepción del 48%. Esto confirma la baja eficiencia reproductiva en épocas de aumento de temperatura ambiental. El estrés inducido al animal por acción de las altas temperaturas entre los días 8 y 17 de preñez altera el medio ambiente uterino y reduce en un 70% la secreción de proteína trofoblástica bovina, lo cual induce al desencadenamiento del mecanismo luteolítico, afectando de manera directa la viabilidad del embrión; de la misma forma las vacas con características cárnica expuestas a altas temperaturas entre los días 8-16 de la gestación, presentaban una disminución en el peso del conceptus y del cuerpo lúteo (Biggers, 1987; Mann, 2001).

Varios factores asociados a la protección del embrión contra el choque calórico pueden ser identificados, los cuales son generados por el cigoto desde que se da el primer clivaje de sus células; por eso es de suma importancia que la hembra

brinde al conceptus un ambiente embriotrófico que permita la expresión de genes que codifican para estas moléculas (Al-Katanani, 2002).

Un importante factor que debe ser controlado de una manera efectiva está asociado a la nutrición, ya que existe una influencia directa entre la nutrición y el desempeño reproductivo del animal. Una nutrición desbalanceada genera un balance energético negativo que trae como consecuencia la disminución del peso del animal y la disminución de los niveles de glucosa sanguínea, necesaria para brindar una fuente energética, que se requiere para llevar a cabo el desarrollo y mantenimiento fisiológico embrionario, y de las funciones reproductivas en la hembra. Este desbalance energético produce una disminución de la función del eje hipotálamo-hipofisiario-ovárico produciendo alteraciones reproductivas, como ovarios sin estructuras que demuestren ciclicidad y anestros prolongados (Palma, 2001). De la misma manera van a evidenciarse disminuciones en la secreción de GnRH con la subsecuente disminución en la liberación de FSH y LH; además de la inhibición del metabolismo mineralocorticoide por una deficiente liberación de hormona ACTH, inhibición del metabolismo basal, atresia folicular, escasa liberación de TSH, disminución en la tasa de ovulación, celo silente, muerte embrionaria y anestro (Elrod, 1993; Schroeder, 2005). Otro factor importante a tener en cuenta son las dietas ricas en proteínas degradables en el rumen, que pueden generar alteraciones en el pH que afectan de manera directa el medio uterino. Se producen alteraciones en los iones; puede afectarse la ionización de los sustratos energéticos para el embrión poniendo en peligro su sobrevivencia

antes de producirse el reconocimiento materno de la preñez, lo cual va a producir una pérdida embrionaria temprana (Baxter, 1997). Los altos niveles de proteína cruda también se relacionan con aumentos en el nivel de amonio ruminal, con el consecuente incremento de los niveles de amonio sistémico, los cuales van a pasar al útero de la hembra gestante causando mortalidad embrionaria (Callaghan, 1999; Robinson, 1999).

La toxicidad es uno de los factores que al ser encontrados en el animal van a causar alteración de las funciones reproductivas así como del desarrollo embrionario. Esta toxicidad puede ser desencadenada en el animal por la ingestión de fitoestrógenos, antiestrógenos y algunas sustancias bociógenas que pueden causar alteraciones reproductivas ya que van a alterar los niveles normales de las hormonas que intervienen en la reproducción y por ende se desencadena la muerte embrionaria. La toxicidad también puede ser producida por varias especies de plantas como es el caso de las pertenecientes al género *Astragalus* spp y *Oxytropis* spp (*Conium*, *Nicotiana*, *Lupinus*); al ingerir estas plantas se van a producirse malformaciones fetales, modificaciones en el balance de los fluidos fetales, muerte fetal y aborto espontáneo, lo cual se atribuye al contenido de alcaloides pirimidínicos (Hernández, 2003). De la misma forma, algunas variedades de pino causan alteraciones hormonales y modificaciones en el fluido sanguíneo alterando en determinado caso el ambiente adecuado para desarrollo y sobrevivencia embrionaria (Chebel, 2004).

Los factores del orden infeccioso así como las toxinas generadas por estos

microorganismos afectan de manera directa la reproducción de la hembra bovina, ya que estos presentan tropismo por el sistema reproductivo, generando infertilidad. La infección causada por agentes como *Leptospira* spp, *Campylobacter fetus* y la *Trichomona fetus* pueden causar muerte embrionaria y generar problemas de repetición de servicios en las hembras infectadas. En el caso de infecciones causadas por el *Haemophilus somnus* se producen fallas en la fertilización y mortalidad embrionaria (Jiménez, 2005). La acción de agentes patógenos como *Mycoplasma* spp. y *Ureoplasma* spp. también están asociada a desórdenes reproductivos, ya que causan infertilidad en la hembra, incluyendo mortalidad embrionaria (Vanroose, 2000). Los hemoparásitos también van a generar un impacto importante en la reproducción de la hembra bovina, ya que al producir su principal efecto (lisis del glóbulo rojo) van a alterar la capacidad para conducir el suficiente volumen de oxígeno a las células, desencadenando abortos y pérdidas embrionarias en las diferentes etapas.

Así mismo, los agentes infecciosos de tipo viral afectan significativamente la viabilidad de los embriones, como es el caso de los virus de Diarrea Viral Bovina, Rinotraqueitis infecciosa y el virus de la lengua azul en los bovinos, los cuales se adhieren a la zona pelúcida, causando múltiples alteraciones reproductivas (Jiménez, 2005).

Los factores asociados al control hormonal son importantes para generar condiciones favorables que permitan brindar un ambiente uterino que garantice al embrión un medio uterino adecuado para la supervivencia. El control endocrino para la síntesis de proteínas uterinas durante el desarrollo embrionario temprano



ha sido parcialmente aclarado en los bovinos; de esta forma, se reporta que la progesterona es la responsable de los cambios cualitativos y cuantitativos de las proteínas presentes en el medio ambiente uterino controlando la síntesis y secreción de un grupo importante de éstas, desde el punto de vista génico. De acuerdo a esto se deduce que deficiencias de progesterona pueden causar que el endometrio llegue a ser deficiente en la producción de los nutrientes necesarios para la sobrevivencia del embrión (Grajales, 2001; Kimmins, 2001; Tovio, 2010). La progesterona regula la producción de las secreciones uterinas que nutren durante las etapas iniciales al blastocisto, así que cualquier alteración en su composición puede comprometer la supervivencia embrionaria; estas secreciones uterinas transportan substratos energéticos, iones, vitaminas, aminoácidos, péptidos, hormonas, enzimas, entre otras sustancias. Por este motivo cualquier alteración en la composición de la dieta en Ca, Mg, K, proteína total, y glucosa, dan como resultado modificaciones del medio ambiente uterino y esto causa embriones anormales y/o mortalidad embrionaria (Robinson, 1999; Lucy, 2001).

Una vez formada la placenta, brinda un bloqueo para que no sea atacado el embrión, constituyéndose como el medio preferente de protección del individuo en desarrollo (Hafez, 2000; Hernández, 2003). En el caso de la técnica de TE pueden presentarse fallas en los mecanismos de aceptación del embrión generando la muerte embrionaria, ya que las vacas receptoras están recibiendo una carga antigénica adicional, debido a que el embrión es completamente extraño para las hembras receptoras y el sistema inmunológico de la hembra puede desencadenar una respuesta inmune atacándolo y generando una inminente pérdida embrionaria (Geisert, 1992).

Es importante tener en cuenta que existen situaciones causantes de estrés en los animales, ya que éstos son organismos vivos de comportamientos sociales; este estrés puede desencadenar disturbios en el proceso de implantación y en consecuencia causar mortalidad embrionaria (Rizzo, 2007).

El período embrionario es la fase más crítica, durante la cual el *conceptus* necesita condiciones óptimas para su sostenimiento, sobretodo cuando realiza la adhesión lenta y gradual a las paredes uterinas. Esta comienza hacia el día 18 de la gestación, cerca al embrión, y el día 36 aún no se ha realizado en toda la extensión del alantocorion. La implantación se completa en toda la extensión mencionada, después del día 70 de la gestación (Hernández, 2008). La exploración del tracto reproductivo por vía rectal antes de los 60 días de la preñez, puede causar pérdida embrionaria, teniendo en cuenta que la implantación es un proceso lento y gradual, en el que se produce la adhesión del trofoblasto al endometrio y es débil en los estadíos tempranos de la implantación (Wathes, 1995; Garret, 1998; Dunne, 2000; Hernández, 2003).

### **1.7. Mecanismos de control del ciclo estral en un programa de TE: Aplicación de terapias hormonales.**

Para poder obtener mejores resultados en cualquier técnica de reproducción asistida debe realizarse un control efectivo del ciclo estral de la hembra bovina. Actualmente, se vienen desarrollando una serie de protocolos de sincronización del estro, proceso por el cual se controla el ciclo estral de la hembra por medio de la utilización de hormonas exógenas que ejercen un directo control sobre el ciclo. Estos procedimientos están influenciados principalmente por la acción de la prostaglandina F2 $\alpha$  que produce la regresión de una manera precoz del cuerpo lúteo y por la acción de la progestágenos los que actúan en la hembra simulando un cuerpo lúteo (Palma, 2001).

La prostaglandina F2 $\alpha$  es uno de los métodos utilizados tradicionalmente en protocolos de control del ciclo estral. El inconveniente de ésta, es que es efectiva únicamente durante la fase luteal del ciclo estral; una aplicación de prostaglandina F2 $\alpha$  entre los días 6 y 16 inducirá la regresión de cuerpo lúteo lo que permitirá la finalización de la fase luteal, dando paso al inicio otro ciclo. Al efectuar una aplicación de prostaglandina F2 $\alpha$ , se encuentra que solo un 50 y 70% de animales responderán al tratamiento entrando en calor. Si se administran dos aplicaciones de prostaglandina F2 $\alpha$  con un intervalo de 11 a 14 días (Gómez, 2005), se permitirá que todas las vacas tengan una fase lútea presente en el momento de la segunda aplicación por lo que se logra la sincronización completa del ciclo estral, realizando la detección del celo 5 días después de la segunda aplicación. Sin

embargo la acción de prostaglandina F2 $\alpha$  se ve limitada por que solo actúa en animales que se encuentren ciclando y que presenten un cuerpo lúteo normal (Hafez, 2000; Bó, 2002; Gouveira, 2004).

Otra manera para Sincronizar el ciclo estral de la hembra bovina es con la ayuda de la progestágenos, por medio de la cual se trata de simular la fase luteínica del ciclo estral, prolongándola (Gordon, 1999). El beneficio de este sistema de control del ciclo estral, es que no se necesita que el animal presente un cuerpo lúteo funcional. Al encontrarse niveles de progesterona exógena en el sistema del animal va a generarse un bloqueo hormonal, debido a que éste simula la presencia de un cuerpo lúteo; pero es importante contar con un sistema en el que los niveles de progesterona permanezcan por un espacio de tiempo determinado en el cuerpo del animal, como pueden ser implantes subcutáneos, dispositivos intravaginales, esponjas, entre otros (Barreto, 2002; Gómez, 2005).

Las nuevas aplicaciones de tratamientos hormonales muestran que la interacción de hormonas generan mejores resultados en el control del ciclo estral (sincronización de celos). Así se encuentra que existen varios protocolos como el Ovsynch en el que se aplica GnRH + prostaglandina F2 $\alpha$  + GnRH para después de 16 a 24 horas post-aplicación de la segunda dosis de GnRH proceder a Inseminar a tiempo fijo (Bó, 2005; Gouveira, 2004). Al hacerse comparaciones entre el método Ovsynch y una inseminación artificial a celo detectado, Stevenson (1996), encontró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) ya que el porcentaje de preñez con el método Ovsynch fue del 35% mientras que al inseminar a celo detectado

presentó un 26% de efectividad. En 1997, Pursley encontró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), ya que el porcentaje de preñez con el método Ovsynch fue del 39% mientras que al inseminar a celo detectado presentó un porcentaje de preñez del 36%. En 1998, De la Sota encontró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) ya que el porcentaje de preñez con el método Ovsynch fue del 14% mientras que al inseminar a celo detectado presentó un porcentaje de preñez del 5%. En otro estudio realizado, se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) ya que el porcentaje de preñez con el método Ovsynch fue del 50% mientras que al inseminar a celo detectado presentó un porcentaje de preñez del 40% (Colazo, 1996). De esta manera se evidencia un aumento en el porcentaje de preñez después de la IA, mediante el uso del protocolo en el que se utilizan dos dosis de GnRH y una dosis de prostaglandina  $F2\alpha$  contra la IA a celo detectado (Stevenson, 1999).

Para la aplicación de las técnicas de sincronización del estro también se encuentran protocolos en los que se emplean dispositivos de liberación lenta de progesterona. Esta hormona ha sido empleada hace aproximadamente cuarenta años para el control del ciclo estral (Wiltbank, 1965). Actualmente se está trabajando con estos dispositivos que al utilizarlos en el animal por vía intravaginal, al día cero del protocolo sumado con la aplicación de Benzoato de Estradiol, va a producir un control del desarrollo folicular, ya que al aumentarse los niveles de estradiol se estimula la secreción de inhibina, pero genera un déficit de los niveles de folistatina, lo cual genera una disminución de la acción de FSH (Bó,

2002).

El dispositivo de liberación lenta de progesterona al ser utilizado solo, genera unos niveles muy bajos de ésta y al estar presente estos niveles en el cuerpo del animal se va a producir una sobremaduración por la persistencia del folículo lo cual hace que cuando ovule este folículo se obtenga un oocito alterado o envejecido (Sánchez, 1995; Sartori, 2002). Al aplicar el dispositivo de liberación de progesterona junto con una dosis de estradiol se genera una retroalimentación negativa para la liberación de GnRH actuando hipotálamo y suprimiendo el desarrollo de los folículos presentes en el ovario, como la vida media del estradiol exógeno es de aproximadamente 4 días, el día 4.3 caen los niveles de éste haciendo que se produzca una liberación de GnRH en el hipotálamo, la cual va a la hipófisis liberando FSH y LH, permitiendo que se inicie una nueva onda de crecimiento folicular (Bó, 1995; 2002; Tribulo, 2002). De esta manera combinando la regulación de la fase folicular con la de la fase luteal, es posible predecir el surgimiento de una nueva onda de desarrollo folicular (Twagiramungu, 1995; Bó, 1996). El día 7 contado desde el inicio del protocolo de sincronización se retira el dispositivo y se realiza una aplicación de prostaglandina F<sub>2</sub>α (para inducir luteolisis); el día 8 se aplica Benzoato de Estradiol (para sincronizar el momento de la ovulación) y treinta horas después proceder a Inseminar a tiempo fijo (Barreto, 2002), ya que la mayoría de los animales ovúlan 66 horas después de retirado el implante de liberación lenta de progesterona (Acosta, 2004). La variabilidad de resultados obtenidos mediante las diferentes técnicas de

sincronización hace que se permita avanzar en los protocolos que controlan el desarrollo folicular; de manera que los animales presenten un folículo en crecimiento, con capacidad de ovular en el momento del retiro del dispositivo de liberación lenta de progesterona y de la aplicación de la prostaglandina (Bó, 1991; Kastelic, 1996; Colazo, 1996).

Las ventajas del tratamiento para la sincronización del celo por medio de la asociación del dispositivo de liberación lenta de progesterona, estradiol, prostaglandina y GnRH, se evidencia por medio de trabajos realizados por Bó (1994), en el que a un grupo de hembras bovinas, n=34, se les sincronizó el estro con el tratamiento descrito anteriormente, el cual fue comparado contra una sincronización efectuada con dos inyecciones de PGF2 $\alpha$ . Los resultados tras la aplicación de los tratamientos se reportaron así, el 75% de las hembras sincronizadas con el tratamiento P4, estradiol, PGF2 $\alpha$ , GnRH presentaron una ovulación efectiva 72 a 84 horas después del tratamiento y un 40% de las hembras sincronizadas con dos inyecciones de PGF2 $\alpha$  ovularon en el mismo tiempo, encontrando diferencias significativas entre estos tratamientos ( $P < 0.05$ ). De la misma forma se evidencia la efectividad de este tratamiento cuando Anderson (1999), lo comparó contra una sincronización que consistía en una inyección aplicada el día cero de GnRH, una inyección de PGF2 $\alpha$  el día seis y se insemina el animal 12 horas después de la observación del celo. Los resultados reportados al realizar esta comparación, demuestran que el tratamiento en el que se usa el dispositivo de liberación lenta de progesterona generó un 64% de preñez

mientras que el otro tratamiento resultó en un 44% de preñez; otra ventaja de la utilización de este tratamiento es la posibilidad de efectuar una inseminación artificial a tiempo fijo (IATF). En otra fase del mismo estudio se sincronizaron 3145 para comparar el uso del tratamiento del dispositivo de liberación lenta de P4 contra un control no tratado. Se reportó que los animales tratados con el dispositivo de progesterona presentaron un porcentaje de preñez del 60% enfrentado con el grupo control que fue del 53%.

Así mismo, se evaluaron las variaciones del protocolo en el que se emplea el dispositivo progestágeno CIDR-B; se aplicó por 7 u 8 días obteniéndose tasas de preñez del 60% (en el tratamiento CIDR-B) por 7 días y de 50% (en el tratamiento CIDR-B) por 8 días ( $P < 0.05$ ), encontrándose una mayor eficiencia en el tratamiento de 7 días (Bó, 1995).

La alternativa mas efectiva para realizar un efectivo control del ciclo estral y de la ovulación resultó ser el tratamiento con el CIDR-B más 17-Beta estradiol, prostaglandina F2 $\alpha$  y una aplicación de GnRH. Se presentó un porcentaje de preñez del 77%. Este fue enfrentado contra la aplicación del CIDR-B más una aplicación de GnRH, el cual presentó un porcentaje de preñez del 42% ( $P < 0.05\%$ ). Por este motivo actualmente se presentan óptimos resultados en el control del ciclo estral mediante aplicación de estas terapias hormonales en las hembras bovinas tratadas con estos dispositivos de liberación de progesterona (Baruselli, 2001), inclusive en el trópico alto colombiano, se confirman estos resultados haciendo las comparaciones entre estos métodos de control del ciclo



estral (Celemin, 2003).

Adicionalmente a los anteriores protocolos utilizados para el control del ciclo estral en las hembras receptoras de embriones para la técnica de TE, se están empleando en estos protocolos el uso de hormonas para favorecer el desarrollo folicular, así como la luteinización que ocurre una vez producida la ovulación; por este motivo se ha vinculado el uso de hormonas como la Gonadotropina Coriónica equina (eCG) en pro del incremento de la eficiencia tras la aplicación de la TE. La anterior hormona es aplicada buscando favorecer el crecimiento folicular durante el ciclo sincronizado (Baruselli, 2005), así como el proceso de especialización de las células foliculares durante la luteinización una vez producida la ovulación (Helmer, 1986). Lo anterior va a influenciar la formación y consolidación de un cuerpo lúteo funcional, que genere unas concentraciones plasmáticas de progesterona que permitan el establecimiento de un medio uterino favorable para el desarrollo, implantación embrionaria y mantenimiento de la gestación (Niswender, 1994; Everton, 2003; Madureira, 2004)

La gonadotropina coriónica equina es una hormona glicoproteína, sintetizada y liberada los cálices endometriales en la hembra equina gestante entre los días 40 a 130 (Bousfield, 2001). Esta sustancia presenta tropismo por los receptores foliculares de las hormonas foliculoestimulante y luteinizante, presentes en el folículo; así como por los receptores en las células del cuerpo lúteo para la hormona luteinizante; de esta manera se va a favorecer el incremento en la

síntesis de RNA mensajero que codifica para receptores de hormonas gonadotrópicas en estas células, permitiendo el aumento de la densidad de este tipo de receptores; lo anterior está asociado a los fenómenos de dominancia folicular, preparación para la ovulación y especialización celular para el desarrollo del cuerpo lúteo (Murphy, 1991; Sartori, 2001; Baruselli, 2003).

Con la aplicación de la gonadotropina coriónica equina durante el día cinco, se busca favorecer el desarrollo folicular, ya que esta hormona al interviene en la síntesis de mRNA que codifica para los receptores de hormonas gonadotrópicas (FSH y LH) a nivel folicular, permitiendo que el folículo dominante mantenga su desarrollo (Evans, 1997). Adicionalmente a nivel de las células foliculares se produce el aumento en la síntesis para la expresión de receptores de hormona luteinizante, mediante este mecanismo se inicia el proceso de dominancia folicular, la cual es influenciada por la acción de las hormonas LH y FSH (Sartori, 2001).

Las ventajas de hacer una sincronización del ciclo estral por medio de ayudas hormonales en la hembra bovina son: favorecer la presentación de celo en las vacas lactantes que no se han visto en celo a los 45 días postparto, la reducción del tiempo necesario para la detección del celo, facilitar el empleo de la inseminación artificial en las empresas ganaderas, aumentando la efectividad en programas de transferencia de embriones y otras biotecnologías, ayudar a las hembras que están en estado de anestro lactacional, entre otros (Cutaia, 2001).

### **1.8. Uso de la ultrasonografía y del radioinmunoanálisis (RIA) como herramientas en el técnica de TE.**

Es importante hacer un control de las diferentes etapas durante la sincronización y superovulación de las hembras donantes así como de las receptoras en un programa de TE, ya que de esta forma se puede controlar de manera efectiva el tamaño y morfología de cada una de la estructuras que se encuentran en el ovario durante las diferentes etapas de esta técnica. Los métodos de diagnóstico utilizados en la práctica veterinaria han aportado el uso de la ultrasonografía para el diagnóstico de gestación en diferentes especies, pero es con el uso de esta herramienta que se ha facilitado el estudio de los fenómenos fisiológicos en la reproducción de una manera poco invasiva, en particular para la comprensión de la dinámica folicular y los cambios presentes en el ovario durante el ciclo de la hembra bovina (Adams, 1992). Gracias a este tipo de avances hay una mejor comprensión de los mecanismos de control de las ondas foliculares lo que ha permitido desarrollar y mejorar los protocolos de control del ciclo estral y multiovulación, para poder dar un enfoque con mayor productividad y eficiencia a la reproducción asistida en grandes animales (Burke, 1996; Pursley, 1997). También se han desarrollado otras aplicaciones como sexaje fetal, seguimiento de las estructuras ováricas, folículocentesis para aspiración de los folículos, diagnóstico de anomalías reproductivas, monitoreo durante el tratamiento de ovarios quísticos, seguimiento de la involución uterina post-parto, evaluación del desarrollo fetal durante las fases de gestación, entre otras aplicaciones

(Edmondson, 1986; Ribadu, 1994; Jeffcoate, 1995).

La ultrasonografía permite observar los folículos antrales como estructuras ecogénicas que presentan en su interior un acúmulo de líquido; al presentarse la ovulación y formación de cuerpo lúteo por medio de la ultrasonografía puede observarse en el ovario una estructura redondeada la cual en algunos casos se puede evidenciar un área no ecogénica central. Esto indica la presencia de un cuerpo lúteo cavitario que tiene una menor capacidad de secretar progesterona ya que su área es menor que uno del mismo tamaño que no presente esta cavidad (Kastelic, 1990).

Antes de cada proceso asociado a la técnica de TE debe hacerse un chequeo ultrasonográfico de las hembras bovinas (Ribadu, 1999), ya que además de todos los criterios de selección para las hembras receptoras, también debe tenerse muy en cuenta los fenómenos fisiológicos presentes en sus ovarios. Así con la ayuda de la ultrasonografía trans-rectal se permite determinar como afecta una estructura como el folículo preovulatorio de una manera directa al subsecuente tamaño que pueda presentar el cuerpo lúteo ya que al presentarse un folículo preovulatorio pequeño puede generar la formación de un cuerpo lúteo pequeño; mientras que un folículo preovulatorio grande, va a dar paso a un cuerpo lúteo de mayor tamaño y por ende unos niveles de progesterona mayores que generen unas condiciones uterinas favorables para el desarrollo del embrión que ha sido transplantado. Por eso es importante determinar el tamaño de las estructuras ováricas antes de realizar la transferencia del embrión a la hembra receptora con la ayuda de técnicas

ultrasonográficas (Vasconcelos, 2001).

Para realizar las mediciones de progesterona en plasma se implementó la técnica de Radioinmunoanálisis (RIA) en fase sólida. Este es el medio para realizar mediciones biológicas por medio de radioisótopos, la cual tiene una alta sensibilidad, especificidad y es fácilmente aplicable a una gran variedad de compuestos, como es el caso de los niveles de progesterona plasmática. Esta técnica se basa en la competencia entre una hormona marcada, por un limitado número de sitios de unión en la molécula del anticuerpo, para lo cual se pone a reaccionar cantidades conocidas o iguales del anticuerpo con cantidades conocidas de la hormona marcada (para progesterona se utiliza Yodo 125 como isótopo marcador), variando solamente las concentraciones de la hormona presente en la muestra a analizar y en los valores conocidos en la curva estándar. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se separan las partes y se realiza el conteo de la radioactividad residual, en un equipo para RIA en fase sólida, en el que a mayor radioactividad residual la concentración de la hormona en la muestra estudiada es menor. La cuantificación de la concentración de la hormona presente en la muestra se determina contrastándola con los valores conocidos de la curva estándar.

En el campo de la reproducción animal aplicada, la técnica de RIA se puede usar para la determinación de hormonas hipotalámicas y gonadales, para el estudio de las interrelaciones del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, para estudiar el ciclo estral, de los niveles hormonales durante la preñez, el periodo periparto y las

alteraciones durante estas etapas. También para evaluar el comportamiento ovárico del post-parto y pubertad y los factores que los afectan, evaluar la eficiencia de la IA, evaluar las alteraciones ováricas y luteales, realizar el seguimiento del control reproductivo de los rebaños y de los resultados de los tratamientos hormonales, así como para estudiar las alteraciones del sistema reproductivo (Rodríguez, 2001).

## REFERENCIAS

- Acosta, T., Hayashi, K., Ohtani, M. and Miyamoto, A. 2003. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction* 125: 759-767.
- Acosta, T. and Miyamoto, A. 2004. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Animal Reproduction Science* 82-83: 127-140.
- Adam, J., Pawson, A. and McNeilly, S. 2005. The pituitary effects of GnRH. *Animal Reproduction Science* 88: 75-94.
- Adams, G., Matteri, R. and Gither, O. 1992. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 95: 627-640.
- Ahmad, N., Schrick, F., Butcher, R. and Inskeep, E. 1995. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biology of Reproduction*. 52: 1129-1135.
- Al-Katanani, Y., Lopez, F. and Hansen, P. 2002. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 85: 390-396.
- Anderson, J. 1999. Resultados de trabajos utilizando CIDR-B. Segundo Workshop de Reproducción Bovina Boehringer Ingelheim S.A, Tandil, Argentina: 1-17.
- Araújo, M., Vale, V., Ferreira, A., Sá, W., Barreto, J. y de Sá Filho, L. 2005. Secreção de interferon-tau em embriões bovinos produzidos in vitro frescos e congelados. (Interferon tau secretion in cattle embryos in vitro fertilized before and after cryopreservation). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 57: 6-17.
- Apelo, C. and Kanagawa, H. 1989. Pathogens associated with mammalian embryo. *Journal Veterinary Research (Japan)* 37: 49-69.
- Barnea, E., Choi, Y. and Leavis, P. 2000. Embryo maternal signaling prior to implantation. *Early pregnancy: biology and medicine*. 4: 166-175.
- Barreto, A. and MacManus, C. 2002. The effect of progestagen CIDR device on pregnancy rates in bovine embryo transfer recipients. *Theriogenology*. 57: 1974-1989.
- Baruselli, P., Marques, M., Madureira, E., Costa Neto, W., Gradinettie, R., Bo, G. 2001. Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with CIDR-B devices and eCG. *Theriogenology*. 55: 157. Abstract.
- Baruselli, P., Bó, G., Reis, E., Marques, M., de Sá Filho, M. 2005. Introducción de la IATF en el manejo reproductivo de rebaños de Ganado de engorde en Brasil. *Memorias, congreso internacional de reproducción bovina. Laboratorio Intervet, Bogotá Colombia*: 121-137.
- Baruselli, P., Reis, E. 2003. Sincronización de receptoras Cebú en condiciones tropicales. *Memorias IV Seminario Internacional de reproducción en grandes animales, CGR Biotecnología Reproductiva. Bogotá, Colombia*: 35-44.
- Baruselli, P., de Sá Filho, M., Martins, C., Reis, E., Nasser, L. y Bó, G. 2005. Nuevos avances en los tratamiento de súper ovulación en donadoras de embriones. *Memorias, Congreso internacional de reproducción bovina. Laboratorio Intervet, Bogotá Colombia*: 139-154.
- Baruselli, P., Marques, M., Reis, E., Nasser, L., Silva, R., Menegatti, J., Valentin, R., Santos, I. 2003. Adequação da dose de FSH (Folltropin-V) em protocolos de superovulacao das vacas Nelore, com inseminacao artificial em tempo fixo. *Memorias, XVII Reunion Anual de la Sociedad Brasileira de Tecnologia de Embriones. Brasil*.
- Baruselli, P., Marques, O., Nasser, L., Reis, E., Bó, G. 2003. Effect of eCG on pregnancy rates of lactating zebu beef cows treated with CIDR-B devices for timed artificial insemination. *Theriogenology*. 59: 214.
- Basurto, H. 2005. Programa estacional de reproducción: una alternativa para la producción bovina en pastoreo en el trópico mexicano. *Memorias, Congreso internacional de reproducción bovina. Laboratorio Intervet, Bogotá Colombia*: 89-96.
- Baxter, S. and Ward, W. 1997. Incidence of fetal loss in dairy cattle after pregnancy diagnosis using an ultrasound scanner. *Veterinary Record*. 140, 11: 287-288.
- Bazer, F., Spencer, T. and Ott, T. 1997. Interferon Tau: A novel pregnancy recognition signal. *American Journal of Reproduction Immunology* 37: 412-420.
- Biggers, B., Geisert, R., Wetteman, R. and Buchanan, D. 1987. Effect of Heat Stress on Early Embryonic Development in the Beef Cow. *Journal of Animal Science*. 64:1512-1518.
- Bilodeau, S. 2006. Embryonic development and factors affecting embryo survival in the cow. *Journal Agriculture and agri-food Canada Research Center*.

- 4: 240-249.
- Bó, G., Adams, G., Caccia, M., Martínez, M., Pierson, R. and Mapletoft, R. 1995. Ovarian Follicular wave emergente after treatment with progesteragen and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science*. 39, 3: 193-204.
- Bó, G., Baruselli, P., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tribulo, R. and Mapletoft, R. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*. 57, 1: 53-72.
- Bó, G., Berfegfet, D., Brogliatti, G., Pierson, R. and Mapletoft, R. 1996. Sistemic Vs. local effect of exogenous estradiol on follicular development in heifers. *Theriogenology*. 45, 1: 333.
- Bó, G., Berfegfet, D. y Mapletoft, R. 1996. Manipulación de la dinámica folicular en ganado bovino: Su aplicación en programas de Transferencia de embriones. *Memorias, II Simposio internacional de reproducción animal*. Cordoba, Argentina: 53-68.
- Bó, G., Caccia, M., Tribulo, H., Adams, G., Pierson, R. and Mapletoft, R. 1995. Estrus synchronization in cattle with estradiol-17B and CIDR-B vaginal devices. *Theriogenology*. 43, 1: 340.
- Bó, G., Cutaia, L. 2005. Implementación de programas de inseminación artificial en rodeos de cría. Argentina. *Memorias del VI Simposio Internacional de Reproducción Animal*. Instituto de Reproducción Animal de Córdoba Argentina. 326-332.
- Bó, G., Moreno, D., Cuaita, L. Caccia, M. 2003. Factores que afectan los porcentajes de preñez en los programas de transferencia de embriones. *Memorias IV Seminario Internacional de reproducción en grandes animales, CGR Biotecnología Reproductiva*. Bogotá, Colombia: 102-119.
- Bó, G., Pierson, R. and Mapletoft, R. 1991. The effect of estradiol valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cows with Synchro-Mate-B implants. *Theriogenology*. 36, 1: 169-183.
- Bousfield, G., Butnev, V. 2001. Identification of twelve O-glycosylation sites in equine chorionic gonadotropin beta and equine luteinizing hormone by solid-phase Edman degradation. *Biology of Reproduction*, 64: 136-147.
- Bowen, J. and Burghardt, R. 2000. Cellular mechanisms of implantation in domestic farm animals. *Seminars in Cell & developmental biology*. 11: 93-104.
- Bridges, P., Wright, D., Buford, W., Ahmad, N., Hernandez, H., McCormick, M., Schrick, F., Dailey, R. Lewis, P., and Inskeep, E. 2000. Ability of induced corpora lutea to maintain pregnancy in beef cows. *Journal of American Science*. 78, 11: 2942-2949.
- Burges, k., Ralph, M., Jenkin, G. and Thorburn, G. 1990. Effect of oxytocin and estradiol on uterine prostaglandin release in nonpregnant and early pregnant ewes. *Biology of Reproduction*. 42: 822-833.
- Burke, J., De la Sota, L., Risco, C., Staples, C., Schmitt, E. and Thatcher, W. 1996. Evaluation of time insemination using a gonadotropin-releasing hormone agonist in lactating cows. *Journal of Dairy Science*. 79, 8: 1385-1393.
- Burns, T., El-Deiry, W. 1999. Pathway and apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*. 181, 2: 231-239.
- Callaghan, D., Boland, M. 1999. Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. *Animal Science*. (U.K.). 68: 299-314.
- Celemín, A., Cifuentes, E. 2003. Sincronización de celos y la ovulación para IATF en vacas Holstein en anestro posparto en la sabana de Bogotá. *Memorias IV Seminario Internacional de reproducción en grandes animales, CGR Biotecnología Reproductiva*. Bogotá, Colombia: 170.
- Cutaia, L., Moreno, D., Villata, M., Bó, G. 2001. Synchrony of ovulation in beef cows treated with progesterone vaginal devices and estradiol benzoate administrated at device removal or 24 hours later. *Theriogenology*. 55:408 abstr.
- Colazo, M., Bartolomé, J., Schmitdt, E., illuminati, H., Serrano, B., Moyano, B., Moralejo, R. 1996. Sincronización de los celos combinando progesteragenos, GnRH, PGF2 $\alpha$ , e inseminacion a tiempo fijo en vacas para carne. *Memorias, II Simposio internacional de reproducción animal*. Cordoba, Argentina: 254
- Crowe, M. 2008. Resumption of Ovarian Cyclicity in Post-partum Beef and Dairy Cows. *Reproduction in Domestic Animals*. 43. 5: 20–28.
- Chabbert-Buffet, N., Skinner, D., Caraty, A., Bouchard, P. 2000. Neuroendocrine effects of progesterone. *Steroids*. 65, 10-11: 613-620.
- Chagas, J., Lopez, L., Robalo, J. 2002. Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle. *Theriogenology*. 58: 51-59.
- Chebel, R., Santos, J., Reynolds, J., Cerri, R., Juchem, S. and Overton, M. 2004. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 84, 3-4: 239-255.
- De la Sota, R., Burke, J., Risco, C., Moreira, F., Thatcher, W. 1998. Evaluation of a timed insemination during summer heat stress in lactating dairy cattle. *Theriogenology* 49, 4: 761-770.



- Demmers, K., Derecka, K., Flint, A. 2001. Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction*. 121: 41-49.
- De Moraes, A. and Hansen, P. 1997. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes development of in vitro produced bovine embryos. *Biology of Reproduction*. 57: 1060-1065.
- Denker, H. 1993. Implantation: a cell biological paradox. *Journal of Experimental Zoology*. 266, 6:541-558.
- Diskin, M. and Sreenan, J. 1980. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *Journal of Reproduction and Fertility*. 59: 463.
- Duica, A., Tovío, N. y Grajales, H. 2007. Factores que afectan la eficiencia reproductiva de la hembra receptora en un programa de trasplante de embriones bovinos. *Journal Facultad de Medicina Veterinaria Universidad de la Salle*. 14: 107.
- Dunne, L., Diskin, M. and Sreenan, J. 2000. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Animal Reproduction Science*. 58, 1-2: 39-44.
- Edmondson, A., Fissore, R., Pashen, R. and Bondurant, R. 1986 The use of ultrasonography for the study of bovine reproductive tract I. Normal and pathological ovarian structures. *Animal Reproduction Science*. 12, 3: 157-165.
- Elrod, C. and Butler, W. 1993. Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *Journal of Animal Science*. 71, 3: 694-701.
- Espey, L. 1994. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biology of Reproduction*. 50: 233-238.
- Evans, A., Fortune, J. 1997. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology*. 138: 2963-2971
- Everton, L., Baruselli, P. 2003. Sincronización de receptoras cruce por cebú en condiciones tropicales. Cuarto seminario de reproducción de grandes animales (memorias) Bogotá.
- Fair, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*. 78, 3-4: 203-216.
- Fazleabas, A., Hild, S. and Verhage, G. 1994. Secretory proteins and growth factor of the Baboon uterus: potential roles in pregnancy. *Cell Biology International*. 18, 12: 1145-1153.
- Fenwick, M., Hurst, P. 2002. Immunohistochemical localization of active caspase-3 in the mouse ovary: growth and atresia of small follicles. *Reproduction*. 124: 659-665.
- Flores, F., Rosas, C., Romano, M. y Pérez, M. 2005. Apoptosis y atresia follicular: un binomio esencial en el desarrollo ovárico. *Revista Veterinaria de México*. 36, 01: 87-103.
- Fortune, J. 1993. Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: a limiting factor in improvement of fertility. *Animal Reproduction Science*. 33, 1-4: 111-125.
- Fortune, J. 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*. 78, 3-4: 135-163.
- Fortune, J., Rivera, G. and Yang, M. 2004. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science*. 82-83: 109-126.
- Fuchs, A. 1990. Oxytocin and vasopressin receptors in bovine endometrium and myometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinology*. 127: 629-636.
- Geisert, R., Morgan, G., Short, E. and Zavy, M. Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. *Reproduction Fertility and Development*. 4, 3: 301-305.
- Gertler, A. and Djiane, J. 2002. Mechanism of ruminant placental lactogen action: molecular and in vivo studies. *Molecular Genetics and Metabolism*. 75, 3: 189-201.
- Goff, A. 2004. Steroid hormone modulation of prostaglandin secretion in the ruminant endometrium during the estrous cycle. *Biology of Reproduction*. 71: 11-16.
- Gómez, C. 2005. Transferencia de embriones experiencias en Colombia. Memorias, congreso internacional de reproducción bovina (Intervet), Bogotá Colombia. 155-158.
- Gonella, A., Grajales, H., Hernández, A. 2010. Ambiente receptivo uterino: control materno, control embrionario, muerte embrionaria. *Rev. MVZ. Córdoba*. 15, 1: 1976-1984.

- Gong, J. and Campbell, B. 1995. Evolution of the requirement for FSH and LH during ovarian follicle growth and development in cattle. *Journal of Reproduction and fertility*. 15. Abstract series.
- Gonzales-Stagnaro, C. 2001. Reproducción bovina. Venezuela. Ed. Fundación Girarz.
- Gordon, I. 1999. Reproducción controlada del ganado vacuno y búfalos. Zaragoza España. Ed. Acribia.
- Gorlach, A. 1999. Transferencia de embriones en el ganado vacuno. Zaragoza España. Ed. Acribia.
- Gouveira, M., Melo, D., Carvalho, L., Fuck, E., Trinca, L., Moraes, C. 2004. Do high progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo recipients synchronized with PGF2 $\alpha$  and eCG. *Theriogenology*. 61, 7-8: 1283-1290.
- Grajales, H. 2001. Síndrome de la hembra repetidora de celo. Documento conceptual. Universidad Nacional de Colombia.
- Green, M., Hunter, M. and Mann, G. 2005. Relationships between maternal hormone secretion and embryo development on day 5 of pregnancy in dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 88, 3-4: 179-189.
- Guillomot, M. 1995. Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility*. 49: 39-51.
- Grygar, I., Kudlac, E., Dolezel, R., Nedbalkova, J. 1997. Volume of luteal tissue and concentration of serum progesterone in cows bearing homogeneous corpus luteum or corpus luteum with cavity. *Animal Reproduction Science*. 49: 77-82.
- Hacker, G. 2000. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Research*. 301: 5-17.
- Hafez, E.S.E. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición. Ed. Mc. Graw Hill.
- Hansen, T., Austin, K., Perry, D., Pru, J., Teixeira, M. and Johnson, G. 1999. Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility* 54: 329-339 .
- Hernández, A. 1995. Lecturas sobre reproducción bovina. Aspectos morfológicos de la implantación. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Hernández, A., Escobar, F. y Vásquez. 2003. Mortalidad embrionaria en bovinos. Documento. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Hernández, A. y Jiménez, C. 2000. Lecturas sobre reproducción bovina. El ciclo estral de la vaca. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Hernández, A. y Prieto, E. 2001. Lecturas sobre reproducción bovina. Pubertad en la hembra. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Hernández, A. y Jiménez, C. 2008. Reproducción en la vaca fisiología y aplicaciones. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. Primera edición.
- Hernández Cerón, J. y Zarco, L. 1998. Función del cuerpo lúteo y muerte embrionaria en rumiantes. *Ciencia Veterinaria Mexico* 8:1-28.
- Honaramooz, A. 1999. Neuroendocrinology of gonadotrophin secretion in prepubertal heifers. Thesis, Department veterinary Biomedical Sciences Saskatchewan University.
- Huertas, I. y Huertas, V. 1991. Manual práctico y moderno de inseminación artificial. Transferencia de embriones. Reproducir LTDA.
- Hunter, M., Robinson, R., Mann, G. and Webb, R. 2004. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Animal Reproduction Science*. 82-83: 461-477.
- Inskeep, E. 2004. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *Journal of Animal Science*. 82: (E. Suppl.):E24-39.
- Ireland, J., Mihm, M., Austin, E., Diskin, M., Roche, J. 2000. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: Key concepts, studies, advancements and terms. *Journal of Animal Science*. 83: 1648 – 1658.
- Jeffcoate, I. and Ayliffe, T. 1995. An ultrasonographic study of bovine cystic ovarian disease and its treatment. *The Veterinary Record*. 136, 16: 406-410.
- Jiménez, C. 2005. Enfermedades transmisibles por la técnica de transferencia de embriones. Memorias, Congreso internacional de reproducción bovina. Laboratorio Intervet, Bogotá Colombia: 35-41.
- Johnson, A. 2003. Intracellular mechanism regulating cell survival in ovarian follicles. *Animal reproduction Science*. 78: 185-201.
- Johnson, A., Bridgham, J. 2002. Caspase-mediated apoptosis in the vertebrate ovary. *Reproduction*. 124: 19-27.
- Kastelic, J., McCartney, D., Garcia, A., Olson, W. and Mapletoft, R. 1996. Estradiol and MGA for estrus synchronization in cattle. *Theriogenology*. 45, 1: 322.
- Kastelic, J., Pierson, R. and Ginther, O. 1990. Ultrasonic Morphology of a corpora lutea and central luteal cavities during the estrous cycle and early

- pregnancy in heifers. *Theriogenology*. 34, 3: 487-498.
- Kastelic, J., Bergfeld, D and Ginther, O. 1990. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology*. 33. 6: 1269-1278.
- Kawarsky, S., Basrur, P., Stubbings, R., Hensen, P. and King, W. 1996. Chromosomal abnormalities in bovine embryos and their influence on development. *Biology of Reproduction*. 54: 53-59.
- Kimmins, S. and MacLaren, L. 2001. Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta*. 22, 8-9: 742-748.
- Kinder, J., Kogima, F., Bergfeld, G., Wehrman, M. and Fike, K. 1996. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. *Journal Animal Science* 74:1424-1440.
- King, W. 1990. Chromosome abnormalities and pregnancy failure in domestic animals. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*. 34, 229:250.
- Knight, P., Glister, C. 2001. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction*. 121: 503-512.
- Kotwica, J., Bogacki, M. and Rekawiecki, R. 2002. Neural regulation of the bovine corpus luteum. *Domestic Animal Endocrinology*. 23, 1-2: 299-308.
- Lane, E., Austin, E., Roche, J., Crowe, M. 2001. The effect of Estradiol benzoate on synchrony of estrus and fertility in cattle after removal of a progesterone-releasing intravaginal device. *Theriogenology*. 55, 9: 1807-1818.
- Lee, W., Otsuka, F., Moore, R. and Shimasaki, S. 2001. Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biology of Reproduction*. 65: 944-999.
- Lequarre, A., Vigneron, C., Ribaucour, F., Holm, P., Donnay, I., Dalbies-Tran, R., Callesen, H. and Mermillod, P. 2004. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology*. 63, 3: 841-859.
- Lopez, H., Caraviello, D., Satter, L., Fricke, P and Wiltbank, M. 2005. Relationship Between Level of Milk Production and Multiple Ovulations in Lactating Dairy Cows. *Journal of animal Science*. 88: 2783-2793.
- Lucy, M. 2001. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *Journal Dairy Science*. 84, 6: 1277-1296.
- Maldonado, J. 2005. Fisiopatología reproductiva en ganado de leche. *Memorias, Congreso internacional de reproducción bovina. Laboratorio Intervet, Bogotá Colombia*: 41-49.
- Mamani, E., Ortiz, J., Quezada, M. 2007. Evaluación de diferentes dosis de eCG en tratamientos de sincronización de celos en receptoras de embriones. VII simposio de reproducción animal – IRAC. p 275.
- Mann, G., Lammung, G. 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction*. 121: 175-180.
- Melanie, J., Starbuck, A., Dailey, E., Keith, I. 2004. Factors affecting retention of early pregnancy in dairy cattle *Animal Reproduction Science*. 84: 27–39.
- Nogueira, M., Melo, D., Carvalho, L., Fuck, E., Trinca, L. and Moraes, C. 2003. Do progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo recipients synchronized with PGF2 and eCG? *Theriogenology*. 61. 7-8: 1283-1290.
- Madureira, E., Marques, M., Baruselli, P., Nasser, L., Rodrigues C. 2004. Efeito do tratamento com eCG na taxa de concepção de vacas nelore com diferentes escores de condição corporal inseminadas em tempo fixo (análise Retrospectiva). *Acta Scientiae veterinariae*. 32S: 228.
- Markström, E., Svensson, E., Shao, R., Svanberg, B. and Billig, H. 2002. Survival factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation. *Reproduction*. 123: 23-30.
- Martal, J., Chêne, N., Camous, S., Huynh, L., Lantier, F., Hermier, P., Haridon, R., Charpigny, G., Charlier, M. and Chauat, G. 1997. Recent developments and potentialities for reducing embryo mortality in ruminants: the role of IFN- $\tau$  and other cytokines in early pregnancy. *Reproduction Fertility and Development*. 9, 3: 355-380.
- Murphy, B., Martinuk, S. 1991. Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine Reviews*. 12: 27-44.
- Nasser, L., Reis, E., Oliveira, M., Bó, G., Baruselli, P. 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Animal Reproduction Science*. 82, 83: 479–486.
- Niswender, G. 2002. Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction*. 123: 333–339.
- Niswender, G., Juengel, J., McGuire, W., Belfiore, C. and Wiltbank, M. 1994. Luteal function: The estrous cycle and early pregnancy. *Biology of*

- reproduction 50: 234-247.
- Niswender, G., Juengel, J., Silva, P., Rollyson, K. and McIntosh, E. 2000. Mechanisms Controlling the Function and Life Span of the Corpus Luteum. *Physiological Reviews* 80: 1-29.
- Ohnishi, J., Ohnishi, E. and Shibuya, H. and Takahashi, T. 2005. Functions for proteinases in the ovulatory process. *Biochimica et Biophysica Acta* 1751: 95-109.
- Olivera, M., Tarazona, A., Ruiz, T. y Giraldo, C. 2007. Vías implicadas en la luteólisis bovina. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 20: 387-393.
- Padmanabhan, V. and Mc Neilly, A. 2001. Is there an FSH-releasing factor. *Reproduction*. 121: 21-30.
- Palma, G. 2001. *Biotecnología de la reproducción*. Buenos Aires, Argentina. Ed. INTA, Balcaré.
- Pate J. 1994. Cellular components involved in luteolysis. *Journal of animal Science*. 72: 1884-1890.
- Pesta, M., Muszynska, A., Kucharsky, J., Superata, J. and Kotwica, J. 1994. Beta adrenergic receptors in corpora lutea from stages of the estrous cycle in conscious and slaughtered cattle. *Biology of Reproduction*. 50: 215-221.
- Peixoto, M., Bergmann, J., Suyama, E., Carvalho, M. and Penna, V. 2007. Logistic Regression analysis of pregnancy rate following transfer of *Bos indicus* embryos into *Bos indicus* X *Bos Taurus* heifers. *Theriogenology*. 67, 2: 287-292.
- Porter, D., Harman, R., Cowan, R., Quirk, S. 2001. Relationship of Fas ligand expression and atresia during bovine follicle development. *Reproduction*. 121: 561-566.
- Pursley, J., Wiltbank, M. and Stevenson, J. 1997. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at synchronized ovulation or synchronized estrus. *Journal of Dairy Science*. 80, 2: 295-300.
- Ribadu, A., Dobson, H. and Ward, W. Ultrasound and progesterone monitoring of ovarian follicular cysts in cows treated with GnRH. 1994. *British Veterinary Journal*. 150, 5: 489-497.
- Ribadu, A. and Nakao, T. 1999. Bovine reproductive ultrasonography. *Journal of Reproduction and Development*. 45, 1: 13-28.
- Richards, J. 2005. Ovulation: New factors that prepare the oocyte for fertilization. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 234: 75-79.
- Rivera, G. Fisiología del ciclo estral de la vaca. 1992. *Revista Argentina de Producción Animal*. No. 12, 3: 287-300.
- Rizzo, A., Minoia, G., Trisolini, C., Manca, R. and Sciorsci, R. 2007. Concentrations of free radicals and beta-endorphins in repeat breeder cows. *Animal Reproduction Science* 100, 3-4: 257-263.
- Rodina, T., Cooke, F., Hansen, P. and Ealy, A. 2009. Oxygen tension and medium type actions on blastocyst development and interferon-tau secretion in cattle. *Animal Reproduction Science*. 111, 2-4: 173-188.
- Rodríguez, J. 2001. Mecanismos para el reconocimiento materno de la preñez en la vaca. En: *Reproducción Bovina*. González-Stagnaro, C. Ed. Fundación Girarz, Maracaibo Venezuela: Cap. III. 29-39.
- Roberts, R., Ealy, A., Alexenko, A., Han, C. and Ezashi, T. 1999. Trophoblast interferons. *Placenta*. 20, 4: 259-264.
- Roberts, R., Chen, Y., Ezashi, T. and Walker, A. 2008. Interferons and the maternal-conceptus dialog in mammals. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 19, 2: 170-177.
- Robinson, J., Sinclair, K. and McEvoy, T. 1999. Nutritional effects on foetal growth. *Animal Science*. 68, 2: 315-329.
- Rodgers, R., Lavranos, T., Van Wezel, I. and Irving, H. 1999. Development of the ovarian follicular epithelium. *Molecular and Cellular Endocrinology*. No. 151, 1-2: 171-179.
- Rosales, A., Guzmán, A. 2008. Apoptosis en la atresia folicular y la regresión del cuerpo lúteo. *Revista técnica pecuaria de México*. 46, 2: 159-182
- Rosenfeld, C., Wagner, J., Roberts, R. and Lubahn, D. 2001. Intraovarian actions of oestrogen. *Reproduction*. 122: 215-226.
- Sánchez, T., Wehrman, M., Bergfeld, E., Petters, K., Kojima, F., Cupp, A., Mariscal, V., Kittok, R., Rasby, R. and Kinder, J. 1993. Pregnancy rate is greater when the corpus luteum is present during the period of progestin treatment to synchronize time of estrus in cow and heifers. *Biology of Reproduction*. 49: 1102-1107.
- Sangha, G., Sharma, R. and Guraya, S. Biology of corpus luteum in small ruminants. 2002. *Small Ruminants Research*. 43,1: 53-64.
- Sartori, R., Rosa, G and Wiltbank, M. 2002. Ovarian Structures and Circulating Steroids in Heifers and Lactating Cows in Summer and Lactating and Dry Cows in Winter. *Journal of Dairy Science*. 85: 2813-2822.
- Sartori, R., Haughian, J., Shaver, R., Rosa, G., Wiltbank, M. 2004. Comparison of Ovarian Function and Circulating Steroids in Estrous Cycles of Holstein Heifers and Lactating Cows. *Journal of Dairy Science*. 87: 905-920.

- Sartori, R., Fricke, P., Ferreira, J., Ginther, O., Wilbank, M. 2001. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biology of Reproduction*; 65: 1403–1409.
- Seidel, G., Seidel, S. 1991. Training manual for embryo transfer in cattle. No. 77. Rome. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Senger, P. 2003. Pathways to pregnancy and parturition. Washington, USA. Current conception Inc.
- Schams, D and Berisha, B. 2004. Regulation of Corpus Luteum Function in Cattle. *Reproduction in Domestic Animals*. 39: 241–251.
- Shemesh, M., Dombrowski, L., Gurevich, M., Shore, L., Fuchs, A. and Fields, M. 1997. Regulation of bovine cervical secretion of prostaglandins and synthesis of cyclooxygenase by oxytocin. *Reproduction fertilization*. 9, 5: 525-530.
- Schroeder, H. 2005. Nutrición y sanidad en la biotecnología. Simposio internacional biotecnología reproductiva y redoblamiento de la ganadería colombiana. Universidad San Martín. Bogotá Colombia: 57.
- Sirois, J. and Fortune, J. 1990. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology*. 127: 916-925.
- Slot, K., Voorendt, M., de Boer-Brouwer, M., Van Vugt, H., Teerds, K. 2006. Estrous cycle dependent changes in expression and distribution of Fas, Fas ligand, Bcl-2, Bax, and pro- and active caspase-3 in the rat ovary. *Journal of Endocrinology*. 188: 179-192.
- Smith, M., McIntosh E. and Smith, G. 1994. Mechanisms Associated with corpus luteum development. *Journal of Animal Science*. 72, 7: 1857-1872.
- Spell, A., Beal, W., Corah, L., Lamb, G. 2001. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*. 56, 2: 287-297.
- Spencer, T., Burghardt, R., Johnson, G. and Bazer, F. 2004. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Animal Reproduction Science* 82–83: 537-550.
- Spencer, T., Johnson, G, Bazer, F., Burghardt, R. and Palmirani, M. 2007. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reproduction Fertility and Development*, 19: 65-78.
- Spencer, T. Ott, T. and Bazer, F. 1996. Tau interferon: pregnancy recognition signal in the ruminants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 213, 3: 215-229.
- Spey, L., Richards, J. 2006. Ovulation en: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. 1, 11: 425-459.
- Starbuck, M., Dailey, R., Inskeep, E. 2004. Factors affecting retention of early pregnancy in dairy cattle. *Animal Reproduction Science*. 82: 27-39.
- Stevenson, J., Kobayashi, Y. and Thompson, K. 1999. Reproductive performance of dairy cows in various programmed breeding systems including Ovsynch and combinations of gonadotropins releasing hormone and prostaglandin F2a. *Journal of Dairy Science*. 82: 506-515.
- Stingfellow, D., Siedel, S. 2000. Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (I.E.T.S.). Illinois U.S.A. Cap. 6, 8 y 9.
- Stocco, C., Telleria, C. and Gibori, C. 2007. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function, and Regression. *Endocrine Reviews*. 28, 1: 117-149.
- Thatcher, W., Staples, C., Danet, G., Oldick, B. and Schmitt, E. 1994. Embryo health and mortality in sheep and cattle. *Journal of Animal Science*. 72: 16-30.
- Torres, J., Pires, M., Ferreira, A., Viana, J., Camargo, L., Ramos, A., Folhadella, I., Polisseni, J., de Freitas, C., Clemente, A., de Sa Filho, M., Lopes, P., Baruselli, P. 2008. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*. 69, 2: 155-166.
- Tovio, N., Duica, A., Grajales, H. 2010. Mortalidad Embrionaria en Bovinos. *Revista Genética Bovina Colombiana*. Julio-Agosto. 19: 34-38.
- Tribulo, H. 2002. Curso de post-grado en reproducción bovina. Modulo IV. Transferencia de embriones. CGR. Biotecnología reproductiva. Cap. 1 y 2.
- Twagiramungu, H., Guilbault, L., Dufor, J. 1995. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle. *Journal Animal Science*. 73: 3141-3151.
- Vale, W., Bilezikjian, L. and River, C. 1994. Reproductive and other roles of inhibins and activins. *Physiology of Reproduction*, 1: 1861-1878.
- Vasconcelos, J., Demétrio, D., Santos, R., Chiari, J., Rodrigues, C., Sá Filho, O. 2006. Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. *Theriogenology*. 65: 192–200.
- Vasconcelos, J., Sartori, R., Oliveira, H., Guenther, J. Wiltbank, M. 2001. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*. 56, 2: 307-314.
- Vanroose, G., Kruij, A. and Van Soom, A. 2000. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. *Animal Reproduction Science*. 60-61: 131-143.
- Wathes, D. and Lamming, G. 1995. The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility*. 49: 53-

67.

Webb, R., Garnsworthy, P., Gong, J. and Armstrong, D. 2004. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *Journal Animal Science*. 82: 63-74.

Wiltbank, J., Zimmerman, D., Ingalls, J., Rowden, W. 1965. Use of progestational compounds alone or in combination with estrogen for synchronization of estrus. *Journal of Animal Science*. 24: 990-994.

**Relación entre Diámetro Folicular, Volumen del Cuerpo Lúteo y niveles de progesterona sobre el porcentaje de preñez en hembras receptoras de embriones en la Sabana de Bogotá.**

**RESUMEN**

El objetivo de este estudio fue analizar la relación entre las estructuras ováricas (diámetro Folicular, volumen del cuerpo lúteo) y los niveles sanguíneos de progesterona sobre el porcentaje de preñez en un grupo de novillas de la raza Holstein Friesian. Cuarenta novillas fueron seleccionadas en una central especializada en la utilización de este tipo de animales para transferencia de embriones; el grupo de animales fue incluido en un programa de control del ciclo estral mediante un protocolo de TETF (Gorlach, 1999; Palma, 2001; 2003; Baruselli, 2003). Durante este procedimiento se realizó un análisis de las estructuras presentes en el ovario por medio de ultrasonografía el día 5 (tomando como día cero el día de inicio del protocolo de sincronización), una segunda exploración ultrasonográfica se realizó el día 9 para determinar el diámetro del folículo preovulatorio (Bó, 2002). Adicionalmente, el día 17 se realizó un tercer análisis ultrasonográfico para determinar el volumen del cuerpo lúteo (Kastelic, 1990; Vasconcelos, 2001, Sartori, 2002). Así mismo, los días 5, 9 y 17 del protocolo de sincronización se tomaron muestras sanguíneas del grupo experimental, por medio de punción de los vasos sanguíneos coccígeos, que fueron procesadas para la determinación de los valores de progesterona, mediante técnica de radioinmunoanálisis (RIA) en fase sólida. El día 52 se realizó análisis del tracto reproductivo con el fin de diagnosticar la gestación de las

hembras. No se encontró efecto del diámetro folicular (DF) evaluado el día 9 del ciclo estral sincronizado sobre el volumen del cuerpo lúteo (VCL). El VCL, determinado el día 17, afecta positivamente los niveles plasmáticos de progesterona para ese mismo día; se establece una relación positiva entre estas dos variables, en la que por cada milímetro cúbico que aumente el volumen luteal, se aumenta en 0.00021ng/ml la secreción de progesterona plasmática, dentro del rango de valores de VCL del presente estudio.

Se relacionó positivamente el efecto de la concentración plasmática de progesterona evaluada el día 17 y el porcentaje de preñez determinado el día 52 ó 42 post ovulación; de tal manera, al aumentar los niveles de progesterona aumenta la probabilidad de preñez positiva, dentro del rango de valores encontrados en el estudio (2 – 10ng/ml).

El VCL afecta positivamente la concentración de progesterona plasmática al momento de trasplantar un embrión; estos niveles de progesterona pueden ser determinantes en la preparación del medio ambiente uterino en el que se va a desarrollar el embrión y afectar, probablemente de manera positiva, el porcentaje de preñez tras la aplicación del TE.



## INTRODUCCIÓN

La utilización de técnicas biotecnológicas aplicadas a la reproducción animal han cobrado gran importancia ya que permiten generar un mejoramiento genético acelerado (Bó, 1996; Vasconcelos, 2006), aumentando así la eficiencia productiva y un uso más eficiente y racional de los recursos (Palma, 2001).

La inseminación artificial ha sido considerada como uno de los pilares biotecnológicos aplicados a la reproducción bovina. A partir de la década de los 70's, la técnica de transferencia de embriones experimentó un desarrollo importante, al transferirse varios millones de embriones alrededor del mundo, hasta considerarse como la segunda generación de las biotecnologías reproductivas después de la inseminación artificial (Thibier, 1992).

La eficiencia tras la aplicación de estas técnicas se ve afectada por múltiples factores; por este motivo, es de suma importancia realizar un excelente proceso de selección a los animales que van a ser incluidos en estos programas. Al analizar los porcentajes de preñez reportados tras la aplicación de la técnica de TE en Colombia, que se encuentra entre el 50 y 60% (Rodríguez, 2007), uno de los aspectos a considerar es que no se está realizando eficiente selección de las hembras receptoras, las cuales van a recibir un embrión alogénico en el útero, y deben desempeñarse como "hembras vientre", permitiendo el desarrollo de éste hasta que la preñez llegue a término.

Esta ineficiencia reproductiva es de origen multifactorial, aunque de manera

general, se considera que está relacionada con algunos aspectos asociados a las condiciones de las estructuras ováricas de la hembra, lo que incide directamente en las concentraciones de progesterona plasmática (Chagas, 2005). Esta cascada de eventos se inicia al presentarse un inadecuado control del ciclo estral, pobre desarrollo folicular con un subsecuente bajo desarrollo luteal (Kastelic, 1990; Vasconcelos, 2001; Sartori, 2002), afectando la función lútea, lo que genera unas concentraciones plasmáticas de progesterona insuficientes, para ofrecer un medio ambiente uterino adecuado al momento de transferir el embrión; ello, desencadena pérdidas embrionarias, ya que se ven afectados los mecanismos de establecimiento y mantenimiento de la gestación (Chagas, 2002; Mann, 2007; Lynch, 2010). Al transferirse el embrión en las anteriores condiciones va a retardarse el proceso de síntesis y secreción de la proteína trofoblástica bovina, desencadenando la activación de los mecanismos luteolíticos que abren campo a un nuevo ciclo estral (Rodina, 2009).

El objetivo del presente trabajo fue generar información acerca de la relación entre las estructuras ováricas (diámetro folículo ovulatorio y volumen del cuerpo lúteo) y los niveles de progesterona plasmática sobre el porcentaje de preñez en un grupo de 40 novillas receptoras de embriones bovinos, de la raza Holstein Friesian, ubicadas en la Sabana de Bogotá.

### **2.1.1. Hipótesis de trabajo.**

El Diámetro Folicular, el Volumen del Cuerpo Lúteo y los niveles de progesterona, son factores relacionados al establecimiento y mantenimiento de la preñez en las

hembras receptoras de embriones bovinos.

### **2.1.2. Objetivo.**

Determinar el efecto de las características morfométricas de las estructuras ováricas y los niveles de progesterona plasmática sobre el porcentaje de preñez en un grupo de novillas receptoras de embriones bovinos de la raza Holstein Friesian en la Sabana de Bogotá.

### **2.1.3. Objetivos Específicos.**

- Determinar la relación entre el Diámetro Folicular y el Volumen del Cuerpo Lúteo.
- Relacionar el Volumen del Cuerpo Lúteo con los niveles plasmáticos de progesterona.
- Evaluar cómo afectan los niveles de progesterona circulantes el porcentaje de preñez en la hembra receptora de embriones bovinos.
- Analizar las relaciones entre Diámetro Folicular, Volumen del Cuerpo Lúteo, y niveles plasmáticos de progesterona y su efecto sobre el porcentaje de preñez en hembras a las que se les transplanta un embrión.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1. Tipo de estudio.**

Este es un estudio de tipo descriptivo, en el que se realizó un análisis de la relación existente entre las estructuras ováricas y los perfiles plasmáticos de la hormona progesterona. Estas variables fueron analizadas y relacionadas con el diagnóstico de gestación en el grupo de estudio. Así mismo, se presenta un componente descriptivo en el que se analizan las determinaciones de la hormona progesterona durante varios días del ciclo estral sincronizado, lo que permite obtener información acerca de la influencia de las características de las estructuras ováricas y los perfiles séricos de progesterona en la gestación de las novillas del grupo experimental al que se trasplantaron embriones bovinos.

### **2.2.2. Localización.**

La fase de intervención de los animales, se realizó en la Hacienda ganadera Gaviotas, adscrita a la Central de Biotecnología Reproductiva CGR, ubicada la población de Zipaquirá, Cundinamarca, en inmediaciones de la Sabana de Bogotá. Esta empresa ganadera se encuentra a una altitud de 2.637 metros sobre el nivel del mar, una temperatura anual promedio es de 14°C, precipitación anual de 825 mm y una humedad relativa del 75%.

### **2.2.3. Grupo evaluado.**

En el estudio se evaluó un grupo de 40 novillas de raza Holstein Friesian, con edades entre 18 - 26 meses de edad, pesos entre 300 a 420 Kilogramos y condición corporal entre 3 a 4 (tomando como referencia la escala de 1-5). Este grupo de hembras se sometió una serie de evaluaciones del tracto reproductivo por medio de ultrasonografía, en busca de las estructuras presentes en el ovario, como folículos y cuerpos lúteos, que permitieron evidenciar ciclicidad reproductiva. Las hembras se seleccionaron de una forma estricta, rigiéndose por las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (I.E.T.S.) (Stringfellow, 2000).

#### **2.2.3.1. Descripción del grupo evaluado.**

Se obtuvieron datos de la edad, peso y condición corporal de los animales, en los que se llevaron a cabo análisis estadísticos descriptivos (Tabla 1); estos cumplieron con los criterios de selección de las novillas receptoras de embriones ya que estas deben presentar un peso mayor al 50% del promedio del peso con respecto a los animales adultos (Bó, 2003), así como una edad mayor a los 18 meses que cronológicamente coincida con el desarrollo reproductivo de las hembras y una condición musculo-esquelética (condición corporal) acorde con un animal bien nutrido en el que se garantice el desarrollo de las funciones corporales (González, 2001). Los valores promedio correspondientes a edad, peso y condición corporal de los animales utilizados para este estudio se asemejan a los utilizados en trabajos que relacionaron el tamaño de las estructuras ováricas y los perfiles hormonales (Kastelic, 1990; Vasconcelos, 2001; España, 2004; Sartori,

2004); también asociando estas variables a la preñez (Kastelic, 1990; Perry, 2006; Siqueira, 2009). Igualmente estos valores podrían considerarse normales de acuerdo al nivel de desarrollo y características de la raza utilizada (López, 2006), es decir, novillas Holstein en sistema de producción de leche en el trópico de altura Colombiano.

**Tabla 1. Edad, peso y condición corporal de la muestra total.**

Variable	N	Mín.	Max.	Promedio <sup>1</sup>
EDAD (meses)	40	18	26	19.8 ± 2.2
PESO (Kg.)	40	300	420	384.5 ± 24.8
CONDICIÓN CORPORAL (1-5)	40	3	4	3.5 ± 0.3

<sup>1</sup>Todos los resultados se expresan como promedio (media) ± D.S. Los datos corresponde al grupo animales que ingresaron al seguimiento.

De acuerdo con la información de la tabla los coeficientes de variación para edad, peso y condición corporal son 11.11%, 6.45%, y 8.6% respectivamente. Estos valores muestran una alta homogeneidad.

#### **2.2.4. Condiciones de manejo**

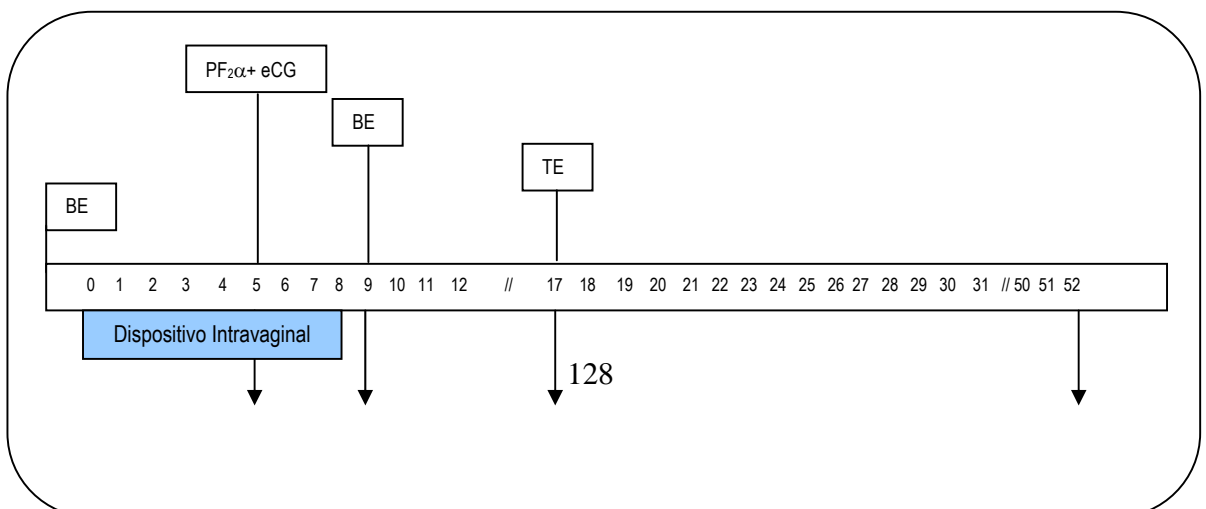
Los animales del grupo estudiado fueron manejados bajo semiestabulación, permitiéndoles pastorear en praderas sembradas con forrajes nativos (*Pennisetum clandestinum*) y mejorados Ryegrass (*Lolium Sp.*); adicionalmente, se administró al grupo experimental sal mineralizada y agua a voluntad.

#### **2.2.5. Tratamiento para el control del ciclo estral de las hembras receptoras.**

Para poder tener uniformidad y concentración de estros en el grupo experimental (técnica necesaria para poder realizar la T.E.T.F.), se realizó una fase de control del ciclo estral (sincronización de celos); este procedimiento favorece el desarrollo folicular, la generación un cuerpo lúteo y, de esta manera, se logra obtener una producción y secreción adecuada de progesterona para el establecimiento y mantenimiento de la preñez (Niswendender, 1994; Palma, 2001; Vasconcelos, 2001; Bó, 2002; Baruselli, 2003; Chagas, 2005, Lynch, 2010); se realizó una supervisión de los síntomas externos del estro generados con la finalidad de medir la eficiencia de la respuesta del protocolo (Bó, 2003). Los embriones que fueron utilizados para TE fueron colectados de animales puros de la raza Holstein Friesian, los cuales se obtuvieron, manipularon, clasificaron y preservaron según la reglamentación de la IETS.

Protocolo de sincronización utilizado en el estudio, con los respectivos productos comerciales utilizados: (se toma como el día 0 cero el día de inicio del protocolo de sincronización estro).

**Figura 6. Protocolo de sincronización, seguimiento ultrasonográfico y obtención de muestras sanguíneas aplicadas al grupo de trabajo.**





- Día 0: DIB ® (Dispositivo intravaginal Bovino P4. 1gr) + 1ml de benzoato de estradiol IM. (Estro - Zoo ® 5 mg.)
- Día 5: Prostaglandina F<sub>2α</sub> 1.5 mg. IM. (PGF<sub>2α</sub>) (Prolise® 2 ml) + Gonadotropina Coriónica equina (eCG) 400 UI. (Novormon®).
- Día 8: Retirar el DIB ® (Dispositivo intravaginal Bovino)
- Día 9: 1ml de benzoato de estradiol IM. (Estro - Zoo ® 5 mg.)
- Día 10: Observar Celos
- Día 17: TE.
- Día 52: Diagnóstico de preñez.

A las hembras del estudio se les aplico un dispositivo de liberación lenta de progesterona sumada a la aplicación de una dosis de benzoato de estradiol el día cero 0. La aplicación inicial del dispositivo junto al estradiol genera la disminución de la producción de gonadotropinas hipofisarias (Bó, 2002). De esta manera se buscó que entre los días 4 y 5 los niveles plasmáticos de estradiol disminuyeran y se desencadenara una nueva onda de crecimiento folicular (Bó, 2002; Baruselli, 2003). El día 5 se aplicó prostaglandina F<sub>2α</sub> para de esta manera iniciar la lisis de cualquier cuerpo lúteo que se encontrase en los ovarios, proveniente de ciclos

anteriores lo cual afectaría el desarrollo folicular y proceso de ovulación (Bó, 1996; Palma, 2001).

Adicionalmente, el día 5 se aplicó gonadotropina coriónica equina (eCG) buscando favorecer el desarrollo folicular durante la onda sincronizada, así como el proceso de luteinización una vez producida la ovulación (Helmer, 1986); se ha observado que al aplicar este apoyo hormonal después del inicio de una onda de crecimiento folicular en un ciclo sincronizado (día 5) se promueve desarrollo (Bó, 2003), ya que puede favorecer la síntesis de mRNA que codifica para receptores de hormonas gonadotrópicas a nivel folicular; esto permite el aumento de la densidad de este tipo de receptores a nivel de membrana en las células foliculares (Sartori, 2001), lo cual está asociado con el crecimiento folicular (Murphy, 1991; Sartori, 2001). Además este soporte hormonal favorece la preparación de las estructuras para la formación de un cuerpo lúteo que genere una concentración de progesterona suficiente para favorecer en el mecanismo de implantación y desarrollo del embrión (Niswender, 1994; Smith, 1994; Baruselli, 2005).

Lo anterior debido al incremento en la síntesis de RNA mensajero que codifica para receptores de las hormonas FSH y LH ubicados en la superficie de las células foliculares, el aumento en la densidad de receptores de las hormonas gonadotrópicas en la superficie de las células de granulosa está relacionado con el fenómeno de dominancia folicular, preparación para la ovulación y especialización celular para el desarrollo del cuerpo lúteo (Sartori, 2001).

Al retirar el dispositivo intravaginal el día 8, los niveles de progesterona decrecen debido a que se inicia la disminución del bloqueo ó retroalimentación negativa (feedback) que por esta hormona se encuentra influenciado el hipotálamo; debido a la presencia de un folículo dominante que se encuentra en la fase final de crecimiento, se presenta un incremento de la producción y liberación de estrógenos, lo cual favorece la síntesis y secreción de las hormonas gonadotrópicas entre estas la LH la cual, al unirse con sus receptores, va a estimular las células favoreciendo el mecanismo de ovulación y especialización celular para la formación del cuerpo lúteo (Bó, 1995).

El día 9 se realizó una segunda aplicación de benzoato de estradiol con la finalidad de favorecer una ovulación más sincrónica, ya que al aplicarlo se espera favorecer la producción y liberación de hormona luteinizante; esta descarga de LH es conocida como pico preovulatorio, mediante el cual se busca sincronizar el mecanismo de ovulación (Bó, 2003). Durante el día 9 en horas de la tarde y el día 10, en la mañana y en la tarde, se realiza la observación del grupo de animales con la finalidad de analizar el comportamiento de estos ante la aplicación del tratamiento de sincronización, buscando evidenciar el reflejo de monta entre el grupo de novillas, el cual es claramente influenciado por acción estrogénica (Palma, 2001; Bó 2002).

El día 17 se procedió a transferir el embrión a la hembra receptora. Ya que el embrión fue colectado el día siete de la hembra donante, es importante que coincida la edad del embrión con el día post-estro de la receptora para así obtener

óptimos resultados, ya que este es uno de los puntos críticos que afectan la eficiencia de esta técnica biotecnológica (Bó, 2003); estos embriones fueron obtenidos, criopreservados y descongelados según protocolos avalados por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (Stringfellow, 2000).

**2.2.6. Aval del comité de ética para la experimentación animal.** El trabajo se realizó bajo el aval del Comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia – UNAL Bogotá; igualmente, bajo los parámetros de manejo animal de la empresa ganadera Gaviotas, adscrita a la central de reproducción animal C.G.R.

**2.2.7. Muestreos sanguíneos y análisis ultrasonográficos.**

Al grupo de hembras se le colectó muestras sanguíneas y se realizaron chequeos ultrasonográficos los días 5, 9 y 17, con respecto al inicio del protocolo de sincronización. El diagnóstico de preñez se realizó el día 52 por medio de ultrasonografía del tracto reproductivo. Cada uno de los animales fueron muestreados en tres oportunidades. El análisis ultrasonográfico del tracto reproductivo se realizó con la finalidad de cuantificar el desarrollo folicular preovulatorio, así como de las medidas del cuerpo lúteo (Bó, 1996), mediante un equipo de ultrasonografía marca Esaote-Pie medical modelo Aquila-vet, con transductor endorectal lineal de 8.0 Mhz. Así mismo, se colectaron muestras sanguíneas, por medio de punción de los vasos sanguíneos coccígeos, en tubos de vacío sin anticoagulante con capacidad para 6 ml. (Vacuette®, Greiner Bio-one,

Monroe, NC 28110, USA). Una vez obtenidas las muestras sanguíneas se sometieron a centrifugación (2500 rpm durante 10 minutos) y congelación (-20°C) (Saumande, 1985), para conducir las al Laboratorio de Hormonas de la Universidad Nacional de Colombia, en donde se determinaron los perfiles de progesterona (P<sub>4</sub>). El análisis de las muestras se realizó en el Laboratorio de Hormonas del Departamento de Producción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá, en el cual se cuantificaron y calcularon las concentraciones plasmáticas de progesterona (P<sub>4</sub>) mediante técnica de Radioinmunoanálisis (RIA), utilizando un equipo de marca Beckman® Gamma 500.

#### **2.2.8. Medición de variables.**

Como variables de respuesta se establecieron el **Diámetro Folículo (DF)** el día 9 (tomando como día cero el inicio del protocolo de sincronización); **Volumen del Cuerpo Lúteo (VCL)** el día 17; **concentraciones plasmáticas de progesterona** el día 17 y **porcentaje de preñez** en las hembras trasplantadas (%), establecido por ultrasonografía el día 52.

El diámetro folículo (DF) fue determinado en milímetros por medio de ultrasonografía ovárica.

Para realizar la evaluación del VCL se aplicaron las siguientes fórmulas:

$$\text{Radio} = (\text{Largo}/2 + \text{Ancho}/2) / 2$$

Volumen Cuerpo Lúteo =  $\frac{4}{3} \times \pi \times R^3$  (Grygar, 1997; Vasconcelos, 2001; López, 2005).

$\pi$ = Valor constante equivalente a 3,1416

$R^3$ = El valor del radio elevado al cubo.

La unidad empleada para cuantificar la concentración de progesterona en suero sanguíneo fue nanogramos por mililitro (ng/ml), determinadas por medio de la metodología RIA.

Antes de iniciar la aplicación de tratamientos para el control del ciclo estral, se realizó una clasificación del grupo experimental, teniendo en cuenta el peso, edad, status sanitario, manejo; así, se determinaron los animales que ingresaron al programa de TE como receptoras. A continuación de esta clasificación se realizó la aplicación del tratamiento de control del ciclo estral con la finalidad de favorecer el proceso de TE, además de garantizar que los animales se encuentren en el mismo estado post-estro (fase del ciclo estral influenciada por la acción de la hormona progesterona) al momento de la TE y así evitar las variaciones en el momento del ciclo que puedan presentarse en las hembras receptoras (Gordon, 1999; Gorch, 1999; Palma, 2001).

### 2.2.9. Análisis estadístico de los datos.

Para las variables de interés en el estudio se llevaron a cabo análisis estadísticos descriptivos que constaron de medidas de tendencia central, dispersión y distribuciones de frecuencia, mediante los procedimientos MEANS y FREQ de SAS. Adicionalmente se analizó, por medio de análisis de regresión, el efecto del DF sobre el VCL; este análisis se realizó mediante el procedimiento REG de SAS, en el que se incluyeron efectos lineal y cuadrático del DF. El modelo empleado fue el siguiente:

$$VCL = \beta_0 + \beta_1 DFD + \beta_2 DFD^2 + \epsilon$$

En donde  $VCL$  es el volumen del cuerpo lúteo;  $\beta_0$ ,  $\beta_1$  y  $\beta_2$  son los estimadores de mínimos cuadrados ordinarios del intercepto, efecto lineal y cuadrático del diámetro del folículo dominante  $DFD$  respectivamente y  $\epsilon$  es el error aleatorio.

Mientras que

$VCL \sim N(\beta_0 + \beta_1 DFD + \beta_2 DFD^2, \sigma_\epsilon^2)$ ,  $\epsilon \sim N(0, \sigma_\epsilon^2)$ ,  $\sigma_\epsilon^2$  corresponde a la varianza del error.

Adicionalmente, se realizó un análisis de regresión mediante el procedimiento REG de SAS, en el que se incluyeron efectos lineales y cuadráticos de cada una de las variables independientes, empleando la metodología FORWARD para encontrar aquellas que tienen efecto significativo y por tanto deben incluirse en el modelo, el cual se incluye a continuación.

$$CP417 = \beta_0 + \beta_1 DFD + \beta_2 DFD^2 + \beta_3 VCL + \beta_4 VCL^2 + \epsilon$$

En donde  $\beta_0$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  y  $\beta_4$  son los estimadores de mínimos cuadrados ordinarios del intercepto y de los efectos lineales y cuadráticos del diámetro del folículo dominante  $DFD$  y volumen del cuerpo lúteo  $VCL$ .

Los supuestos de distribución son:

$$P4 \sim N(\beta_0 + \beta_1 DFD + \beta_2 DFD^2 + \beta_3 VCL + \beta_4 VCL^2 + \epsilon, \sigma_\epsilon^2), \epsilon \sim N(0, \sigma_\epsilon^2), \sigma_\epsilon^2$$

Debido a que el diagnóstico de preñez no es una variable continua sino dicotómica se realizó una regresión logística mediante el procedimiento LOGISTIC de SAS, en donde se modeló el diagnóstico de preñez al día 52 (1 positivo, 0 negativo) en función del diámetro del folículo dominante  $DFD$ , volumen del cuerpo lúteo  $VCL$  y concentración sérica de progesterona el día 17  $CP417$ .

$$P(DP = 1) = f(DFD, VCL, CP417)$$

De esta forma se modeló la probabilidad de que el diagnóstico de preñez sea positivo  $P(DP = 1)$ , en función ( $f$ ) del  $DFD$  para el día 9 ( $DFD$ ), Volumen del cuerpo lúteo ( $VCL$ ) y concentración plasmática de progesterona al día 17 ( $CP417$ ) (Spell, 2001; Sartori, 2002). Para seleccionar las variables que se deben tener en cuenta en el modelo se empleó la metodología Forward.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **2.3.1. Variables respuesta durante el primer muestreo (día 5 con respecto al inicio del protocolo de sincronización).**

#### **2.3.1.1. Diámetro folicular.**

Al observar las estadísticas descriptivas de los datos correspondientes al número de folículos encontrados durante el primer muestreo (Tabla 2), puede pensarse que se presentó una nueva onda de desarrollo folicular del ciclo sincronizado, debido al número y tamaño de los mismos (Adams, 1992; Gordon, 1999; Gonzáles, 2001; Palma, 2001). Mediante la aplicación del protocolo de sincronización, se generaron niveles sanguíneos de las hormonas requeridas para lograr la inducción de una retroalimentación (feed-back) negativa, que afectó la síntesis y secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas y alteró el normal desarrollo de los folículos; lo que permite pensar que se indujo la regresión de los folículos en crecimiento (FSH-dependientes) y no se permitió el fenómeno de la ovulación en los folículos dominantes (LH-dependientes) (Adams, 1992; Taniguchi, 2007).

Entre el día 3 y 4 (tomando como 0 el día de inicio del protocolo de sincronización) disminuyó el bloqueo presente en el hipotálamo y se incrementó la síntesis de mRNA, que codifica para la GnRH; al sintetizarse y liberarse la GnRH, es conducida por el sistema portal hipofisiario hacia la glándula hipófisis, en donde esta hormona se acopla con los receptores de membrana de los gonadotropos de

la adenohipofisis (Palma, 2001; Senger, 2003), lo que estimula la síntesis y secreción de las gonadotropinas FSH y LH (Padmanabhan, 2001; Adam, 2005). Una vez producida la liberación de las hormonas, estas son conducidas por vía sanguínea hacia las estructuras del tracto reproductivo, y así, la FSH, favorece el establecimiento de una nueva onda de desarrollo folicular, entre los días 4 y 5 aproximadamente (Bó, 1995; Bó, 2002; Tribulo, 2002).

En relación con los resultados obtenidos en este estudio, para el día del primer muestreo (día 5), en cuanto al número y tamaño de los folículos, se espera que se esté presentando el fenómeno de reclutamiento, bajo la influencia de la FSH (González, 2001). Al ser contrastados los resultados (Tabla 2), coinciden con lo reportado por la literatura en cuanto al número de folículos (González, 2001; Gordon, 1999; Palma, 2001) y con lo reportado en estudios adelantados por Adams (1992), que en un grupo de novillas Holstein, para el día 5 encontró, en promedio 7 folículos en etapa de desarrollo. En cuanto al diámetro de los folículos que se encontraron durante esta etapa, el DF es menor al encontrado por Adams (1992), que en promedio encontró DF de  $12 \pm 1.2$  mm. De la misma forma, se encontraron diámetros inferiores a los reportados por Satrori (2004), quien para animales de raza Holstein en vacas sincronizadas con un protocolo similar (Progesterona, estradiol, prostaglandina F $2\alpha$ , estradiol), reportó valores promedio de 13.3 mm y para novillas valor promedio de 8.5 mm de DF. Igualmente, se reportaron DF mayores en trabajos realizados por Sakase (2006), quien para el día 5 desde el inicio del protocolo de sincronización encontró DF promedio de 7.5 mm, en vacas tipo carne.

Los datos de DF encontrados en este estudio fueron numéricamente menores al

compararlos con los encontrados por los autores citados, esta tendencia puede deberse a la dieta que recibieron los animales, pues este factor incide sobre la dinámica folicular en las novillas receptoras, ya que el grupo experimental en este trabajo se encuentra en pastoreo sin suplemento adicional. Una fuerte interacción existe entre los factores nutricionales y la respuesta reproductiva. Al existir un desbalance dietario se genera un efecto inicial en el hipotálamo y en la adenohipofisis, que afecta la síntesis y secreción de las hormonas gonadotrópicas; de esta manera, al existir un déficit en el nivel circulante de hormona folículo estimulante se puede ver afectado el desarrollo del grupo de folículos en crecimiento (Rekwolt, 2004; Roche, 2006). Lo anterior permite pensar aunque los animales del estudio presentaron un peso homogéneo y una condición corporal acorde con la requerida para ser incluidos en un programa de TE (Tabla 1), pueden presentarse carencias de algún elemento nutricional necesario.

**Tabla 2. Número y tamaño de las estructuras ováricas durante el primer muestreo (día 5).**

<b>Variable</b>	<b>N</b>	<b>Mín.</b>	<b>Max.</b>	<b>Promedio<sup>1</sup></b>
Número de folículos	40	2	8	5 ± 1.5
Número de cuerpos lúteos	40	0	1	1 ± 0.4
Diámetro folicular (mm)	40	3	5.2	4.3 ± 0.1
Volumen luteal (mm <sup>3</sup> )	40	0	9190.6	1173.8 ± 420.2
Concentración plasmática de progesterona (ng/ml.)	40	0.9	13.4	4.7 ± 0.5

<sup>1</sup>Los resultados diámetro folicular, volumen luteal y concentración plasmática de Progesterona se expresan como promedio (media) ± S.E.M. mientras que los otros valores (números) se expresan como promedio ± D.S.

### **2.3.1.2. Volumen de cuerpo lúteo y niveles de progesterona.**

En los valores correspondientes al VCL y niveles de progesterona presentes en suero sanguíneo durante el muestreo realizado el día 5; al observar los datos (Tabla 2), se encuentran rangos de valores, entre mínimos y máximos para éstas variables, que pueden ser asociados a dispersión en los datos causada por la irregularidad en las fases del ciclo estral en la que se encontraban las novillas del grupo de estudio; posiblemente como consecuencia de la no pre-sincronización de este grupo (Bó, 2003; 2005). Lo anterior indica que dentro del grupo de animales pueden encontrarse algunos con cuerpos lúteos presentes al inicio del tratamiento para el control del ciclo estral, así como otros pueden no presentar estas estructuras luteales en los ovarios. Por este motivo, para el día 5 del protocolo de sincronización, se encontró solamente el 20% (8/40) de los animales con un cuerpo lúteo detectable por medio de exploración ultrasonográfica realizada este día (Tabla 2), este porcentaje es menor al reportado en la literatura, en donde se encuentra que aproximadamente el 50% de un grupo de hembras aptas para la reproducción podrían presentar estructuras luteales a nivel ovárico, al realizar una exploración reproductiva (Palma, 2001; Gordon, 1999). De la misma forma, al existir algunos animales que no presentan cuerpo lúteo es de esperarse que algún porcentaje de los animales presenten niveles basales de progesterona (por debajo de 0.3-0.5ng/ml) (Chagas, 2002; Gonzáles, 2001); al analizar los resultados del presente estudio, se constata que para el día 5, se presentan concentraciones plasmáticas de progesterona (Tabla 2), lo cual puede ser atribuible a la presencia

del dispositivo de liberación lenta, que favorece el incremento de la hormona durante este periodo del protocolo para el control del ciclo estral (Baruselli, 2003; Bó, 2003).

### **2.3.2. Variables de respuesta durante el segundo muestreo (día 9 con respecto al inicio del protocolo de sincronización).**

Las variables de respuesta obtenidas durante el segundo muestreo (correspondiente al día 9 tomando como día cero el inicio del protocolo de sincronización) junto con algunas estadísticas descriptivas asociadas se presentan en la tabla 3.

#### **2.3.2.1. Diámetro folicular.**

Durante el segundo muestreo se presentó comportamiento reproductivo homogéneo, ya que según DF se presume que existe un folículo completamente desarrollado en etapa preovulatoria. Lo anterior se contrasta de manera esperada con los niveles séricos de progesterona que son acordes con lo esperado en esta etapa del ciclo estral sincronizado debido a la etapa de dominancia folicular (Tabla 3).

En el presente estudio, el total de las hembras presentó un folículo preovulatorio desarrollado (Tabla 3), que posiblemente se encontraba en fase de dominancia folicular y podía presentar una alta capacidad esteroideogénica, con un diámetro folicular cercano a 10mm (Sartori, 2004; Senger, 2003), esta observación coincide

con lo reportado por Lynch (2010), quien en un grupo de novillas (*Bos taurus*), con características cárnicas, al aplicar terapia para el control del ciclo estral, observo que la totalidad de los animales presento desarrollo folicular; estos hallazgos son similares a lo observado por Sartori (2002) y Perry (2005), los cuales observaron desarrollo folicular en diferentes grupos de vacas y novillas, a las que sincronizo el estro por medio de terapia hormonal, en animales raza Holstein y cruzados con características cárnicas, respectivamente.

Durante el desarrollo folicular, en el ciclo sincronizado, participa de manera activa la gonadotropina coriónica equina (Bó, 2003), la cual fue aplicada durante el día 5 del protocolo para el control del ciclo estral, buscando favorecer la síntesis de mRNA que codifica para receptores de hormonas gonadotrópicas a nivel folicular; esto permite el aumento de la densidad de este tipo de receptores a nivel de membrana en las células foliculares (Sartori, 2001), lo cual está asociado con el crecimiento folicular (Murphy, 1991; Sartori, 2001).

En estudios realizados al respecto se han encontrado diferentes resultados; entre los cuales Baruselli (2001) reporta diferencias estadísticas para el número promedio folículos y el DF aplicando eCG como apoyo hormonal durante el protocolo de control de ciclo estral en hembras receptoras de embriones. De manera contraria autores como Mamani, (2001); Machado (2006); Siqueira (2009) no observaron esta tendencia al aplicar dicha hormona.

Los resultados obtenidos durante esta fase del experimento, en cuanto al DF

durante el día 9 del ciclo sincronizado, coinciden con los hallazgos reportados por Machado (2006), quien al comparar tres protocolos para el control del ciclo estral reportó diámetros foliculares para el día 9 de  $9.6\pm 1.7\text{mm}$  (protocolo 1),  $9.5\pm 0.6\text{mm}$  (protocolo 2) y  $9.8\pm 0.6\text{mm}$  (protocolo 3) en hembras cruzadas (*Bos taurus* x *Bos indicus*). De la misma forma, Perry (2007) al sincronizar un grupo de animales para aplicar inseminación artificial a tiempo fijo, buscando relacionar la fertilidad y muerte embrionaria con los tamaños de folículos preovulatorios y los niveles circulantes de estradiol, reporta valores para folículos preovulatorios de  $12.2\pm 0.2\text{mm}$  en novillas cruzadas (*Bos taurus* x *Bos indicus*). Sartori (2002), reportó para el día 9 de seguimiento, en un grupo de animales de la raza Holstein, DF preovulatorios promedio de  $13.3\pm 0.2\text{mm}$ , en un estudio en que se relacionan las estructuras ováricas y los niveles hormonales circulantes en novillas, vacas lactantes y vacas secas, sincronizadas durante temporadas de invierno y verano. De igual forma, en un trabajo que analiza el DF y su relación con la preñez realizado por Perry (2005), reporta DF preovulatorio promedio de  $14.8\pm 0.3\text{mm}$  en grupos de animales a los que se les aplicó terapias de apoyo hormonal. En otro estudio, Sartori (2004), al comparar la función ovárica y los niveles sanguíneos hormonales de vacas vs. novillas raza Holstein, reporta para vacas un DF de  $16.8\pm 0.5\text{mm}$  y para novillas  $14.9\pm 0.2\text{mm}$  de DF durante en un ciclo estral no inducido. Así mismo, Vasconcelos (2001), en dos grupos de vacas lactantes de la raza Holstein, a las que aplicó tratamientos hormonales para control del ciclo estral, reporta un DF así: grupo 1.  $13.0\pm 0.3\text{mm}$  y grupo 2.  $15.8\pm 0.2\text{mm}$ . Martínez (2000), al comparar 4 protocolos de control del ciclo estral en novillas cruzadas

con características cárnicas, reporta DF de  $12.7 \pm 0.4$  mm. Un hallazgo similar reportó Taniguchi (2007), en vacas cruzadas (*Bos taurus*), las cuales recibieron terapia hormonal para control del ciclo estral; en estos animales, se reportaron valores promedio de DF en etapa preovulatoria de  $12.2 \pm 0.6$  mm.

Los datos reportados por los anteriores autores, al ser comparados con los valores obtenidos durante este estudio, para el día 9, presentaron valores numéricos menores en cuanto a los promedios de los valores, ya que los rangos correspondientes al diámetro folicular inician desde los 7 mm (Tabla 3), lo cual está por debajo de los valores propuestos para folículos preovulatorios ( $\geq 10$  mm) (Sartori, 2004; Senger, 2003). Al analizar el porcentaje de animales que presentaron folículos preovulatorios el día 9, con DF menores a 10 mm, correspondiente al 35% (14/40), debe tenerse en cuenta que estas mediciones se realizaron por medio de exploración ultrasonográfica de los folículos en la mañana del día 9 del ciclo estral sincronizado; una vez realizado el examen, cada animal recibió una dosis de 1 ml de benzoato de estradiol IM. (5 mg.) con la finalidad de estimular la síntesis y descarga de hormonas gonadotrópicas al torrente sanguíneo; este incremento transitorio (pico) de gonadotropinas (FSH y LH) prepara al ovario y al folículo, favoreciendo el desarrollo final folicular así como la ovulación (Spey, 2006; Baruselli, 2005). Después de esta aplicación de estradiol se inicio la observación del grupo de animales durante la tarde del día 9 y mañana - tarde del día 10 para observar el comportamiento de monta de los animales y así confirmar el celo manifiesto de estos. Como el análisis ultrasonográfico de los



folículos se realizó en la mañana del día 9, antes de la aplicación del benzoato de estradiol, posiblemente no se había completado la etapa de desarrollo final del folículo preovulatorio, en la que por la acción de las hormonas gonadotrópicas, este incrementa su diámetro final, motivo por el cual puede pensarse que los rangos inferiores de los DF encontrados en este estudio, para el día 9, se encuentren por debajo de los valores de referencia al compararlos con otras investigaciones (Sartori, 2002; 2004; Perry, 2005; 2007; Vasconcelos, 2001). Lo anterior, sumado a que los animales utilizados en el estudio fueron novillas, conduce a pensar que las estructuras que se pueden encontrar en el ovario presentan DF menores si se comparan con animales adultos o con animales multiparos, como es el caso de los utilizados en algunos estudios anteriormente citados.

**Tabla 3. Número y tamaño de las estructuras ováricas durante el segundo muestreo (día 9).**

Variable	n	Mín.	Max.	Promedio <sup>1</sup>
Número de folículos	40	1	1	1
Diámetro folículo dominante (mm)	40	7	19	11.6 ± 0.5
Concentración plasmática de progesterona (ng/ml.)	40	0.02	0.8	0.28 ± 0.04

<sup>1</sup>Los resultados diámetro folículo dominante y concentración plasmática de Progesterona se expresan como promedio (media) ± S.E.M.

### **2.3.2.2. Volumen del cuerpo lúteo y niveles de progesterona.**

En la tabla 3 no se reportan valores en relación al VCL el día nueve de muestreo, ya que al aplicar durante el quinto día del tratamiento prostaglandina F2 $\alpha$  por vía intramuscular, para el control del ciclo estral, se busca desencadenar la cascada

de eventos que terminan con la regresión funcional (rápida disminución de la síntesis y liberación de progesterona) y estructural del cuerpo lúteo (apoptosis del CL) (Ohtani, 1998; Barnea, 2000). Por este motivo, al realizar la exploración ultrasonográfica ovárica, correspondiente a este día del experimento, no se encontraron estructuras compatibles con cuerpos lúteos. Lo anterior, es corroborado al observar las concentraciones de progesterona plasmática de los animales en seguimiento (Tabla 3), ya que al no encontrarse estructuras luteales en los ovarios es de esperarse que los niveles sanguíneos de progesterona se encuentren muy cercanos a niveles basales:  $\leq 0.3\text{ng/ml}$  (Ohtani, 1998), entre los días 9 y 10 del ciclo sincronizado.

Los hallazgos durante etapa del estudio (día 9), en cuanto a concentraciones de progesterona en sangre, coinciden con los reportados por Kastelic (1990), quien en un grupo de novillas de la raza Holstein relacionó las medidas del cuerpo lúteo, obtenidas por medio de ultrasonografía, con las concentraciones plasmáticas de progesterona, obteniendo como resultado para el día 9, una máxima caída en los niveles de progesterona:  $\leq 0.3\text{ng/ml}$ . Así mismo, Chagas (2002), en un grupo de novillas receptoras de embriones de la raza Holstein, a las que aplicó tratamiento para el control del ciclo estral, reportó durante el día de máximo descenso en los niveles de progesterona (día 9), valores en el grupo de hembras gestantes de  $0.22\pm 0.01\text{ng/ml}$  y en el grupo de hembras no gestantes  $0.21\pm 0.02\text{ng/ml}$ . Perry en 2005, en un grupo de vacas cruzadas con características cárnicas, a las que aplicó terapia hormonal para sincronizar el ciclo estral (GnRH,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , GnRH),

reportó valores de concentración de progesterona de 0.2ng/ml, tanto para el grupo de hembras gestante como para el grupo de no gestantes. De la misma forma, Sakase (2006), en un trabajo en el que comparó 3 protocolos para el control del ciclo estral, reportó como valores mínimos de progesterona plasmática, en el primer y tercer tratamiento, de 0.09ng/ml y en el segundo de 0.08ng/ml, durante el noveno día del ciclo estral sincronizado. Igualmente, se reportó el descenso de los niveles plasmáticos de progesterona, en el trabajo realizado por Ohtani (1998), en el que en un grupo de vacas Holstein, a las que se sincronizo el estro, se reportaron valores de 0.3ng/ml, para los días de máximo desarrollo folicular (9 y 10) del seguimiento.

Los anteriores hallazgos, obtenidos por diferentes autores en grupos de animales a los que aplicaron terapias hormonales para el control del ciclo estral, son acordes con los datos arrojados por el presente estudio, ya que se presentaron tendencias numéricas que permiten observar que el día en que se presento máximo DF, los niveles de progesterona plasmática caen a niveles basales (Kastelic, 1990; Ohtani, 1998; Chagas, 2002; Perry, 2005; Sakase, 2006). Esto está asociado a la aplicación de prostaglandina F<sub>2</sub>α (el día 5 del ciclo sincronizado), la cual favorece la dramática disminución de la irrigación sanguínea que va al ovario, desencadenando la cascada de mecanismos luteolíticos; de esta manera, para el día 9 se espera que se encuentre un cuerpo cicatrizal (albicans) en el lugar en que se desarrollo el cuerpo lúteo, acompañado de niveles basales de progesterona en la circulación sanguínea (Niswender, 2000; Schams, 2004);

mientras que en esta misma etapa se encuentra en el ovario un folículo completamente desarrollado, que presenta una alta actividad esteroideogénica en la etapa previa a la ovulación.

### **2.3.3. Variables de respuesta durante el tercer muestreo (día 17 con respecto al inicio del protocolo de sincronización).**

Las variables respuesta obtenidas durante la tercera fase de muestreo (correspondiente al día 17, tomando como día cero el inicio del protocolo de sincronización y 10 el día de ovulación) se presentan junto con algunas estadísticas descriptivas asociadas en la tabla 4.

#### **2.3.3.1. Diámetro folicular.**

Durante el tercer muestreo correspondiente al día 17, es importante tener en cuenta que entre los días 9 - 10 se produjo la ovulación de la onda de desarrollo folicular sincronizada; por este motivo, es de esperarse que se inicie una nueva onda de desarrollo folicular entre los días 4 - 5 posterior a la ovulación (14 y 15 tomando como día cero el inicio del protocolo de sincronización y día 10 ovulación) (Martinez, 2000); esto se corrobora con el número de folículos y DF hallados durante el muestreo 3 (día 17) (Tabla 4), que indican que hay folículos en etapa de reclutamiento (Ireland, 2000).

Adams (1992), observó en un grupo de novillas Holstein, a las que administró terapia hormonal en diferentes dosis para controlar el ciclo estral, que durante la

segunda onda de desarrollo folicular se presentó en promedio el desarrollo de 6 folículos y los folículos presentaban DF promedio de  $5.0 \pm 0.9$  mm. Así mismo, Taniguchi (2007), en un grupo de vacas (entre 5 y 10 años), tratadas hormonalmente para controlar el ciclo estral, buscando establecer diferencias entre el día de inicio de la aplicación de protocolos hormonales en el desarrollo folicular, reporta DF para el día 17 de  $9.6 \pm 0.2$  mm para un tratamiento y de  $9.2 \pm 3.8$  mm para el segundo. Al comparar los datos reportados en los anteriores estudios con los valores obtenidos para número de folículos y DF durante el tercer muestreo (día 17), se encontraron valores menores a los reportados por Adams (1992).

En cuanto a los DF, los valores encontrados en los anteriores trabajos coinciden con los rangos mínimos y máximos hallados en el muestreo del día 17 (Tabla 4), pero son superiores a los valores promedios; esto puede deberse a que en el segundo experimento Taniguchi (2007) incluyó en el grupo experimental vacas adultas, las cuales presentan mayor tamaño en las estructuras ováricas (Sartori, 2004). Por este motivo, los valores para DF reportados por Adams (1992), para el día 17 (grupo de novillas) son más cercanos a los hallados en este estudio, ya que en los dos estudios se utilizaron novillas. Lo anterior, sumado al análisis de la comparación de resultados del primer muestreo, haciendo referencia al DF (Tabla 2), en donde se comentó que la disminución del número y DF en desarrollo, puede deberse al efecto de la dieta sobre la dinámica folicular en las novillas, ya que al no adicionarse a la dieta fuentes nutricionales a manera de suplemento, puede

jugar un papel importante en el desarrollo de las estructuras ováricas en este grupo de hembras (Rekwolt, 2004). Por esto es importante resaltar que este grupo de animales no solo el día 5, sino también el 17, presentaron valores por debajo de los encontrados por diversos autores en cuanto al desarrollo folicular; además de esto, solamente el 40% (16/40) del grupo de animales presentó folículos en desarrollo en la segunda onda de desarrollo folicular (Tabla 5).

**Tabla 4. Número y tamaño de las estructuras ováricas durante el tercer muestreo (día 17).**

Variable	N	Mín.	Max.	Promedio <sup>1</sup>
Número de folículos	40	0	4	1 ± 1.1
Número de cuerpos lúteos	40	1	1	1
Diámetro folicular (mm)	40	0	10.1	2.6 ± 0.5
Volumen luteal (mm <sup>3</sup> )	40	614.8	16443.6	5402.7 ± 531.4
Concentración plasmática de progesterona (ng/ml.)	40	2.0	10.1	5.18 ± 0.3

<sup>1</sup>Los resultados diámetro folicular, volumen luteal y concentración plasmática de Progesterona se expresan como promedio (media) ± S.E.M. mientras que los otros valores (número de folículos y de cuerpos lúteos) se expresan como promedio ± D.S.

### **2.3.3.2. Volumen del cuerpo lúteo y niveles de progesterona.**

Al analizar los datos obtenidos en el tercer muestreo, se observa que el 100% (40/40) de los animales del grupo experimental durante la etapa del diestro desarrolló un cuerpo lúteo consolidado y funcional que genera niveles de progesterona (Tabla 4), para de esta forma provocar cambios en el medio ambiente uterino, favoreciendo el desarrollo embrionario, así como la síntesis y secreción de un grupo de proteínas uterinas específicas que intervienen en este mecanismo (Hernández, 1995). Una vez determinados los datos correspondientes

a las medidas de las estructuras ováricas y obtenidas las muestras sanguíneas, en cada una de las novillas del grupo estudiado, se dispuso un embrión en el útero, el día séptimo post-ovulación (17 desde el inicio de ciclo estral sincronizado). Este embrión fue manipulado siguiendo cada uno de los protocolos consignados en el manual de la IETS (Stingfellow, 2000).

Los datos obtenidos para el presente estudio, correspondientes al día 17, son analizados en dos componentes. Primero, se analizarán los valores reportados por otros autores referente al VCL y a continuación se hace referencia a los valores que representan las concentraciones plasmáticas de progesterona (CPP4) para éste día.

Machado (2006), reporta valores de VCL para el día 7 post-ovulación (17 desde el inicio del ciclo sincronizado), comparando tres protocolos de tratamiento para el control del ciclo estral (Tto 1, 2 y 3), obteniendo para el Tto. 1: VCL:  $7117.2 \pm 25.5 \text{mm}^3$  y CPP4:  $6.20 \pm 1.6 \text{ng/ml}$ , para el Tto. 2: VCL:  $5437 \pm 40.5 \text{mm}^3$  y CPP4:  $4.49 \pm 0.5$  y para el Tto. 3: VCL:  $6927 \pm 05.8 \text{mm}^3$  y CPP4:  $6.13 \text{ng/ml}$ , en hembras cruzadas (*Bos taurus X Bos indicus*). Otro punto de referencia es Sartori (2004), quien en dos grupos compuestos por vacas y novillas de la raza Holstein, reporta para el día 17 (7 post-estro) volúmenes luteales de  $5300 \pm 30.8 \text{mm}^3$ ; CPP4:  $7.3 \pm 0.4 \text{ng/ml}$  para novillas y VCL:  $8450 \pm 67.8 \text{mm}^3$ ; CPP4:  $5.8 \pm 0.5 \text{ng/ml}$  para vacas. Así mismo, Siqueira (2009), en un grupo de hembras cruzadas (*Bos taurus X Bos indicus*), bajo el control del ciclo estral con un protocolo para control del ciclo estral en el que utilizó BE, dispositivo de progesterona, prostaglandina, eCG

y segunda aplicación de BE; al analizar los factores que afectan la tasa de preñez relacionados con el cuerpo lúteo, reportó los VCL promedio y CPP4 en el grupo de hembras preñadas de VCL:  $5425.2 \pm 620 \text{mm}^3$ ; progesterona de  $5.9 \pm 0.5 \text{ng/ml}$ . Y, en el grupo de no preñadas, VCL:  $4849 \pm 341 \text{mm}^3$ ; progesterona de  $4.4 \pm 0.2 \text{ng/ml}$ . Kastelic (1990), en un grupo de novillas Holstein relacionando las medidas de cuerpo lúteo con los perfiles sanguíneos de progesterona, reportó para el día 17 VCL:  $7830.3 \text{mm}^3$  y CPP4:  $12.2 \text{ng/ml}$ . Así mismo, Chagas (2002), en un grupo de novillas receptoras de embriones de la raza Holstein, a las que aplicó tratamiento para el control del ciclo estral, reportó para el día 17 concentraciones de progesterona de  $6.0 \pm \text{ng/ml}$  en el grupo de hembras preñadas. Spell (2001), en un grupo de vacas de la raza Angus, al que sometió a tratamiento hormonal para realizar transferencia de embriones a tiempo fijo, para tratar de analizar varios factores que afectan la tasa de preñez, reportó valores en el grupo de hembras preñadas un VCL:  $7100 \text{mm}^3$ ; CPP4:  $4.1 \text{ng/ml}$  y en el grupo de hembras no preñadas un VCL:  $6800 \text{mm}^3$ ; CPP4:  $3.9 \text{ng/ml}$ . Perry (2005), en dos grupos de vacas posparto cruzadas, con características cárnicas, analizando el tamaño de las estructuras ováricas y su relación con la preñez, aplicó terapias hormonales para el control del ciclo estral, reportando valores para CCP4:  $2.4 \text{ng/ml}$  para el grupo de hembras no preñadas y de  $3.6 \text{ng/ml}$  de la hormona, para el grupo de hembras preñadas. Rodríguez (2007), en hembras cruzadas (*Bos taurus* X *Bos indicus*) con características cárnicas, a las que se aplicó terapia hormonal para el control del ciclo estral, buscando analizar ciertas características del embrión a transferir y de las hembras receptoras, reporta rangos que van de  $0.5$  a  $12.6 \text{ng/ml}$



para el grupo de hembras preñadas (obteniendo como promedio 6.55ng/ml) y 0.3 a 9.1ng/ml para el grupo de no preñadas (obteniendo como promedio 4.7ng/ml), durante el día 17 del ciclo estral sincronizado para TETF). Mann (2009), al buscar la relación entre el tamaño del cuerpo lúteo y los niveles sanguíneos de progesterona, en un grupo de vacas adultas Holstein, a las que aplicó terapia hormonal para control del ciclo estral, reportó valores promedio de progesterona para el día 17 de  $7.3 \pm 0.3$  ng/ml. Sartori en 2002, reportó en un grupo de animales de la raza Holstein, en las que se relacionan las estructuras ováricas y los niveles hormonales circulantes en novillas, vacas lactantes y vacas secas, sincronizadas, para el día 17 de seguimiento, los siguientes valores VCL:  $5515.2 \pm 273$  mm<sup>3</sup> y CPP4:  $3.0 \pm 0.1$  ng/ml. Así mismo, Vasconcelos (2001), en dos grupos de vacas lactantes de la raza Holstein, a las que aplicó tratamientos hormonales para control del ciclo estral diferentes, reporta para el día 17 los siguientes valores VCL:  $5887 \pm 569$  mm<sup>3</sup>; CPP4:  $2.4 \pm 0.2$  ng/ml para el grupo 1 y para el grupo 2 VCL:  $7100 \pm 439$  mm<sup>3</sup>; CPP4:  $3.0 \pm 0.1$  ng/ml. Adams (1992), buscando establecer el efecto de la progesterona sobre el desarrollo folicular y los niveles de esta hormona, en novillas raza Holstein, sincronizadas, reporta valores de 9.7ng/ml para el día 17 del ciclo, cuando se evidencia un cuerpo lúteo desarrollado. Taniguchi (2007), utilizando vacas cruzadas (*Bos taurus*), entre 5 y 10 años de edad, las cuales recibieron terapia hormonal para control del ciclo estral, reporta valores, para el día 17 de 9.0ng/ml de progesterona. De la misma forma, Nasser (2004) en un grupo de novillas cruzadas (*Bos taurus* X *Bos indicus*), en las que aplico terapia para control del ciclo estral, reportó la presencia de un cuerpo lúteo

completamente apreciable por ultrasonografía en la totalidad de animales del grupo de trabajo al que se aplicó eCG el día 5 y presentaron niveles de P4 de 2.08ng/ml para el día 17.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, referentes a los VCL (Tabla 4), comparados con los hallazgos que han sido reportados por los autores anteriormente relacionados, son consecuentes, ya que estos datos son muy cercanos a los valores promedio del estudio (Tabla 4).

Al analizar los rangos de los VCL, se presentó una tendencia numérica que permite pensar en la dispersión de este conjunto de valores, ya que van desde 614 a 16443mm<sup>3</sup>; por este motivo, se analizan los datos de los animales que resultaron gestantes, para establecer si los que presentaron valores bajos de foliculo preovulatorio (con respecto a los demás animales del estudio), presentaron valores de volumen de cuerpo lúteo bajo y también niveles de progesterona plasmática baja y coinciden o no con un diagnóstico de preñez negativa y viceversa (caso positivo); ya que el porcentaje de preñez hallado en este estudio es del 75% (29/40) (Tabla 5).

#### **2.3.4. Niveles de progesterona durante el ciclo estral sincronizado.**

Al observar los niveles sanguíneos de la hormona progesterona, presentes en los animales del grupo de estudio durante los días de muestreo (días 5, 9, 17), se observa un patrón de comportamiento, en el que durante los muestreos inicial y final (días 5 y 17), tiende a observarse dispersión en el rango de datos (Figura 7).

Lo anterior es de esperarse durante estos días, ya que en el día 5 es posible que se encuentren a nivel ovárico cuerpos lúteos provenientes de ovulaciones anteriores y, adicionalmente, a que hasta el día 5 se aplicó la prostaglandina F<sub>2α</sub>, buscando producir la lisis de cualquier cuerpo lúteo que afecte el desarrollo folicular final del ciclo sincronizado (Bó, 1996; 2002). Después del día 5 se inició una caída en los niveles de progesterona sanguíneos (luteolisis funcional) acompañada por la disminución en el tamaño del cuerpo lúteo (luteolisis estructural) (Barnea, 2000; Baruselli, 2005).

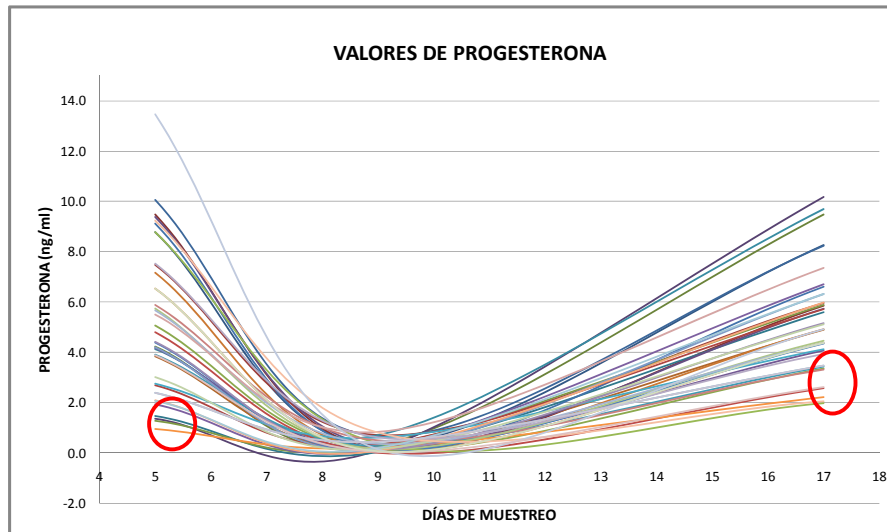
El día 17 del ciclo sincronizado, cuando se espera encontrar un cuerpo lúteo desarrollado y funcional, los niveles de progesterona plasmática tendieron a la dispersión, tabla 4. Debe tenerse en cuenta que esta diferencia en los niveles de progesterona es consecuente con la diferencia en los tamaños de los cuerpos lúteos (expresados para este caso en VCL) reportados en el grupo de animales.

Al observar y analizar las curvas de los niveles de progesterona plasmática del total de los animales del grupo de trabajo (Figura 7), es importante resaltar que la diferencia manifiesta entre el primer y tercer muestreo (días 5 y 17) radica en que durante el muestreo del día 5 puede haber o no presencia de un cuerpo lúteo como se observó en lo reportado en la tabla 2; esto se corrobora con los niveles cercanos a 0.9ng/ml que se presentaron en la figura 7 (resaltado círculo rojo muestreo día 5), lo que permite pensar que estos bajos niveles de progesterona puedan deberse a los liberados por el implante que está siendo utilizado durante este periodo (Anderson, 1999; Barreto, 2002, Bó, 2003). Lo anterior demuestra la

eficiencia del tratamiento para el control del ciclo estral empleado para este estudio, ya que éste puede ser iniciado durante cualquier etapa del ciclo estral, debido a que va a inducir la regresión de los folículos que se encuentren presentes en el ovario, sin importar su estado de desarrollo, gracias a la supresión en la síntesis y secreción de gonadotropinas (Taniguchi, 2007), además de generar la inducción de la luteolisis, al realizar la aplicación de prostaglandina F<sub>2α</sub> el día 5. Es por este motivo que no se empleó la técnica de presincronización del ciclo estral.

Comparando con lo anterior (lo observado durante el día 5), en el muestreo correspondiente al día 17, en el 100% (40/40) de los animales se observó un cuerpo lúteo (Tabla 4); esto se corrobora con lo graficado en la Figura 7 (resaltado círculo rojo muestreo día 17), en donde los niveles de progesterona plasmática de los animales presentan valores mínimos cercanos a 2ng/ml (Tabla 4); ésto permite pensar que en el ovario se encontraba un cuerpo lúteo de volumen bajo (con respecto a la media del volumen encontrado para este día de muestreo) que generaba bajos niveles de hormona progesterona (Figura 7). La anterior observación coincide con reportes en los que, para días acordes con los del presente estudio, algunos animales presentaron cuerpos lúteos de tamaño menor al de la media del grupo animal, generando niveles de progesterona de 2.48 y 1.19ng/ml (Vasconcelos, 2001; Baruselli, 2003), respectivamente.

**Figura 7. Niveles plasmáticos de progesterona del total de los animales durante los tres muestreos (días 5, 9 y 17).**



En cuanto a los niveles promedio de progesterona presentados por los animales del grupo experimental durante los tres muestreos (Figura 8), se observa inicialmente (día 5) niveles promedio aumentados de progesterona plasmática, lo cual permite pensar que se debe a la alta dispersión en los datos evidenciados durante el primer muestreo del estudio; la explicación a esta tendencia en los valores de la hormona presente en sangre para este día, se asocia al hecho de no haber realizado un control previo del ciclo estral sincronizado en los animales del grupo, por lo que es de esperarse que en algún porcentaje de animales se encontrara, para ese momento, uno o varios cuerpos lúteos, el o los cuales generaran incrementos en los niveles de progesterona en sangre para este día de muestreo, mientras se encontraba en desarrollo la onda folicular sincronizada. Esta presencia de estructuras luteales es controlada, en este ciclo sincronizado, por medio de la aplicación, el día 5 (inmediatamente después de los muestreos), de una dosis de prostaglandina F2 $\alpha$  que desencadene efectivamente el proceso

de luteolisis, para así no alterar los procesos asociados al desarrollo final del folículo de mayor tamaño de la onda sincronizada; como pueden ser la sobremaduración (envejecimiento) del oocito y retardos en la ovulación, entre otros que afectan la eficiencia reproductiva de la hembra (Adams, 1992; Ohtani, 1998; Sartori, 2002; Bó, 2003).

Para el día 9 de muestreos se observa una caída de los niveles promedio de progesterona; este descenso es completamente esperado ya que ésta se constituye en uno de los pilares del proceso de control del ciclo estral al que se sometieron los animales del grupo experimental. Al ser aplicada la prostaglandina F2 $\alpha$  durante el día 5 se espera el inicio de la activación de mecanismos luteolíticos que generan la apoptosis de cualquier cuerpo lúteo proveniente de ondas anteriores a la sincronizada (Baruselli, 2003; Tribulo, 2002); adicionalmente, el día 8 del ciclo sincronizado, es retirado el implante de liberación lenta de progesterona, lo cual favorece a la disminución de los niveles progestágenos que experimentan los animales durante el día del segundo muestreo; esto es plenamente evidenciable en la figura 8. Lo anterior coincide con lo reportado por Kastelic (1990) y Ohtani (1998), quienes reportaron en grupos de novillas niveles promedio de progesterona de 0.3ng/ml, para el día de mayor desarrollo del folículo preovulatorio (9 del ciclo sincronizado). De la misma forma, estos valores son muy cercanos a los reportados por Chagas (2002) y Perry (2005), los cuales reportan niveles de esta hormona para el día 9, de 0.2ng/ml. Al desencadenarse la ovulación y producirse la formación del cuerpo lúteo, inicia el incremento de la

síntesis y liberación de progesterona, el cual va a incrementarse hasta que se presenta un completo desarrollo lúteo, lo cual se espera que se produzca hacia el día en que se realiza la transferencia del embrión al grupo de hembras del estudio (día 17); esto ocurre 7 días después de la ovulación. Ya para este día se encuentra una estructura luteal completamente desarrollada, con una alta capacidad esteroideogénica, la cual va a permitir el incremento de los niveles sanguíneos de progesterona en sangre (Figura 8); este incremento, experimentado durante esta etapa, va a generar un aumento en la capilaridad de los diferentes estratos celulares (epitelios luminál y glandular) que componen el útero, en donde se incrementa la síntesis de moléculas como enzimas, factores de crecimiento, citoquinas, linfoquinas, hormonas, proteínas transportadoras y otras sustancias histotropas (Spencer, 2004), que permiten establecer un medio ambiente uterino acorde con las necesidades del embrión en formación, garantizando así, favorecer un adecuado desarrollo embrionario, reconocimiento por parte de la madre, implantación y mantenimiento de la gestación (Hernández, 2008). Así mismo, por acción hormonal, se disminuye el tono de la musculatura lisa uterina que facilita la adherencia del embrión, previniendo pérdidas embrionarias tempranas (Bowen, 2000; Gonella, 2010).

Durante esta etapa del ciclo sincronizado se realizó la transferencia del embrión a las hembras receptoras; es muy importante tener en cuenta una correcta coordinación entre el momento en que es obtenido el embrión de la hembra donante y el día del ciclo sincronizado en que se encuentra la receptora,

adicionalmente a la etapa evolutiva en la que se encuentra el embrión (Bó, 2003), ya que si la hembra receptora presenta alguna asincronía con la donadora, ésta no puede garantizar un medio ambiente uterino que favorezca el desarrollo del embrión; además de la importancia de unos óptimos niveles de progesterona, es importante verificar que no se presenten retrasos en el incremento post ovulatorio de progesterona, ya que se afecta el desarrollo embrionario temprano, así como la síntesis, por parte del conceptus, de la señal que activa los mecanismos luteotrópicos, conocida como proteína trofoblástica bovina ó interferón Tau, lo cual afecta la posibilidad de que ocurra el establecimiento y mantenimiento de la gestación afectando las tasas de concepción (Darwash, 1998).



**Figura 8. Niveles plasmáticos de progesterona promedio en los animales durante los tres muestreos (días 5, 9 y 17).**



Al observar la dinámica de los niveles promedio de progesterona del grupo estudiado, durante el segundo y tercer muestreo (días 9 y 17, respectivamente), en el grupo de hembras que presentaron o no gestación (Figura 9), la cual fue verificada el día 52 (día 0 el inicio del protocolo de sincronización y día 10, día de ovulación), se aprecia una tendencia numérica que indica, que en el grupo de hembras no gestantes, se presentó un menor descenso en los niveles de progesterona al comparar este promedio con los que presentaron las hembras gestantes durante el día 9 (máximo desarrollo folicular); pero estadísticamente no se presentaron diferencias ( $P > 0.05$ ) (Figura 9).

Al observar la tendencias numéricas de los niveles de progesterona de los grupos

de hembras gestantes y no gestantes (Figura 9), debe tenerse en cuenta la importancia del “suficiente” o “adecuado” descenso en los niveles de progesterona plasmática para el día de máximo desarrollo del folículo preovulatorio, ya que la concentración que se dé y el tiempo que permanezca su acción en esta etapa, aparentemente influyen en el mantenimiento o no del “bloqueo de la progesterona”, modulando el grado de sensibilidad a los estrógenos (cambio de retroalimentación negativo a positivo) y con ello el modelo de liberación de gonadotropinas (particularmente LH), afectando el fenómeno de luteinización del folículo ovulatorio. Esta alteración en el modelo de liberación de la LH causa una demora en el proceso de ovulación, generando un folículo de mayor tamaño y un oocito “sobremadurado” o “envejecido” (Palma, 2001), posiblemente afectando la luteinización del folículo ovulatorio y con ello la estructuración o programación del vida del futuro cuerpo lúteo y las señales apropiadas que se espera deben darse en la etapa del reconocimiento de la preñez. De esta manera, los niveles de progesterona presentes durante la fase preovulatoria, aparentemente promueven la alteración en la secuencia de los eventos fisiológicos, que afectan la eficiencia reproductiva de la hembra, ya que también retrasan el aumento post ovulatorio de progesterona, alterando el medio ambiente uterino y el desarrollo del conceptus, lo que incide en el establecimiento de la gestación (Darwash, 1998; Gonella, 2010).

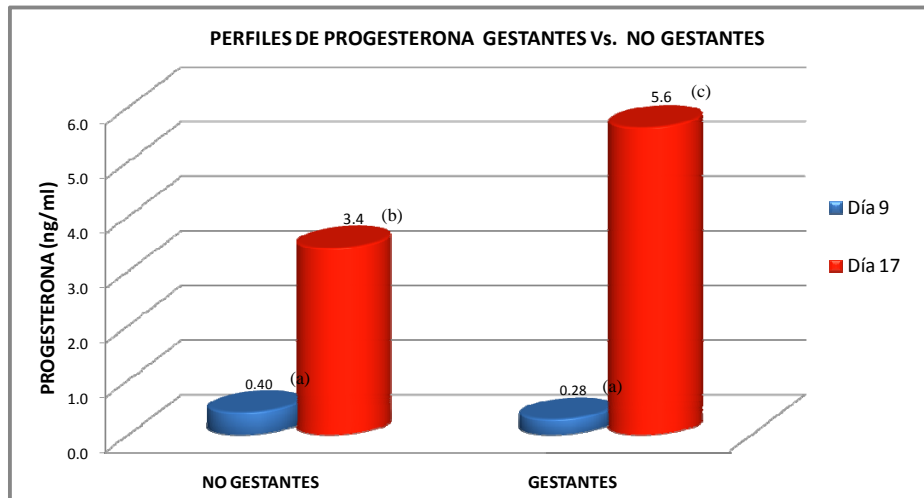
En cuanto a lo observado en la figura 9, correspondiente a los niveles de progesterona durante el día 17, y comparar estos niveles entre los grupos de hembras gestantes y no gestantes se presentaron diferencias significativas

( $P < 0.05$ ). El grupo de hembras gestantes presenta valores promedio superiores a los observados en las hembras no gestantes. Lo anterior podría estar ligado a la asociación existente entre los niveles de progesterona y la gestación, ya que al encontrarse, en el ovario, un cuerpo lúteo que genere unos niveles de progesterona adecuados, para garantizar un medio ambiente uterino el cual favorezca la síntesis de proteínas y otras moléculas necesarias para el desarrollo embrionario e implantación, va a favorecerse el proceso de mantenimiento de la gestación (Niswender, 2000; Gonella, 2010).

Los niveles de progesterona observados durante el segundo y tercer muestreo (Figura 9), son acordes a los de estudios que reportan concentraciones de progesterona plasmática durante los días de máximo desarrollo del folículo preovulatorio (día 9), así como de la etapa en la que se presenta un cuerpo lúteo desarrollado (día 17), en grupos de hembras gestantes y no gestantes. De esta forma, Perry (2005), reporta valores de progesterona para el día 9 del ciclo sincronizado para el grupo de no gestantes de 0.2 y en gestantes de 0.2ng/ml. Mientras que en el día 17, para el grupo de no gestantes fue de 2.4 y en gestantes fue de 3.6ng/ml. Así mismo, Siqueira (2009), mostró valores para el día 9 del ciclo sincronizado, en el grupo no gestantes de 0.4 y en gestantes de 0.2ng/ml. Mientras que en el día 17, para el grupo no gestantes de 4.4 y en gestantes de 5.9ng/ml. Puede observarse que los animales de los estudios revisados anteriormente, presentaron niveles similares de progesterona durante el día 9 en los grupos de no gestantes y gestantes; no obstante, durante el presente estudio,

en las hembras no gestantes, se observó una tendencia numérica a un mayor nivel de progesterona para el día de máximo desarrollo folicular ovulatorio (Figura 9), presumiéndose que la segunda aplicación de benzoato de estradiol, que tenía como finalidad la sincronización de la ovulación, aparentemente no controló el efecto del nivel suprabasal de la progesterona, lo que pudo haber determinado, como ya se indicó, una posible alteración del modelo de liberación de la LH y con ello de la subsecuente luteinización del folículo ovulatorio, causando posibles alteraciones en la formación del cuerpo lúteo (Tribulo, 2002; Bó, 2003; Baruselli, 2005), lo cual es consecuente con el menor valor numérico en el VCL que se observa en las hembras no gestantes (menor síntesis y liberación de progesterona?) durante el muestreo del día 17 (Figura 9), la que puede haber llevado a una posterior falla en el mantenimiento de la gestación (Knobil, 2006).

**Figura 9. Comparación de los perfiles plasmáticos promedio de progesterona durante el segundo y tercer muestreo (días 9 y 17) de los animales preñados y no preñados.**



Durante el análisis realizado para el día 17 se encontraron diferencias en cuanto al nivel de progesterona, en los grupos gestante y no gestante ( $P < 0.05$ ), lo cual coincide con lo reportado por los autores comparados (Perry, 2005; Siqueira, 2009). Al analizar este comportamiento se refuerza la hipótesis que existe una relación entre el nivel de progesterona circulante durante la fase luteal y el porcentaje de preñez (Niswender, 2000; Vasconcelos, 2001), lo cual coincide con lo reportado en la figura 11.

### **2.3.5. Relación entre estructuras ováricas, perfiles de progesterona y porcentaje de preñez.**

Una vez analizados estadísticamente los valores obtenidos durante el estudio, se establecen las relaciones existentes entre estos datos, en cada uno de los niveles propuestos como objetivos del trabajo.

#### **2.3.5.1. Efecto del diámetro del folículo sobre el volumen del cuerpo lúteo.**

Al analizar estadísticamente el efecto del DF (muestreo realizado el día 9) sobre el VCL (día 17 del ciclo sincronizado), los resultados indican que no existe efecto significativo de DF al día 9 sobre VCL al día 17 ( $P > 0.05$ ).

Los resultados estadísticos obtenidos en los que se indica el no efecto de DF sobre VCL, coinciden con lo reportado por Lynch (2010). Este autor, que hace referencia a tamaño del folículo preovulatorio, no encontró relación entre éste y el cuerpo lúteo subsecuente en las novillas del grupo experimental, las cuales recibieron tratamiento para el control del ciclo estral. Así mismo Lynch (2010), refuerza lo encontrado al analizar los niveles de hormonas circulantes, ya que sugiere que no hay relación entre la concentración de estrógenos durante el periodo periovulatorio y los niveles de progesterona presentes durante el día 7 post ovulación, lo que le permite comentar que la capacidad esteroideogénica del cuerpo lúteo no está asociada con la capacidad esteroideogénica de folículo dominante del cual se formó. Adicionalmente Vasconcelos (1999), muestra bajos porcentajes de sobrevivencia embrionaria en hembras que presentan folículos preovulatorios por encima de la media del grupo y el autor clasifica como grandes. Esto permite pensar que al presentarse folículos grandes durante el momento de ovulación podría generar una cavidad ovulatoria, haciendo que se presenten cuerpos lúteos cavitarios; los cuales van a presentar una menor cantidad de estroma luteal y menor cantidad de células luteales productoras de progesterona (Kastelic, 1990), afectando así la sobrevivencia embrionaria y la tasa de concepción (Grygar, 1997; Lynch, 2010).

### **2.3.5.2. Efecto del volumen del cuerpo lúteo sobre la concentración de progesterona plasmática.**

Es importante tener en cuenta que la relación entre las variables VCL y concentración de progesterona plasmática, se evaluó durante el día 17 del ciclo sincronizado; siete días después de la presentación de la ovulación. En la figura 10 se muestra la función estimada mediante el análisis de regresión la cual resulto significativa ( $P < 0.05$ ).

Este es un hallazgo esperado ya que como ha sido comentado, el cuerpo lúteo se constituye como una glándula transitoria, cuya principal función es la secreción de la mayor parte de la progesterona durante la fase luteal. Esta relación entre el VCL y los niveles de progesterona depende de la cantidad de superficie real (descontando cavidad luteal) de estroma luteal, ya que este tejido está compuesto principalmente por células luteales grandes y pequeñas, cuya función es la síntesis y liberación de progesterona (Niswender, 2000).

De esta manera al analizar la relación estimada del nivel plasmático de progesterona en función del cuerpo lúteo, evidenciados durante el día 17 del ciclo estral sincronizado, según la ecuación planteada, es posible predecir que por cada milímetro cúbico de tejido luteal que aumenta el VCL, también aumenta la concentración de progesterona plasmática para este día en un 0.00021ng/ml, para este grupo de hembras y bajo las condiciones que se encuentran enmarcadas en el estudio.

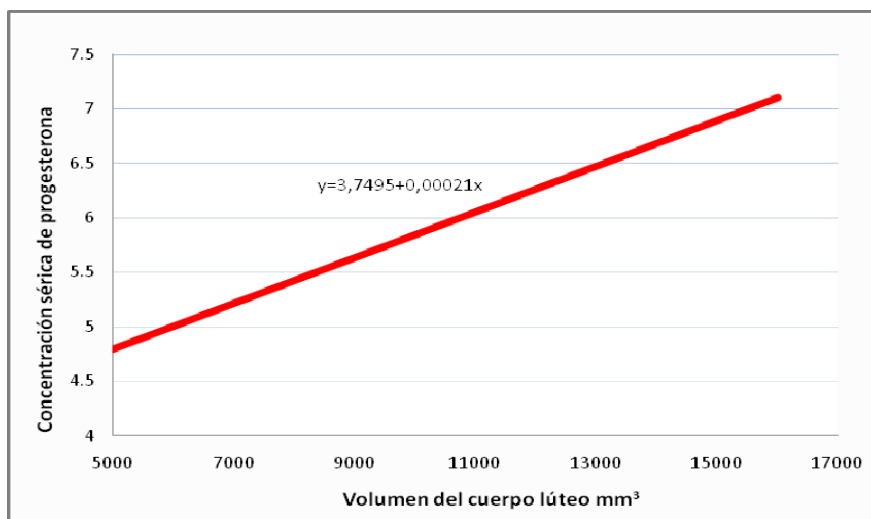
Los resultados evidenciados, acerca de la relación entre el VCL y los niveles de progesterona plasmática durante el día 17 de muestreo, coinciden con los hallazgos reportados por varios autores, quienes establecieron relaciones positivas entre los volúmenes luteales y las concentraciones de progesterona plasmática en los animales estudiados. De esta forma, España (2004), propone que el área luteal podría asociarse con el estado reproductivo del animal; ya que ésta se puede relacionar con los niveles de progesterona plasmática y esta a su vez, con el diagnóstico de gestación.

Kastelic (1990), reporta que el “área de tejido luteal” y la concentración de progesterona plasmática están relacionadas positivamente; por eso el autor comenta que la valoración por medio de ultrasonografía de los cuerpos lúteos se convierte en una alternativa viable para la determinación de las concentraciones de progesterona por la valoración de la función luteal en novillas raza Holstein. Mann (2008), reporta que a partir del día 5 post ovulación (día 15 desde el inicio de ciclo sincronizado), se evidenció una fuerte relación positiva entre el “peso del cuerpo lúteo” y la concentración plasmática de progesterona, en un grupo de vacas Holstein a las que se les aplicó terapia hormonal para el control del ciclo estral. Sartori (2002), evidenció correlación positiva entre el VCL y los niveles sanguíneos de progesterona en novillas, vacas lactantes y vacas secas de la raza Holstein, lo cual fue analizado durante el día 7 post ovulación (día 17 desde el inicio del tratamiento para el control del ciclo estral). De la misma forma Spell (2001), reporta una relación positiva entre el VCL y las concentraciones de



progesterona plasmática en hembras con características cárnicas, a las cuales se aplicó terapia hormonal para realizar la transferencia de embriones a tiempo fijo (TETF). De esta manera, los hallazgos reportados por los anteriores autores, los cuales coinciden con los datos evidenciados en el presente estudio, permiten pensar que al presentarse un cuerpo lúteo desarrollado, se podría encontrar en sangre niveles de la hormona progesterona que favorezcan la preparación de un medio ambiente uterino adecuado para el desarrollo del conceptus y las subsiguientes etapas de la implantación y mantenimiento de la gestación (Gonella, 2010).

**Figura 10. Relación estimada del nivel plasmático de progesterona en función del volumen del cuerpo lúteo.**



### **2.3.5.3. Efecto del DF, VCL y concentraciones de progesterona plasmática sobre el evento de presentación de la gestación.**

El análisis realizado reveló que solamente la variable concentración de progesterona plasmática al día 17 tiene un efecto significativo sobre la probabilidad de preñez positiva ( $P < 0.1$ ). Para esta variable se trabajó con un nivel de significancia de 0.1, ya que la preñez es una característica influenciada por un gran número de factores (difíciles de controlar), por este motivo se decidió aumentar a dicho nivel.

De esta manera puede afirmar que solamente la variable concentración sérica de progesterona tiene un efecto significativo sobre el diagnóstico de preñez.

La siguiente es la función logística estimada que describe la probabilidad de que el diagnóstico de preñez sea positivo en función de la concentración de progesterona

para el día 17 (CP417).

$$P(DP = 1) = \frac{1}{1 + \exp[-(-0,7785 + 0,3515CP4P17)]}$$

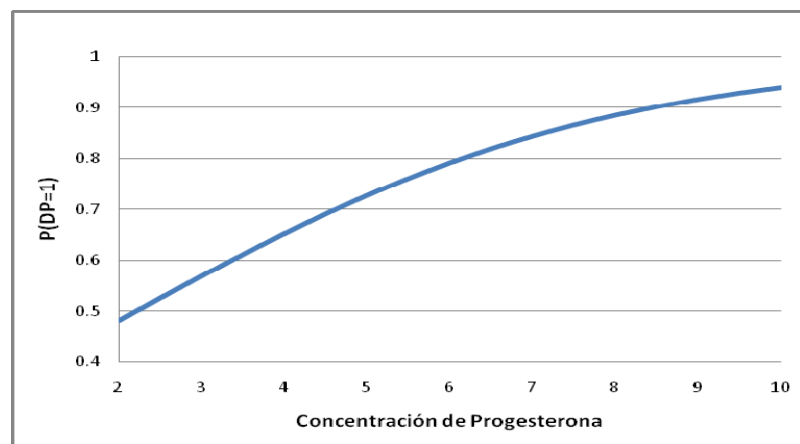
La figura 11 muestra la función logística estimada vía máxima verosimilitud para el dominio de los datos del estudio.

El incremento en la probabilidad de preñez se presenta hasta el máximo valor de concentración de progesterona observado en el estudio (10 ng/ml) dicho valor corresponde a 0.939 o en porcentaje 93.9%, valor que se obtiene al evaluar el máximo valor de progesterona en la función logística estimada. Es importante resaltar que este incremento en la probabilidad de preñez aumenta hasta el nivel de 10ng/ml, para el grupo de animales del estudio, en el rango de valores encontrados; este resultado no se puede generalizar, asumiendo que esta relación se repita en todos los casos, ya que no siempre se podrá esperar que un incremento en el valor de progesterona se obtendrá una mayor probabilidad de preñez (Melanie, 2004); esto llega ser independiente de la afirmación que indica que los niveles de progesterona en sangre y el medio ambiente uterino durante la fase luteal favorecen el establecimiento y mantenimiento de la gestación (Schams, 2004).

Ésta relación positiva evidenciada en el presente estudio entre el nivel plasmático de progesterona y el diagnóstico positivo de preñez (Figura 11), coincide con lo reportado por Diskin (2002), quien reporta una relación positiva entre las concentraciones plasmáticas de progesterona y la tasa de sobrevivencia

embrionaria en un grupo de novillas a las que se aplicó terapia hormonal para el control del ciclo estral. Así mismo, Chagas (2002), concluye que las bajas concentraciones de progesterona plasmática al momento de transferir el embrión (día 7 post ovulación), pueden afectar negativamente la sobrevivencia embrionaria en hembras de la raza Holstein a las que se aplicó terapia hormonal para el control del ciclo estral, dentro de un protocolo para transferencia de embriones a tiempo fijo. Así mismo, Moore (2005), concluye que las pérdidas embrionarias pueden evitarse incrementando los niveles de progesterona plasmática en vacas.

**Figura 11. Relación estimada para el diagnóstico de preñez positivo en función de la concentración plasmática de progesterona.**

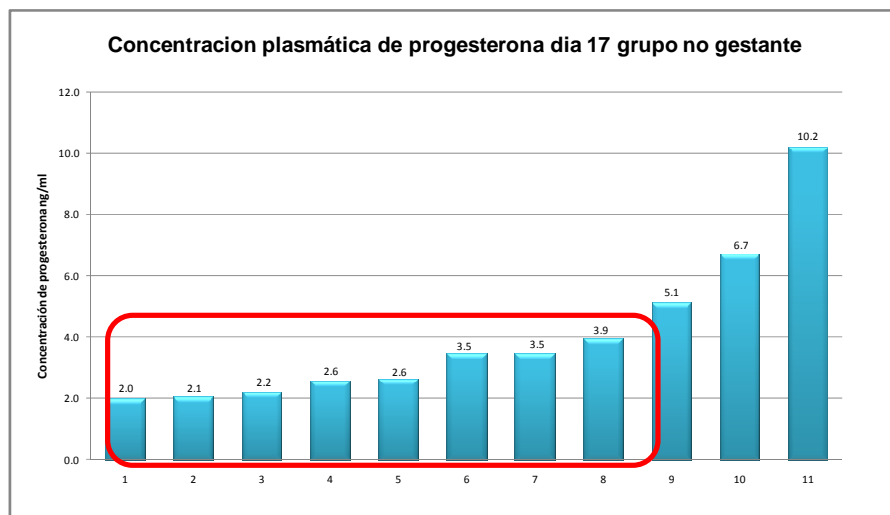


P(DP=1) Se refiere a la probabilidad de que el diagnóstico de preñez sea positivo ó igual a 1.

Spell (2001), afirma que las concentraciones de progesterona plasmática menores de 0.5ng/ml y mayores de 16ng/ml, no presentan diferencias en la presentación de preñez, ya que estos valores son tenidos en cuenta como los rangos mínimos y máximos para los niveles de progesterona plasmática asociada

a gestación positiva; así mismo, este autor reporta que las concentraciones plasmáticas óptimas para que se establezca la preñez están entre los 2.0 y 5.0ng/ml en hembras con características cárnicas, a las cuales se aplicó terapia hormonal para realizar la transferencia de embriones a tiempo fijo (TETF). El anterior rango de valores propuestos por Spell (2001), se encuentran por debajo de los valores que se obtuvieron en el presente estudio, ya que para el grupo de hembras no gestantes, a las que se observó los niveles de progesterona plasmática durante el día 17 (Figura 12), el 73% (8/11) de estas hembras presentaron valores por debajo de 4ng/ml (resaltado en rojo figura 12); puede pensarse que para este grupo de animales los niveles de progesterona plasmática inferiores a este valor no fueron compatibles con la gestación. Por otra parte, en la figura 12, se presenta el 27% (3/11) de los animales del grupo de hembras no gestantes, las cuales presentan valores de progesterona plasmática para el día 17 (tercer muestreo) superiores a 4ng/ml; estos valores tienden a ser numericamente similares a los presentados por los animales del grupo de gestantes. Por lo anterior, puede pensarse que estos tres animales presentaron diagnóstico negativo de preñez atribuible a otros factores y no a los niveles plasmáticos de progesterona observados el día de la transferencia del embrión, ya que la preñez es un evento regulado de manera multifactorial (Rodríguez, 2007).

**Figura 12. Concentración plasmática de progesterona del grupo de hembras no gestantes, durante el día 17 (tercer muestreo).**



En la tabla 5 se muestra la estimación del Odds (disparidad) y su respectivo intervalo de confianza; de esta manera se propone que si el intervalo contiene al 1, no existe mayor probabilidad de que se presente el evento 1 (preñez positiva); si este no contiene al uno y su límite inferior es mayor que uno, se concluye que es más probable que se dé el evento favorable (es decir que la variable respuesta y valga 1), si el intervalo de confianza no contiene al uno y su límite superior es menor a 1, entonces es más probable que se presente el evento 0 (no preñez en este caso). El intervalo de confianza que se obtuvo fue del 95%.

En la tabla 5 se muestran algunos ejemplos en los cuales se comparan perfiles de progesterona (en ng/ml) mediante la razón de los Odds. Por ejemplo, al comparar una vaca con una concentración de progesterona de 7 ng/ml (perfil 1), con una

vaca con una concentración de progesterona de 5 ng/ml (perfil 2), se encuentra un valor de la razón de los Odds de 2.01, lo cual indica que es 2.01 veces más probable que la vaca con el perfil 1 quede preñada, comparada con la vaca con el perfil 2. confirmada por medio de exploración ultrasonográfica del tracto uterino durante el día 52.

**Tabla 5. Tabla de contrastes entre perfiles de progesterona plasmática día 17 y probabilidad de gestación (día 52).**

Concentración de progesterona		Probabilidad
Perfil 1	Perfil 2	
7	5	2,01
5	2	2,87
8	3	5,8
6	3	2,87

Los datos de los perfiles 1 y 2 se presentan en ng/ml.

#### **2.3.5.4. Porcentajes de preñez.**

A los 42 días de realizada la TE, por medio de análisis ultrasonográfico del tracto reproductivo, se determino si el grupo de animales se encontraban gestantes ó no. El anterior examen permitió observar que el 72.5% (29/40) se encontraban gestantes; estos hallazgos se encuentran por encima de los observados por Peixoto (2007), quien reportó tasa de preñez del 63.7%, a los 53 días después de realizar el procedimiento de transferencia de embriones, en hembras cruzadas (*Bos taurus* X *Bos indicus*). Así mismo, Spell (2001), observo tasas de preñez en hembras con características cárnicas del 70% (172/245) dentro de un protocolo de

TETF, después de transferir el embrión el día 7 post ovulación. Hasler (2007), reportó tasas de preñez en hembras sincronizadas después de aplicar transferencia de embriones a tiempo fijo (TETF), cercanas al 58%. Tribulo (2002), observo tasas de preñez en grupos de hembras a las que se controla el ciclo estral, mediante un protocolo similar al utilizado en el presente estudio, de 69,4% (50/72). Al observar los resultados de autores que evaluaron la tasa de preñez al aplicar la biotecnología de transferencia de embriones, se presentaron tendencias numéricas similares a los obtenidos durante el presente estudio, pero deben ser vistas con cuidado este tipo de comparaciones, ya que en varios de los trabajos comparados, los grupos experimentales y el manejo pueden diferir en cuanto al número de animales, las épocas del año, la suplementación de los animales, las edades de los animales, el entorno en que estos se encontraban, las condiciones ambientales y otros factores que pueden afectar los resultados positivos ante la aplicación de este tipo de técnicas biotecnológicas (Tribulo, 2002; Bó, 2003).

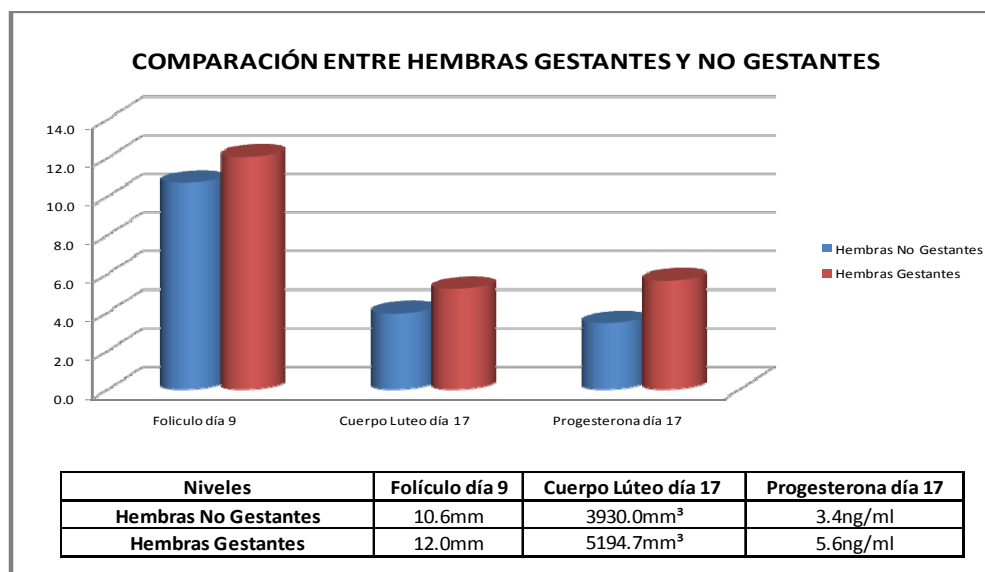
### **2.3.6. Patrón de comportamiento de las estructuras ováricas, niveles plasmáticos de progesterona y su relación con la gestación.**

Una vez observadas individual y grupalmente las diferentes variables respuesta propuestas para este estudio, es pertinente realizar una observación global en el que se tengan en cuenta los valores obtenidos durante los tres muestreos y ver la tendencia numérica promedio de los animales que resultaron gestantes y no gestantes. Debe tenerse en cuenta que este es un análisis de tipo descriptivo, en el que se observan las tendencias numéricas de los promedios en una serie de



datos y se establecen patrones de comportamiento en los animales gestantes y no gestantes (Figura 13).

**Figura 13. Comparación entre grupos gestante y no gestante en cuanto a Diámetro Folicular (día 9), Volumen del Cuerpo Lúteo (día 17) y nivel de Progesterona (día 17).**



De esta manera, se observa en las hembras que presentaron gestación positiva el día 52 (desde el inicio del protocolo de sincronización), una tendencia numérica en la que se observa el incremento en el promedio de los valores de DF evaluado el día 9, el VCL evaluado el día 17 y la concentración plasmática de progesterona evaluada el día 17, con respecto a los animales que fueron diagnosticados como negativos después de la exploración ultrasonográfica realizada el día 52 (Figura 13). Esta relación manifiesta, fue estadísticamente significativa en los casos de la relación entre el volumen del cuerpo lúteo (día 17) y los perfiles plasmáticos de progesterona (día 17) e igualmente fue significativa para la relación entre el volumen plasmático de progesterona y la gestación.

## CONCLUSIONES

No existe efecto del diámetro folicular evaluado el día 9 del ciclo estral sincronizado sobre el volumen del cuerpo lúteo (día 17), para el grupo de animales analizado durante este estudio.

El VCL, determinado el día 17, afecta positivamente los niveles plasmáticos de progesterona para ese mismo día; se establece una relación positiva entre estas dos variables, en la que por cada milímetro cúbico que aumente el volumen luteal, se aumenta en 0.00021ng/ml la secreción de progesterona plasmática, dentro del rango de valores de VCL del presente estudio.

Se relacionó positivamente el efecto de la concentración plasmática de progesterona evaluada el día 17 y el porcentaje de preñez determinado el día 52 ó 42 post ovulación; de tal manera, al aumentar los niveles de progesterona aumenta la probabilidad de preñez positiva, dentro del rango de valores encontrados en el estudio (2 – 10ng/ml).

Únicamente la concentración plasmática de progesterona, al momento de transferir un embrión (día 17), presentó efecto sobre el diagnóstico de preñez, confirmado el día 52; los niveles de progesterona pueden ser determinantes en la preparación del medio ambiente uterino en el que se va a desarrollar el embrión y afectar, probablemente de manera positiva, el porcentaje de preñez, tras la aplicación de la TE.

## RECOMENDACIONES

Es importante realizar trabajos en los que se evalúen las diferentes hormonas utilizadas en el protocolo para el control del ciclo estral en la hembra receptora de embriones, con el fin de realizar ajustes para la incrementar la eficiencia, ya que un porcentaje de animales del presente estudio, así como de los trabajos consultados no responden de forma efectiva a el tratamiento de sincronización.

Se deben realizar trabajos que permitan conocer más acerca de los efectos de los niveles suprabasales y la residualidad de la progesterona durante la fase folicular en los animales a los que se controla el ciclo estral; ya que este fenómeno podría ser un punto crítico que afecta la eficiencia reproductiva en la hembra receptora de embriones.

Es necesario continuar ampliando el conocimiento acerca de los patrones fisiológicos y respuestas a los tratamientos hormonales para control del ciclo estral en diferentes grupos raciales, así como en cruces de estos, diferentes etapas fisiológicas, condiciones de manejo, entre otros; para de esta forma direccionar la selección hacia animales eficientes.

Es pertinente realizar trabajos en los que se profundice acerca de los factores determinantes para el desarrollo de cuerpos lúteos, que generen niveles suficientes de progesterona, para el establecimiento de un medio ambiente uterino que favorezca el desarrollo embrionario así como el mantenimiento de la preñez.

## REFERENCIAS

- Acosta, T., Hayashi, K., Ohtani, M. and Miyamoto, A. 2003. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction* 125: 759-767.
- Acosta, T. and Miyamoto, A. 2004. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Animal Reproduction Science* 82-83: 127-140.
- Adam, J., Pawson, A. and McNeilly, S. 2005. The pituitary effects of GnRH. *Animal Reproduction Science* 88: 75-94.
- Adams, G., Matteri, R. and Gither, O. 1992. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 95: 627-640.
- Ahmad, N., Schrick, F., Butcher, R. and Inskeep, E. 1995. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biology of Reproduction*. 52: 1129-1135.
- Al-Katanani, Y., Lopez, F. and Hansen, P. 2002. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 85: 390-396.
- Anderson, J. 1999. Resultados de trabajos utilizando CIDR-B. Segundo Workshop de Reproducción Bovina Boehringer Ingelheim S.A, Tandil, Argentina: 1-17.
- Araújo, M., Vale, V., Ferreira, A., Sá, W., Barreto, J. y de Sá Filho, L. 2005. Secreção de interferon-tau em embriões bovinos produzidos in vitro frescos e congelados. (Interferon tau secretion in cattle embryos in vitro fertilized before and after cryopreservation). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 57: 6-17.
- Apelo, C. and Kanagawa, H. 1989. Pathogens associated with mammalian embryo. *Journal Veterinary Research (Japan)* 37: 49-69.
- Barnea, E., Choi, Y. and Leavis, P. 2000. Embryo maternal signaling prior to implantation. *Early pregnancy: biology and medicine*. 4: 166-175.
- Barreto, A. and MacManus, C. 2002. The effect of progestagen CIDR device on pregnancy rates in bovine embryo transfer recipients. *Theriogenology*. 57: 1974-1989.
- Baruselli, P., Marques, M., Madureira, E., Costa Neto, W., Gradinettie, R., Bó, G. 2001. Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with CIDR-B devices and eCG. *Theriogenology*. 55: 157. Abstract.
- Baruselli, P., Bó, G., Reis, E., Marques, M., de Sá Filho, M. 2005. Introducción de la IATF en el manejo reproductivo de rebaños de Ganado de engorde en Brasil. *Memorias, congreso internacional de reproducción bovina. Laboratorio Intervet, Bogotá Colombia*: 121-137.
- Baruselli, P., Reis, E. 2003. Sincronización de receptoras Cebú en condiciones tropicales. *Memorias IV Seminario Internacional de reproducción en grandes animales, CGR Biotecnología Reproductiva. Bogotá, Colombia*: 35-93.
- Baruselli, P., de Sá Filho, M., Martins, C., Reis, E., Nasser, L. y Bó, G. 2005. Nuevos avances en los tratamiento de súper ovulación en donadoras de embriones. *Memorias, Congreso internacional de reproducción bovina. Laboratorio Intervet, Bogotá Colombia*: 139-154.
- Baruselli, P., Marques, M., Reis, E., Nasser, L., Silva, R., Menegatti, J., Valentin, R., Santos, I. 2003. Adequação da dose de FSH (Folltropin-V) em protocolos de superovulação das vacas Nelore, com inseminação artificial em tempo fixo. *Memorias, XVII Reunión Anual de la Sociedad Brasileira de Tecnología de Embriones. Brasil*.
- Baruselli, P., Marques, O., Nasser, L., Reis, E., Bó, G. 2003. Effect of eCG on pregnancy rates of lactating zebu beef cows treated with CIDR-B devices for timed artificial insemination. *Theriogenology*. 59: 214.
- Basurto, H. 2005. Programa estacional de reproducción: una alternativa para la producción bovina en pastoreo en el trópico mexicano. *Memorias, Congreso internacional de reproducción bovina. Laboratorio Intervet, Bogotá Colombia*: 89-96.

- Baxter, S. and Ward, W. 1997. Incidence of fetal loss in dairy cattle after pregnancy diagnosis using an ultrasound scanner. *Veterinary Record*. 140, 11: 287-288.
- Bazer, F., Spencer, T. and Ott, T. 1997. Interferon Tau: A novel pregnancy recognition signal. *American Journal of Reproduction Immunology* 37: 412-420.
- Biggers, B., Geisert, R., Wetteman, R. and Buchanan, D. 1987. Effect of Heat Stress on Early Embryonic Development in the Beef Cow. *Journal of Animal Science*. 64:1512-1518.
- Bilodeau, S. 2006. Embryonic development and factors affecting embryo survival in the cow. *Journal Agriculture and agri-food Canada Research Center*. 4: 240-249.
- Bó, G., Adams, G., Caccia, M., Martinez, M., Pierson, R. and Mapletoft, R. 1995. Ovarian Follicular wave emergence after treatment with progestagen and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science*. 39, 3: 193-204.
- Bó, G., Baruselli, P., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tribulo, R. and Mapletoft, R. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*. 57, 1: 53-72.
- Bó, G., Berfegfet, D., Brogliatti, G., Pierson, R. and Mapletoft, R. 1996. Sistemic Vs. local effect of exogenous estradiol on follicular development in heifers. *Theriogenology*. 45, 1: 333.
- Bó, G., Berfegfet, D. y Mapletoft, R. 1996. Manipulación de la dinámica folicular en ganado bovino: Su aplicación en programas de Transferencia de embriones. *Memorias, II Simposio internacional de reproducción animal. Córdoba, Argentina: 53-68.*
- Bó, G., Caccia, M., Tribulo, H., Adams, G., Pierson, R. and Mapletoft, R. 1995. Estrus synchronization in cattle with estradiol-17B and CIDR-B vaginal devices. *Theriogenology*. 43, 1: 340.
- Bó, G., Cutaia, L. 2005. Implementación de programas de inseminación artificial en rodeos de cría. Argentina. *Memorias del VI Simposio Internacional de Reproducción Animal. Instituto de Reproducción Animal de Córdoba Argentina. 326-332.*
- Bó, G., Moreno, D., Cuaita, L. Caccia, M. 2003. Factores que afectan los porcentajes de preñez en los programas de transferencia de embriones. *Memorias IV Seminario Internacional de reproducción en grandes animales, CGR Biotecnología Reproductiva. Bogotá, Colombia: 102-119.*
- Bó, G., Pierson, R. and Mapletoft, R. 1991. The effect of estradiol valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cows with Synchro-Mate-B implants. *Theriogenology*. 36, 1: 169-183.
- Bousfield, G., Butnev, V. 2001. Identification of twelve O-glycosylation sites in equine chorionic gonadotropin beta and equine luteinizing hormone by solid-phase Edman degradation. *Biology of Reproduction*, 64: 136-147.
- Bowen, J. and Burghardt, R. 2000. Cellular mechanisms of implantation in domestic farm animals. *Seminars in Cell & developmental biology*. 11: 93-104.
- Bridges, P., Wright, D., Buford, W., Ahmad, N., Hernandez, H., McCormick, M., Schrick, F., Dailey, R. Lewis, P., and Inskip, E. 2000. Ability of induced corpora lutea to maintain pregnancy in beef cows. *Journal of American Science*. 78, 11: 2942-2949.
- Burges, k., Ralph, M., Jenkin, G. and Thorburn, G. 1990. Effect of oxytocin and estradiol on uterine prostaglandin release in non pregnant and early pregnant ewes. *Biology of Reproduction*. 42: 822-833.
- Burke, J., De la Sota, L., Risco, C., Staples, C., Schmitt, E. and Thatcher, W. 1996. Evaluation of time insemination using a gonadotropin-releasing hormone agonist in lactating cows. *Journal of Dairy Science*. 79, 8: 1385-1393.
- Callaghan, D., Boland, M. 1999. Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. *Animal Science. (U.K.)*. 68: 299-314.
- Celemín, A., Cifuentes, E. 2003. Sincronización de celos y la ovulación para IATF en vacas Holstein en anestro posparto en la sabana de Bogotá. *Memorias IV Seminario Internacional de reproducción en grandes animales, CGR Biotecnología Reproductiva. Bogotá, Colombia: 170.*

- Cutaia, L., Moreno, D., Villata, M., Bó, G. 2001. Synchrony of ovulation in beef cows treated with progesterone vaginal devices and estradiol benzoate administrated at device removal or 24 hours later. *Theriogenology*. 55:408 abstr.
- Colazo, M., Bartolomé, J., Schmitdt, E., illuminati, H., Serrano, B., Moyano, B., Moralejo, R. 1996. Sincronización de los celos combinando progestagenos, GnRH, PGF2 $\alpha$ , e inseminación a tiempo fijo en vacas para carne. Memorias, II Simposio internacional de reproducción animal. Córdoba, Argentina: 254
- Crowe, M. 2008. Resumption of Ovarian Cyclicity in Post-partum Beef and Dairy Cows. *Reproduction in Domestic Animals*. 43. 5: 20–28.
- Chabbert-Buffet, N., Skinner, D., Caraty, A., Bouchard, P. 2000. Neuroendocrine effects of progesterone. *Steroids*. 65, 10-11: 613-620.
- Chagas, J., Lopez, L. 2005. Luteotrophic influence of early bovine embryos and the relationship between plasma progesterone concentrations and embryo survival. *Theriogenology*. 64: 49-60.
- Chagas, J., Lopez, L., Robalo, J. 2002. Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle. *Theriogenology*. 58: 51-59.
- Chebel, R., Santos, J., Reynolds, J., Cerri, R., Juchem, S. and Overton, M. 2004. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 84, 3-4: 239-255.
- De la Sota, R., Burke, J., Risco, C., Moreira, F., Thatcher, W. 1998. Evaluation of a timed insemination during summer heat stress in lactating dairy cattle. *Theriogenology* 49, 4: 761-770.
- Demmers, K., Derecka, K., Flint, A. 2001. Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction*. 121: 41-49.
- De Moraes, A. and Hansen, P. 1997. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes development of in vitro produced bovine embryos. *Biology Reproduction*. 57: 1060-1065.
- Denker, H. 1993. Implantation: a cell biological paradox. *Journal of Experimental Zoology*. 266, 6:541-558.
- Diskin, M., Kenny, D., Dunne, L., Sreenan, J. 2002. Systemic progesterone pre-and post-IA and embryo survival in heifers. *Irish Agricultural Research Forum*. 27.
- Diskin, M., Sreenan, J. 1980. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *Journal Reproduction Fertility*. 59: 463.
- Drawash, A., Lamming. 1998. The importance of milk progesterone concentrations during early pregnancy in the cow. *Journal of Animal Breeding*. 2: 41-43.
- Duica, A., Tovío, N. y Grajalas, H. 2007. Factores que afectan la eficiencia reproductiva de la hembra receptora en un programa de trasplante de embriones bovinos. *Journal Facultad de Medicina Veterinaria Universidad de la Salle*. 14: 107.
- Dunne, L., Diskin, M. and Sreenan, J. 2000. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Animal Reproduction Science*. 58, 1-2: 39-44.
- Edmondson, A., Fissore, R., Pashen, R. and Bondurant, R. 1986. The use of ultrasonography for the study of bovine reproductive tract I. Normal and pathological ovarian structures. *Animal Reproduction Science*. 12, 3: 157-165.
- Elrod, C. and Butler, W. 1993. Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *Journal of Animal Science*. 71, 3: 694-701.
- España, F.; Perez, C.; Rodriguez, I.; Dorado, J.; Hidalgo, M. 2004. Estudio comparativo de la eficacia del diagnóstico precoz de gestación en vacuno mediante ecografía luteal y progesterona plasmática. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 14, 1: 20-27.
- Espey, L. 1994. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biology of Reproduction*. 50: 233-238.

- Everton, L., Baruselli, P. 2003. Sincronización de receptoras cruce por cebú en condiciones tropicales. Cuarto seminario de reproducción de grandes animales (memorias) Bogotá.
- Evans, A., Fortune, J. 1997. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology*. 138: 2963-2971
- Fair, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*. 78, 3-4: 203-216.
- Fazleabas, A., Hild, S. and Verhage, G. 1994. Secretory proteins and growth factor of the Baboon uterus: potential roles in pregnancy. *Cell Biology International*. 18, 12: 1145-1153.
- Flores, F., Rosas, C., Romano, M. y Pérez, M. 2005. Apoptosis y atresia follicular: un binomio esencial en el desarrollo ovárico. *Revista Veterinaria de Mexico*. 36, 01: 87-103.
- Fortune, J. 1993. Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: a limiting factor in improvement of fertility. *Animal Reproduction Science*. 33, 1-4: 111-125.
- Fortune, J. 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*. 78, 3-4: 135-163.
- Fortune, J., Rivera, G. and Yang, M. 2004. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science*. 82-83: 109-126.
- Fuchs, A. 1990. Oxytocin and vasopressin receptors in bovine endometrium and myometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinology*. 127: 629-636.
- Geisert, R., Morgan, G., Short, E. and Zavy, M. Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. *Reproduction Fertility and Development*. 4, 3: 301-305.
- Gertler, A. and Djiane, J. 2002. Mechanism of ruminant placental lactogen action: molecular and in vivo studies. *Molecular Genetics and Metabolism*. 75, 3: 189-201.
- Goff, A. 2004. Steroid hormone modulation of prostaglandin secretion in the ruminant endometrium during the estrous cycle. *Biology of Reproduction*. 71: 11-16.
- Gonella, A., Grajales, H., Hernández, A. 2010. Ambiente receptivo uterino: control materno, control embrionario, muerte embrionaria. *Rev. MVZ. Córdoba*. 15, 1: 1976-1984.
- Gong, J. and Campbell, B. 1995. Evolution of the requirement for FSH and LH during ovarian follicle growth and development in cattle. *Journal of Reproduction and fertility*. 15. Abstract series.
- Gonzales-Stagnaro, C. 2001. Reproducción bovina. Venezuela. Ed. Fundación Girarz.
- Gordon, I. 1999. Reproducción controlada del ganado vacuno y búfalos. Zaragoza España. Ed. Acribia.
- Gorlach, A. 1999. Transferencia de embriones en el ganado vacuno. Zaragoza España. Ed. Acribia.
- Gouveira, M., Melo, D., Carvalho, L., Fuck, E., Trinca, L., Moraes, C. 2004. Do high progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo recipients synchronized with PGF2 $\alpha$  and eCG? *Theriogenology*. 61, 7-8: 1283-1290.
- Grajales, H. 2001. Síndrome de la hembra repetidora de celo. Documento conceptual. Universidad Nacional de Colombia.
- Green, M., Hunter, M. and Mann, G. 2005. Relationships between maternal hormone secretion and embryo development on day 5 of pregnancy in dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 88, 3-4: 179-189.
- Guillomot, M. 1995. Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility*. 49: 39-51.



- Grygar, I., Kudlac, E., Dolezel, R., Nedbalkova, J. 1997. Volume of luteal tissue and concentration of serum progesterone in cows bearing homogeneous corpus luteum or corpus luteum with cavity. *Animal Reproduction Science*. 49: 77-82.
- Hafez, E.S.E. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición. Ed. Mc. Graw Hill.
- Hansen, T., Austin, K., Perry, D., Pru, J., Teixeira, M. and Johnson, G. 1999. Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility* 54: 329-339.
- Hasler, J. 2001. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*. 56, 9: 1401-1415.
- Hasler, J. 2007. Factors that affect embryo transfer conception rates in cattle. Embryo transfer proceedings. Thero/ACT/AETA Joint Convention. 47-66.
- Helmer, S., Britt, J. 1986. Fertility of dairy cattle treated with human chorionic gonadotropin (hCG) to stimulate progesterone secretion. *Theriogenology*. 26, 5: 683-695.
- Hernández, A. 1995. Lecturas sobre reproducción bovina. Aspectos morfológicos de la implantación. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Hernández, A., Escobar, F. y Vásquez. 2003. Mortalidad embrionaria en bovinos. Documento. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Hernández, A. y Jiménez, C. 2000. Lecturas sobre reproducción bovina. El ciclo estral de la vaca. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Hernández, A. y Prieto, E. 2001. Lecturas sobre reproducción bovina. Pubertad en la hembra. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Hernández, A. y Jiménez, C. 2008. Reproducción en la vaca fisiología y aplicaciones. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. Primera edición.
- Hernández Cerón, J. y Zarco, L. 1998. Función del cuerpo lúteo y muerte embrionaria en rumiantes. *Ciencia Veterinaria Mexico* 8:1-28.
- Honaramooz, A. 1999. Neuroendocrinology of gonadotrophin secretion in prepubertal heifers. Thesis, Department veterinary Biomedical Sciences Saskatchewan University.
- Huertas, I. y Huertas, V. 1991. Manual práctico y moderno de inseminación artificial. Transferencia de embriones. Reproducir LTDA.
- Hunter, M., Robinson, R., Mann, G. and Webb, R. 2004. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Animal Reproduction Science*. 82-83: 461-477.
- ICA. 2006. Estadísticas segundo semestre. Cartilla Instituto Colombiano Agropecuario ICA.
- Inskip, E. 2004. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *Journal of Animal Science*. 82: (E. Suppl.):E24-39.
- Jeffcoate, I. and Ayliffe, T. 1995. An ultrasonographic study of bovine cystic ovarian disease and its treatment. *The Veterinary Record*. 136, 16: 406-410.
- Jiménez, C. 2005. Enfermedades transmisibles por la técnica de transferencia de embriones. Memorias, Congreso internacional de reproducción bovina. Laboratorio Intervet, Bogotá Colombia: 35-41.
- Kastelic, J., McCartney, D., Garcia, A., Olson, W. and Mapletoft, R. 1996. Estradiol and MGA for estrus synchronization in cattle. *Theriogenology*. 45, 1: 322.
- Kastelic, J., Pierson, R. and Ginther, O. 1990. Ultrasonic Morphology of a corpora lutea and central luteal cavities during the estrous cycle and early pregnancy in heifers. *Theriogenology*. 34, 3: 487-498.

- Kastelic, J., Bergfeld, D and Ginther, O. 1990. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology*. 33, 6: 1269-1278.
- Kawarsky, S., Basrur, P., Stubbings, R., Hensen, P. and King, W. 1996. Chromosomal abnormalities in bovine embryos and their influence on development. *Biology of Reproduction*. 54: 53-59.
- Kimmins, S. and MacLaren, L. 2001. Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta*. 22, 8-9: 742-748.
- Kinder, J., Kogima, F., Bergfeld, G., Wehrman, M. and Fike, K. 1996. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. *Journal Animal Science* 74:1424-1440.
- King, W. 1990. Chromosome abnormalities and pregnancy failure in domestic animals. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*. 34, 229:250.
- Knight, P., Glister, C. 2001. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction*. 121: 503-512.
- Knobil E., Neill J. 2006 *Physiology of reproduction*. Third edition. Vol. 1. Ed. Elsevier, Academic Press.
- Kotwica, J., Bogacki, M. and Rekawiecki, R. 2002. Neural regulation of the bovine corpus luteum. *Domestic Animal Endocrinology*. 23, 1-2: 299-308.
- Lane, E., Austin, E., Roche, J., Crowe, M. 2001. The effect of Estradiol benzoate on synchrony of estrus and fertility in cattle after removal of a progesterone-releasing intravaginal device. *Theriogenology*. 55, 9: 1807-1818.
- Lee, W., Otsuka, F., Moore, R. and Shimasaki, S. 2001. Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biology of Reproduction*. 65: 944-999.
- Lequarre, A., Vigneron, C., Ribaucour, F., Holm, P., Donnay, I., Dalbies-Tran, R., Callesen, H. and Mermillod, P. 2004. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology*. 63, 3: 841-859.
- Leroy J., Opsomer, G., Vlieghe, S., Vanholder, T., Groossens, L., Geldhof, A., Bols, P., Kruijff, A. and Van Soom, A. 2005. Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. *Theriogenology*. 64, 9: 2022-2036.
- López, F. 2006. Relaciones entre condición corporal y eficiencia reproductiva en vacas Holstein. *Revista Facultad de Ciencias Agrarias* 4,1: 77-86.
- López, H., Caraviello, D., Satter, L., Fricke, P and Wiltbank, M. 2005. Relationship Between Level of Milk Production and Multiple Ovulations in Lactating Dairy Cows. *Journal of animal Science*. 88: 2783-2793.
- Lucy, M. 2001. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *Journal Dairy Science*. 84, 6: 1277-1296.
- Lynch, C., Kenny, D., Childs, S., Diskin, M. 2010. The relationship between periovulatory endocrine and follicular activity on corpus luteum size, function, and subsequent embryo survival. *Theriogenology*. 73: 190-198.
- Machado, R., Taveira, R., Bergamaschi, M., Alvarenga, C., Binelli, M. 2006. Sincronização da ovulação em vacas da raça Nelore e seus efeitos na função ovariana. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento*. 7, 1ª. Edição: P.36.
- Madureira, E., Marques, M., Baruselli, P., Nasser, L., Rodrigues C. 2004. Efeito do tratamento com eCG na taxa de concepção de vacas nelore com diferentes escores de condição corporal inseminadas em tempo fixo (análise Retrospectiva). *Acta Scientiae veterinariae*. 32S: 228.
- Maldonado, J. 2005. Fisiopatología reproductiva en ganado de leche. Memorias, Congreso internacional de reproducción bovina. Laboratorio Intervet, Bogotá Colombia: 41-49.
- Mamani, E., Ortiz, J., Quezada, M. 2007. Evaluación de diferentes dosis de eCG en tratamientos de sincronización de celos en receptoras de embriones. VII simposio de reproducción animal – IRAC. p 275.

- Mann, G., Lamming, G. 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction*. 121: 175-180.
- Mann, G. 2009. Corpus luteum size and plasma progesterone concentration in cows. *Animal Reproduction Science*. 115: 296-299.
- Mann, G., Robinson R. and Hunter, M. 2007. Corpus luteum size and function following single and double ovulations in non-lactating dairy cows. *Theriogenology*. 67, 7: 1256-1261.
- Nogueira, M., Melo, D., Carvalho, L., Fuck, E., Trinca, L. and Moraes, C. 2003. Do progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo recipients synchronized with PGF2 and eCG? *Theriogenology*. 61. 7-8: 1283-1290.
- Markström, E., Svensson, E., Shao, R., Svanberg, B. and Billig, H. 2002. Survival factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation. *Reproduction*. 123: 23-30.
- Martal, J., Chêne, N., Camous, S., Huynh, L., Lantier, F., Hermier, P., Haridon, R., Charpigny, G., Charlier, M. and Chauat, G. 1997. Recent developments and potentialities for reducing embryo mortality in ruminants: the role of IFN- $\tau$  and other cytokines in early pregnancy. *Reproduction Fertility and Development*. 9, 3: 355-380.
- Martinez, M., Adams, G., Kastelic, J., Bergfelt, D., Mapletoft, R. 2000. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. *Theriogenology*. 54: 757-769.
- Melanie, J., Starbuck, A., Dailey, E., Keith, I. 2004. Factors affecting retention of early pregnancy in dairy cattle *Animal Reproduction Science*. 84: 27–39.
- Merton, J., Roos, A., Mullaart, E., Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P. and Dieleman, S. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in cattle breeding industry. *Theriogenology*. 59, 2: 651-674.
- Moore, D., Overton, M., Chebel, R., Truscott, M., BonDurant, R. 2005. Evaluation of factors that affect embryonic loss in dairy cattle. *Journal of the American Medical Association*. 266, 7: 1112-1118.
- Moreno, D., Cuaita, L., Villata, M., Ortisi, F. and Bó, G. 2001. Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology*. 55: 408.
- Murphy, B., Martinuk, S. 1991. Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine Reviews*. 12: 27-44.
- Nasser, L., Reis, E., Oliveira, M., Bó, G., Baruselli, P. 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Animal Reproduction Science*. 82, 83: 479–486.
- Nigro, M., Burry, E., Villata, M. and Bó, G. 2002. Effect of different estrogen and progestagen treatments on superovulatory response in beef and dairy cattle. *Theriogenology*. 57: 769.
- Niswender, G. 2002. Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction*. 123: 333–339.
- Niswender, G., Juengel, J., McGuire, W., Belfiore, C. and Wiltbank, M. 1994. Luteal function: The estrous cycle and early pregnancy. *Biology of reproduction* 50: 234-247.
- Niswender, G., Juengel, J., Silva, P., Rollyson, K. and McIntosh, E. 2000. Mechanisms Controlling the Function and Life Span of the Corpus Luteum. *Physiological Reviews* 80: 1-29.
- Ohnishi, J., Ohnishi, E. and Shibuya, H. and Takahashi, T. 2005. Functions for proteinases in the ovulatory process. *Biochimica et Biophysica Acta* 1751: 95-109.
- Olivera, M., Tarazona, A., Ruiz, T. y Giraldo, C. 2007. Vías implicadas en la luteólisis bovina. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 20: 387-393.
- Ohtani, M., Kobayashi, S., Miyamoto, A., Hayashi, K., Fukui, Y. 1998. Real-time relationships between intraluteal and plasma concentrations of endotelin,

- oxytocin, and progesterone during prostaglandin F<sub>2α</sub>-induced luteolysis in the cow. *Biology of Reproduction*. 58: 103-108.
- Padmanabhan, V. and Mc Neilly, A. 2001. Is there an FSH-releasing factor. *Reproduction*. 121: 21-30.
- Palma, G. 2001. *Biotecnología de la reproducción*. Buenos Aires, Argentina. Ed. INTA, Balcare.
- Pate J. 1994. Cellular components involved in luteolysis. *Journal of animal Science*. 72: 1884-1890.
- Perry, G., Smith, M., Lucy, M., Green, J., Parks, T., MacNeil, M., Roberts, A. Geary, T. 2005. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America Current (PNAS). 102, 14: 5268-5273.
- Perry, G., Smith, M., Roberts, A., MacNeil, M., Geary, T. 2007. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *Journal of Animal Science*. 85: 684-689.
- Pesta, M., Muszynska, A., Kucharsky, J., Superata, J. and Kotwica, J. 1994. Beta adrenergic receptors in corpora lutea from stages of the estrous cycle in conscius and slaughtered cattle. *Biology of Reproduction*. 50: 215-221.
- Peixoto, M., Bergmann, J., Suyama, E., Carvalho, M. and Penna, V. 2007. Logistic Regression analysis of pregnancy rate following transfer of *Bos indicus* embryos into *Bos indicus* X *Bos Taurus* heifers. *Theriogenology*. 67, 2: 287-292.
- Pursley, J., Wiltbank, M. and Stevenson, J. 1997. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at synchronized ovulation or synchronized estrus. *Journal of Dairy Science*. 80, 2: 295-300.
- Rekwot. P. 2004. Effects of feeding maize stover and cottonseed cake on onset of puberty in Bunaji (*Bos indicus*) heifers. *Tropical Animal Health and Production*. 36: 637-644.
- Ribadu, A., Dobson, H. and Ward, W. Ultrasound and progesterone monitoring of ovarian follicular cysts in cows treated with GnRH. 1994. *British Veterinary Journal*. 150, 5: 489-497.
- Ribadu, A. and Nakao, T. 1999. Bovine reproductive ultrasonography. *Journal of Reproduction and Development*. 45, 1: 13-28.
- Richards, J. 2005. Ovulation: New factors that prepare the oocyte for fertilization. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 234: 75–79.
- Rivera, G. Fisiología del ciclo estral de la vaca. 1992. *Revista Argentina de Producción Animal*. No. 12, 3: 287-300.
- Rizzo, A., Minoia, G., Trisolini, C., Manca, R. and Sciorsci, R. 2007. Concentrations of free radicals and beta-endorphins in repeat breeder cows. *Animal Reproduction Science* 100, 3-4: 257-263.
- Roche, J. 2006. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Animal Reproduction Science*. 96: 282-296.
- Rodina, T., Cooke, F., Hansen, P. and Ealy, A. 2009. Oxygen tension and medium type actions on blastocyst development and interferon-tau secretion in cattle. *Animal Reproduction Science*. 111, 2-4: 173-188.
- Rodríguez, J. 2001. Mecanismos para el reconocimiento materno de la preñez en la vaca. En: *Reproducción Bovina*. González-Stagnaro, C. Ed. Fundación Girarz, Maracaibo Venezuela: Cap. III. 29-39.
- Rodríguez, J., Giraldo, G., Castañeda, S., Ruiz, T., Olivera, M. 2007. Análisis multifactorial de las tasas de preñez en programas de transferencia de embriones en Colombia. *Rev. M.V.Z. Córdoba*. 12(2): 978-984.
- Roberts, R., Ealy, A., Alexenko, A., Han, C. and Ezashi, T. 1999. Trophoblast interferons. *Placenta*. 20, 4: 259-264.
- Roberts, R., Chen, Y., Ezashi, T. and Walker, A. 2008. Interferons and the maternal–conceptus dialog in mammals. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 19, 2: 170-177.
- Robinson, J., Sinclair, K. and McEvoy, T. 1999. Nutritional effects on foetal growth. *Animal Science*. 68, 2: 315-329.

- Rodgers, R., Lavranos, T., Van Wezel, I. and Irving, H. 1999. Development of the ovarian follicular epithelium. *Molecular and Cellular Endocrinology*. No. 151, 1-2: 171-179.
- Rosales, A., Guzmán, A. 2008. Apoptosis en la atresia folicular y la regresión del cuerpo lúteo. *Revista técnica pecuaria de México*. 46, 2:159-182
- Rosenfeld, C., Wagner, J., Roberts, R. and Lubahn, D. 2001. Intraovarian actions of oestrogen. *Reproduction*. 122: 215-226.
- Sakase, M., Kawate, N., Nakagawa, C., Fukushima, M., Noda, M., Takeda, K., Ueno, S., Inaba, T., Kida, K., Tamada, H., Sawada. 2006. Preventive effects of CIDR-based protocols on premature ovulation before timed-AI in Ovsynch in cycling beef cows. *The Veterinary Journal*. In press.
- Sanchez, T., Wehrman, M., Bergfeld, E., Petters, K., Kojima, F., Cupp, A., Mariscal, V., Kittok, R., Rasby, R. and Kinder, J. 1993. Pregnancy rate is greater when the corpus luteum is present during the period of progesterin treatment to synchronize time of estrus in cow and heifers. *Biology of Reproduction*. 49: 1102-1107.
- Sangha, G., Sharma, R. and Guraya, S. Biology of corpus luteum in small ruminants. 2002. *Small Ruminants Research*. 43, 1: 53-64.
- Sartori R., Fricke P., Ferreira J., Ginther O., Wilbank M. 2001. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biology of Reproduction*. 65: 1403 – 1409.
- Sartori, R., Rosa, G and Wiltbank, M. 2002. Ovarian Structures and Circulating Steroids in Heifers and Lactating Cows in Summer and Lactating and Dry Cows in Winter. *Journal of Dairy Science*. 85:2813–2822.
- Sartori, R., Haughian, J., Shaver, R., Rosa, G., Wiltbank, M. 2004. Comparison of Ovarian Function and Circulating Steroids in Estrous Cycles of Holstein Heifers and Lactating Cows. *Journal of Dairy Science*. 87: 905-920.
- Saumande, J., Tamboura, D., Chupin, D., 1985. Changes in milk and plasma concentrations of progesterone in cows after treatment to induce superovulation and their relationships with the number of ovulations and of embryos collected. *Theriogenology*. 23: 719–731.
- SAS Institute. Users Guide: Statistics Version 9.3. SAS Institute, 2009.
- Seidel, G., Seidel, S. 1991. Training manual for embryo transfer in cattle. No. 77. Rome. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Senger, P. 2003. Pathways to pregnancy and parturition. Washington, USA. Current conception Inc.
- Schams, D and Berisha, B. 2004. Regulation of Corpus Luteum Function in Cattle. *Reproduction in Domestic Animals*. 39: 241–251.
- Shemesh, M., Dombrowski, L., Gurevich, M., Shore, L., Fuchs, A. and Fields, M. 1997. Regulation of bovine cervical secretion of prostaglandins and synthesis of cyclooxygenase by oxytocin. *Reproduction fertilization*. 9, 5: 525-530.
- Schroeder, H. 2005. Nutrición y sanidad en la biotecnología. Simposio internacional biotecnología reproductiva y redoblamiento de la ganadería colombiana. Universidad San Martín. Bogotá Colombia: 57.
- Siqueira, L., Torres, C., Souza, E., Monteiro, P., Arashiro, E., Camargo, L., Fernandes, C., Viana, J. 2009. Pregnancy rates and corpus luteum-related factors affecting pregnancy establishment in bovine recipients synchronized for fixed-time embryo transfer. *Theriogenology*. 72: 949-958.
- Sirois, J. and Fortune, J. 1990. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology*. 127: 916-925.
- Smith, M., McIntosh E. and Smith, G. 1994. Mechanisms Associated with corpus luteum development. *Journal of Animal Science*. 72, 7: 1857-1872.
- Spell, A., Beal, W., Corah, L., Lamb, G. 2001. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*. 56, 2: 287-297.
- Spencer, T., Burghardt, R., Johnson, G. and Bazer, F. 2004. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Animal Reproduction Science* 82–83: 537-550.

- Spencer, T., Johnson, G., Bazer, F., Burghardt, R. and Palmarini, M. 2007. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reproduction Fertility and Development*, 19: 65-78.
- Spencer, T., Ott, T. and Bazer, F. 1996. Tau interferon: pregnancy recognition signal in the ruminants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 213, 3: 215-229.
- Spey, L., Richards, J. 2006. Ovulation en: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 1, 11: 425-459.
- Starbuck, M., Dailey, R., Inskoop, E. 2004. Factors affecting retention of early pregnancy in dairy cattle. *Animal Reproduction Science*. 82: 27-39.
- Stevenson, J., Kobayashi, Y. and Thompson, K. 1999. Reproductive performance of dairy cows in various programmed breeding systems including Ovsynch and combinations of gonadotropins releasing hormone and prostaglandin F2a. *Journal of Dairy Science*. 82: 506-515.
- Stingfellow, D., Siedel, S. 2000. *Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (I.E.T.S.)*. Illinois U.S.A. Cap. 6, 8 y 9.
- Stocco, C., Telleria, C. and Gibori, C. 2007. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function, and Regression. *Endocrine Reviews*. 28, 1: 117-149.
- Taniguchi, M., Ikeda, A., Arikawa, E., Shimizu, R., Seki, M., Karaki, M., Rajamahendran, R., Otoi, T. 2007. Ovarian follicular and corpus luteum changes, progesterone concentrations, estrus and ovulation following estradiol benzoate/progesterone based treatment protocol in cross-bred cows. *Animal Reproduction Science*. 99: 389-394.
- Thatcher, W., Staples, C., Danet, G., Oldick, B. and Schmitt, E. 1994. Embryo health and mortality in sheep and cattle. *Journal of Animal Science*. 72: 16-30.
- Thibier, M., Nibart, M. 1992. Clinical aspects of embryo transfer in some domestic farm animals. *Animal Reproduction Science*. 28: 139-148.
- Torres, J., Pires, M., Ferreira, A., Viana, J., Camargo, L., Ramos, A., Folhadella, I., Polisseni, J., de Freitas, C., Clemente, A., de Sa Filho, M., Lopes, P. and Baruselli, P. 2008. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*. 69, 2: 155-166.
- Tribulo, H. 2002. *Curso de post-graduação em reprodução bovina. Módulo IV. Transferencia de embriões. CGR. Biotecnología reproductiva*. Cap. 1 y 2.
- Twagiramungu, H., Guilbault, L., Dufor, J. 1995. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle. *Journal Animal Science*. 73: 3141-3151.
- Vale, W., Bilezikjian, L. and River, C. 1994. Reproductive and other roles of inhibins and activins. *Physiology of Reproduction*, 1: 1861-1878.
- Vasconcelos, J., Demétrio, D., Santos, R., Chiari, J., Rodrigues, C., Sá Filho, O. 2006. Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. *Theriogenology*. 65: 192-200.
- Vasconcelos, J., Sartori, R., Oliveira, H., Guenther, J., Wiltbank, M. 2001. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*. 56, 2: 307-314.
- Vasconcelos, J., Silcox, R., Rosa, G., Pursley, J., Wiltbank, M. 1999. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate, after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology*. 52: 1067-1078.
- Vanroose, G., Kruijff, A. and Van Soom, A. 2000. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. *Animal Reproduction Science*. 60-61: 131-143.
- Wathes, D. and Lamming, G. 1995. The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility*. 49: 53-67.
- Webb, R., Garnsworthy, P., Gong, J. and Armstrong, D. 2004. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *Journal Animal Science*. 82: 63-74.
- Wiltbank, J., Zimmerman, D., Ingalls, J., Rowden, W. 1965. Use of progestational compounds alone or in combination with estrogen for synchronization of estrus. *Journal of Animal Science*. 24: 990-994.