

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias de la Salud

Escuela de Medicina Veterinaria

Comparación de los perfiles de progesterona, diámetro folicular y volumen luteal durante el ciclo estral entre vaquillas, primíparas, multíparas y repetidoras en una hacienda del Cantón Mejía, Ecuador.

Francisco Javier Zapata Segovia

Luz María Granados, MVZ. M. Sc.

Directora de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito
para la obtención del título de Médico Veterinario

Quito, mayo de 2015

Universidad San Francisco de Quito

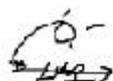
Colegio de Ciencias de la Salud

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Comparación de los perfiles de progesterona, diámetro folicular y volumen luteal durante el ciclo estral entre vaquillas, primíparas, múltiparas y repetidoras en una hacienda del Cantón Mejía, Ecuador.

Francisco Javier Zapata Segovia

Luz María Granados, MVZ. M. Sc.,
Director de Tesis



Gabriela Chávez, MVZ. PCV.,
Miembro del Comité de Tesis

Lenin Vinueza, MVZ. M. Sc.,
Miembro del Comité de Tesis

Ivette Dueñas, MVZ. M. Sc.,
Miembro del Comité de Tesis

Ivette Dueñas, MVZ. M. Sc.,
Decana de la Escuela de Medicina Veterinaria

Quito, mayo de 2015

© DERECHOS DE AUTOR

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

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

Firma:

Nombre: Francisco Javier Zapata Segovia

C. I.: 172320935-7

Fecha: Quito, mayo de 2015

Dedicatoria

Esta tesis está dedicada con mucho cariño a mi familia.
Por ustedes y para ustedes, siempre.

Agradecimientos

Quiero hacer un agradecimiento especial a Luz María Granados, por toda la ayuda brindada en el desarrollo de esta tesis y por el tiempo puesto a disposición a pesar de la distancia y sus responsabilidades como madre y estudiante de doctorado.

También quiero expresar mi agradecimiento a Sebastián Montufar, quien nos permitió utilizar los animales de su explotación para realizar esta investigación.

Resumen

La función ovárica entre vacas Holstein (n=12) de distintos estados reproductivos (vaquillas, primíparas, multíparas y repetidoras) fue evaluada, comparada entre sí y con información publicada. La dinámica folicular, volumen luteal y concentraciones de progesterona (P_4) en suero fueron determinadas mediante ultrasonografía y muestreo sanguíneo durante el ciclo estral. La tasa de crecimiento folicular fue diferente ($P<0,05$) entre vaquillas ($1,54\pm 0,26$ mm/d), primíparas ($2,72\pm 0,77$ mm/d), multíparas ($6,63\pm 0,78$ mm/d) y repetidoras ($1,86\pm 0,28$ mm/d). El diámetro máximo del folículo dominante independientemente de la onda fue diferente ($P<0,05$) encontrándose menores diámetros en vaquillas ($12,56\pm 2,98$ mm) y mayores en multíparas ($20,52\pm 1,99$ mm). De igual manera, el diámetro de los subordinados fue diferente ($P<0,05$) entre los grupos. Al comparar con información referencial, el diámetro máximo del folículo ovulatorio fue menor ($P<0,01$) en la presente investigación en comparación con 19 publicaciones ($13,5\pm 3,3$ mm vs. $17,18\pm 2,3$ mm). El volumen luteal fue menor ($P<0,01$) en esta investigación respecto a la información de 20 publicaciones ($6329,35\pm 2089,04$ vs. $8515,01\pm 2127,37$ mm³). Todos los grupos de la presente investigación mostraron AUC de P_4 mayores que los generados a partir de 17 investigaciones para vaquillas ($P<0,05$), primíparas ($P<0,01$), multíparas ($P<0,05$) y repetidoras ($P<0,01$). La concentración máxima de P_4 alcanzada durante el ciclo estral de los animales de este estudio fue mayor ($P<0,01$) en comparación a las concentraciones de 17 publicaciones ($9,26\pm 3,17$ ng/ml vs. $5,19\pm 1,76$ ng/ml). En esta investigación se evidencian diferencias de función ovárica entre vacas de distintos estados reproductivos. Además, los animales de la presente investigación tienen mayor concentración de P_4 , menor diámetro folicular y menor volumen luteal en comparación con valores referenciales.

Palabras clave: progesterona, Holstein, estral, folículo, luteal.

Abstract

Ovarian function between Holstein cows ($n = 12$) of different reproductive stages (heifers, primiparous, multiparous and repeat-breeders) was evaluated in comparison to each other and to published information. Follicular dynamics, luteal volume and serum progesterone (P_4) concentrations were determined by ultrasonography and blood sampling during the estrous cycle. Follicular growth rate was different ($P < 0,05$) between heifers ($1,54 \pm 0,26$ mm/d), primiparous ($2,72 \pm 0,77$ mm/d), multiparous ($6,63 \pm 0,78$ mm/d) and repeat-breeders ($1,86 \pm 0,28$ mm/d). The maximum diameter of the dominant follicle regardless of the wave was different ($P < 0,05$); smaller diameters were found in heifers ($12,56 \pm 2,98$ mm) and higher diameters in multiparous ($20,52 \pm 1,99$ mm). Similarly, the diameter of subordinate was different ($P < 0,05$) between groups. Compared to reference information, the maximum diameter of the ovulatory follicle was lower ($P < 0,01$) in the present investigation compared with 19 publications ($13,5 \pm 3,3$ mm vs. $17,18 \pm 2,3$ mm). Luteal volume was lower ($P < 0,01$) in this research in comparison to the information of 20 publications ($6329,35 \pm 2089,04$ vs. $8515,01 \pm 2127,37$ mm³). All of the groups of this study showed higher P_4 AUC than those generated from 17 investigations for heifers ($P < 0,05$), primiparous ($P < 0,01$), multiparous ($P < 0,05$) and repeat-breeders ($P < 0,01$). The maximum concentration of P_4 reached during the estrous cycle in the animals of this study was higher ($P < 0,01$) compared to the concentrations of 17 publications ($9,26 \pm 3,17$ ng/ml vs. $5,19 \pm 1,76$ ng/ml). Certain differences of ovarian function between cows of diverse reproductive stages are evident. In addition, animals of this research have higher concentrations of P_4 , lower follicular diameter and lower luteal volume compared to reference values.

Key words: progesterone, Holstein, estrous, follicle, luteal.

Tabla de contenido

Resumen	7
Lista de figuras	11
Lista de cuadros.....	12
Introducción.....	13
1. Ciclo estral en la vaca	17
1.1. Regulación hormonal del ciclo estral.....	25
1.2. Foliculogénesis	30
1.3. Luteinización	49
2. Efectos fisiológicos de la progesterona	72
3. Ciclo estral y niveles de progesterona en vacas de distintos estados reproductivos	75
3.1. Ciclo estral y niveles de P4 en vaquillas.....	75
3.2. Ciclo estral y niveles de P4 en vacas primíparas	80
3.3. Ciclo estral y niveles de P4 en vacas multíparas	81
3.4. Ciclo estral y niveles de P4 en vacas repetidoras	83
4. Digitalización de datos a partir de imágenes.....	86
5. Cálculo del área bajo la curva mediante la regla del trapecio.....	88
Hipótesis.....	90
Objetivo general	90
Objetivo específico.....	91
Metodología.....	92
Resultados	97
Perfiles de función ovárica en vaquillas, primíparas, multíparas y repetidoras de esta investigación	97
<i>Dinámica folicular, desarrollo luteal y perfil de P₄ por individuo (n=12)</i>	97
<i>Día de luteolisis</i>	104
<i>Concentraciones de Progesterona (ng/ml) en los animales estudiados (n=12)</i> ...	105
Comparación de perfiles de P ₄ , diámetro folicular y volumen luteal con información publicada.....	106
Discusión/análisis de los resultados	111

<i>Dinámica folicular entre los animales de esta investigación</i>	111
<i>Intervalo interestro</i>	114
<i>Emergencia</i>	115
<i>Tasa de crecimiento folicular</i>	115
<i>Máximo tamaño folicular</i>	116
<i>Tamaño de subordinados</i>	118
<i>Día de luteolisis</i>	118
<i>Volumen del CL</i>	119
<i>Progesterona</i>	120
<i>Progesterona AUC</i>	123
<i>Comparación con información publicada</i>	124
Conclusiones	127
Recomendaciones.....	129
Referencias	131
Apéndices	156

Lista de figuras

Fig 1	Términos y conceptos relacionados con las etapas folicular y lútea.....	18
Fig 2	Términos relacionados con la emergencia de la onda folicular..	20
Fig 3	Diagrama esquemático que representa los mecanismos de retroalimentación.. ...	25
Fig 4	Centro tónico y cíclico en el hipotálamo.....	26
Fig 5	Eminencia media del hipotálamo y sistema sanguíneo hipofisiario..	27
Fig 6	Resumen esquemático de la secreción de LH y FSH.....	28
Fig 7	Representación esquemática de la morfología ovárica..	31
Fig 8	Dinámicas del desarrollo folicular ovárico y la secreción de gonadotropinas.....	32
Fig 9	Reclutamiento, selección y dominancia en un patrón de 3 ondas foliculares.....	33
Fig 10	Patrones de secreción de FSH, LH, P4 y E2 y de crecimiento folicular.....	35
Fig 11	Modelo esquemático de la naturaleza de la desviación folicular en vacas..	38
Fig 12	Desarrollo de dominancia..	39
Fig 13	Biosíntesis de esteroides en el ovario.....	45
Fig 14	Modelo esquemático de los genes involucrados en la biosíntesis de colesterol .	45
Fig 15	Representación de la expresión de ANPT-2 en relación a ANPT-1..	53
Fig 16	Esquema que representa el desarrollo de un CL a partir de un folículo.....	56
Fig 17	Modelo de segundo mensajero y la regulación de las células luteales.....	60
Fig 18	Representación del rol de DBI y PBR en la biosíntesis de esteroides.	61
Fig 19	Rol de la prostaglandina-F2 α (PGF) en el control de la luteolisis.	63
Fig 20	Esquema de los factores posiblemente involucrados en la luteolisis en vacas. .	66
Fig 21	Vía de biosíntesis de progesterona en una célula lutea genérica..	69
Fig 22	Niveles de LH y FSH de terneras desde el nacimiento hasta 12 meses.....	76
Fig 23	Niveles plasmáticos de 17 β - estradiol y progesterona en vaquillas maduras.	76
Fig 24	Niveles de 17-estradiol y P4 alrededor del momento del primer estro.....	78
Fig 25	Patrones foliculares, desarrollo luteal y nivel de P4 de vaquillas nulíparas.	97
Fig 26	Patrones foliculares, desarrollo luteal y nivel de P4 de vacas primíparas.	98
Fig 27	Patrones foliculares, desarrollo luteal y nivel de P4 de vacas multíparas.....	99
Fig 28.	Patrones foliculares, desarrollo luteal y nivel de P4 de vacas repetidoras.....	100
Fig 29.	Tasa de crecimiento folicular (mm/d) en la onda ovulatoria entre grupos.	103
Fig 30.	Diámetro folicular máximo alcanzado entre grupos	103
Fig 31.	Diámetro folicular máximo alcanzado por los folículos subordinados.....	104
Fig 32.	Concentraciones de P ₄ (ng/ml) durante el ciclo por grupos	105
Fig 33.	Perfiles de P ₄ en vaquillas, primíparas, multíparas y repetidoras	106
Fig 35.	AUC de P ₄ de publicaciones y de resultados de la presente investigación.	108
Fig 34	AUC de P ₄ de publicaciones y de los grupos de la presente investigación.....	107
Fig 36.	Niveles máximos de P ₄ en publicaciones y de la presente investigación.....	109

Lista de cuadros

Cuadro 1. <i>Descripción de los grupos de estudio</i>	92
Cuadro 2. <i>Parámetros a comparar entre vaquillas, primíparas, multíparas y repetidoras (media \pm desviación estándar).</i>	101
Cuadro 3 <i>Análisis de Kruskal-Wallis de los parámetros obtenidos en vaquillas, primíparas, multíparas y repetidoras</i>	102
Cuadro 4. <i>Estimación del día de luteolisis</i>	104
Cuadro 5. <i>Niveles de P_4 (ng/ml) en animales (n=7) con CL funcional al día 19</i>	105
Cuadro 6. <i>AUC de P_4 (Media \pm D.E.) entre la información publicada para cada grupo y los resultados de esta investigación</i>	107
Cuadro 7. <i>t-Student del AUC (ng/ml) entre vaquillas, primíparas, multíparas y repetidoras</i>	107
Cuadro 8. <i>t-Student del AUC (ng/ml) entre información publicada y la presente investigación</i>	108
Cuadro 9. <i>t-Student de las concentraciones de P_4 (ng/ml) entre información publicada y la presente investigación</i>	109
Cuadro 10. <i>t-Student del diámetro máximo del folículo ovulatorio entre información publicada y la presente investigación</i>	109
Cuadro 11. <i>t-Student del volumen lúteo máximo durante el ciclo entre información publicada y la presente investigación</i>	110

Introducción

La eficiencia reproductiva tiene un impacto importante en la rentabilidad de las operaciones ganaderas, incluyendo los hatos lecheros (Wiltbank, López, Sartori, Sangsritavong y Gümen, 2006). En investigaciones se ha descrito la ineficiencia reproductiva en vacas lecheras en lactación y en los últimos años se ha convertido en una situación particularmente alarmante (Lucy, 2001; Royal, 2000). La disminución de la fertilidad se ha expresado en parámetros como días abiertos incrementados, aumento de servicios por concepción y días al primer servicio y en una reducción en la tasa de detección de estro (Washburn, Silvia, Brown, McDaniel y McAllister, 2002).

La fertilidad es un rasgo multifactorial y su deterioro ha sido causado por factores genéticos, fisiológicos, nutricionales, ambientales y de manejo, sumado a la compleja interacción entre ellos; lo cual hace difícil determinar la razón exacta para su disminución (Walsh, Williams y Evans, 2011). Simultáneamente con la selección de los animales para aumentar la producción de leche, se ha observado una disminución de la fertilidad en las vacas lecheras en las últimas décadas (López-Gatius, 2003). Por esta razón, se ha asociado la alta producción de leche con cambios fisiológicos que provocan la disminución de la eficiencia reproductiva (Wiltbank et al., 2006). Washburn et al. (2002) analizaron la relación entre la tasa de concepción y la producción en vacas lecheras durante un periodo de 20 años (1976-1999) y determinaron que la tasa de concepción disminuyó de 55% a 35% durante este período, mientras que la producción de leche aumentó dramáticamente. Anteriormente, se había observado una reducción en la duración e intensidad del comportamiento de estro (Dransfield, Nebel, Pearson y Warnick, 1998), y un estudio realizado por Lopez, Satter y Wiltbank (2004) lo confirma al determinar que en promedio la duración del estro es menor en vacas en lactación con una duración de menos de 8 horas. Otros estudios demostraron además que la tasa de

concepción es menor en vacas en lactación en comparación con vaquillas (25-40% y 60-75%, respectivamente) (Lucy, 2001; Pursley, 1997 y Washburn, Silvia, Brown, McDaniel y McAllister, 2002). Conjuntamente, se ha reportado que la pérdida embrionaria es mucho mayor en vacas en lactancia en relación a vaquillas (Santos, Thatcher, Chebel, Cerri y Galvao, 2004). Varias investigaciones en vacas de alta producción comprueban una alta incidencia de irregularidades reproductivas como quistes ováricos (Wiltbank, Gümen y Sartori, 2002), retraso en la ovulación (Royal et al., 2000), y partos gemelares (Kinsel, Marsh, Ruegg y Etherington, 1998). En contraste, las vaquillas nulíparas han presentado menos anomalías reproductivas y su tasa de concepción ha estado siempre por encima del 70% (Pursley et al., 1997).

Dichos hallazgos han conducido a investigar tanto los efectos de la paridad sobre la fertilidad, como la función ovárica en vacas de varios estados reproductivos. Por ejemplo, Balendran et al. (2008) demostraron que la paridad tiene un efecto significativo sobre la tasa de preñez, observándose una menor tasa conforme aumenta el número de partos. Dichos resultados han sido ratificados en otros reportes (Butler y Smith, 1989, Pryce, Royal, Garnsworthy y Mao, 2004) que demuestran que la tasa de preñez se ve reducida en vacas lactantes en comparación con vaquillas. Por otro lado, Sartori et al. (2004) comparan distintos estados reproductivos y observan que las vaquillas tienen menor diámetro folicular y menor volumen luteal pero mayor concentración de E_2 y P_4 que vacas lactantes; y concluyen que dicha disminución en la circulación puede estar relacionada ya sea a una menor esteroidogénesis o a un mayor metabolismo esteroide en vacas lactantes. Previamente, en el 2002, Sartori y sus colaboradores realizaron dos experimentos en un mismo estudio, donde evalúan el desarrollo folicular y luteal y las concentraciones de esteroides circulantes en vaquillas, vacas lactantes y vacas secas no preñadas. Sus resultados demuestran que no existen

diferencias en el diámetro del folículo ovulatorio entre vaquillas y lactantes; sin embargo, las vacas lactantes tienen menor concentración de E_2 y P_4 . En contraste, las concentraciones de E_2 y P_4 fueron similares entre lactantes y vacas secas no preñadas a pesar de que las lactantes tuvieron estructuras ováricas más grandes.

Por otro lado, en el grupo de vacas subfértiles conocidas como repetidoras, también se han estudiado diferencias a nivel de función ovárica. Pérez-Marín y España (2007) experimentan con vacas repetidoras y encuentran que algunas pueden presentar ciclos normales (con perfiles de P_4 y patrones ováricos aparentemente normales) y otras pueden presentar ciclos irregulares (con fase lútea prolongada, quistes ováricos, disfunción luteal, etc.). Observan además, vacas repetidoras que presentan signos de estro y otras que exhiben estros silentes; demuestran finalmente que aquellas que no presentaron signos tuvieron niveles de P_4 más elevados que aquellas que si los presentaron.

De acuerdo a lo anterior, los posibles factores causales relacionados a la diferencia de fertilidad entre vaquillas, vacas lactantes y repetidoras con ciclos normales son las diferencias en el desarrollo folicular y concentraciones hormonales circulantes. Es por esto que el objetivo principal de esta investigación es describir y comparar la dinámica de la morfología ovárica y hormonas reproductivas durante el ciclo estral de diferentes estados reproductivos como un paso primordial en la examinación tanto de la fertilidad variable como de las razones de fertilidad disminuidas en vacas lecheras.

Simultáneamente, describir la función ovárica permite la generación de información acerca del comportamiento reproductivo en animales de esta localidad. Las biotecnologías reproductivas aplicadas en el Ecuador generalmente han sido extraídas de investigaciones científicas desarrolladas en condiciones diferentes a las del país.

Particularmente, se ha observado en dos investigaciones previas realizadas en distintas haciendas de la serranía ecuatoriana, que las concentraciones de progesterona tienen patrones diferentes durante el ciclo estral y durante la inseminación artificial (Freile y Añasco, 2011, datos no publicados; Gallmeier, 2013); sin embargo, los índices de preñez en dichos animales no se han visto afectados (Gallmeier, 2013) lo cual genera incongruencia con lo anteriormente publicado. Por esta razón, es necesario establecer los perfiles hormonales y patrones ováricos que se presentan en los ciclos estrales de las vacas en nuestro medio y compararlos con los de investigaciones de otros países para aclarar la confusión generada.

Finalmente, el propósito de esta investigación es usar el conocimiento emergente para desarrollar aplicaciones prácticas más efectivas que regulen la fertilidad de acuerdo al estado reproductivo del individuo.

Revisión de la literatura

1. Ciclo estral en la vaca

El patrón cíclico de la actividad ovárica es lo que permite a las hembras ir desde un período de no-receptividad hacia uno de receptividad, lo cual finalmente permite el apareamiento y posteriormente el establecimiento de la gestación; a dicho patrón cíclico se lo representa mediante el ciclo estral (Forde et al., 2011). El ciclo ovárico es fundamental para la función reproductiva; y se caracteriza por patrones repetidos de proliferación celular, diferenciación y transformación que abarcan tanto el desarrollo folicular y la ovulación como la formación y funcionamiento del cuerpo lúteo (CL) (Schams y Berisha, 2004).

La pubertad puede definirse como la etapa en la cual la hembra ha adquirido la capacidad de producir descendencia exitosa; además, la primera ovulación en la vida del animal inicia un patrón rítmico de ciclicidad reproductiva (Peter, Levine, Drost y Bergfelt, 2009). Dicha etapa ocurre en vacas entre los 6 y 12 meses de edad (200-250kg de peso) (Forde et al., 2011). La base del ciclo estral es que las hembras tengan varias oportunidades para poder gestarse, ya que cada ciclo estral usualmente termina con una ovulación al final del estro (Peter et al., 2009).

La longitud del ciclo estral puede referirse ya sea a la detección del estro hasta la detección del siguiente estro, o desde la detección de la ovulación hasta la detección de la siguiente ovulación (conocido también como intervalo interovulatorio) (Peter et al., 2009).

En general, la literatura describe que la longitud del ciclo estral en vacas de carne y en vacas lecheras va desde los 18 a 24 días; y consiste en dos fases: una fase lútea que dura entre 14-18 días y una fase folicular que dura entre 4-6 días (Forde et al.,

2011). La fase lútea es el período que sigue luego de la ovulación cuando el cuerpo lúteo (CL) se forma; a menudo, este período es dividido en metaestro y diestro (Forde et al., 2011; Peter et al., 2009). Por otro lado, la fase folicular es el período que comprende desde la lisis del cuerpo lúteo o luteolisis hasta la ovulación; generalmente se divide a este período en proestro y estro (Fig. 1) (Forde, et al., 2011; Peter et al., 2009). Durante la fase folicular ocurre la maduración y ovulación del folículo ovulatorio; el oocito es liberado al oviducto permitiendo la fertilización (Blondin y Sirard, 1995; Forde, et al., 011).

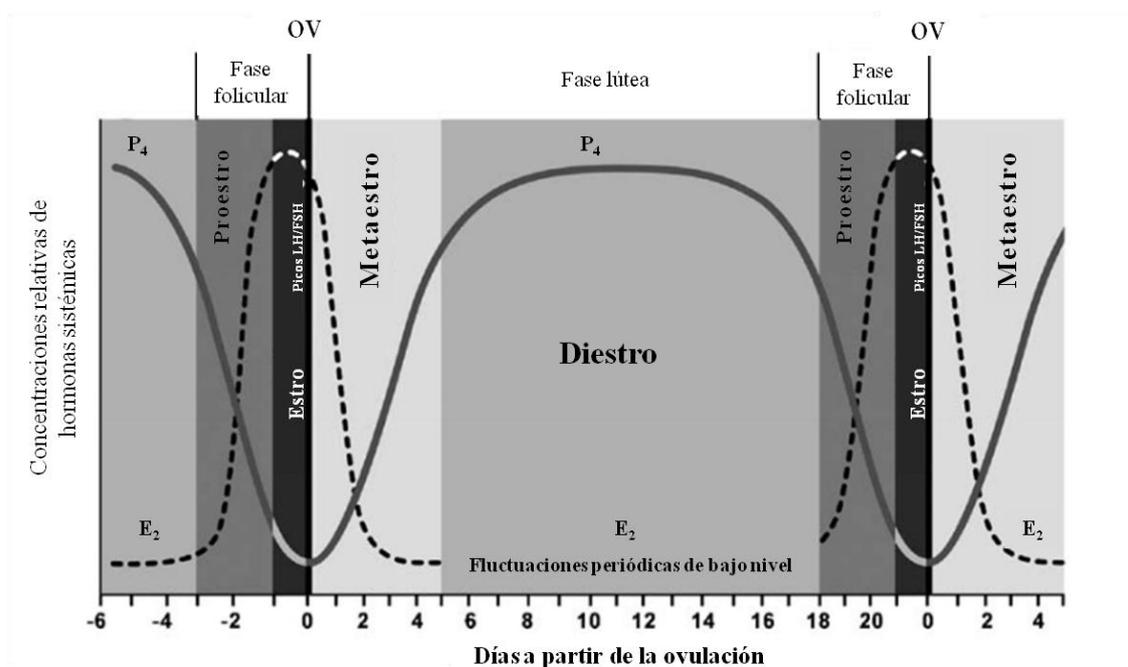


Fig 1. Términos y conceptos relacionados con las etapas dentro de las fases folicular y lútea en asociación con los respectivos cambios en las concentraciones circulantes de estradiol (E2), progesterona (P4) y pico preovulatorio (OV) de gonadotropinas durante el ciclo estral bovino. Adaptado de Peter et al. (2009).

Mantenerse quietas para dejarse montar por un toro o por otra vaca del hato es el signo principal y definitivo del estro en vacas (Forde et al., 2011). Los estrógenos, especialmente el estradiol, son la señal principal hacia el cerebro que induce la expresión del estro, pero únicamente en presencia de concentraciones reducidas de progesterona (Vailes, Washburn y Britt, 1992).

Se ha calculado el promedio de duración del estro en vacas lecheras y se determinó puede durar 8,1 horas con 9,1 montas registradas durante el estro (Diskin, 2008). Hay evidencia que la duración del estro disminuye conforme la producción de leche aumenta (14,7h y 2,8h en vacas de 25 y 55 kg de leche, respectivamente) (Forde et al., 2011). En un estudio realizado por López et al. (2004), se demostró mediante un sistema de monitoreo de estro electrónico que vacas con producción de leche superior al promedio (~40kg/día) tienen menor duración de celo ($6,2\pm 0,5$ h) comparado con vacas de baja producción ($10,9\pm 0,7$ h). En vaquillas, aparentemente la duración del celo es de 12-14 horas (Diskin, 2008). De todas maneras, está claro que tasas bajas de detección de estro reducen la eficiencia reproductiva en fincas lecheras (Wiltbank et al., 2006).

De acuerdo a Diskin (2008), tanto la duración del estro como la intensidad de su expresión pueden verse afectadas por una variedad de factores estresores medioambientales dentro de los cuales puede incluirse el tipo superficie en la que se encuentran los animales, el tamaño del grupo sexualmente activo y la presencia de toro, entre otras.

De acuerdo a lo anterior, tanto fisiológica como conductualmente, el ciclo estral consiste en una fase folicular (con proestro y estro) y una fase lútea (con metaestro y diestro). Sin embargo, existen distinciones morfológicas, fisiológicas y endócrinas entre dichas etapas las cuales serán revisadas a continuación:

Fase folicular

Es un período relativamente corto del ciclo estral y va desde el inicio de la regresión del cuerpo lúteo (CL) hasta la ovulación; es decir involucra al proestro y estro (Peter et al., 2009). Esta fase se caracteriza por el inicio del comportamiento de estro y el cambio de dominio de progesterona al dominio de los estrógenos, principalmente

como resultado de la regresión estructural y funcional del cuerpo lúteo maduro hacia un cuerpo albicans (disminución de progesterona) y el desarrollo del un folículo preovulatorio (incremento de estradiol) (Peter et al., 2009)

Proestro

Es el inicio de la fase folicular que comienza con la regresión funcional y estructural del CL, que en consecuencia provoca la disminución de progesterona (P_4); posteriormente, hay un aumento de estradiol (E_2) el cual juega un rol en el aumento del tono uterino (Bonafos, Kot y Ginther, 1995) y en la descarga de un moco acuoso claro desde la vulva característica de que el animal está iniciando su etapa de estro (Peter et al., 2009). La dinámica folicular durante el proestro involucra la regresión continua del folículo dominante de la onda anovulatoria previa que se superpone con el crecimiento del folículo dominante de la onda ovulatoria (Fig. 2).

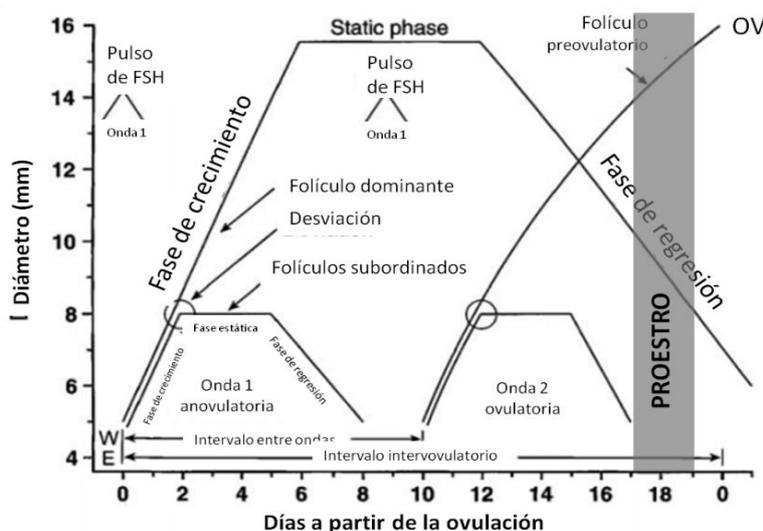


Fig 2. Términos relacionados con la emergencia de la onda folicular y el posterior desarrollo de la onda 1 (anovulatoria) y onda 2 (ovulatoria,) en asociación con los respectivos aumentos repentinos de FSH durante el ciclo estral bovino. Adaptado de Ginther (1998).

Estro

Finalmente la fase folicular termina en la presentación del estro el cual a su vez concluye con la ovulación del folículo dominante; sin embargo, para que esto ocurra es

necesario que las concentraciones de estradiol alcancen su pico y de esta manera inicie la receptividad sexual (comportamiento de estro y descarga de moco desde la vulva). El crecimiento final y la maduración del folículo preovulatorio ocurren en asociación con la disminución de las concentraciones de estradiol y el pico de gonadotropinas preovulatorias principalmente LH y en menor medida FSH; y así finalmente, la ovulación se da aproximadamente 29 horas después (Peter et al., 2009).

La detección del comportamiento de monta asociado al estro es presentado por aproximadamente el 90% de las vacas (Roelofs, Van Eerdenburg, Soede y Kemp, 2005). La posición de estro con el arqueo del lomo es una postura que se da durante el apareamiento y que se conoce como lordosis, es el signo más definitivo y característico del estro (Peter et al., 2009). Además de este, existen otros signos de celo secundarios dentro de los cuales se incluyen: rastrear, olfatear los genitales e intentar montar a otros animales, descarga mucosa con hinchazón y enrojecimiento de la vulva, incremento de la vocalización inquietud, descansar la barbilla sobre otra vaca y arrugar el labio superior (reflejo de Flehmen) (Boer, Veerkamp, Beerda y Woelders, 2010; Peter et al., 2009). Los términos “estro silente” y “ovulación silente” han sido usados para describir la ocurrencia de ovulación sin la presencia de signos de estro (Allrich, 1993) y es una condición que ha sido asociada a la ovulación de vacas en lactación post-parto; de hecho, se ha reportado que la ocurrencia de ovulaciones silentes a la primera, segunda, tercera y cuarta ovulación post-parto es de 83%, 46%, 13% y 0%, respectivamente (Isobe, Yoshimura, Yoshida y Nakao, 2004).

Ovulación

El evento final del estro se caracteriza por la ruptura del folículo dominante, evacuación del fluido folicular, células de la granulosa y el oocito; además empieza a

desarrollarse cuerpo lúteo (CL) en el sitio de ruptura, a este proceso en general se lo conoce como ovulación (Peter et al., 2009).

A pesar que de las vacas son consideradas monotocas (que generalmente ovulan un solo folículo dominante), puede existir ovulaciones múltiples espontáneas que pueden estar influenciadas por varios factores como: raza, paridad, nutrición y estado reproductivo (Sartori et al., 2004). En un estudio realizado en 2005 que involucro 1917 vacas lecheras de alta producción, el porcentaje de ovulaciones dobles fue de 16% y el de ovulaciones triples fue de 5,8% (López-Gatius, Lopez-Bejar, Fenech y Hunter, 2005).

Fase lútea

Es el período más largo del ciclo estral (80% del ciclo) y comprende desde la ovulación hasta la regresión del cuerpo lúteo, lo cual involucra al metaestro y diestro. Esta fase se caracteriza por el cambio de dominancia de estrógenos a dominancia de progesterona (Wettemann, Hafs, Edgerton y Swanson, 1972), ya que luego de la ovulación disminuye el estradiol y la maduración funcional y estructural del CL aumenta las concentraciones de progesterona. Sin embargo, hay fluctuaciones de bajas concentraciones de estradiol asociado con la aparición o emergencia periódica de ondas foliculares y el correspondiente pulso de FSH (Fig. 1) (Peter et al., 2009)

Metaestro

Es el período inmediato después del estro y se extiende por 5 días luego de la ovulación. Esta etapa involucra la luteinización de las células foliculares del folículo dominante previo (Peter et al., 2009). El proceso de luteinización involucra el remodelamiento del estroma y del tejido vascular y la transformación de las células productoras de andrógenos (teca) y estrógenos (granulosa) en células luteales productoras de progesterona (Niswender, Juengel, Silva, Rollyson y McIntush, 2000).

En vacas, la formación temprana de la glándula lútea se asocia con la formación de una cavidad intralútea transitoria llena de sangre a cual se la conoce como cuerpo hemorrágico (Niswender et al., 2000). Al final del metaestro, el CL completa su transformación estructural y funcional observándose mediante ultrasonografía con una ecodensidad homogénea o en ocasiones heterogénea con una cavidad intralútea llena de fluido anecoico conocido como cuerpo lúteo cavitario (Peter et al., 2009). Durante el metaestro el útero desprende algo de su epitelio endometrial (Hansel y Asdell, 1952), particularmente a nivel de las áreas intercarunculares lo cual conlleva a la presencia de moco sanguinolento en los labios vulvares (Peter et al., 2009).

Diestro

Esta etapa empieza después del metaestro y termina alrededor del inicio de la regresión del CL. El final del metaestro se caracteriza por el cese del sangrado, ausencia de comportamiento de estro y por un CL relativamente maduro con incremento sistémico de las concentraciones de progesterona. A lo largo del diestro, el CL maduro mantiene concentraciones máximas de progesterona durante la emergencia de la segunda onda folicular y la tercera onda folicular (Peter et al., 2009).

Durante la fase de diestro, la concentración de progesterona permanece elevada, mientras que las ondas de desarrollo folicular continúan llevándose a cabo por la liberación de FSH desde la pituitaria anterior (Forde et al., 2011). Sin embargo, esos folículos dominantes que crecen durante la fase lútea del ciclo estral no ovulan (Forde et al., 2011). La progesterona domina la fase lútea del ciclo estral, y a través de un “feedback” o retroalimentación negativa permite la secreción de pulsos de LH de mayor amplitud pero menor frecuencia que son inadecuados para la ovulación del folículo dominante (Rahe, Owens, Fleeger, Newton y Harms, 1980).

Durante la fase lútea temprana los pulsos de LH tienen menor amplitud y mayor frecuencia (20-30 pulsos/24h), durante la fase lútea media son mayores en amplitud y menores en frecuencia (6-8 pulsos/24h) y en ambas situaciones la amplitud y frecuencia son insuficientes para la maduración y subsecuente ovulación del folículo dominante (Rahe et al., 1980). Por esta razón, el folículo dominante producido durante la fase lútea del ciclo estral experimenta atresia, la producción de E2 e inhibina disminuye y remueve el bloqueo de la retroalimentación negativa del hipotálamo/pituitaria, la secreción de FSH puede entonces aumentar y una nueva onda folicular emerge (Forde et al., 2011).

Durante la mitad de la fase lútea, estas altas concentraciones de progesterona sostenidas causan una regulación decreciente o “downregulation” del receptor nuclear de progesterona en el epitelio luminal del endometrio (Kimmins y MacLaren, 2001). Este es un “interruptor” crítico que permite el incremento o disminución sincrónica de los genes del endometrio que son necesarios para iniciar la receptividad uterina, independientemente del estado de reproductivo (Spencer, Sandra y Wolf, 2008). Si es que al día 16 de ciclo estral, el reconocimiento de la señal de preñez (interferon tau) no ha sido detectada en cantidades suficientes, ocurrirá luteolisis (Forde et al., 2011).

En la ausencia de preñez, la regresión funcional y estructural del CL ocurre de manera espontánea principalmente en respuesta a la $PGF_{2\alpha}$ durante el diestro tardío (Kindahl, Edqvist, Granström y Bane, 1976).

El término luteolisis ha sido usado para referirse a la regresión o lisis del cuerpo lúteo; sin embargo, los términos “regresión luteal” describen de manera más apropiada la secuencia compleja de eventos moleculares sincronizados que se asocian con la “muerte” del CL (Bowen-Shauver y Telleria, 2003) a estos términos se pueden sumar otros como “funcional o endocrinológica” y “estructural o morfológica” para aclarar el

contexto en el cual la regresión luteal se presenta. En definitiva, el cuerpo lúteo sufre regresión estructural (disminuye en diámetro) y funcional (disminuye su secreción de progesterona) y animales no gestantes para formar al cuerpo albicans (remanente del CL) dando lugar nuevamente al inicio del proestro (Peter et al., 2009).

1.1.Regulación hormonal del ciclo estral

Las vacas son animales poliéstricos y que presentan comportamiento de estro cada 21 días en promedio. La hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas (GnRH), las hormonas de la pituitaria anterior como la hormona foliculoestimulante (FSH) y la luteinizante (LH), las hormonas ováricas como progesterona (P₄), estradiol (E₂) e inhibinas; y la hormona uterina prostaglandina F_{2α} (PGF), son las hormonas que regulan el ciclo estral mediante un sistema de retroalimentaciones o “feedbacks” positivas y negativas (Fig. 3) (Forde et al., 2011).

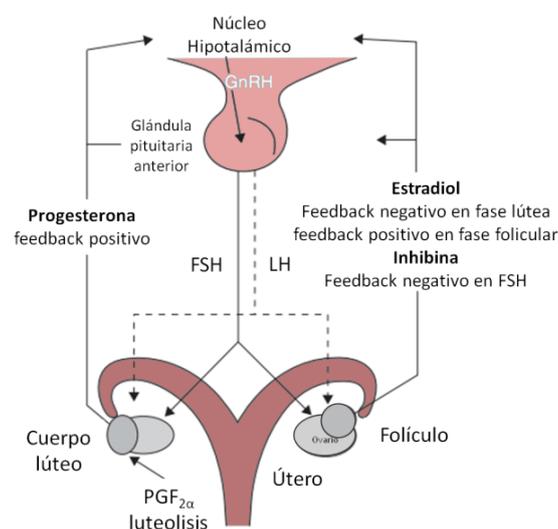


Fig 3. Diagrama esquemático que representa los mecanismos de retroalimentación o “feedback” endócrinos del eje hipotálamo-pituitaria-ovario-útero que regulan el ciclo estral en bovinos. La hormona luteinizante (LH) y la foliculoestimulante (FSH) son secretadas por la glándula pituitaria anterior. Los pulsos de LH están estrechamente relacionados con los pulsos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) producida en el hipotálamo. La frecuencia del pulso de la GnRH y en consecuencia de la LH son reguladas por un mecanismo de feedback negativo por el estradiol y la progesterona durante la fase lútea, mientras que en la fase folicular hay un feedback positivo de estradiol (en ausencia de P₄) desde el foliculo preovulatorio que induce la secreción de GnRH, LH y FSH. La secreción de FSH requiere de GnRH pero está regulada por mecanismo de feedback de estradiol e inhibinas. Adaptado de Crowe (2011).

En 1971, Schally y colaboradores aíslan un polipéptido del hipotálamo porcino que estimula la liberación de las gonadotropinas y lo llaman Hormona Liberadora de Gonadotropinas o GnRH (por sus siglas en inglés: Gonadotropin-Releasing Hormone). Determinan que dicha GnRH controla el ciclo estral mediante la regulación de la secreción de gonadotropinas (FSH y LH) en la pituitaria anterior.

En el hipotálamo hay dos centros de secreción de GnRH, un centro tónico y un centro cíclico. El centro tónico produce una secreción pulsátil de niveles basales de GnRH; mientras que el centro cíclico produce un aumento preovulatorio de GnRH. Ambas formas de secreción previenen la desensibilización del receptor de GnRH en las células gonadotropas de la pituitaria anterior (Fig. 4) (Forde et al., 2011).

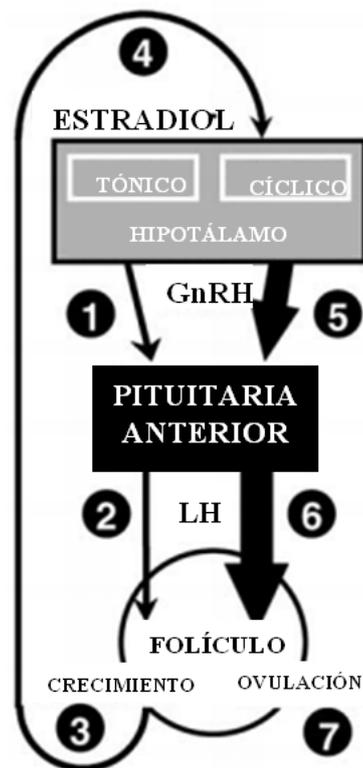


Fig 4. Durante la fase folicular en una vaca normal, (1) el centro tónico en el hipotálamo secreta GnRH a una alta frecuencia, (2) estimulando la secreción de LH en modo de alta frecuencia, (3) que promueve la maduración del folículo dominante. (4) Este folículo secreta crecientes concentraciones de estradiol que (5) finalmente alcanzan un umbral adecuado para desencadenar el centro cíclico en el hipotálamo que libera GnRH que (6) en cantidades adecuadas estimula el pulso preovulatorio de LH. (7) El pulso preovulatorio de LH inducirá la ovulación del folículo dominante. (Adaptado de Silvia (2002).

La GnRH es liberada desde las terminales nerviosas de la eminencia media del hipotálamo en episodios discretos y es transportada hacia la pituitaria por medio del sistema sanguíneo portal hipofisario (Fig. 5) (Moenter et al., 1992).

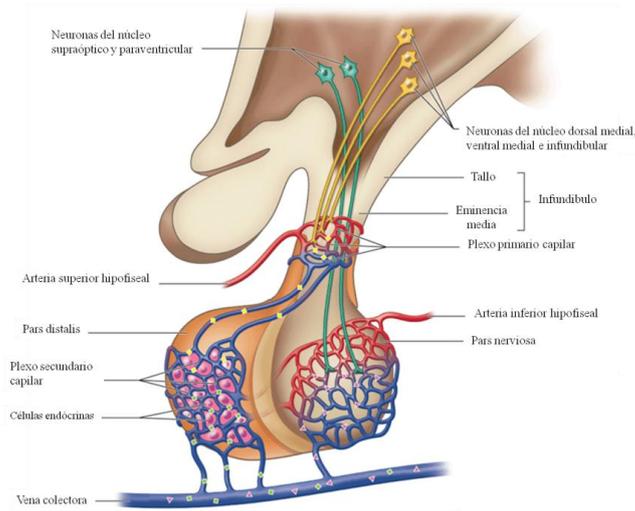


Fig 5. Terminales nerviosas de la eminencia media del hipotálamo y sistema sanguíneo hipofisario. Adaptado de Mescher (2010).

Los receptores para la GnRH están localizados en las membranas celulares de los gonadotrofos en la adenohipófisis (Kakar et al, 1993). Estos receptores acoplados a proteínas G en la superficie de las células gonadotropas median la acción de la GnRH al estimular la secreción de gonadotropinas; proceso en el cual existe liberación de calcio intracelular (segundo mensajero) el cual activa la fosfolipasa C que lleva al aumento de la proteína cinasa C (PKC) y de la actividad de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) (Weck et al., 1998); lo que conlleva finalmente a la liberación de FSH y LH desde compartimentos en el citoplasma (Fig. 6) (Roche, 1996; Weck et al., 1998).

La FSH es almacenada en gránulos secretorios en el citoplasma durante períodos cortos de tiempo, mientras que la LH permanece almacenada por períodos más largos durante el ciclo estral (Farnworth, 1995).

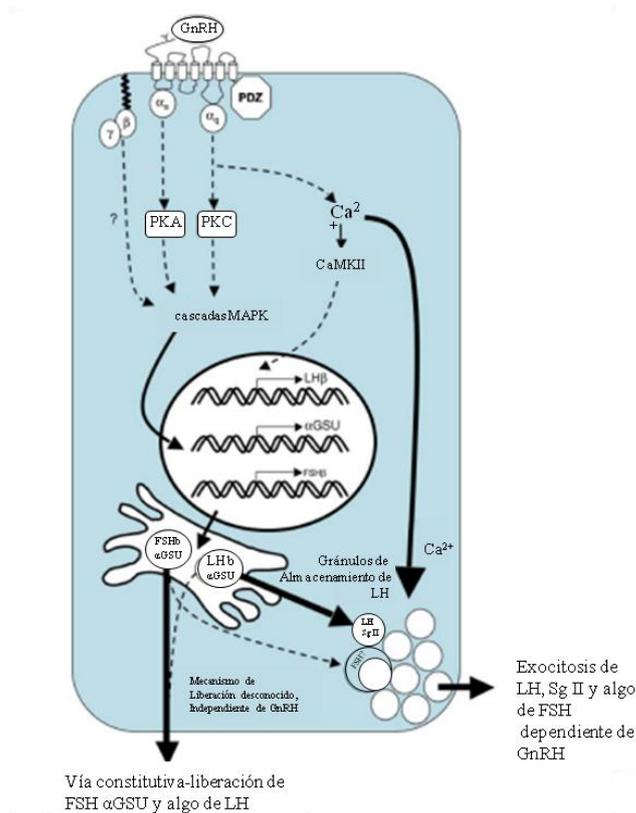


Fig 6. Resumen esquemático de las vías que llevan al receptor al agonista del receptor de GnRH a secretar LH y FSH. La ocupación del receptor de GnRH inicia la señalización hacia las cascadas MAPK, las cuales llevan a la biosíntesis de LH β , FSH β y las subunidades α GSU. Luego de la síntesis y transporte a través del aparato de Golgi, la FSH, algo de LH y α GSU libres salen del gonadotrofo por una vía constitutiva independiente de GnRH. En contraste, la mayoría de LH asociada con secretogranina II (Sg II) es almacenada en gránulos que son liberados en respuesta a incrementos locales de Ca^{2+} en la membrana celular, inducido por GnRH. Adaptado de Pawson y McNeilly (2005).

Los gonadotrofos pierden sensibilidad a la GnRH, y su liberación pulsátil es necesaria para prevenir la regulación decreciente de su receptor; además, la GnRH produce la liberación episódica de LH, y su frecuencia está determinada por la retroalimentación de progesterona o estradiol (Roche, 1996).

En resumen, el principal estímulo para la síntesis y secreción de FSH y LH es el decapeptido GnRH, el cual es liberado desde el hipotálamo de manera pulsátil, y pasa hacia la pituitaria a través del sistema portal de vasos sanguíneos. Los esteroides sexuales de las gónadas proveen una retroalimentación negativa para la secreción de gonadotropina a nivel hipotalámico al suprimir su liberación. La GnRH promueve la exocitosis de FSH y LH al desencadenar la liberación de Ca^{2+} intracelular.

Otros factores producidos dentro del ovario como inhibinas, activina, factores de crecimiento similar a la insulina I y sus proteínas de unión, juegan un papel importante en la regulación del ciclo estral ya sea indirectamente al alternar la síntesis de estradiol, o directamente mediante mecanismo de retroalimentación negativa en la glándula pituitaria anterior (Roche, 1996; Forde et al., 2011).

Las inhibinas tienen efectos tanto autocrinos como paracrinos; ellas incrementan la síntesis de andrógenos inducida por LH en las células de la teca y su producción es estimulada por esteroides y FSH (Roche, 1996). Las inhibinas, detectadas en las células de la granulosa de vacas, se encargan de la supresión de FSH secretada por la pituitaria anterior, regulando así el ciclo estral (Farnworth, 1995; Findlay et al., 2002).

La super-familia de los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) y dentro de ella el IGF-1 contribuye al crecimiento, proliferación y capacidad esteroidogénica del futuro folículo dominante (Mihm, 2000; Canty, Boland, Evans y Crowe, 2006), afectando indirectamente el mecanismo de retroalimentación negativa inducida por estradiol (Forde et al., 2011). La super-familia del factor de crecimiento transformante (TGF) contiene proteínas (como TGF, hormona antimulleriana, inhibinas, activinas y proteínas morfogénicas del hueso), receptores y moléculas de señalamiento que han sido identificadas en fluido folicular (Forde et al., 2011); la activina por ejemplo puede aumentar la producción de estradiol en dicho líquido folicular (Knight y Glistler, 2003) y estimular la síntesis de FSH independiente de GnRH en asociación con cambios secuenciales de la proteína de unión a la activina conocida como folistatina (Farnworth, 1995; Roche, 1996). La folistatina se une a la activina con una alta afinidad y neutraliza su actividad biológica previniendo así la estimulación de la síntesis de FSH y su secreción (Farnworth, 1995).

En 1996, Roche indica que el crecimiento del folículo dominante y el aumento en la producción de estradiol se caracterizan por relativamente bajas concentraciones de inhibina, activina y proteínas de unión de IGFs y probablemente altas concentraciones de IGFs. En contraste, el comienzo de la atresia y pérdida de la capacidad de los folículos para producir estradiol, están caracterizadas por las relativamente altas concentraciones de inhibina, activina o proteínas de unión de IGFs (Roche, 1996).

Para que la progesterona pueda actuar en el tracto reproductivo se necesita de la exposición previa a estrógenos (Ing y Tornesi, 1997). En contraste, la progesterona causa una regulación decreciente de los receptores de estradiol y por lo tanto bloquea varias de las acciones de los estrógenos que generalmente actúan como factores mitogénicos (Iwai et al., 1995).

Endocrinológicamente durante la dinámica folicular, el cambio sistémico más notable es el pulso de FSH que estimula la aparición de cada onda folicular durante el ciclo estral (Peter et al., 2009). El incremento inicial de FSH ha sido asociado con folículos de 1 a 3 mm de diámetro (Jaiswal, Singh y Adams, 2004), con picos de concentraciones que ocurren cuando el folículo más grande de la onda alcanza aproximadamente los 4mm (Ginther, 1998). Posteriormente, las concentraciones de FSH disminuyen para alcanzar concentraciones basales durante el crecimiento tardío/fase estática temprana del folículo dominante (Peter et al., 2009).

1.2. Foliculogénesis

En la mayoría de mamíferos, durante la etapa fetal se establece el número total de folículos primordiales. Los folículos primordiales se forman ya sea antes o en los primeros días después del nacimiento (Drummond, 2006). Dichos folículos dan origen a los folículos primarios que se transforman en preantrales (folículos secundarios), luego

en antrales (folículos terciarios) y finalmente en preovulatorios (folículos Graafianos); ese crecimiento y diferenciación de folículos desde la población primordial se denomina foliculogénesis (Fig. 7) (Drummond, 2006). El crecimiento folicular tarda entre 3 a 4 meses y se categoriza en un crecimiento independiente de gonadotropinas y un crecimiento dependiente de gonadotropinas (Webb, Garnsworthy, Gong, Armstrong, 2004). De hecho, los folículos antrales inicialmente se vuelven sensibles y posteriormente dependientes de FSH (Roche, 1996).

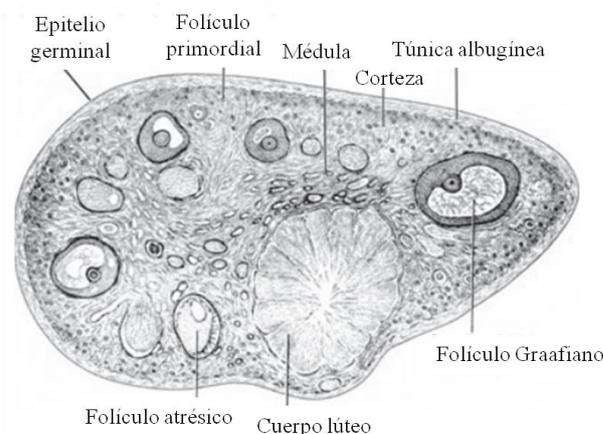


Fig 7. Representación esquemática de la morfología ovárica. Adaptado de Aerts y Bols (2010).

Procesos como el crecimiento, desarrollo y maduración de los folículos ováricos son fundamentales para la eficiencia reproductiva en los animales de producción (Forde et al., 2011). En vacas el crecimiento folicular dependiente de gonadotropinas ocurre en oleadas, con 2 a 3 oleadas por ciclo estral (Savio, Keenan, Boland y Roche, 1988; Aerts y Bols, 2010b); el 95% de los ciclos estrales tienen patrones de 2 y 3 oleadas (Peter et al., 2009), y cada oleada incluye un reclutamiento o emergencia de una cohorte de folículos, la selección de un folículo dominante y la dominancia seguido ya sea por atresia o por ovulación del folículo dominante (Fig. 8) (Berisha y Schams, 2005; Forde et al., 2011). La presencia de una o cuatro ondas foliculares es poco común (De Rensis y Peters, 1999).

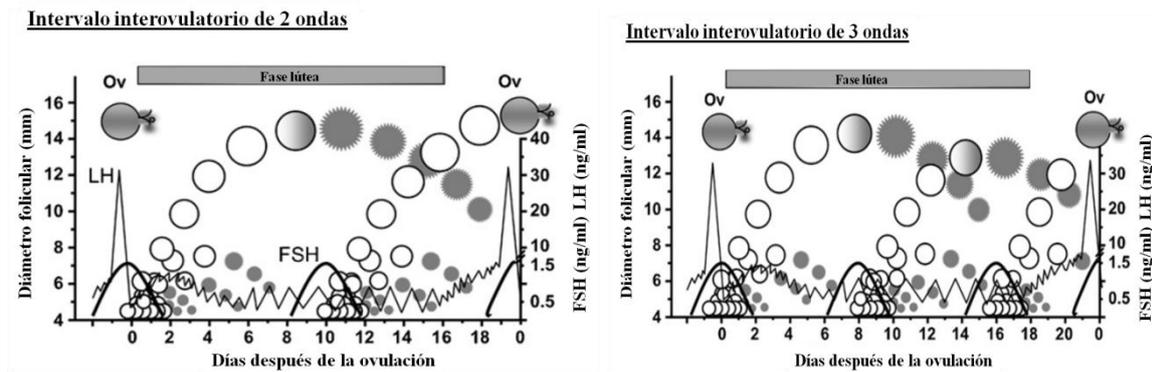


Fig 8. Dinámicas del desarrollo folicular ovárico y la secreción de gonadotropinas durante ciclos estrales de 2 y 3 ondas en bovinos. Los folículos dominantes y subordinados se indican como círculos abiertos (viables) o cerrados (atrésicos). Un pico de concentraciones de FSH circulante (línea gruesa) precede a la emergencia en cada onda. Un pico de concentraciones de LH circulantes (línea delgada) precede a la ovulación. El pico de LH es precedido y logrado por un período de secreción de LH de alta frecuencia como resultado de las bajas concentraciones de progesterona. Adaptado de Adams et al. (2008).

De acuerdo a Roche (1996) el escaneo diario de los ovarios mediante ultrasonido confirmó que generalmente dos (pero a veces solo una) ondas foliculares no ovulatorias ocurren en la fase lútea. Dichos ciclos cortos aparentemente son más comunes postparto (Savio, Boland y Roche, 1990) y durante la pubertad (Evans, Adams y Rawlings, 1994). De acuerdo a un estudio (McDougall, Burke, MacMillan y Williamson, 1995) se determinó que vacas lecheras al pastoreo pueden tener un promedio de 4,2 ondas de crecimiento folicular. Dicho retraso en la primera ovulación generalmente se atribuye al período de balance energético negativo durante el período temprano post-parto en vacas lecheras, y a una reducción en la secreción pulsátil de LH necesaria para estimular las etapas finales del crecimiento folicular y la producción de estradiol (Beam y Butler, 1997; Lamming y Darwash, 1998). El crecimiento de ondas foliculares ocurre durante el ciclo estral, pero aparentemente también se presenta en terneras antes de la pubertad (Evans et al., 1994), durante la gestación (Ginther, Knopf y Kastelic, 1989), en el periodo postparto y lactación (Savio et al., 1990a) y en períodos de anestro (Savio, Boland, Hynes y Roche, 1990). En general, el desarrollo de una onda folicular involucra el crecimiento simultáneo y organizado de una cohorte de folículos antrales dependientes de gonadotropinas (conocida como onda de aparición, emergencia o reclutamiento) dentro

de un intervalo de 2 a 3 días (Peter et al., 2009). Dichos folículos incrementan de tamaño y subsecuentemente hay una diferenciación de un folículo dominante que continúa su crecimiento, mientras que múltiples folículos subordinados cesan su crecimiento durante una fase estática (conocida como desviación) (Peter et al., 2009). Así los folículos adquieren su capacidad ovulatoria (10mm) un día después del inicio de la desviación folicular (Sartori, Fricke, Ferreira, Ginther y Wiltbank, 2001). En el momento en el que el folículo dominante anovulatorio de la 1era onda (y de la 2da onda en los ciclos estrales de 3 ondas) o el folículo dominante ovulatorio de la 2da onda y 3ra onda alcanza su fase estática o preovulatoria, los folículos subordinados correspondientes han experimentado regresión (Fig. 9) (Peter et al., 2009).

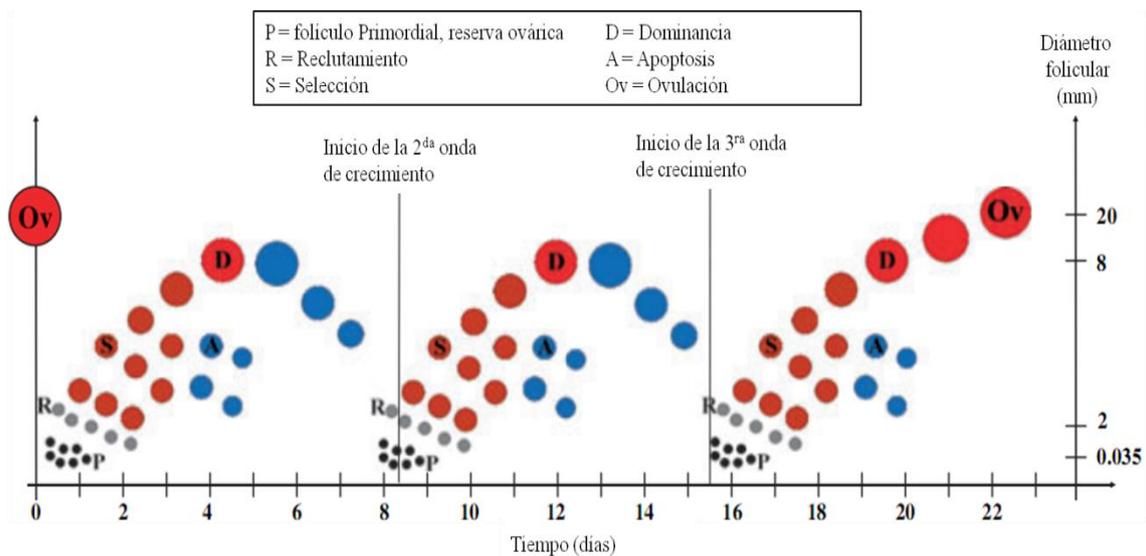


Fig 9. Representación esquemática de las fases de reclutamiento, selección y dominancia en un patrón de crecimiento de 3 ondas foliculares durante un ciclo estral bovino. Adaptado de Aerts

Factores como la raza, nutrición, paridad y lactación son varios de los factores que influyen el número de ondas foliculares por ciclo estral, el número o cohorte de folículos asociados con una onda y el diámetro del folículo más grande o futuro folículo dominante en la desviación, dominancia y preovulación (Peter et al., 2009).

Emergencia de la onda folicular

El inicio del desarrollo folicular dependiente de gonadotropinas está dado por la aparición, reclutamiento o “emergencia” de una cohorte de 5 a 20 folículos de más de 5mm conjuntamente con el aumento de las concentraciones de FSH (Adams, Matteri, Kastelic, Ko y Ginther, 1992). De acuerdo a Adams et al. (2008) la emergencia dura entre 2 a 3 días y se caracteriza por la presencia de 8 a 41 (promedio 24) folículos pequeños que pueden ser detectados mediante ultrasonografía cuando tienen un diámetro de 3 a 4mm.

Las concentraciones de FSH empiezan a incrementarse de 1,5 a 2 veces dentro de 2 días y alcanzan su pico entre 12 a 24 horas antes de la emergencia (Adams et al., 2008). Conforme el folículo dominante emerge de la cohorte de folículos, el diámetro aumenta y es reconocido como el folículo más grande, y este incremento en el tamaño del folículo conlleva a un incremento de las concentraciones de estradiol e inhibina en el fluido folicular (Hillier, 1994). Dicho incremento en las concentraciones de estradiol o inhibina disminuyen las concentraciones de FSH a niveles basales mediante retroalimentación negativa (Ginther, Bergfelt, Kulick y Kot, 2000).

En vacas post-parto, dicha emergencia de la primera onda folicular se da entre los 4 (Ginther, Kot, Kullick, Martin y Wiltbank, 1996) a 12 (Haughian, Sartori, Guenther, Gümen y Wiltbank, 2002) días luego del parto. De acuerdo a Peter et al. (2009), la emergencia ocurre cuando los folículos alcanzan un diámetro ≥ 4 mm en los días 0 (para la primera onda; anovulatoria) y 9 o 10 (para la 2^{da} onda; ovulatoria) en una ciclo estral de 2 ondas foliculares (Adams et al., 2008). En ciclos estrales de 3 ondas foliculares, la emergencia de la 1^{ra} onda (anovulatoria), 2^{da} onda (anovulatoria) y 3^{ra} onda

anovulatoria) ocurren aproximadamente en los días 0, 9 y 15 o 16, respectivamente (Fig. 10) (Adams et al., 2008; Peter et al., 2009).

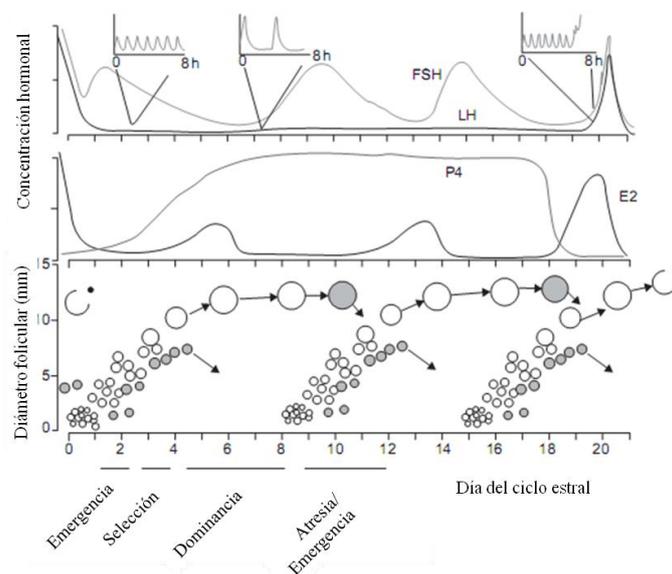


Fig 10. Descripción esquemática del patrón de secreción de la FSH, LH, P4 y E2; y el patrón de crecimiento folicular durante el ciclo estral en vacas. Cada crecimiento de onda folicular es precedido por un incremento transitorio de FSH. Los folículos saludables se representan como círculos abiertos, los atresícos son círculos grises. Un pico de LH y FSH ocurre al inicio del estro e induce la ovulación. El patrón de secreción de LH durante una ventana de 8h en la fase lútea temprana (alta frecuencia, baja amplitud), en la fase lútea media (baja frecuencia y baja amplitud) y en la fase folicular (alta frecuencia, formación del pico) se indica en la parte alta del esquema. Adaptado de Crowe (2011).

La emergencia está asociada con un arreglo jerárquico, de tal manera que el folículo más grande de la cohorte, usualmente mantiene su posición durante el crecimiento y se convierte en dominante (Ginther, Bergfelt, Beg y Kot, 2001). Así, al folículo más grande se lo llama el futuro folículo dominante y a los siguientes folículos se les conoce como los futuros subordinados antes de la desviación (Peter et al., 2009).

Como resultado de una fase lútea más larga (19d versus 16d), los ciclos estrales o los intervalos interovulatorios son significativamente más largos en vacas dando lugar a ciclos de 3 ondas foliculares en aproximadamente 23 días (versus 20d normalmente); y en dichos animales, los intervalos entre ondas de emergencia son más cortos que en animales con ciclos de dos ondas (Fig. 10) (Ginther, Knopf y Kastelic, 1989).

Selección y desviación

La selección se da durante los 2 a 4 días del ciclo estral (Roche, 1996); y en general es un proceso en el cual un folículo es seleccionado de la cohorte de folículos en crecimiento y se vuelve dominante, con crecimiento continuo hacia un tamaño preovulatorio antes de la regresión u ovulación (Peter et al., 2009). Por otro lado, los folículos restantes conocidos como subordinados, entran en regresión (Peter et al., 2009). Durante este tiempo el folículo más grande tiene un diámetro de 8,5mm aproximadamente (Aerts y Bols, 2010).

La selección es un proceso que involucra varios cambios morfológicos y eventos fisiológicos/endócrinos que inicia con el asentamiento de las células germinales primordiales del ovario del embrión/feto (Peter et al., 2009). Existen además otros eventos antes de dicha selección que incluyen el tiempo de reclutamiento de los folículos primordiales, el arreglo jerárquico en el crecimiento de folículos antrales, la etapa de desarrollo y tamaño de los folículos antrales al momento de la emergencia y el paso a regresión de los subordinados (Lucy, Savio, Badinga, De La Sota y Thatcher, 1992).

Para distinguir la separación abrupta en el crecimiento entre el folículo dominante y el más grande de los subordinados se ha utilizado el término “desviación” folicular (Peter et al., 2009). El punto de partida o el tiempo del cambio diferencial o distintivo en el diámetro de los folículos representa la desviación (Bergfelt, Sego, Beg y Ginther, 2003) y ocurre aproximadamente 2,5 días después de la emergencia, cuando el folículo más grande tiene aproximadamente 8mm (Sartori, Haughian, Shaver, Rosa y Wiltbank, 2004).

En general, después de la onda de emergencia y el pico de concentraciones de FSH, el desarrollo de la onda en crecimiento se asocia con una disminución de FSH (Peter et al., 2009) durante los primeros 3 días de la onda (Adams et al., 2008). El nadir de FSH se alcanza al 4^{to} día después de la emergencia y las concentraciones permanecen bajas durante 2 a 3 días. Durante este tiempo, se dan cambios diferenciales entre el folículo dominante y los subordinados debido a mecanismos hormonales locales (como IGF's e IGFBP, producción de estradiol e inhibina) y sistémicos que en parte regulan la disminución de las concentraciones de FSH (Beg, Bergfelt, Kot y Ginther, 2002; Aerts y Bols 2010). En vacas, hay un mantenimiento o incremento del IGF-I libre mediante la activación del sistema IGF por BP-proteasas (PAPP-A) y un incremento del estradiol y receptores para LH en el folículo de mayor tamaño antes del inicio de la desviación (Beg y Ginther, 2006). Al mismo tiempo, las concentraciones de IGF-I disminuyen en el folículo secundario de mayor tamaño.

Durante el proceso de desviación hay una supresión de FSH el cual es un mecanismo que genera la diferencia en tasas de crecimiento entre el folículo dominante y el subordinado; el folículo dominante continúa creciendo y hay un cambio de dependencia primaria de gonadotropinas de FSH a LH, donde los folículos subordinados dependientes de FSH son privados de la hormona (Fig. 11) (Ginther, Wiltbank, Fricke, Gibbons y Kot, 1996).

Dominancia folicular

En términos generales, la dominancia ocurre generalmente al día 5 (Roche, 1996) cuando el folículo ha alcanzado ≥ 10 mm (Ginther, Beg, Donadeu y Bergfelt, 2003). La dominancia se puede definir de acuerdo al tamaño del folículo al momento de la

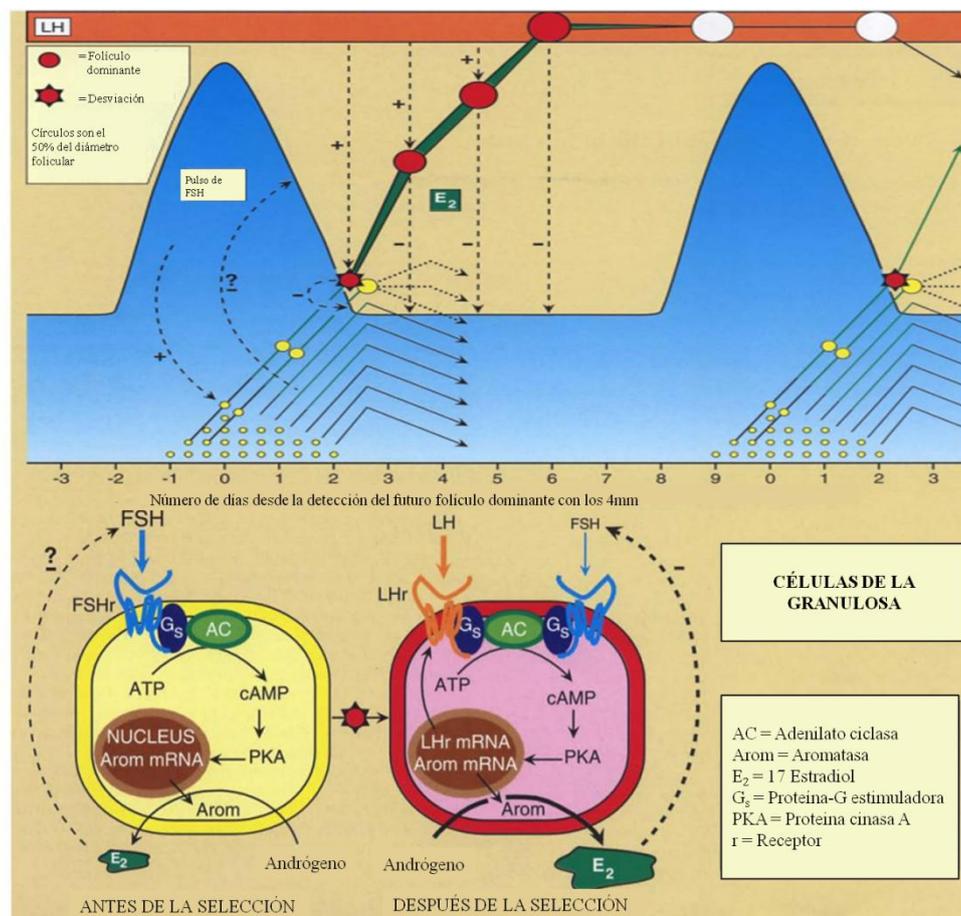


Fig 11. Modelo esquemático de la naturaleza de la desviación folicular en vacas, donde se observan los aspectos sistémicos (arriba) y los aspectos celulares (abajo). Adaptado de Ginther et al. (1996a).

desviación o su capacidad ovulatoria al responder a un estímulo ovulatorio (Sartori, Fricke, Ferreira, Ginther y Wiltbank, 2001). El diámetro máximo de un folículo dominante tanto de ondas anovulatorias como ovulatorias es aproximadamente 16mm en vacas lecheras (Ginther, Wiltbank, Fricke, Gibbons y Kot, 1996).

La naturaleza de la dominancia representa aspectos tanto fisiológicos (vascularidad, receptores de LH en granulosa) como endócrinos (inhibina y estradiol en fluido folicular) del folículo dominante durante su fase de crecimiento que indirectamente influyen la regresión de los folículos subordinados y la supresión de subsecuentes ondas de emergencia mediante la supresión de FSH. Los receptores de FSH están presentes únicamente en las células de la granulosa, mientras que los

receptores de LH están localizados tanto en la granulosa como en la teca de los folículos antrales. El folículo dominante adquiere más receptores para LH en sus células de granulosa que los folículos subordinados y por lo tanto es capaz de cambiar su dependencia hacia LH durante el nadir de FSH, y continuar creciendo mientras los subordinados entran en regresión (Adams et al., 2008).

El folículo dominante seleccionado se torna sensible a LH (Ginther et al., 2000) y continúa creciendo a pesar de la disminución de las concentraciones de FSH (Forde et al., 2011). Dicho cambio de dependencia de FSH a LH se da por la presencia de receptores de LH en las células de la granulosa (Fig. 12) (Xu et al., 1995a; Mihm et al., 2006).

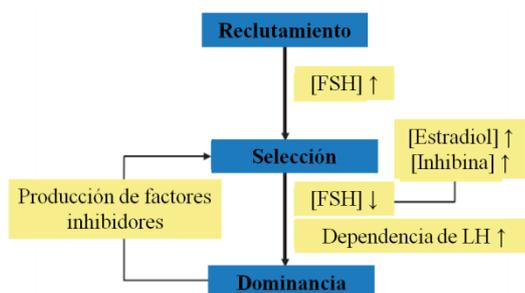


Fig 12. Desarrollo de dominancia. Adaptado de Aerts y Bols (2010b).

Durante la fase folicular, cuando las concentraciones de progesterona son basales, la gran cantidad de estradiol producida por el folículo dominante preovulatorio induce la producción de GnRH (centro cíclico) en el hipotálamo (Forde et al., 2011), lo cual resulta en la producción de LH de amplitud y frecuencia suficiente para estimular la maduración y ovulación del folículo dominante (Sunderland, Crowe, Boland, Roche y Ireland, 1994). Cambios sutiles en la frecuencia del pulso de LH pueden ser suficientes como para desencadenar la pérdida de receptores de LH en el folículo diferenciado el cual experimenta atresia (si la frecuencia de pulso de LH es baja) o luteinización (si la frecuencia de pulso de LH es alta) (Roche, 1996).

Durante la preñez, el crecimiento folicular continúa durante los primeros dos trimestres a intervalos regulares de 7 a 10 días. En la etapa tardía de la preñez, la fuerte retroalimentación negativa de los progestágenos (procedentes tanto del cuerpo lúteo como de la placenta) y estrógenos (de origen placentario principalmente) suprimen el incremento transitorio de la FSH requerida para el crecimiento folicular (Ginther, 1996), lo cual cesa el desarrollo de la onda folicular durante los últimos 20 a 25 días de preñez (Forde et al., 2011).

Luego del parto, la progesterona y el estradiol disminuyen a concentraciones basales lo cual resulta en la reactivación de FSH recurrente durante la primera semana (3 a 5 días) (Beam y Butler, 1998; Ginther, 1996; Crowe, Padmanabhan, Mihn, Beitins y Roche, 1998). El primer aumento de FSH post-parto estimula la primera oleada folicular, resultando en un folículo dominante a los 7 a 10 días post-parto (Crowe, Goulding, Baguisi, Boland y Roche, 1993). Lo que ocurrirá con ese primer folículo de onda folicular post-parto dependerá de su capacidad de secretar suficiente estradiol para inducir un incremento de gonadotropinas (Forde et al., 2011). La secreción de estradiol por parte del folículo dominante es dependiente de la frecuencia de pulsos de LH, el tamaño del folículo dominante y la biodisponibilidad de IGF-1 (Canty et al., 2006).

El principal estimulador de la ovulación del folículo dominante durante el post-parto temprano es la frecuencia del pulso de LH con un pulso de LH/hora requerido para que el folículo dominante ovule (Duffy, Crowe, Boland y Roche, 2000). La mayoría de las vacas lecheras post-parto reanudan normalmente su actividad ovárica y ovulación dentro de los 15 a 45 días post-parto y tienen ciclos regulares a intervalos de 18 a 24 días (Forde et al., 2011). Sin embargo, en una compilación de 10 estudios reportados por Ferguson (1996), la primera ovulación se ve retrasada en vacas en lactancia con un promedio de $33,3 \pm 2,1$ días postparto.

1.2.1. Relación entre el diámetro folicular y niveles hormonales

Se ha determinado que el crecimiento extendido del folículo dominante afecta la maduración final del oocito lo cual afecta severamente la fertilidad (Revah y Butler, 1995). Un oocito de un folículo dominante persistente que finalmente ovula puede ser fertilizado pero el desarrollo del embrión se verá deteriorado y la muerte embrionaria temprana puede llevarse a acabo (Ahmad, Schrick, Butcher y Inskeep, 1995; Mihm et al., 1999).

Durante la fase folicular, las concentraciones de estrógenos (E_2) se elevan debido a la proliferación rápida del folículo dominante preovulatorio; al mismo tiempo hay un descenso de las concentraciones circulantes de progesterona (P_4), lo cual induce un aumento de la GnRH que a su vez permite la presentación del comportamiento de celo (Forde et al., 2011). Dicho aumento en la GnRH genera a su vez un aumento de la FSH y de la LH; y únicamente cuando las concentraciones de progesterona en suero son basales y los pulsos de LH ocurren cada 40-70 minutos durante 2-3 días, el folículo dominante puede ovular (Roche, 1996).

La FSH es la hormona clave que estimula el apareamiento de ondas foliculares y su disminución está asociada con la selección de un folículo dominante, el cual se vuelve dependiente de LH en la etapa final cuando las concentraciones de FSH son mínimas (Roche, 1996).

La producción de altas concentraciones de estradiol es una característica que define al folículo dominante, antes de que haya diferencias visibles en el diámetro folicular (Ireland y Roche, 1982); el folículo dominante tiene mayores concentraciones de estradiol en el fluido folicular comparado con otros folículos de su cohorte (Mihm et al., 2000). Lopez, Satter y Wiltbank (2004), analizaron el tamaño folicular máximo y las concentraciones de estradiol en el día del estro y demostraron que las vacas de mayor

producción (46,8kg/día) tenían folículos más grandes ($18,6\pm 0,3$ versus $17,4\pm 0,2$ mm de diámetro; $P<0,01$), pero menor estradiol circulante ($6,8\pm 0,5$ versus $8,6\pm 0,5$ pg/ml; $P<0,01$) comparado con vacas de baja producción ($32,3\pm 0,6$ kg/día). La disminución de estradiol puede causar aumento del tamaño folicular al retrasarse el tiempo del estro inducido por estradiol, retrasarse la producción de GnRH y la ovulación en vacas de alta producción (Wiltbank et al., 2006).

En otro estudio realizado por Sartori et al. (2004) se monitoreó diariamente a vaquillas y vacas en lactación mediante ultrasonografía de ovarios y análisis hormonales, y se determinó que existían vacas que ovulaban folículos grandes pero tenían niveles de estradiol circulantes bajos. Y de igual manera, paradójicamente vacas en lactación tenían un gran volumen de tejido lúteo pero niveles de progesterona reducidos. Otros estudios como Wolfenson et al. (2004) y Ahmad et al. (1996) han reportado cambios en la circulación de hormonas y el tamaño de las estructuras ováricas en vacas en lactación.

Hay dos explicaciones razonables para la desconexión entre las hormonas esteroideas circulantes y el tamaño de los folículos y CL. La primera posible explicación es que los folículos y el CL son menos esteroideogénicamente activos en vacas en lactación; esto puede deberse a: 1) la circulación inadecuada de hormonas estimulantes, 2) a los sustratos para la esteroideogénesis o a las vías esteroideogénicas intracelulares (Wiltbank et al., 2006). El sustrato principal para la esteroideogénesis ovárica en bovinos es la lipoproteína de alta densidad (HDL), y esta se encuentra particularmente elevada en vacas en lactación (Grummer y Carroll, 1988). Sin embargo, hay una reducción del factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) en vacas en lactación y esto podría estar relacionado a la reducción de la capacidad esteroideogénica (Lucy, 2000). No obstante, la hipótesis de que las estructuras ováricas en vacas lactantes

tengan menor producción esteroideogénica aún no ha sido estudiada adecuadamente (Wiltbank et al., 2006)

Una explicación más probable es que las vacas lecheras en lactación tienen un incremento en el metabolismo de las hormonas esteroideas a medida que aumenta la producción de leche (Wiltbank et al., 2006). Las concentraciones de hormonas circulantes se determinan por la tasa de producción y metabolismo de dichas hormonas. De acuerdo a varias investigaciones, un incremento en el consumo de alimento durante la lactación, altera la progesterona circulante y la excreción de metabolitos de progesterona (Parr, Davis, Miles y Squires, 1993a; Parr, Davis, Miles y Squires, 1993b; Rabiee, Macmillan y Schwarzenberger, 2001a y Rabiee, Macmillan y Schwarzenberger, 2001b). El aumento del metabolismo de esteroides debido al alto consumo de alimento podría alterar la fisiología reproductiva de cualquier especie, pero particularmente en especies con aumento extremo en el consumo de alimento, como las vacas en lactación (Wiltbank et al., 2006). Al parecer, en vacas en lactación el alto nivel de nutrición eleva de manera crónica la circulación sanguínea hepática y el metabolismo de hormonas esteroideas, lo cual indica que a pesar de que se produzcan cantidades normales de hormonas, habría menores concentraciones de hormonas circulantes en vacas en lactación (Wiltbank et al., 2006)

Si se toman los datos del estudio realizado por Sartori et al. (2004) en el cual se comparan vaquillas y vacas en lactación mediante ultrasonografía de ovarios y análisis hormonales y se divide la concentración de estradiol circulante para el volumen folicular se encuentra que las vaquillas tienen el doble de valores que las vacas en lactación (6,5pg/mL versus 3,2ng/mL de estradiol por cm³ de volumen folicular) (Wiltbank et al., 2006).

1.2.2. Esteroidogénesis durante la fase folicular

El crecimiento final y maduración del folículo depende del pulso de LH incrementado para actuar sobre: 1) las células de la teca para proveer andrógenos como sustrato para la aromatización hacia 17- β estradiol en las células de la granulosa y 2) las células de la granulosa para proveer un estímulo adicional con FSH para aumentar la actividad aromatasa cuando las concentraciones de FSH disminuyan con el aumento del tamaño del folículo dominante (Richards et al., 1986).

El crecimiento folicular y la esteroidogénesis son dependientes de las acciones coordinadas entre la FSH y la LH con sus receptores en las células de la granulosa y la teca de los folículos ováricos (Bao y Garverick, 1998). El modelo más aceptado para el crecimiento folicular y esteroidogénesis sugiere que las células de la granulosa y teca están involucradas en la producción de 17- β estradiol; modelo conocido como “dos células/dos gonadotropinas” (Fortune and Quirk, 1988).

El modelo dos células y dos gonadotropinas describe el rol de las células de la teca y granulosa en la producción de esteroides, resaltando la cooperación entre los dos tipos celulares, la cual es necesaria para la producción de estrógenos (Drummond, 2006). Armstrong, Golf y Dorrington. (1979) propusieron que las células de la granulosa y de la teca responden de manera diferente a la FSH y a la LH con el desarrollo de distintas capacidades enzimáticas para sintetizar (teca) o metabolizar (granulosa) andrógenos a estrógenos (Fig. 13). Además, este modelo indica que las células de la granulosa contienen receptores para FSH (FSHr) y las células de la teca tienen receptores para LH (LHr) durante etapas tempranas de desarrollo (Bao y Garverick, 1998). Ambos tipos celulares pueden tener la enzima citocromo P-450 que escinde la cadena lateral del colesterol (P-450_{scc}), necesaria para la conversión de

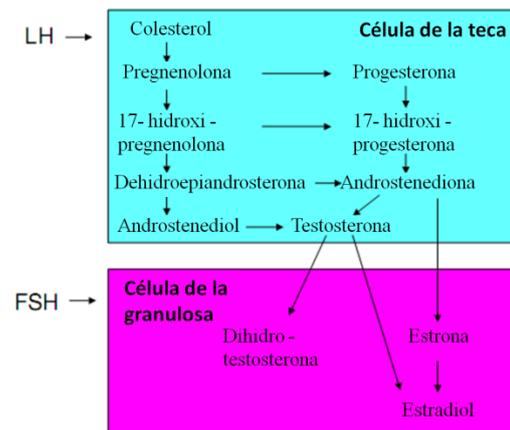


Fig 13. Biosíntesis de esteroides en el ovario. En la teca, bajo la influencia de LH, el colesterol es convertido en pregnenolona y metabolizado en una serie de sustratos que terminan en la producción de andrógenos. De acuerdo al modelo de 2 células y 2 gonadotropinas, los andrógenos producidos por la célula de la teca son transportados a la célula de la granulosa donde son aromatizados a estrógenos. Adaptado de Drummond (2006).

colesterol en esteroides C21 (progestinas); las progestinas, pregnenolona y progesterona son precursores de la síntesis de androstenediona en las células tecaes (Fig. 14) (Bao y Garverick, 1998). En el momento en que la LH se une a su receptor en las células tecaes, se estimula la actividad de la enzima citocromo P-450 17 α -hidroxilasa (P-450_{c17}), enzima necesaria para la conversión de progestinas en androstenediona; mientras que las células de la granulosa no producen andrógenos aun en presencia de precursores progestinas. En la granulosa, los andrógenos son metabolizados a 17- β estradiol por la enzima citocromo P-450 aromatasa (P-450_{arom}) (Bao y Garverick, 1998).

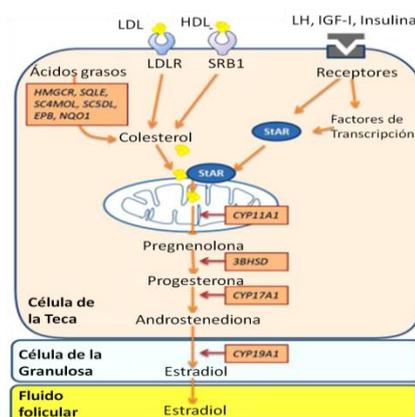


Fig 14. Modelo esquemático de los genes involucrados en la biosíntesis de colesterol de novo y en la esteroidogénesis en el folículo preovulatorio bovino. Adaptado de Walsh (2012).

Esteroidogénesis en folículos preantrales y antrales tempranos

En folículos preantrales y antrales tempranos de 2 a 4mm de diámetro, la expresión de P-450_{arom} es indetectable, lo cual sugiere que estos folículos no tienen la capacidad de convertir andrógenos en 17- β estradiol en las células de la granulosa (Bao y Garverick, 1998); información que es consistente con la presentada por Skyer et al. (1987) que indicaban que los folículos con un diámetro ≤ 5 mm de diámetro son estrógeno-inactivos. Por otro lado, las células de la granulosa de folículos preantrales y antrales tempranos no expresan P450_{scc} ni 3 β -HSD, lo cual indica que tampoco son capaces de convertir colesterol en pregnenolona y posteriormente en progesterona; por lo tanto, la fuente principal de hormonas esteroideas (pregnenolona, progesterona y andrógenos) en esta etapa son las células de la teca (Bao y Garverick, 1998).

El aumento de las concentraciones de FSH durante el desarrollo folicular lleva a un aumento a su vez de la actividad de la enzima aromatasa (P450_{arom}) en las células de la granulosa de los folículos ováricos; enzima que convierte andrógenos a estrógenos (Hillier, 1994). La síntesis de estradiol es dependiente de la producción de andrógenos en las células de la teca y la subsecuente aromatización de estos andrógenos a estrógenos en las células de la granulosa (modelo dos células/dos gonadotropinas) (Fortune y Quirk, 1988).

Esteroidogénesis en folículos antrales

En vacas, el desarrollo del folículo antral (>4mm en diámetro) es considerado dependiente de gonadotropinas e incluye las fases de reclutamiento, selección, dominancia y atresia u ovulación (Bao y Garverick, 1998).

Reclutamiento. El reclutamiento folicular está asociado con la iniciación de la expresión simultánea de las enzimas P-450_{scc} y P-450_{arom} en las células de la granulosa

de la cohorte de folículos reclutados (4-6mm de diámetro) (Xu et al., 1995b). Sin embargo, en etapas finales del reclutamiento, (24-36h) la expresión de dichas enzimas se observa en folículos de diámetros entre 6 a 9mm y no en folículos de 4 a 5mm (Bao y Garverick, 1998).

Durante el reclutamiento, los folículos crecen de 5 a 9mm, las células de la granulosa expresan P-450arom y P-450scc, pero no 3 β -HSD; mientras que las células de la teca expresan ARNm para receptores para LH (LHr), P-450scc, P-450c17, 3 β -HSD y StAR. Es decir que las células de la granulosa empiezan a metabolizar los andrógenos que provienen de las células tecales en 17 β -estradiol y colesterol a pregnenolona pero no pregnenolona a progesterona (Bao y Garverick, 1998).

Selección. La selección está asociada a la expresión de ARNm para LHr y la enzima 3 β -HSD en las células de la granulosa (Xu et al., 1995b) y por lo general se detecta dicha expresión en un folículo de ≥ 8 mm de diámetro (Xu et al., 1995b). El aumento de la expresión de ARNm para FSHr, LHr, P-450scc, P-450c17, P-450arom, 3 β -HSD y StAR en las células de la teca y/o en las células de la granulosa durante la selección del folículo dominante después del inicio de la onda ocurre durante el momento en que los folículos producen mayores concentraciones de 17 β -estradiol e inhibina (Martin, Fogwell y Ireland, 1991).

Dominancia. La mayor expresión de ARNm para gonadotropinas, enzimas esteroideogénicas y StAR se da en los folículos dominantes en el día 4 de la onda folicular (Xu et al., 1995b). Los folículos dominantes expresan niveles mayores de ARNm para StAR en las células de la teca con la finalidad de asegurar suficiente transporte de colesterol hacia la mitocondria para la producción de andrógenos (Bao y Garverick, 1998). StAR es una proteína que regula el transporte agudo de colesterol

desde la membrana mitocondrial externa hacia la interna para su conversión a pregnenolona por la P-450_{scc} (Stocco y Clark, 1996). Por otro lado, los folículos dominantes expresan grandes niveles de ARNm para la aromatasa, la cual permite convertir grandes cantidades de andrógenos producidos por la teca interna en 17 β -estradiol (Xu et al., 1995b). La expresión de ARNm para LHr y 3 β -HSD en las células de la granulosa aumenta durante la fase de crecimiento del folículo dominante, de tal manera que las células de la granulosa son capaces no solo de convertir los andrógenos en más 17 β -estradiol sino también colesterol en pregnenolona y progesterona. Dicha pregnenolona y progesterona producidas por la granulosa pueden ser utilizadas por las células de la teca para producir andrógenos (Bao et al., 1997).

En vacas, el ARNm para StAR está expresado únicamente en las células de la teca y su expresión es mayor en los folículos dominantes; y como se requieren altos niveles de colesterol dentro de la mitocondria de las células de la teca para sintetizar andrógenos, el cual es metabolizado posteriormente a 17 β -estradiol, se puede concluir que la biosíntesis de estradiol por las células de la granulosa está regulada por la producción de andrógenos en las células de la teca (Badinga, Driancourt, Savio, Wolfenson, Drost, De La Sota y Thatcher, 1992).

Dentro de folículos dominantes, la expresión de enzimas esteroideogénicas, StAR y receptores para gonadotropinas disminuye dramáticamente entre el día 4 y 6 de la onda folicular, lo cual indica que la regresión funcional de los folículos dominantes ocurre antes de la aparente disminución de su tamaño y degeneración morfológica (Bao y Garverick, 1998).

Folículos preovulatorios. La expresión de ARNm para todas las enzimas excepto para P-450_{arom} en la célula de la granulosa aumenta durante el desarrollo

folicular preovulatorio, de igual manera aumentan las concentraciones de androstenediona y 17β -estradiol, lo cual sugiere que la expresión de ARNm para las enzimas esteroidogénicas es aún mayor en folículos preovulatorios asociado a la regresión luteal y a la alta frecuencia de pulsos de LH (Tian, Berndtson y Fortune, 1995). Luego de la luteolisis el aumento en la frecuencia de pulsos de LH aumenta el ARNm para las enzimas esteroidogénicas en las células de la teca, las cuales incrementan la síntesis del sustrato androgénico para su aromatización a 17β -estradiol en la granulosa (Bao y Garverick, 1998). El ARNm para la expresión de P-450c17 en las células de la teca, P-450arom en las células de la granulosa y P-450scc y 3β -HSD en las células de la granulosa y teca disminuyen dramáticamente en los folículos preovulatorios luego del pulso preovulatorio de LH (Voss y Fortune, 1993). Esa disminución en la expresión de las enzimas esteroidogénicas es acompañado de la disminución de las concentraciones de androstenediona y estradiol y el incremento de las concentraciones de progesterona en el fluido folicular (Voss y Fortune, 1993). Esto puede estar asociado al inicio de la fase de luteinización de las células de la teca y granulosa (Bao y Garverick, 1998).

1.3. Luteinización

La estructura ovárica denominada por Marcello Malpighi “corpora lutea”, cuerpo amarillo o cuerpo lúteo fue ampliamente descrita por Regnier Graaf, al notar que después del apareamiento, ciertos “cuerpos globulares aparecían en los ovarios de conejas y se mantenían hasta el parto” (Niswender et al., 2000); posteriormente Prenant (1898), después de examinar la histología del CL concluye que puede producir sustancias que regulan la preñez. Magnus (1901) experimenta en conejas el factor biológico activo de extractos luteales; y en 1934, Allen y Wintersteiner y otros grupos

independientes cristalizan y caracterizan el factor el cual se comprobó que se trataba de una hormona esteroidea posteriormente llamada progesterona (Niswender et al., 2000).

El cuerpo lúteo se origina de células del folículo ovulatorio (Forde et al., 2011). La principal hormona luteotrófica en vacas es la LH (Hansel, 1966) y es responsable de la luteinización de las células de la teca y granulosa del folículo preovulatorio en células luteales (Alila y Hansel, 1984).

La función del cuerpo lúteo es producir suficientes concentraciones de progesterona durante la fase lútea del ciclo estral para mantener la gestación (si es que hubo concepción) y disminuir la secreción de gonadotropinas y así prevenir la ocurrencia de comportamiento de celo (Forde et al., 2011).

Formación del cuerpo lúteo

De acuerdo a Smith (1986), el cuerpo lúteo (CL) es una glándula endócrina transitoria que se desarrolla a partir de un folículo Graafiano luego de la ovulación. El cuerpo lúteo es un tejido heterogéneo que consiste en células endoteliales, células esteroideogénicas luteales grandes y pequeñas, fibroblastos, células musculares lisas y células del sistema inmune (Reynolds, Grazul-Bilska, Killilea, y Redmer, 1994). El crecimiento del tejido depende del crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y el establecimiento de un suministro sanguíneo funcional (Berisha y Schams, 2005).

El cuerpo lúteo (CL) es la continuación de la maduración folicular (Alila y Hansel, 1984; Donaldson y Hansel, 1965b) y su formación se inicia por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos en las células de la teca interna (IT) y en las células de la granulosa (GC) del folículo preovulatorio (Berisha, 2005). Estos cambios, conocidos como luteinización, ocurren luego del pico de LH (Berisha y Schams, 2005).

El inicio de la fase lútea es conocido como metaestro y generalmente dura entre 3 a 4 días. Esta fase se caracteriza por la formación del cuerpo lúteo (CL) a partir del folículo colapsado que ha ovulado, conocido como cuerpo hemorrágico (Forde et al., 2011).

El CL secreta progesterona y tiene una función regulatoria importante ya que la longitud del estro está determinada por la duración de la secreción de la progesterona (Smith, 1986). La progesterona regula la longitud del ciclo estral al influenciar el momento de la señal luteolítica de la $PGF2\alpha$ desde el endometrio (Berisha y Schams, 2005).

Dichos cambios morfo y bioquímicos se pueden dividir en varias etapas:

Maduración folicular y ovulación

La maduración folicular preovulatoria en vacas y otras especies resulta de las acciones coordinadas de las hormonas LH y FSH en las células de la teca y de la granulosa, respectivamente (Smith 1986). McNatty (1979) sugiere que el desarrollo normal de un CL depende de que el folículo ovulatorio tenga características como: 1) un adecuado número de células en la granulosa, 2) células de la granulosa capaces de sintetizar cantidades adecuadas de progesterona y 3) un número adecuado de receptores de LH en las células de la granulosa y teca.

Las concentraciones de gonadotropinas y estradiol intrafoliculares cambian durante la maduración folicular y son importantes en la preparación de un folículo preovulatorio para la luteinización y funcionamiento luteal normal (Smith, 1986).

Una proliferación inadecuada de las células de la granulosa pueden posteriormente reducir el número de células luteales y por ende la secreción de progesterona. Además, la proliferación de las células de la granulosa y la síntesis de

receptores de LH por las células de la granulosa antes de la luteinización es regulado por las acciones sinérgicas de la FSH y el 17β -estradiol (Smith, 1986).

El pico preovulatorio de gonadotropinas induce la ovulación y la diferenciación de células foliculares residuales que forman el cuerpo lúteo y empiezan a producir progesterona (Niswender et al., 2000). Antes de que esto suceda, el estradiol es el principal esteroide secretado y producido por las células de la granulosa y teca del folículo ovárico (Arakane et al., 1997). El pico preovulatorio de LH resulta en la luteinización de las células de la granulosa y la teca y en la alteración de la vía esteroidogénica para que la progesterona sea la principal hormona esteroidea producida por este tipo de células luego de la luteinización (Niswender et al., 2000).

Angiogénesis

El folículo preovulatorio posee una red vascular a nivel de la teca interna la cual crea un microambiente adecuado que prepara al folículo preovulatorio para la luteinización (Smith, 1986). El flujo sanguíneo disminuye justo después de la ovulación pero posteriormente incrementa de manera paralela con el aumento del volumen del CL y las concentraciones plasmáticas de progesterona desde el día 2 al 5 (Acosta, Yoshizawa, Ohtani y Miyamoto 2002).

Existen ciertos factores que intervienen tanto en la maduración del folículo como en la formación del CL; factores como VEGF, FGF, IGF y angiopoyetina (ANPT), quienes participan en la angiogénesis del nuevo CL en formación (Berisha y Schams, 2005). El plasminógeno también puede jugar un rol al promover el remodelamiento de la matriz extracelular ovárica necesaria para la ruptura del folículo en vacas (Berisha y Schams, 2005). El VEGF induce los activadores del plasminógeno en las células endoteliales (Pepper, Ferrara, Orci y Montesano, 1991), el FGF-2 es un factor importante para el crecimiento endotelial (Gospodarowicz, Cheng, Lui, Baird, Esch y

Bohlen, 1985). Los IGFs pueden tener efectos indirectos en angiogénesis en el CL temprano mediante acciones estimuladoras para la producción de VEGF en las células luteales grandes (Schams, Kosmann, Berisha, Amselgruber y Miyamoto, 2001), así como en la estimulación de la proliferación y diferenciación de las células endoteliales (Berisha y Schams, 2005). Finalmente, se ha encontrado que los miembros de la familia angiopoyetina ANPT-1, ANPT-2 y sus receptores en células endoteliales Tie1 y Tie2 tienen un rol importante en la modulación de la angiogénesis y angiólisis en el CL durante el ciclo estral; al mantener y estabilizar los vasos sanguíneos (en el caso de ANPT-1) y al causar que las células endoteliales experimenten remodelación activa al desestabilizar la estructura vascular (en el caso de ANPT-2) (Berisha y Schams, 2005; Yancopoulos et al., 2000).

La desestabilización de los vasos sanguíneos es un prerrequisito para la formación vascular y regresión; cuando el VEGF se mantiene elevado, la desestabilización de los vasos sanguíneos resulta en la formación de una nueva red vascular; mientras que la disminución de VEGF resulta en la regresión de dichos vasos sanguíneos (Fig. 15) (Hanahan, 1997).

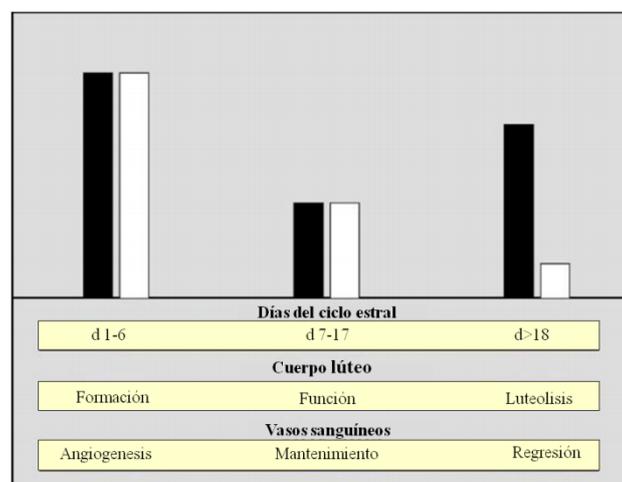


Fig 15. Representación esquemática de los perfiles de expresión de ANPT-2 en relación a ANPT-1 (barras negras) y el factor angiogénico VEGF (barras blancas) en el cuerpo lúteo bovino durante su formación, funcionamiento y luteolisis. Adaptado de Berisha y Schams (2005).

Por otro lado, la prostaciclina también puede tener un rol luteotrópico en el cuerpo lúteo bovino; debido a que dicho tejido luteal contiene gran cantidad de prostaciclina sintetasa, la cual convierte la prostaglandina endoperoxidasa (PGH₂) en prostaciclina (Sun, Chapman y McGuire 1977). En vacas, la administración de prostaciclina aumento la secreción de progesterona luteal in vivo e in vitro (Milvae y Hansel, 1980). Mientras que la administración de indometacin (inhibidor de la síntesis de prostaglandina) disminuyó la secreción de progesterona y redujo la duración del cuerpo lúteo (Milvae y Hansel, 1985). Debido a que el tejido lúteo es extremadamente vascularizado y la prostaciclina es un potente vasodilatador, se supuso que la prostaciclina puede regular el flujo sanguíneo luteal y además ayudar en la angiogénesis durante el desarrollo del CL (Smith, 1986). Debido a que el CL es transitorio y capaz de secretar grandes cantidades de progesterona dentro de unos pocos días después de la ovulación, el reclutamiento rápido de una red vascular por parte de la granulosa avascular parece ser crucial (Smith, 1986). Cerca de la ovulación, la membrana basal del folículo preovulatorio se rompe y vasos sanguíneos de la teca interna penetran la capa granulosa (Koos y LeMarie, 1983).

En vacas, la capa de células de granulosa es invadida por capilares dentro de varias horas después de la ovulación; sin embargo, la red capilar luteal no se completa hasta el día 9 después del estro (Smith, 1986). El reclutamiento de la red vascular se debe probablemente a factores angiogénicos (Smith, 1986), los cuales no solo regulan la angiogénesis del CL recientemente formado, sino que también son potentes estimuladores de la función del CL al estimular la secreción de progesterona y oxitocina (Berisha y Schams, 2005).

En respuesta al pulso de LH de mitad de ciclo, se producen prostaglandinas de tipo E por parte del folículo las cuales son cruciales para la ruptura exitosa del mismo y

la liberación del oocito al espacio periovárico (Filion, Bouchard, Goff, Lussier y Sirois, 2001).

La luteinización estimulada por el pico preovulatorio de LH parece desencadenar la producción de oxitocina en el ovario, concomitantemente con neurofisisina y progesterona (Berisha y Schams, 2005). La LH estimula y prepara las células de la granulosa y de la teca para la luteinización (Smith, McIntush y Smith, 1994). Las células del cumulus comienzan a sintetizar ácido hialurónico y la hidratación de este permite la expansión del cumulus a través del aumento del espacio entre las células de la granulosa (Eppig, 2001).

Diferenciación de células foliculares residuales

Luego de la ovulación, las concentraciones de progesterona empiezan a incrementarse debido a la formación del cuerpo lúteo, en el cual las células de la granulosa y la teca del folículo dominante se han luteinizado para producir progesterona con la finalidad de prepararse para el establecimiento y mantenimiento de la gestación y/o reanudación del ciclo estral (Forde et al., 2011).

La diferenciación hacia células capaces de producir progesterona se logra gracias al incremento en la expresión de enzimas necesarias para la conversión de colesterol en progesterona como la enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol citocromo P450 (P-450_{scc}) y la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ^5 , Δ^4 isomerasa (3 β -HSD), y la disminución de la expresión de enzimas que convierten progesterona en estrógenos como la 17 α -hidroxilasa citocromo P-450 y la citocromo P-450 aromatasa (Bao y Garverick, 1998).

Las células derivadas de la granulosa y la teca dan lugar a dos tipos distintos de células luteales que difieren tanto fisiológica como morfológicamente; de acuerdo a

esto, las células derivadas predominantemente de las células de la granulosa se han designado como células luteales grandes y aquellas derivadas de las células de la teca han sido designadas como células luteales pequeñas (Niswender et al., 2000). Además de las células esteroideogénicas, el CL contiene células endoteliales, fibroblastos, pericitos y células de origen sanguíneo (Fig. 16) (Channing, 1969).

El tejido folicular es extensamente reorganizado durante la migración de las células de la teca, fibroblastos y células endoteliales durante el desarrollo del CL; las células del CL se mezclan en la medida de que las células luteales grandes, células luteales pequeñas, fibroblastos y células endoteliales están en estrecha proximidad unas a otras (Doraiswamy, Grazul-Bilska, Ricke, Redmer y Reynolds, 1995; Farin, Moeller, Sawyer, Gamboni y Niswender, 1986).

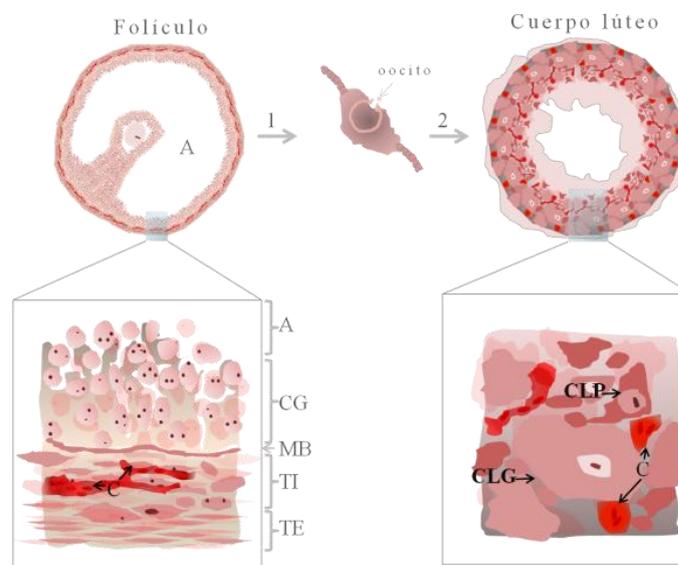


Fig 16. Esquema que representa el desarrollo de un CL a partir de un folículo. Antes de la ovulación, el folículo es organizado en distintas capas: el antro (A) del folículo es un lumen lleno de fluido que está rodeado de la capa granulosa (CG). La capa granulosa y el oocito están separados del resto del folículo por una membrana basal (MB). Afuera de la membrana basal están las capas de teca interna (TI) y teca externa (TE) del folículo. Las células de la granulosa y la teca interna sintetizan y secretan hormonas esteroideas; mientras que las células de la teca externa no son esteroideogénicas. Los capilares (C) que rodean los folículos están presentes en la teca interna y externa pero están ausentes en la granulosa debido a que la membrana basal actúa como una barrera a la vascularización. Eritrocitos pueden observarse en el lumen de los capilares. La LH causa la ruptura de la pared folicular y la liberación del oocito en la ovulación (1). Luego de la ovulación, las células de la teca interna y sus capilares cruzan la membrana basal degradada e invaden la granulosa mientras el tejido folicular se desarrolla en cuerpo lúteo (2). El CL posee una población heterogénea de células que incluyen células lúteas grandes (CLG) y células lúteas pequeñas (CLP), las cuales son células de la granulosa y teca luteinizadas. Nótese la abundancia de capilares los cuales son indicativos del alto grado de vascularización del CL Niswender et al (2000).

Un aspecto interesante del desarrollo temprano del cuerpo lúteo es la velocidad del crecimiento tisular y la proliferación celular durante este tiempo (Niswender et al., 2000). La proliferación de células en el desarrollo del CL resulta en una tasa mitótica que es igual a la de tumores de crecimiento rápido (Jablonka-Shariff, Grazul-Bilska, Redmer y Reynolds, 1993). Dentro de los factores que regulan dicha proliferación de las células luteales pequeñas y fibroblastos pueden estar involucrados los factores de crecimiento de fibroblastos (Redmer y Reynolds, 1994), hormona de crecimiento (Juengel et al., 1995) y LH (Grazul-Bilska et al., 1995). El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF; por sus siglas: Vascular endothelial growth factor) es probablemente el principal regulador de la proliferación de células luteales endoteliales en el ciclo temprano (Behrman, MacDonald y Greep, 1971). La LH induce la expresión de VEGF por parte del folículo preovulatorio (Garrido, Saule y Gospodarowicz, 1993). La proliferación de células endoteliales es un requisito para la neovascularización durante el desarrollo que resulta en la extensa red capilar del CL (Redmer y Reynolds, 1996).

Mantenimiento y función del CL

El rol principal del cuerpo lúteo es sintetizar y secretar progesterona, la cual es esencial para el mantenimiento de la gestación (Smith, 1986). La síntesis y secreción de progesterona está regulada por el balance de mecanismos luteotrópicos y luteolíticos presentes durante el ciclo estral y la gestación (Smith, 1986). Las hormonas luteotrópicas son aquellas que apoyan el crecimiento y/o la función del CL (Niswender et al., 2000). En rumiantes domésticos, las principales hormonas luteotrópicas, que mantienen el desarrollo y función del CL, son LH y GH (hormona de crecimiento o “growth hormone”) (Berisha y Schams, 2005), prolactina, IGF-I, oxitocina, PGE₂ y

PGI₂ (Niswender et al., 2000). Durante la fase lútea, el CL incrementa de tamaño y en habilidad para secretar progesterona (Niswender et al., 2000).

Una vez que el CL ha obtenido su tamaño maduro y alcanza su potencial máximo de secreción de progesterona, la función luteal es mantenida por unos pocos días y si el animal no se gesta, la regresión lútea debe ocurrir para permitir una nueva ovulación y una nueva oportunidad para que la gestación pueda ocurrir (Niswender et al., 2000).

Las concentraciones de progesterona en suero son dependientes de la cantidad de tejido esteroideogénico, del flujo de sangre y de la capacidad del tejido esteroideogénico para sintetizar progesterona (Niswender et al., 2000). La cantidad de tejido esteroideogénico es dependiente tanto del número como del tamaño de las células luteales esteroideogénicas, las cuales se incrementan durante el desarrollo luteal.

El flujo sanguíneo del CL aumenta también las concentraciones de progesterona en suero; aunque dicho aumento en suero también se asocian con cambios en las concentraciones de los componentes regulatorios y/o de la vía esteroideogénica codificados por ARNm (por ejemplo: concentraciones de ARNm que codifica para HDL, LDL, LH, PGF_{2α}, GH e IGF-I) (Niswender et al., 2000).

La LH estimula la síntesis de progesterona y es considerada un importante luteotrópico en varias especies, y en vacas se comprobó que su administración puede prolongar la permanencia del cuerpo lúteo, mientras que la administración de anti-LH bovina induce luteolisis (Donaldson y Hansel, 1965a; Schomberg, Condert y Short, 1967). De acuerdo a esto, la hormona principal para estimular la producción de progesterona en las células luteales pequeñas es LH; de hecho, está comprobado que se requiere de LH para mantener la expresión del ARNm que codifica a StAR, P-450_{scc} y 3β-HSD (Niswender et al., 2000). La hormona luteinizante es liberada desde la glándula

pituitaria de una manera pulsátil (Niswender et al., 2000). En vacas, la administración de un antagonista de GnRH durante el desarrollo luteal afecta la función normal del CL, lo cual indica que la liberación pulsátil de LH es necesaria para este proceso (Peters et al., 1994).

En vacas, la progesterona es secretada en pulsos y estos pulsos ocurren con una frecuencia mayor a los pulsos de LH (Hixon, Pijanowski, Weston, Shanks y Wagner, 1983; Walters, Schams y Schallenberger, 1984). Walters et al., (1984) reportaron que casi cada pulso de FSH durante la fase lútea temprana y media era seguido por un pulso de progesterona; además, se ha reportado la presencia de receptores de FSH en el cuerpo lúteo por lo cual se sugiere que tanto FSH como LH tienen un rol luteotrópico (Smith, 1986).

Sin embargo, en vacas el tratamiento con antagonistas de GnRH después de que el CL está completamente formado no tiene efecto en la secreción de progesterona (Peters et al., 1994). Por lo tanto los pulsos de LH parecen no ser necesarios para el mantenimiento de la secreción de progesterona en vacas (Niswender et al., 2000).

Control agudo de la secreción de progesterona

Las células lúteas grandes y pequeñas difieren en sus tasas basales de secreción de progesterona; las células lúteas grandes producen de 2 a 40 veces más progesterona (Niswender et al., 2000). Ambas células luteales también difieren en su respuesta a las diferentes hormonas y/o a los estímulos de segundos mensajeros (Niswender y Nett, 1994).

Efectos agudos de LH en la secreción de progesterona

La función principal de LH es a nivel del desarrollo y función del CL; de hecho, las concentraciones fisiológicas de LH incrementan la secreción de progesterona por

parte de las células luteales pequeñas, pero no de las células luteales grandes (Alila, Dowd, Corradino, Harris y Hansel, 1988).

En células luteales bovinas, la unión de LH a su receptor activa adenilato ciclasa, que lleva al aumento de las concentraciones de AMPc y posteriormente a la activación de PKA (Davis, May y Keel, 1996). La activación de la PKA en las células luteales pequeñas aumenta la liberación de colesterol desde los esteres de colesterol, pero no influencia las concentraciones de ARNm o la actividad de P-450_{scc} o 3 β -HSD (Fig. 17) (Wiltbank, Belfiore y Niswender, 1993).

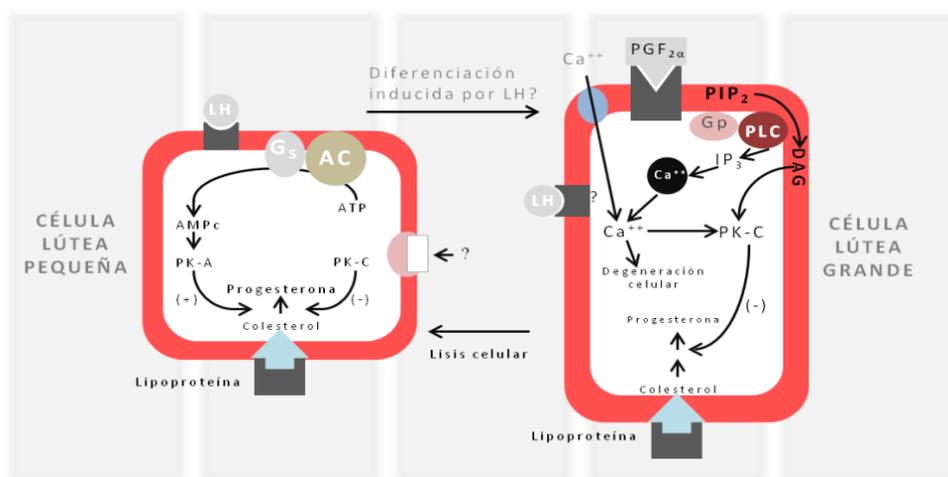
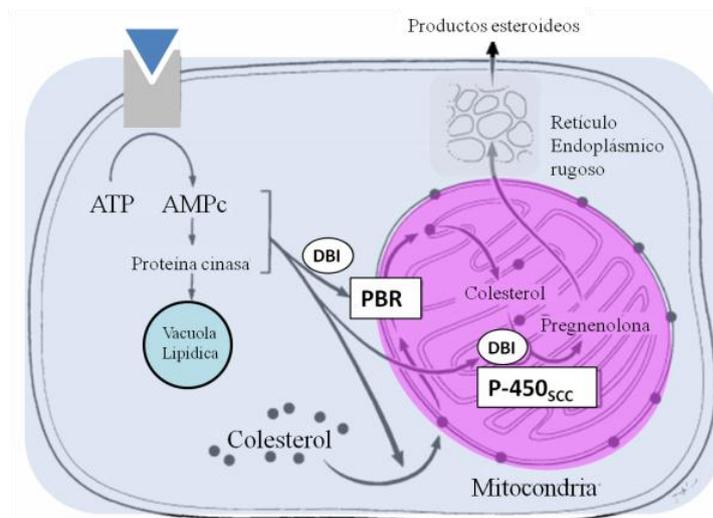


Fig 17. Representación del modelo de segundo mensajero involucrado en la regulación de las funciones de las células luteales pequeñas y grandes. Adaptado de Niswender et al. (2000).

Se ha sugerido que la LH aumenta la producción de esteroides al facilitar el transporte de colesterol a través de la célula (Wiltbank, Belfiore y Niswender, 1993). La activación de PKA aumenta la cantidad de StAR fosforilada y parece estimular el transporte de colesterol (Arakane et al., 1997), lo cual es un paso clave para la estimulación hormonal aguda para la síntesis de progesterona (Niswender et al., 2000). Hay evidencia que el receptor periférico de benzodiazepinas PBR/endocepa interactúa también en el transporte de colesterol a través de la membrana mitocondrial (Niswender

et al., 2000). Otras proteínas como el canal de aniones voltaje dependiente también pueden estar involucradas en este proceso (Fig. 18) (Papadopoulus y Brown, 1995)



Efectos agudos de la GH e IGF-I en la secreción de progesterona

Fig 18. Representación esquemática del rol de DBI y PBR en la biosíntesis de esteroides. Hormonas polipépticas interactúan con la superficie celular estimulando la producción de AMPc. La activación del AMPc dependiente de proteína cinasa resulta en la liberación de colesterol libre de diferentes almacenamientos intracelulares. Este colesterol es transportado a la mitocondria e incorporado en la membrana externa mitocondrial. PBR juega un rol en la incorporación del colesterol a dicha membrana y media el paso limitante en la biosíntesis de esteroides (paso del colesterol desde la membrana externa a la interna de la mitocondria). Este proceso es activado por la unión del DBI citoplasmático al PBR. Una vez dentro de la membrana interna, el colesterol puede acceder a la P450_{SCC}. Adaptado de Papadopoulus y Brown (1995)

Tanto GH como IGF-I aumentan la secreción de progesterona por el tejido luteal (Liebermann y Schams, 1994). La GH podría tener efecto directo en la función luteal a través de la unión a su receptor y la activación de la tirosina cinasa asociada a membrana JAK2 (Argetsinger et al., 1993). De acuerdo a la perfusión de GH directamente dentro del CL, aumenta la secreción de progesterona y oxitocina dentro de 60 minutos (Liebermann y Schams, 1994). Además, la GH puede influenciar indirectamente la función luteal al incrementar la expresión de IGF-I, el cual estimula la fosforilación del sustrato1 del receptor para insulina y aumenta la actividad de la fosfoinositida 3-cinasa, la cual produce fosfatidilinositol 3-fosfato que actúa como segundo mensajero (Chakravorty, Joslyn y Davis, 1993).

Efectos estimulatorios de las prostaglandinas en la secreción de progesterona

Las prostaglandinas E e I tienen su importancia en la función luteal normal; de hecho, son producidas en grandes cantidades en la etapa lútea temprana por lo tanto se presume que tienen su rol principal en el desarrollo del CL (Milvae y Hansel, 1983).

Homeida y El-Eknaah (1992), demostraron que un antagonista de la oxitocina induce un retraso en el desarrollo luteal debido a la supresión de la síntesis de PGI₂; además, adicionar PGI₂ a tejido luteal de vacas incrementa la secreción de progesterona (Alila, Corradino y Hansel, 1988). La prostaglandina E₂ también produce un incremento en la producción de progesterona en células luteales bovinos y ovinas (Alila, Corradino y Hansel, 1988).

Luteolisis y regresión

Luteolisis funcional y estructural

Se define luteolisis como la lisis o la muerte estructural y funcional del CL (Niswender et al., 2000). Al final de un ciclo no fértil, la regresión del cuerpo lúteo se lleva a cabo, se pierde la capacidad esteroidogénica (luteolisis funcional), se inicia la muerte celular y finalmente la involución del tejido así como la resorción ocurre dentro de unos pocos días (luteolisis estructural) (Berisha y Schams, 2005). De acuerdo a esto, durante la luteolisis normal ocurren dos eventos muy relacionados: la pérdida de la capacidad de sintetizar y secretar progesterona (McGuire, Juengel y Niswender, 1994), seguido de la pérdida de células que comprenden el CL (Pate, 1994).

En la mayoría de mamíferos, la luteolisis normalmente depende de la presencia del útero (Niswender et al., 2000). La prostaglandina (PGF) es secretada por el útero en el bovino (Lamothe, Bousquet y Guay, 1977) y es la principal hormona luteolítica en rumiantes (Kindahl, Edqvist, Granstrom y Bane, 1976). El inicio de luteolisis por la

PGF_{2α} parece ser un efecto local entre cada cuerno uterino y el ovario ipsilateral (Ginther, 1974). En el útero, la hormona oxitocina se une a los receptores de oxitocina lo cual propaga el episodio de secreción de PGF desde el útero (Forde et al., 2011). La PGF entonces media el mecanismo luteolítico mediante un intercambio contracorriente entre la vena uterina y la arteria ovárica (Berisha y Schams, 2005; Forde et al., 2011; Ginther, 1974) sin entrar en la circulación pulmonar donde sería enzimáticamente inactivada por los pulmones (Piper, Vane y Wyllie, 1970), induciendo la regresión del cuerpo lúteo (Fig. 19). Esto reduce las concentraciones circulantes de progesterona, las concentraciones de estradiol incrementan y la GnRH en el hipotálamo es estimulada conforme el animal entra en la fase folicular del ciclo estral (Forde et al., 2011).

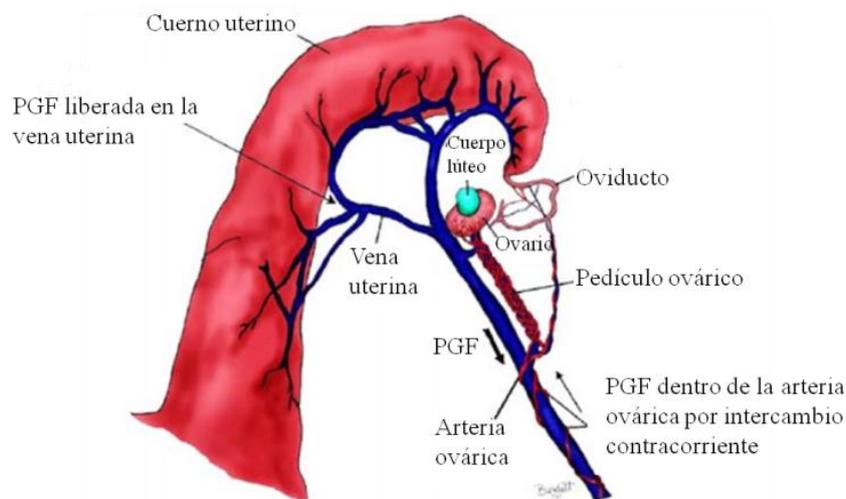


Fig 19. Diagrama esquemático ilustrando el rol de la prostaglandina-F_{2α} (PGF) en el control de la luteólisis. La prostaglandina es liberada del endometrio uterino en la vena uterina y es transferida a la arteria ovárica a través de un intercambio contracorriente y luego es entregada al CL como un mecanismo local donde se produce la luteólisis. Adaptado de Forde et al. (2011).

Durante la regresión luteal, la disminución inicial de las concentraciones de progesterona parecen no deberse a la pérdida de células luteales esteroideogénicas, debido a que el número de células luteales no disminuye hasta que las concentraciones

de progesterona en suero han disminuido (Braden, Gamboni y Niswender, 1988). La disminución de la secreción de progesterona en suero se debe a la disminución del flujo sanguíneo luteal y a la disminución de la capacidad esteroidogénica de las células luteales individuales (Niswender et al., 2000).

Se ha propuesto que el estradiol que proviene del folículo preovulatorio desencadena la liberación de oxitocina hipofisiaria (McCracken, Custer, Eldering y Robinson, 1994), la cual estimula la liberación de una pequeña cantidad de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Fairclough et al., 1980). Posteriormente, la $\text{PGF}_{2\alpha}$ inicia un circuito de retroalimentación positiva que involucra la liberación de oxitocina luteal adicional y más $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Tsai y Wiltbank, 1997).

Flujo sanguíneo y cambios vasculares

Las $\text{PGF}_{2\alpha}$ reduce el flujo sanguíneo del CL y así puede ocasionar luteolisis al privar a la glándula de nutrientes, sustratos para esteroidogénesis y soporte luteotrópico (Niswender et al., 2000). Las células endoteliales poseen receptores para $\text{PGF}_{2\alpha}$, al unirse al receptor causa degeneración de dichas células (O'shea, Nightingale y Chamley, 1977), lo cual resulta en una marcada reducción de la densidad capilar (Azmi y O'shea, 1984) y consecuentemente en una reducción del flujo sanguíneo en el parénquima luteal. De acuerdo Niswender et al. (2000), incluso bajos niveles de $\text{PGF}_{2\alpha}$ puede inducir apoptosis de células capilares endoteliales.

Existen ciertas interacciones entre la $\text{PGF}_{2\alpha}$ y péptidos vasoactivos (ET-I y Ang II) y citoquinas inflamatorias, ambos producidos y liberados en el CL bovino (Miyamoto et al., 1997; Hayashi, 1999). La $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimula la producción de endotelina-I (ET-I) la cual tiene una potente acción vasoconstrictora e inhibe la actividad esteroidogénica de las células luteales (Girsh et al., 1996).

Después de la angiogénesis, el CL se convierte en uno de los órganos más vascularizados y recibe la mayor tasa de flujo sanguíneo (Wiltbank, Dysko, Gallagher y Keyes, 1988). Una rápida disminución del flujo sanguíneo luteal ha sido propuesta como la principal acción luteolítica de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Berisha y Schams, 2005). Esta disminución ocurre después de un aumento a corto tiempo (2 a 4 horas) tanto en luteolisis normal como inducida por $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Knickerbocker, Wiltbank y Niswender, 1988). El incremento temprano en el flujo sanguíneo al inicio de la luteolisis puede ser mediado por la liberación de óxido nítrico (NO) y PGE_2 (Shirasuna et al., 2004)

En conclusión, la disminución de progesterona y el incremento transitorio del flujo sanguíneo puede desencadenar la cascada luteolítica (Acosta, Yoshizawa, Ohtani y Miyamoto, 2002). Hay evidencia de que el sistema IGF juega un rol importante en el complejo proceso de luteolisis inducida por $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el CL bovino (Berisha y Schams, 2005). Durante la luteolisis estructural hay una regulación decreciente de los receptores de VEGF y disminución de la expresión de su mRNA; por otro lado, FGF-1 Y FGF-2 experimentan una regulación por incremento (“upregulation”), lo cual parece indicar que tienen mayor impacto en la luteolisis funcional (Berisha y Schams, 2005).

Los péptidos vasoactivos AngII y ET-1 pueden tener una función importante durante la luteolisis fisiológica e inducida en vacas (Berisha y Schams, 2005). Estos péptidos están relacionados a funciones ováricas como ovulación, maduración del oocito y la función del CL (Berisha, Schams y Miyamoto, 2002). AngII y ET-1 tienen efectos directos en las células luteales al inhibir la producción de progesterona (Hayashi y Miyamoto, 1999). Schams y Berisha (2004) indican que ambos péptidos pueden actuar como vasoconstrictores durante la luteolisis funcional, pero también como inductores de apoptosis durante la luteolisis funcional/estructural (Fig. 20).

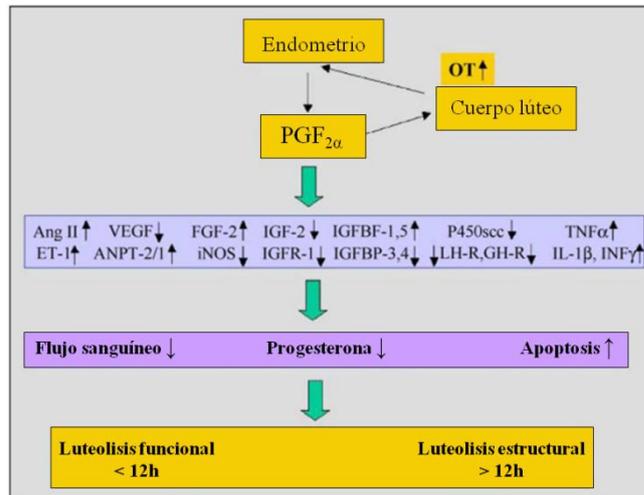


Fig 20. Representación esquemática de los factores posiblemente involucrados en la luteolisis en vacas. Adaptado de Berisha y Schams (2005).

Por otro lado, citoquinas inflamatorias y otros factores tienen una función importante en la luteolisis. En el ovario bovino, leucocitos, linfocitos T-1 y macrófagos aumentan significativamente durante la regresión del CL (Penny et al., 1999). Durante la regresión tardía, el 70% de todas las células proliferando en el CL bovino son macrófagos CD-14 (Bauer, Reibiger y Spanel-Borowski, 2001). Davis y Rueda (2002) asumen que la involución del CL es una condición similar a un proceso inflamatorio. Citoquinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF α), interferon γ (IFN γ), interleucina 1 β (IL-1 β), NO sintasa y FGF-2 experimentan regulación por incremento (“upregulation”) en tejido luteal bovino después de la luteolisis (Neuvians, Schams, Berisha y Pfaffl, 2004).

En definitiva, las citoquinas pueden tener un papel no solo en la luteolisis estructural sino también en la luteolisis funcional y en la privación de factores de sobrevivencia lútea llevando así a una situación en la cual la apoptosis puede ocurrir (Berisha y Schams, 2005).

Cambios morfológicos

La $\text{PGF}_{2\alpha}$ provoca una serie de cambios morfológicos (Niswender et al., 2000). La proporción de células luteales esteroideogénicas ocupando el cuerpo lúteo disminuye dentro de 24 horas en ovejas tratadas con $\text{PGF}_{2\alpha}$ en la mitad de la fase lútea (Braden, Gamboni y Niswender, 1988). Los cambios morfológicos de las células luteales tanto grandes como pequeñas no se hace evidente sino hasta 24 a 36 horas después de la exposición a $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Sawyer, Niswender y Braden, 1990) aunque la capacidad esteroideogénica para ese entonces es muy reducida.

Señales intracelulares

Los receptores de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ son receptores acoplados a proteína-G (Graves et al., 1995). Una vez unida a su receptor la $\text{PGF}_{2\alpha}$ induce la activación de la fosfolipasa C (PLC). Dicha PLC cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol a inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) (Berridge e Irvine, 1984). El aumento de las concentraciones citosólicas de IP_3 resulta en la liberación de calcio desde el retículo endoplásmico liso lo cual estimula la actividad catalítica de la proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} (PKC) (Nishizuka, 1986). Se cree que la PKC media muchas de las acciones antiesteroideogénicas de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ en las células lúteas grandes; como por ejemplo, la modificación de proteínas celulares involucradas en la esteroideogénesis (McGuire, Juengel y Niswender, 1994), disponibilidad de colesterol (Behrman, MacDonald y Greep, 1971) y mantenimiento de la matriz extracelular (Niswender et al., 2000). Finalmente, la activación de la PKC al estar involucrada en la inducción de la expresión y activación de proteínas apoptóticas, es posible que esté relacionada con la apoptosis de las células luteales grandes (Niswender et al., 2000). Una de las proteínas identificadas como reguladora de la apoptosis es bcl-2 la cual previene la muerte celular al regular los mecanismos homeostáticos del Ca^{2+} , atenuando el estrés oxidativo e interactuando con ras y bax. Bax (gen asociado a bcl-2) promueve la apoptosis al unirse

a bcl-2 (Niswender et al., 2000). Durante la luteolisis en vacas, el ARNm que codifica para bax está aumentado mientras que el que codifica para bcl-2 permanece sin cambios (Rueda et al., 1997). El crecimiento del folículo dominante está asociado también con el incremento en la expresión de genes asociados a tumores como DICE-1 y MCL-1. Este último es un miembro de la familia de proteínas antiapoptóticas bcl-2. Por otro lado, en el ambiente de folículos subordinados, donde la concentración de estradiol es baja, numerosos genes directamente involucrados en la apoptosis se ven altamente expresados en las células de la granulosa y teca, en comparación con folículos dominantes (Evans et al., 2004). Por ejemplo, CAD (responsable de la fragmentación del ADN), TNF α (estimula la apoptosis de las células de la granulosa bovina), DRAKs (proteína involucrada en el señalamiento apoptótico), caspasa-13 (proteasa esencial para el inicio e ejecución de apoptosis), Apaf-1 (proapoptótica y crucial en el reclutamiento y activación de caspasas), BTG (molécula antiproliferativa), TS-BCLL (posible rol en muerte celular de las células de la teca) (Evans et al., 2004).

1.3.1. Esteroidogénesis durante la fase lútea

Las células de la teca expresan las enzimas necesarias para convertir el colesterol en andrógenos pero carecen las enzimas necesarias para convertir andrógenos a estradiol (Bao y Garverick, 1998). A la inversa, las células de la granulosa producen progesterona pero no pueden convertir pregnenolona o progesterona a andrógenos (Niswender et al., 2000). Sin embargo, las células de la granulosa pueden convertir andrógenos a estradiol; y así los andrógenos producidos en las células de la teca son aromatizados a estradiol por las células de la granulosa. La síntesis de progesterona es la vía esteroidogénica menos compleja en el ovario (Fig. 21).

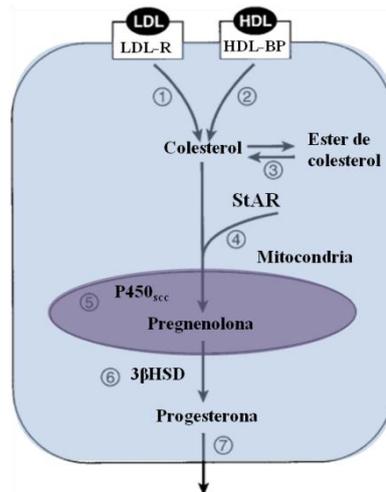


Fig 21. Vía biosíntesis de progesterona en una célula lútea genérica. Tres fuentes de colesterol pueden utilizarse: 1) lipoproteína de baja densidad (LDL), 2) lipoproteína de alta densidad (HDL) o 3) esteres de colesterol almacenados e hidrolizados por colesterol esterasa. 4) El colesterol libre es transportado a la mitocondria y transportado de la membrana externa a la interna donde se involucra la proteína reguladora esteroideogénica aguda StAR. 5) El colesterol es convertido a pregnenolona por la P450_{sc}. Luego es transportado fuera de la mitocondria y 6) convertido a progesterona por la 3βHSD la cual está presente en el retículo endoplásmico liso. 7) La progesterona se difunde desde la célula lútea. Adaptado de Niswender et al. (2000).

Sustratos esteroideogénicos

El sustrato para la esteroidogénesis es el colesterol. Bajo condiciones normales, la mayoría del colesterol es sintetizado en el hígado (Krisans, 1996) y transportado hacia tejidos esteroideogénicos como la corteza adrenal, folículos, cuerpo lúteo y testículos en forma de lipoproteínas (Niswender et al., 2000). Las fuentes de colesterol más comunes son las lipoproteínas de baja densidad (LDL; por sus siglas: low-density lipoprotein) y las lipoproteínas de alta densidad (HDL; por sus siglas: High density lipoprotein); usadas en la producción de hormonas esteroideas por el CL (Pate y Condon, 1982).

La captación de LDL por parte de las células lúteales ocurre por endocitosis mediada por receptor (Brown y Goldstein, 1986) y es una vía bastante eficiente debido a que cada molécula de LDL contiene aproximadamente 2500 moléculas de colesterol (Niswender et al., 2000). Una vez dentro de la célula, el endosoma se combina con los lisosomas donde el LDL se disocia del receptor y se rompe liberando al colesterol y

haciéndolo disponible para la célula (Niswender et al., 2000). El receptor del LDL se recicla o se degrada (Grummer y Carroll, 1988). Por otro lado, la captación de HDL ocurre luego de que se acopla a una proteína de unión adherida a la membrana plasmática y el colesterol es transportado dentro de la célula por un mecanismo que no es endocitosis mediada por receptor (Lestavel y Fruchart, 1994).

Una vez que el colesterol libre está presente en el citosol de la célula puede ser usado para la esteroidogénesis, para la formación de membranas celulares o puede ser esterificado con ácidos grasos para formar esteres de colesterol (por acción de la colesterol ester sintetasa) y ser almacenado (Johnson, Phillips y Rothblat, 1997). La colesterol esterasa es activada cuando se fosforiliza por la proteína cinasa A (PKA) (Trzeciak y Boyd, 1974) e hidroliza los esteres de colesterol almacenados y provee colesterol libre para que sea usado por la célula (Niswender et al., 2000).

Transporte del colesterol

El transporte del colesterol a la mitocondria es una parte clave para la síntesis de esteroides; de igual manera el paso desde la capa externa de la mitocondria hacia la interna donde el complejo enzimático de escisión de la cadena lateral rompe la cadena lateral del colesterol para formar pregnenolona (Stone y Hechter, 1954).

El transporte hacia la membrana externa de la mitocondria requiere un citoesqueleto intacto debido a que inhibidores de la función de los microtúbulos y microfilamentos previene la acumulación de colesterol mitocondrial (Niswender et al., 2000). El estado de fosforilación de las proteínas del citoesqueleto influencia de sobremanera la tasa de transporte de esteroides (Niswender et al., 2000). El paso limitante de la velocidad de la vía esteroidogénica aparentemente es el transporte del colesterol desde la capa externa hacia la membrana mitocondrial interna (Stevens, Xu y

Lambeth, 1993); además este paso parece ser el principal sitio de regulación aguda positiva y negativa mediante segundo mensajero (Simpson y Waterman, 1983).

La estimulación de la vía esteroidogénica por hormonas tróficas requiere de la síntesis de una proteína de vida corta; esta proteína se conoce con el nombre de proteína reguladora esteroidogénica aguda (StAR) (Niswender et al., 2000). Lin et al., (1995) demostraron que la síntesis esteroidea adrenal y gonadal reducida en pacientes con hiperplasia adrenal lipoide congénita se debe a la ocurrencia de mutaciones en el gen de StAR. Además de StAR, los receptores mitocondriales para benzodiazepinas y el ligando endógeno para este receptor, parecen requerirse para el transporte normal de colesterol desde la membrana mitocondrial externa hacia la interna, el sitio donde se lleva a cabo la escisión de la cadena lateral del colesterol (Niswender et al., 2000).

Conversión de colesterol a progesterona

Una vez dentro de la matriz mitocondrial, las acciones de la P-450_{sc}, la adrenoxina y la adrenoxina reductasa escinden la cadena lateral del colesterol para formar pregnenolona (Stone y Hechter, 1954). Posteriormente, la pregnenolona es transportada al retículo endoplasmático liso (generalmente cercano a la mitocondria) donde la 3 β -HSD convierte la pregnenolona en progesterona (Hanukoglu, 1992). Posteriormente, la progesterona se difunde desde la célula (Niswender et al., 2000).

Mecanismo de acción de la LH en la producción de progesterona

De acuerdo a Smith (1986), la LH estimula la síntesis de progesterona mediante un sistema de segundo mensajero, el cual involucra una hormona proteica (LH; primer mensajero), receptor unido a membrana, conversión de adenosina trifosfato (ATP) a adenosina-3', 5'-monofosfato cíclico (cAMP; segundo mensajero) por medio de la

adenilato ciclasa, activación de cAMP-dependiente de proteína cinasa y una respuesta intracelular (esteroidogénesis).

Niswender et al. (1980), propusieron un modelo en el cual la LH se une a su receptor de membrana específico y activa la adenilato ciclasa resultando en la síntesis de cAMP. El complejo receptor de la hormona es internalizado posteriormente por endocitosis y degradado por un lisosoma. El aumento intracelular de las concentraciones de cAMP estimula la actividad de la proteína cinasa la cual puede fosforilar enzimas esteroidogénicas (colesterol esterasa y el complejo de escisión de cadena lateral) para de esta manera aumentar la síntesis de progesterona (Smith, 1986).

Otro concepto de mecanismo de acción involucra el metabolismo fosfolipídico dentro de la membrana plasmática y puede estar asociado con la síntesis luteal de progesterona (Smith, 1986). La membrana citoplasmática contiene una bicapa fosfolipídica intercalada con proteínas. La metilación de fosfolípidos o el metabolismo del fosfatidil inositol puede estar asociado con la secreción de progesterona estimulada por LH en células luteales bovinas (Smith, 1986).

2. Efectos fisiológicos de la progesterona

Las hormonas esteroideas actúan a través de receptores nucleares para regular eventos de transcripción (Drummond, 2006). Estos receptores forman parte de una superfamilia de receptores nucleares.

Los objetivos principales de la progesterona son el tracto reproductivo y el eje hipotálamo-pituitario; brevemente, la progesterona cumple su función al preparar al tracto reproductivo para la iniciación y mantenimiento de la gestación (Niswender et al, 2000). La P₄ es la hormona que regula la longitud del ciclo estral al influenciar el

momento de la señal luteolítica de la PGF2 α por parte del endometrio (Berisha y Schams, 2005).

Aparentemente la progesterona ejerce la mayoría de sus efectos al regular directamente la transcripción de genes a través de receptores nucleares específicos que actúan como factores de transcripción inducibles por ligando (Moutsatsou y Sekeris, 1997). Sobre la unión del ligando, estos receptores modulan la expresión de genes al unirse a elementos específicos del ADN sensibles a progesterona (Niswender et al., 2000).

En el útero, la progesterona actúa en el endometrio como un factor de diferenciación (Cummings y Yochim, 1984). Los estrógenos, durante la fase folicular, inducen la proliferación de células del endometrio y elevadas concentraciones de progesterona durante la fase lútea del ciclo reproductivo inhibe la mitosis del endometrio (Padykula et al., 1989). La progesterona además induce la diferenciación del estroma, estimula la secreción glandular y cambia el patrón de proteínas secretadas por las células endometriales que soportan el desarrollo embrionario temprano (Niswender et al., 2000).

En el útero, la progesterona induce la inactividad del miometrio (Niswender et al., 2000). Además, disminuye la recepción de calcio extracelular que es requerido para la contracción de las células del miometrio (Batra, 1986), al generar una regulación decreciente de los genes que codifican las subunidades dependientes de voltaje de los canales de calcio (Tezuka, Ali, Chwalisz y Garfield, 1995). Además previene contracciones uterinas al bloquear la capacidad del estradiol de inducir receptores α -adrenérgicos, lo cual causa contracciones (Bottari, Vokaer, Kaivez, Lescrainier y Vauquelin, 1983).

La longitud del ciclo reproductivo está gobernado en parte por la progesterona (Niswender et al., 2000). Las concentraciones de progesterona son bajas durante la fase folicular y durante este tiempo, el aumento de las concentraciones de estradiol actúa en el hipotálamo y la pituitaria para estimular pulsos de LH de baja amplitud y alta frecuencia, lo cual resulta en la elevación de las concentraciones circulantes de LH que lleva al desarrollo folicular al punto de la ovulación (Lucy et al., 1992). Luego de la ovulación, una vez que el CL se ha desarrollado, las concentraciones de progesterona aumentan restringiendo la secreción de LH (Niswender et al., 2000), al bloquear los pulsos de GnRH desde el hipotálamo (Kasa-Vubu et al., 1992). A nivel de la pituitaria, la progesterona reduce mediante regulación decreciente el número de receptores de GnRH (Bauer-Danton, Weiss y Jameson, 1995). Altos niveles de progesterona resultan en una expresión decreciente de genes que codifican las subunidades β tanto de LH como de FSH (Brann, O'Conner, Wade, Zamorano y Mahesh, 1993). Sin embargo, estos efectos de la progesterona sobre la secreción de gonadotropinas parece ser dependiente del ambiente endócrino completo, en ciertas ocasiones, la progesterona facilita los pulsos de gonadotropinas inducidas por estradiol (Attardi y Happe, 1986).

La progesterona en la mitad del ciclo inhibe la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Skarzynski y Okuda, 1999). Además la parece jugar un rol luteotrópico al estimular la síntesis de LHR en el cuerpo lúteo bovino (Jones, Ottobre y Pate, 1992). También hay evidencia que la P_4 reprime la ocurrencia de apoptosis en el CL mediante un mecanismo dependiente del receptor de progesterona (PR) (Rueda et al., 2000; Skarzynski, Jaroszewski y Okuda, 2001)

En fase subluteal, las concentraciones de progesterona (proporcionadas a través del uso de dispositivos intravaginales o implantes auriculares en ausencia de un cuerpo lúteo) generan un aumento de la frecuencia del pulso de LH, supresión

del recambio de las ondas foliculares y aumento secuencial de FSH, así como la formación de un folículo dominante persistente que mantiene su actividad esteroidogénica (Roche, 1996).

El evento postovulatorio de mayor importancia es el aumento temprano de progesterona, tanto para el desarrollo del embrión como para el establecimiento de la sincronía entre el embrión y el útero (Båge et al., 2002). Además de controlar la señal luteolítica, la progesterona estimula la producción de secreciones endometriales necesarias para el desarrollo del embrión durante las etapas tempranas de la gestación (Geisert, Morgan, Short y Zavy, 1992).

3. Ciclo estral y niveles de progesterona en vacas de distintos estados reproductivos

En este capítulo se pretende abordar de manera breve ciertas diferencias en la función ovárica relacionadas a la paridad o estados reproductivos distintos en vacas lecheras.

3.1. Ciclo estral y niveles de P4 en vaquillas

En vaquillas la pubertad se alcanza después de un período de 6 a 24 meses de maduración postnatal; dicha maduración involucra una compleja interacción de factores endócrinos que permiten el desarrollo del tracto reproductor (Moran, Quirke y Roche, 1989). La primera ovulación se desencadena porque el eje hipotálamo pituitaria pierde sensibilidad al efecto de retroalimentación negativa del 17β -estradiol, permitiendo la ocurrencia del pulso de LH (Moran et al., 1989; Nogueira, 2004).

El sistema nervioso central (SNC) controla la reproducción de las vaquillas a través de las gonadotropinas FSH y LH. Los niveles de LH alcanzan su máxima

concentración a los 3 meses de edad luego disminuyen hasta antes de un incremento gradual que culmina con la ovulación varios meses más tarde (Fig. 22) (Schams, Schallenberger, Gombe y Karg, 1980). Desjardins y Hafs (1969) encontraron que las concentraciones adenohipofisiales de ambas gonadotropinas aumentan hasta los 7 meses de edad.

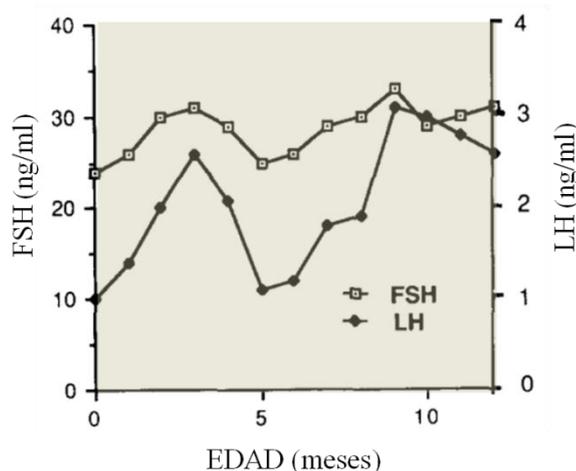


Fig 22. Concentraciones plasmáticas de LH y FSH de 4 terneras desde el nacimiento hasta 12 meses de edad. Cada punto representa el valor promedio mensual de 52 muestras (aproximadamente 13 por animal). El primer estro se dio en estas vaquillas entre los 10 a 11 meses de edad. Adaptado de Schams et al. (1980)

Por otro lado, los esteroides más importantes en la reproducción de las vaquillas (17β -estradiol y progesterona) se mantienen en concentraciones muy bajas y constantes en relación con los patrones adultos hasta que la primera ovulación es inminente (Fig. 23) (Schams et al., 1980; Moran, 1988), lo cual implica que a pesar de que juegan un rol en el inicio de la pubertad no inician el proceso (Moran et al., 1989).

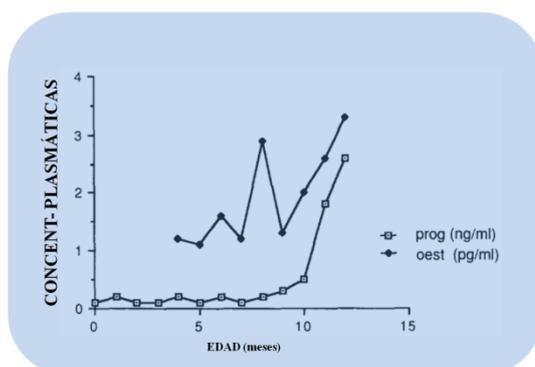


Fig 23. Concentraciones plasmáticas de 17β -estradiol y progesterona en vaquillas maduras. Los datos de niveles de P_4 (promedio de 52 muestras) pertenecen a Schams et al. (1980); mientras que los datos de E_2 (promedio de 15 muestras) pertenecen a Moran (1988). El primer estro ocurrió a los 12 meses de edad en este grupo. Adaptado de Moran et al. (1989).

En el ovario, el contenido de folículos en crecimiento incrementa de manera dramática sobre los primeros 3 a 4 meses después del nacimiento (Desjardins y Hafs, 1969), y esto corresponde al período de incremento de niveles de LH en la circulación.

Generalmente, la primera ovulación se da a los 9 a 10 meses de edad en vaquillas; sin embargo, hay ocasiones en las que puede llegar entre los 6 (Glencross, 1984) y 24 meses de edad (Moran et al., 1989). Por otro lado, el peso es otro determinante importante en el momento de la pubertad. Sorensen et al. (1959) mostraron que las vaquillas alcanzan la pubertad al alcanzar cierto peso en lugar de alcanzar cierta edad.

Una serie de cambios en el patrón endócrino acompañan la primera ovulación en vaquillas en comparación con los patrones normales del ciclo estral. La clásica teoría gonadostática sugiere que la primera ovulación ocurre cuando disminuye la sensibilidad a la retroalimentación de esteroides, lo cual permite la liberación de suficientes gonadotropinas para llevar a cabo la maduración folicular (Ramírez y McCann, 1963). Levasseur (1977) propone otra teoría en la que indica que la pubertad es desencadenada cuando hay un incremento en la estimulación del hipotálamo por parte del SNC y que a pesar de la retroalimentación negativa, suficientes gonadotropinas son liberadas desde la pituitaria para provocar la ovulación. Sin embargo, la madurez en vaquillas parece acercarse más hacia la teoría gonadostática (Moran et al., 1989). El eje hipotálamo-pituitaria de la hembra bovina no es siempre sensible a la retroalimentación negativa. Durante la gestación, el feto secreta gonadotropinas por 7 meses, luego se inhibe por acción del SNC (Levasseur, 1977); luego del nacimiento la secreción de gonadotropinas nuevamente se lleva a cabo llegando a su concentración máxima a los 3 meses de edad (Moran et al., 1989). Los folículos en crecimiento son la fuente del 17β -estradiol que genera la retroalimentación negativa en vaquillas y el dramático incremento de la

sensibilidad del eje hipotálamo-pituitaria ocurre en ese momento (Anderson et al., 1986). Kinder, Day y Kittok (1986) demuestran una disminución en los receptores citosólicos del 17β -estradiol en la pituitaria anterior y el hipotálamo medial-basal durante ese momento, lo cual lleva a una situación en la cual el estradiol se vuelve inefectivo para suprimir la secreción de LH y en ese punto el primer pulso ovulatorio se libera (Moran et al., 1989).

Se conoce que la ovulación en vaquillas en algunos casos es precedida por varias pequeñas elevaciones de los niveles de progesterona (Berardinelli, Dailey, Butcher y Inskoop, 1979), lo cual indica que en ciertas ocasiones la primera ovulación se logra con la formación de un cuerpo lúteo de vida corta (Fig. 24). En otras ocasiones la ovulación no se produce, y varios de estos intentos de ovulación son seguidos de ovulaciones silentes al momento de la pubertad en vaquillas (Berardinelli et al., 1979).

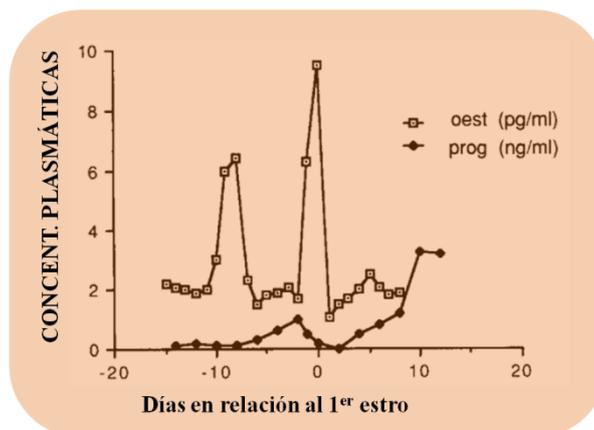


Fig 24. Concentraciones plasmáticas de 17-estradiol y progesterona alrededor del momento del primer estro (día 0) en una vaquilla típica. Datos de Glencross (1984). Gráfico adaptado de Moran et al. (1989).

Por esta razón, aparentemente la ausencia de progesterona antes de la ovulación es responsable de la falla de ovulación, ausencia de estro y de CL inadecuados en el momento de la pubertad; por otro lado, elevaciones de progesterona gracias a dichos cuerpos lúteos transitorios permite a las vaquillas asegurar que el pulso de LH siguiente

permita la ovulación acompañada de signos de estro y fase lútea normal (Moran et al., 1989).

Longitud de los ciclo

Al realizar investigaciones en la dinámica folicular McDougall et al. (1995) indican que en vaquillas, en promedio, se dan 4,2 oleadas de crecimiento folicular antes de la primera ovulación. Wolfenson et al. (2004) observa que las longitudes de los ciclos estrales es 2,6 días menor en vaquillas en comparación con vacas multíparas. Sartori et al. (2004) indica que el intervalo interovulatorio en vaquillas fue de $22,0 \pm 0,4$ días, en comparación con vacas multíparas de $22,9 \pm 0,7$ días. En dicho estudio se encontraron ciclos en vaquillas de 2 (n=15), 3 (n=9) y 4 (n=3) ondas foliculares.

Tamaño folicular

De acuerdo a Wolfenson et al. (2004) en lo que a tamaño folicular ovulatorio se refiere, las vaquillas presentan menores diámetros en comparación a vacas multíparas ($13,0 \pm 0,3$ vs. $16,5 \pm 0,05$, respectivamente). En la misma investigación concluyen que dichos diámetros menores corresponden a que en vaquillas las concentraciones de FSH presentes son más bajas.

De igual manera, la dominancia de dicho folículo ovulatorio tiende a ser menor en vaquillas en comparación con vacas multíparas (1,2 días menor en vaquillas) (Wolfenson et al., 2004). Sartori et al. (2004) confirma la información encontrada pues indica que las vaquillas tienen folículos ovulatorios de menor tamaño en comparación con vacas ($14,9 \pm 0,2$ vs. $16,8 \pm 0,5$ mm).

Estradiol

De acuerdo a lo observado por Wolfenson et al. (2004) las concentraciones de estradiol alrededor del estro y el pulso preovulatorio de LH son mayores en vaquillas comparado con vacas multíparas (8,7 vs. 6,4 pg/ml y 20 vs. 9 ng/ml, respectivamente).

De acuerdo a Sartori et al. (2004) la máxima concentración de estradiol luego de ovulación es mayor en vaquillas en comparación con vacas multíparas ($11,3 \pm 0,6$ vs. $7,9 \pm 0,8$ pg/ml)

Progesterona

Wolfenson et al. (2004) indica que las concentraciones de progesterona fueron mayores en vaquillas comparado a vacas multíparas a partir del día 3 hasta el día 16 del ciclo estral. De acuerdo a Sartori et al. (2004) la concentración sérica máxima de progesterona es mayor en vaquillas ($7,3 \pm 0,4$ ng/ml) en comparación con vacas multíparas ($5,6 \pm 0,5$ ng/ml); sin embargo, el volumen luteal es menor en vaquillas (7303 ± 308 mm³ vs. 11120 ± 678 mm³).

Pursley et al. (1997) reporta que la tasa de concepción en vaquillas es mucho mayor que en vacas en lactación (74,4% y 38,9%, respectivamente). De acuerdo a Roche et al. (1981) vaquillas fértiles normalmente tienen una tasa de concepción de casi 90% pero la muerte embrionica temprana disminuye la tasa a 60% (Diskin y Sreenan, 1980).

3.2.Ciclo estral y niveles de P4 en vacas primíparas

Roelofs et al. (2005) indica que una diferencia característica en vacas de primer parto es que los signos de estro puede ser más intensos en primíparas comparado con multíparas.

Balendran et al. (2008) realiza una investigación en la cual evalúa la relación entre la paridad y las concentraciones de progesterona durante el ciclo estral donde examina la tasa de gestación y concluye que las vacas primíparas tienen una significativamente mayor tasa de gestación (67,9%) en relación a vacas con segundo, tercero y cuarto parto (20% y 11,9%, respectivamente). Adicionalmente no encuentra diferencias

significativas en las relaciones de progesterona entre los grupos durante el ciclo estral, a pesar de que las vacas primíparas con las que alcanzan el nivel más alto de progesterona en leche al día 16 con $9,2 \pm 0,8$ ng/ml aproximadamente.

Tanaka et al. (2008) evalúa la influencia de la paridad en la dinámica folicular y la reactivación ovárica en vacas postparto y concluye que las primíparas tardan significativamente más tiempo en alcanzar la primera ovulación postparto ($31,8 \pm 8,3$ días) en relación a las vacas multíparas ($17,3 \pm 6,3$ días). Nyman et al. (2014) indican de igual manera que la paridad está asociada con el retraso de la ciclicidad; dicha incidencia de retraso de la ciclicidad disminuye de la lactación 1 (12,5%) a la lactación 4 (9,4%).

Un estudio realizado por Rosenberg, Herz, Davidson y Folman (1977) compara las variaciones de los niveles de progesterona en vacas primíparas y multíparas y encuentran que el pico de las concentraciones de progesterona (>4 ng/ml) tarda más tiempo (en días postparto) en alcanzarse en primíparas que en multíparas ($51,6 \pm 4,7$ d vs. $37,6 \pm 2,6$ d).

3.3. Ciclo estral y niveles de P4 en vacas multíparas

Longitud de los ciclos

Se han realizado varias investigaciones en dinámica folicular de vacas multíparas; por ejemplo, Wolfenson et al. (2004) observa que las longitudes de los ciclos estales es 2,6 días mayor en vacas multíparas en comparación con vaquillas. Sartori et al. (2004) indica que el intervalo interovulatorio en vaquillas fue de $22,0 \pm 0,4$ días, en comparación con vacas multíparas de $22,9 \pm 0,7$ días. En dicho estudio hubo vacas multíparas con ciclos de 2 (n=11), 3 (=2) y 4 (=1) ondas foliculares.

Tamaño folicular

De acuerdo a Wolfenson et al. (2004) en lo que a tamaño folicular ovulatorio se refiere, las vacas multíparas presentan mayores diámetros en comparación a vaquillas ($16,5 \pm 0,05$ vs. $13,0 \pm 0,3$, respectivamente). En la misma investigación concluyen que dichos diámetros foliculares aumentados corresponden a la presencia de mayores concentraciones de FSH en vacas multíparas. Wolfenson et al. (2004) observan dicha pequeña pero significativamente mayor concentración de FSH durante el ciclo estral de vacas comparado con vaquillas que además puede ser la responsable de la mayor tasa de ovulaciones dobles en vacas en comparación con vaquillas.

Sartori et al. (2004) confirma la información encontrada pues indica que las vacas multíparas tienen folículos ovulatorios de mayor tamaño en comparación con vaquillas ($16,8 \pm 0,5$ vs. $14,9 \pm 0,2$ mm).

Estradiol

De acuerdo a lo observado por Wolfenson et al. (2004) las concentraciones de estradiol alrededor del estro y el pulso preovulatorio de LH es menor vacas multíparas comparado con vaquillas (9 vs 20ng/ml, respectivamente). De acuerdo a Sartori et al. (2004) la máxima concentración de estradiol luego de ovulación es menor en vacas en comparación con vaquillas ($7,9 \pm 0,8$ vs. $11,3 \pm 0,6$ pg/ml).

Progesterona y CL

Wolfenson et al. (2004) indica que las concentraciones de progesterona fueron mayores en vaquillas comparado a vacas multíparas a partir del día 3 hasta el día 16 del ciclo estral. De igual manera, Sartori et al. (2004) indican que las concentraciones máximas de P₄ fueron menores en vacas en relación a vaquillas ($5,6 \pm 0,5$ vs. $7,3 \pm 0,4$ ng/ml).

En vacas se ha observado que 37% de cuerpos lúteos poseen cavidad mientras que un 63% no (Kito, Okuda, Miyazawa y Sato, 1986).

3.4. Ciclo estral y niveles de P4 en vacas repetidoras

De acuerdo a Gustafsson (2000) la incidencia de vacas lecheras repetidoras es de alrededor del 10%. Las vacas repetidoras son consideradas un impacto económico considerable en granjas lecheras y ha sido revisado en (Bartlett, Kirk y Mather, 1986; Lafi y Kaneene, 1992; Lafi, Kaneene, Black y Lloyd, 1992). Otros estudios epidemiológicos indican que se ha podido encontrar la prevalencia de vacas repetidoras desde 5% en Jordán (Ayalon, 1984) hasta 36% en Cuba (Zambrano, Avila y Albi, 1982). Debido a que en la ganadería de leche se busca productividad (idealmente, una cría por vaca por año), las vacas repetidoras tienen un gran impacto en la economía de dichas explotaciones (Pérez-Marín y España, 2007).

De acuerdo a Pérez-Marín y España (2007) las vacas repetidoras son un grupo heterogéneo de vacas subfértiles sin anomalías anatómicas o infecciones, que presentan una variedad de alteraciones reproductivas en un patrón coherente a lo largo de 3 o más ciclos estrales consecutivos de duración normal (17-25 días); además la etiología del síndrome no está completamente clara y es multifactorial.

Båge, Gustafsson, Larsson, Forsberg y Rodríguez-Martínez (2002) investigaron las dinámicas foliculares en vaquillas repetidoras y los hallazgos fueron duración prolongada del estro, retraso del pico de LH, tiempo de vida prolongada del folículo dominante y un incremento retrasado de progesterona postovulatorio. También hay una tendencia a que tengan concentraciones suprabasales de progesterona periovulatorias, lo cual causa cambios en el microambiente del folículo preovulatorio afectando la maduración final del oocito (Båge et al., 2002).

Una asincronía endócrina entre el conceptus y el ambiente materno, ya sea a nivel de oviducto o útero, resultante en muerte embrionaria temprana podría explicar la

alteración de la fertilidad observada en vacas repetidoras (Albihn, Gustafsson, Hurst y Rodríguez-Martínez, 1991).

Pérez-Marín y España (2007) detectan diferencias entre vacas repetidoras presentando ciclos estrales aparentemente normales y ciclos irregulares. También identifican diferencias en la expresión del estro; una gran cantidad de vacas repetidoras (50%) presentaron retraso en el estro o estro silente. Pérez-Marín y España (2007) indican que se puede dividir a las vacas repetidoras en 2 grupos: vacas con funciones ováricas fisiológicas y vacas con funciones ováricas atípicas. En las vacas con función ovárica fisiológica puede haber animales que presenten o no signos de estro. En las vacas de función ovárica atípica además de haber animales que demuestren o no signos de estro, se presentan otros problemas como fase lútea prolongada, quistes ováricos, anestro, disfunción luteal, entre otras.

La ultrasonografía y los perfiles de progesterona son herramientas útiles para identificar los agentes causales involucrados en el síndrome de la vaca repetidora, así como para obtener una imagen clara de los cambios endócrinos que se dan (Pérez-Marín y España, 2007). El diagnóstico y el tratamiento del síndrome de la vaca repetidora a menudo requiere ser individualizado debido a que las diferencias intra-grupo son considerables (Pérez-Marín y España, 2007).

Progesterona

Una asincronía hormonal ha sido registrada en vacas repetidoras alrededor del estro, con niveles de progesterona de aproximadamente 0,5 a 1,0nmol/l (lo cual excede las concentraciones normales basales de $\leq 0,5$ nmol/l) y una falta o retraso de la aparición del pico preovulatorio de LH (Gustafsson, Larsson, Kindahl y Madej, 1986). Una elevación marginal de progesterona es suficiente para afectar la expresión del estro y los perfiles hormonales alrededor del estro y la ovulación, lo cual resulta en una

disminución de la fertilidad, a pesar del hecho de que las inseminaciones repetidas se realizaron hasta que la ovulación fue detectada ultrasonográficamente (Duchens, Forsberg, Gustafsson, Edqvist y Rodríguez-Martínez, 1995).

Niveles suprabasales de progesterona después de la luteolisis se ha relacionado con el crecimiento extendido del folículo preovulatorio en vaquillas repetidoras (Båge et al., 2002). Se ha confirmado el efecto significativo del leve exceso de progesterona durante el estro, y se demostró que el ciclo es muy vulnerable a pequeñas alteraciones de niveles hormonales (Båge et al., 2002).

El origen del exceso de progesterona durante el estro en repetidoras es desconocido; sin embargo podría deberse a una luteolisis incompleta o a la liberación de otras fuentes diferentes al ovario (Båge et al., 2002). Se ha examinado en vaquillas repetidoras la producción extragonadal de esteroides por parte de las glándulas adrenales (Båge, Forsberg, Gustafsson, Larsson y Rodríguez-Martínez, 2000); sin embargo, no se pudo confirmar que las concentraciones suprabasales de progesterona durante el estro deriven de las glándulas adrenales. En el estudio realizado por Båge et al. (2002) las vaquillas repetidoras producían numéricamente menos cantidad de progesterona al día 7 del ciclo con un riesgo potencial de retraso del desarrollo embrionario y ausencia de la señal adecuada para el reconocimiento materno en los días 16 y 17, lo cual resulta en muerte embrionaria.

A pesar de que una gran cantidad de vacas repetidoras presentan asincronía hormonal, hay otra cantidad importante de vacas repetidoras con una función ovárica fisiológica; es decir, presentan comportamiento de estro acompañado de un folículo preovulatorio alrededor de 16 a 18mm de diámetro, y niveles basales de progesterona (Pérez-Marín y España, 2007). Los niveles de progesterona en dichos animales aumentan a 1,0 ng/ml o mayor dentro de los 5 días post IA y un nivel de 2,0 ng/ml o

mayor es mantenido durante la fase media y luteal. Varios factores estarían relacionados con la existencia de vacas repetidoras dentro de los cuales están desordenes relacionados al postparto y balance energético negativo (Båge et al., 2002).

Las características predominantes en vaquillas repetidoras en el estudio realizado por Båge et al. (2002) fueron mayor duración del estro con un retraso en el pulso preovulatorio de LH, niveles suprabasales de progesterona durante el estro, persistencia del folículo preovulatorio, retraso en el incremento de progesterona en la fase lútea temprana y bajas concentraciones de progesterona en la fase lútea.

Longitud de los ciclos

Pérez-Marín y España (2007) indica que la duración de los ciclos estrales en vacas repetidoras que presentaron estro fue de $22,2 \pm 2,2$ días (contando desde el estro [día 0] hasta el siguiente comportamiento de estro espontáneo); mientras que en los animales que no presentaron signos de estro o estros silentes, el intervalo entre estros fue de $64,9 \pm 29,0$ días.

4. Digitalización de datos a partir de imágenes.

Una gran cantidad de información útil en publicaciones científicas se encuentra disponible únicamente como puntos en una figura o un gráfico. En estas figuras es fácil determinar las variables involucradas; sin embargo, recuperar el valor numérico exacto de los datos es un procedimiento tedioso y propenso a errores de gran magnitud.

Usualmente esto se habría realizado usando una regla para leer las coordenadas de los puntos de interés de un gráfico impreso, así como las longitudes; y una vez hecho esto convertirlas a las unidades originales tomando en cuenta la escala y las unidades de los ejes del gráfico (Aymard y Shirts, 2000). Con el objetivo de solucionar este problema varios programas de digitalización de datos han sido desarrollados a través de los años (Rohatgi, 2014). El método para digitalizar la imagen se conoce como conversión de

pixeles, el cual es una manera de extraer las coordenadas de puntos desde un gráfico impreso o en formato de imagen (Aymard y Shirts, 2000). Los programas que digitalizan los datos a partir de imágenes, convierten la posición de un pixel en los valores originales del eje X y el eje Y usando las siguientes relaciones simples (Aymard y Shirts, 2000):

$$1) \quad X = X_{min} + (pX - pX_{min}) \frac{X_{max} - X_{min}}{pX_{max} - pX_{min}}$$

$$2) \quad Y = Y_{min} + (pY - pY_{min}) \frac{Y_{max} - Y_{min}}{pY_{max} - pY_{min}}$$

Donde X_{min} e Y_{min} son las coordenadas de origen del gráfico (expresado en las unidades apropiadas; ejm: ng/ml de P_4); X_{max} es el valor máximo del eje X (en las unidades apropiadas) leído en el gráfico; Y_{max} es el valor del eje Y leído en el gráfico; pX_{min} , pX_{max} , pY_{min} e pY_{max} , corresponden a las coordenadas, en posiciones de pixeles leídas en la imagen de la pantalla; pX e pY son coordenadas en pixeles de cada punto de interés, leídos desde la imagen en la pantalla; finalmente, X e Y son las coordenadas deseadas. Estas relaciones son calculadas automáticamente por el programa de extracción de datos.

Error en la digitalización

Por supuesto, mientras mejor resolución tenga el gráfico mejores serán los resultados (Tummers, 2006). Por esta razón se recomienda utilizar gráficos con una resolución de 300ppp (pixeles por pulgada) por 6 pulgadas (es decir 1800pixeles). El máximo error de digitalización para una imagen escaneada es de 1 pixel, que equivale a un error de 0,05% (Aymard y Shirts, 2000).

En definitiva, si se utilizan gráficos con definiciones de 300ppp, el error es de 0,05% del valor obtenido. De acuerdo a Shadish et al. (2009), los investigadores pueden extraer datos con un alto grado de confianza de que son casi idénticos a los datos originales.

5. Cálculo del área bajo la curva mediante la regla del trapecio.

En investigaciones médicas, a menudo los datos son colectados en los sujetos de una manera seriada y el análisis estadístico a menudo es inadecuado ya que puede dejar de lado cuestiones relevantes haciendo al trabajo estadísticamente inválido (Matthews, Altman, Campbell y Royston, 1990). Por esta razón, al comparar varios grupos en una serie de puntos en el tiempo (como es el caso de la comparación de curvas de P_4 a lo largo del ciclo estral), se puede usar métodos que utilizan un resumen de las mediciones. Primeramente, un resumen de la respuesta del individuo, como el área bajo la curva, debe ser calculada para cada sujeto de estudio. El área bajo la curva es calculada al añadir las áreas bajo el gráfico entre cada par de observaciones consecutivas. Si se tienen mediciones y_1 e y_2 en tiempos t_1 y t_2 , entonces el área bajo la curva entre esos dos tiempos es el producto de la diferencia de los tiempos y el promedio de las dos mediciones. Entonces, se tiene que:

$$(t_2 - t_1) \frac{(y_1 + y_2)}{2}$$

Si se tienen $n+1$ mediciones y_i en tiempos t_i ($i=0, \dots, n$), entonces el área bajo la curva (AUC) es calculado así:

$$AUC = \frac{1}{2} \sum_{i=0}^{n-1} (t_{i+1} - t_i) (y_i + y_{i+1})$$

Posteriormente, el resumen de las mediciones es analizado mediante técnicas estadísticas simples como si se tratasen de datos en bruto.

Este método es conocido como la regla del trapecio debido a la forma de cada segmento del área bajo la curva. Utilizar este método es estadísticamente válido y es probablemente más relevante para las responder las preguntas de la investigación.

Particularmente, este método ha sido utilizado para comparar las curvas de P_4 en vacas en estudios previos (Båge et al. 2002; Pérez-Marín, 2009; Pérez-Marín y España, 2007).

Identificación del problema

En la actualidad, los médicos veterinarios de Ecuador han repetido diferentes biotecnologías creadas para condiciones de otros países. Particularmente, se ha observado que las concentraciones de P4 tienen patrones diferentes al momento de la inseminación (Freile y Añasco, 2011 datos no publicados; Gallmeier, 2013); sin embargo, los índices de preñez en dichos animales no se han visto afectados (Gallmeier, 2013) lo cual genera incongruencia con lo anteriormente publicado. Por esta razón, es necesario establecer las curvas hormonales que se presentan en los ciclos estrales de las vacas en nuestro medio para aclarar la confusión generada; sobre este criterio:

¿Es posible que la variación de valores de progesterona, diámetro folicular y volumen luteal a lo largo del ciclo estral, difiera de forma significativa entre animales de diferente estado reproductivo; y a su vez, de la información publicada respecto a explotaciones de otras localidades?

Hipótesis

H1: Los valores de progesterona, diámetro folicular y volumen luteal registrados en la Hacienda “Sausalito” no difieren de forma significativa entre animales de distinto estado reproductivo.

H2: Los valores de progesterona, diámetro folicular y volumen luteal registrados en la Hacienda “Sausalito” difieren de forma significativa con los valores referenciales publicados.

Objetivo general

Investigar la variación del diámetro folicular, volumen luteal y de los niveles de progesterona durante el ciclo estral en vacas de distinto estado reproductivo en la hacienda “Sausalito” en el cantón Mejía.

Objetivo específico

1. Establecer, mediante la técnica de ultrasonido, el diámetro folicular y el volumen luteal durante el ciclo estral y representarlo mediante gráficos de líneas.
2. Comprobar estadísticamente, si la tasa de crecimiento folicular, tamaño máximo folicular y el volumen luteal máximo difieren entre los estados reproductivos.
3. Determinar los niveles de progesterona durante el ciclo estral, mediante inmunoensayo enzimático, a partir de 132 muestras de sangre y representarlas con gráficos de área.
4. Comprobar estadísticamente, si la concentración máxima y el área bajo la curva (AUC) de P_4 durante el ciclo difieren entre los estados reproductivos.
5. Comprobar, mediante análisis estadístico, si los niveles de progesterona y áreas bajo las curvas encontrados en esta investigación, difieren de la información referencial obtenida mediante un software de extracción digital de datos (DataThief 3.0).
6. Determinar, mediante análisis estadístico, si el diámetro folicular y volumen lúteo durante el ciclo estral encontrados en esta investigación difieren de la información publicada.

Metodología

Tipo de estudio: Este es un estudio de tipo descriptivo, comparativo, exploratorio e intencionado, en el cual se investigó la función ovárica durante el ciclo estral en vacas de distinto estado reproductivo, para luego ser comparadas entre los grupos de estudio y a su vez con la información publicada referencial.

Localización: Este estudio se realizó en la hacienda lechera Sausalito S.C.C. ubicada en Tambillo en el Cantón Mejía, provincia de Pichincha, en la serranía Ecuatoriana. Esta empresa ganadera se encuentra a una altitud de 2803,03 msnm.

Selección de animales: El estudio se realizó en el periodo comprendido entre el 20 de agosto de 2013 y el 9 de octubre de 2013. Se utilizaron 12 bovinos hembras de raza Holstein, aparentemente sanas al examen físico del médico veterinario. Para agrupar los animales se aprovechó del manejo normal de la granja, donde se administra PGF2 α para lizar al cuerpo lúteo; de esta manera, los animales que iban demostrando signos de estro ingresaban al estudio. El total de animales estuvo conformado por 4 grupos, como se describe en el Cuadro 1 a continuación:

Cuadro 1.
Descripción de los grupos de estudio

Estado reproductivo	Características	Producción (kg.)	Días post-parto
Vaquillas (Grupo 1, n= 3)	19,06 \pm 2,40 meses de edad; [rango de 15 a 23 meses]; 350kg de peso		
Primíparas (Grupo 2, n=3)	Primer parto, 2,4 \pm 0,1 años de edad [rango de 2,3 a 2,6 años]	20,16 \pm 0,4 [rango de 16,83 a 23,14]	38,3 \pm 2,3 [rango de 34 a 42 días]
Múltiparas (Grupo 3, n=3)	A partir de tercer parto, 4,4 \pm 0,1 años de edad [rango de 4,3 a 4,5]; 3,6 partos [rango de 3 a 5]	39,59 \pm 0,6 kg [rango de 33,41 a 47,56]	38,3 \pm 3,5 [rango de 33 a 45]
Repetidoras (Grupo 4, n=3)	9,4 \pm 3,5 años de edad [rango de 5,9 a 12,9]; 4 partos [rango de 2 a 7]. Más de 3 inseminaciones	13,81 \pm 1,1 kg [rango de 5,96 a 23,01 kg]	475 \pm 52,5 [rango de 390 a 571]

Definición de ciclo estral y día de luteolisis: un ciclo estral típico es aquel que empieza y termina con signos de estro y con una ovulación natural del folículo que ha emergido (≥ 4 mm) antes o en el momento del día de luteolisis. El día de luteolisis puede definirse como el día antes de que las concentraciones de P₄ disminuyan a menos

del 50% del promedio de las cuatro concentraciones máximas durante el ciclo estral; adicionalmente, las concentraciones de P_4 deben disminuir al día siguiente a menos del 25% del promedio de las cuatro concentraciones máximas (Sartori et al., 2004).

Manejo de los animales: Los animales mantuvieron su rutina normal en la granja. Las vaquillas se mantenían en el potrero durante todo el día y se les administraba concentrado. Las vacas fueron ordeñadas 2 veces al día y alimentadas con una ración total mezclada (TMR) que consistía en soya, silo de maíz, pepa de algodón, maíz molido, minerales y melaza; además, pastoreaban durante todo el día. El TMR contenía 17,5% PC (Proteína Cruda) y 1,63Mcal/kg de EN_L . Todos los grupos tenían acceso libre a agua. El índice de condición corporal fue evaluado cada 30 días de acuerdo a los protocolos de la granja. Todas las vacas tuvieron una condición corporal entre 2,5 a 3 al inicio del experimento.

Manejo reproductivo: Los animales se mantuvieron en las mismas condiciones que tenían en la granja antes del inicio del estudio. Los animales fueron observados por signos de estro desde las 3 a. m. hasta las 8 a. m. (hora del ordeño de la mañana) y entre las 2:30 p. m. y 8:00 p. m. (ordeño de la tarde). Además, poseían un detector de celo en su miembro anterior (detector de estro CowScout™ Activity Monitoring System, GEA Farm Technologies, Inc., Naperville, IL). A los cuatro grupos se les realizó un escaneo de los ovarios mediante ultrasonografía (Landwind C40 con transductor lineal de 7,5 MHz, Landwind Industry Co., Shenzhen) en los días 0 (estro), 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 20 del ciclo estral para observar las estructuras foliculares y luteales. Las mediciones de folículos y CL mediante ultrasonido fueron usadas para calcular el promedio de diámetro (promedio de largo [L] y ancho [A]; $D = \frac{L+A}{2}$) y de volumen (V). El volumen

fue calculado mediante la fórmula $V = \frac{4}{3} \times \pi \times R^3$ donde el radio (R) fue calculado

mediante la fórmula $R = \frac{(\frac{L}{2} + \frac{A}{2})}{2}$ como se indica en Sartori et al. (2004).

Análisis hormonales: se tomaron 132 muestras de sangre mediante venopunción coccígea (jeringa de 10 ml y aguja de 18Gx1/2”) coincidiendo con el escaneo ultrasonográfico de los ovarios empezando en el día 0 (estro), 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19 y 20 del ciclo estral. Las muestras fueron colocadas en tubos de ensayo y se dejaron reposar por 30 minutos hasta la formación del coagulo. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 15 minutos (Champion E-33-12V Centrifuge, Ample Scientific L.L.C, Norcross, GA), posteriormente con pipetas Pasteur desechables graduadas de 3ml se aspiró el suero de cada muestra para depositarlo en un tubo graduado desechable de 1,5 ml (Eppendorf Tubes®) y posteriormente almacenarlo en un contenedor refrigerado a 4°C. Las muestras se mantuvieron a -20°C hasta ser analizadas. Para analizar la progesterona el suero fue evaluado mediante inmunoensayo enzimático competitivo fluorométrico en un analizador automático (ST AIA-PACK PROG, Tosoh Co., Ltd., Japan). La sensibilidad del test de acuerdo a la concentración mínima detectable se estimó que fue 0,1ng/ml. Los coeficientes de variación intra-ensayo e inter-ensayo fueron de 9,9% y 11,3%, respectivamente. Todos los sueros fueron analizados simultáneamente.

Digitalización de referencias: Para comparar los resultados obtenidos en esta investigación con la información referencial se utilizó un software (DataThief 3.0; Tummers, 2006) que permite la extracción de datos numéricos a partir de gráficos (ingeniería inversa) mediante su digitalización; para lo cual solo se requiere escanear el gráfico de la publicación, cargarlo en el software y utilizar las coordenadas resultantes (en este caso expresadas en ng/ml de P₄ durante los días del ciclo estral). Al utilizar una

imagen con una resolución de 300ppp (píxeles por pulgada) el error es de $\pm 0,05\%$ del valor obtenido; es decir que si el valor obtenido es 15,11ng/ml, el error es de $\pm 0,0075$ ng/ml. Este software ha sido utilizado exitosamente en numerosas investigaciones de varias áreas incluidos meta-análisis (Clark y Covey, 2012; Critchley, Yang y Lee, 2011; Gonzalez-Heydrich, Steingard, Putnam, Beardslee y Kohane, 1999; Hiles, Baker, de Malmanche y Attia, 2012; Pluess, 2013; Shoo y Catterall, 2013).

Se utilizaron 17 investigaciones para obtener información de las curvas de P_4 en vaquillas, primíparas, multíparas y repetidoras. Un total de 295 ciclos estrales de 247 animales fueron conseguidos, de los cuales 109 ciclos son de vaquillas, 55 de primíparas, 117 de multíparas y 14 de repetidoras. La selección de dichas investigaciones se realizó en base al estado reproductivo (vaquillas, primíparas, multíparas y repetidoras), raza (Holstein-Friesian; se tomó un estudio de sueco rojo), medición de P_4 en plasma o suero (se evitó P_4 en leche) y días postparto (desde 45 d). En algunos estudios se realizaban tratamientos (ejm: tratamientos hormonales); sin embargo, solo fueron digitalizadas aquellas curvas pertenecientes a los grupos control de dichas investigaciones (sin tratamiento alguno). De igual manera no se tomó en cuenta ningún perfil hormonal que haya sido transformado (ejm: transformación logarítmica, de potencia, etc.) (Apéndice 1). Las imágenes utilizadas en este estudio, tuvieron una resolución de 150ppp, lo cual nos permitió extraer datos con un error de $\pm 0,1\%$ del valor; es decir que si el valor obtenido es 15,11ng/ml de P_4 , el error es de $\pm 0,015$ ng/ml.

Cálculo del área bajo la curva: La producción total de progesterona durante el ciclo fue calculada a partir del área bajo la curva (ABC o AUC) de acuerdo con la regla del trapecio (Matthews et al., 1990).

Análisis estadístico: En primer lugar se hizo un análisis de los perfiles de función ovárica de los animales del presente estudio; posteriormente, se realizó una comparación de los resultados encontrados con las referencias publicadas digitalizadas.

Para la comparación entre los grupos de esta investigación (vaquillas, primíparas, múltiparas y repetidoras), se utilizó Kruskal–Wallis (debido al tamaño de la muestra) en variables como intervalo interestro, tasa de crecimiento folicular, máximo tamaño folicular, tamaño del folículo subordinado, volumen del CL, máxima concentración de progesterona durante el ciclo y área bajo la curva de progesterona. Para comparar los resultados de esta investigación con la información referencial publicada, primeramente se comprobó normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk (Apéndice 2); una vez comprobada la normalidad, se utilizó la prueba F para determinar la igualdad de las varianzas y posteriormente se utilizó la prueba t-Student en variables como máxima concentración de progesterona durante el ciclo y área bajo la curva de progesterona, diámetro máximo del folículo ovulatorio y volumen luteal. Dichos análisis fueron realizados utilizando el software SPSS Statistics versión 21 (IBM, Boston) utilizando un nivel de confianza de 95%. Todos los resultados están expresados en media aritmética \pm desviación estándar.

Resultados

Perfiles de función ovárica en vaquillas, primíparas, multíparas y repetidoras de esta investigación

Dinámica folicular, desarrollo luteal y perfil de P₄ por individuo (n=12)

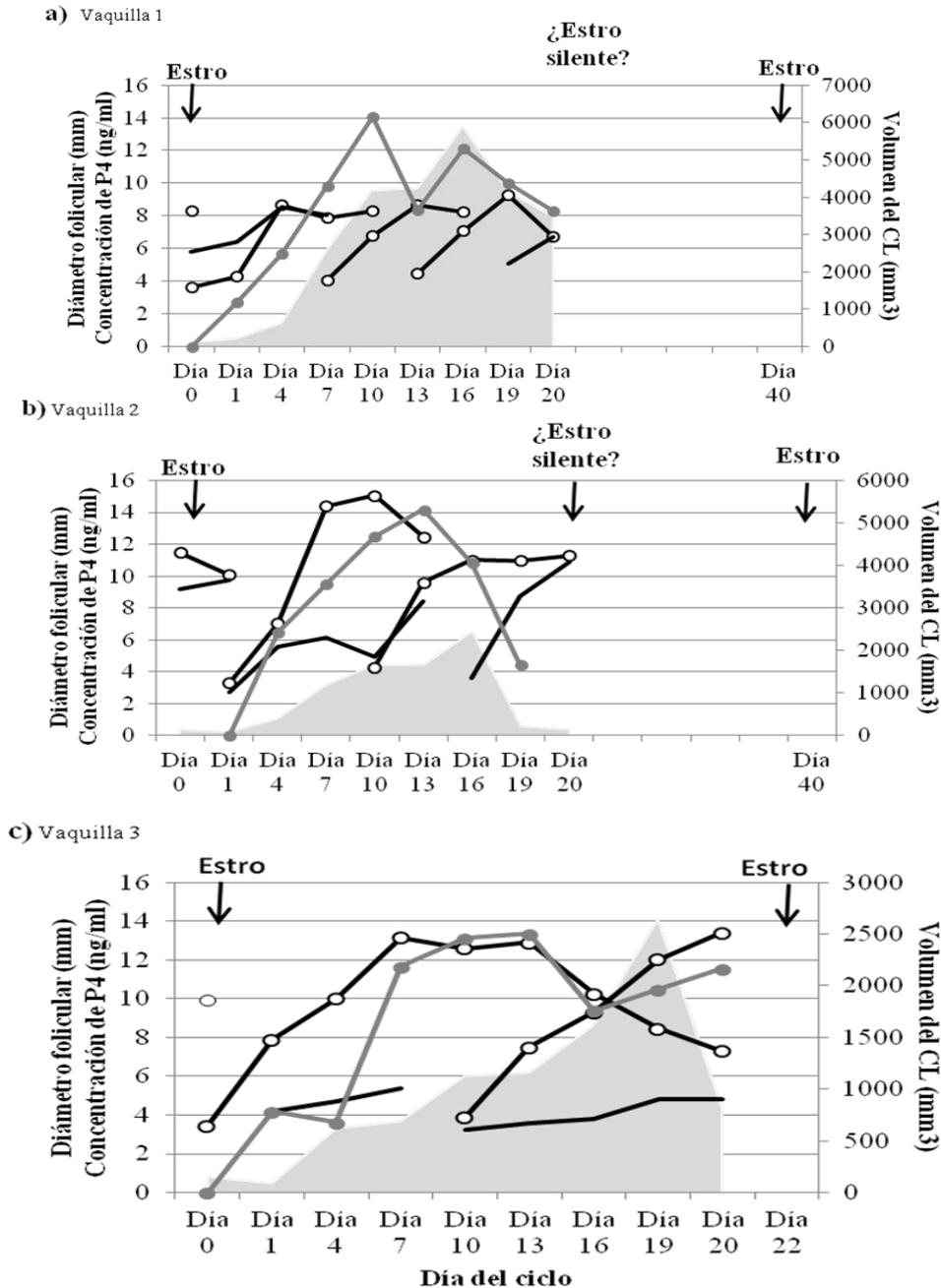
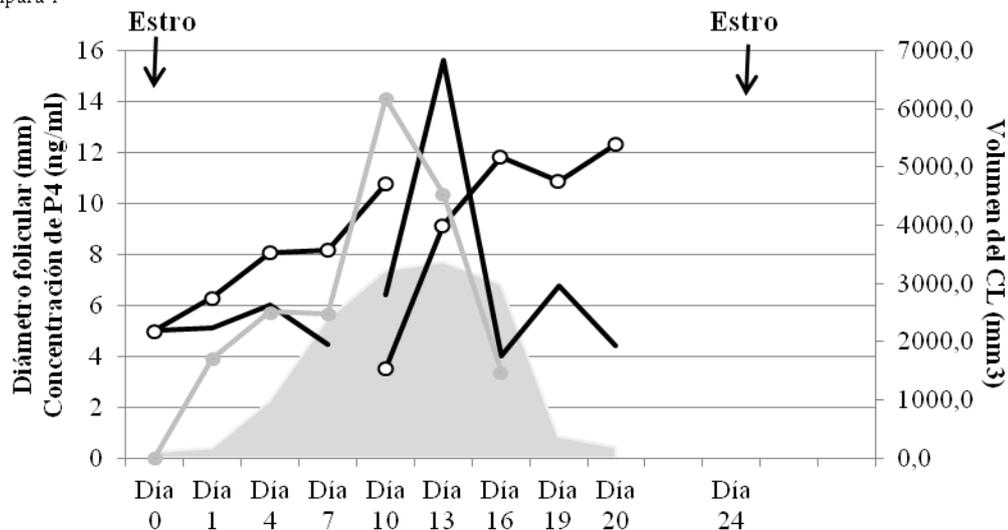


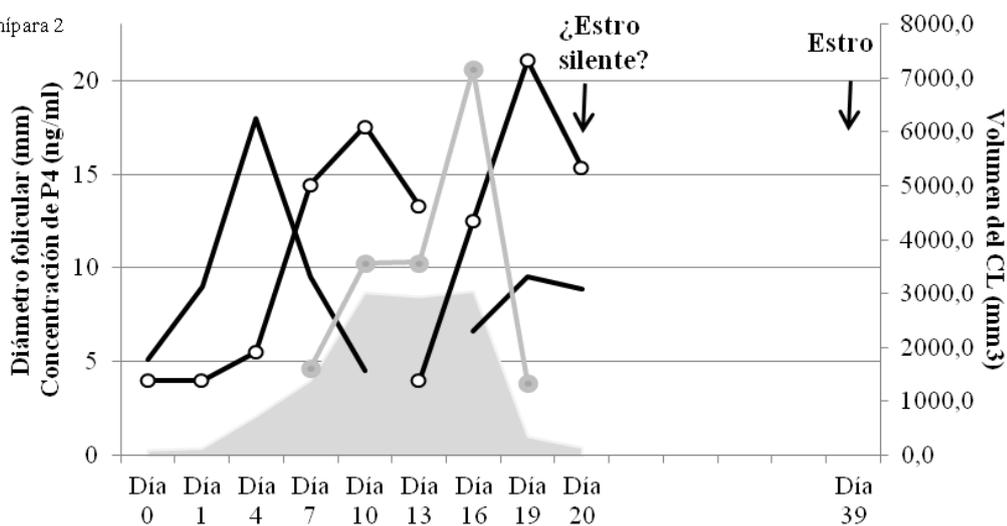
Fig 25. Patrones foliculares (folículos dominantes = líneas negras con círculos blancos, folículos subordinados= líneas negras), desarrollo luteal (líneas grises con círculos grises) y concentración de progesterona (área gris) de vaquillas nulíparas (n=3). Dos de las vaquillas tuvieron 2 ondas foliculares (n=2; b y c). La vaquilla restante (n=1; a) mantenía niveles de progesterona elevados al día 20 (7,96 ng/ml) y presentaba un volumen de CL de 3631,2mm³. Folículos codominantes fueron observados en dos vaquillas. En una de ellas (a) se observa codominancia folicular durante la primera oleada de desarrollo; mientras que en la otra se observa durante la segunda oleada folicular (b).

Autor: Francisco Zapata

a) Primípara 1



b) Primípara 2



c) Primípara 3

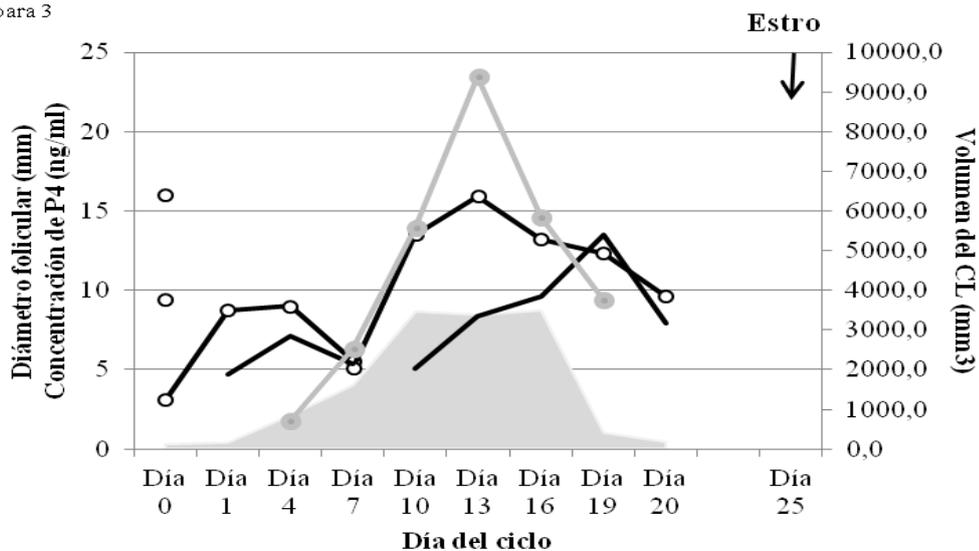
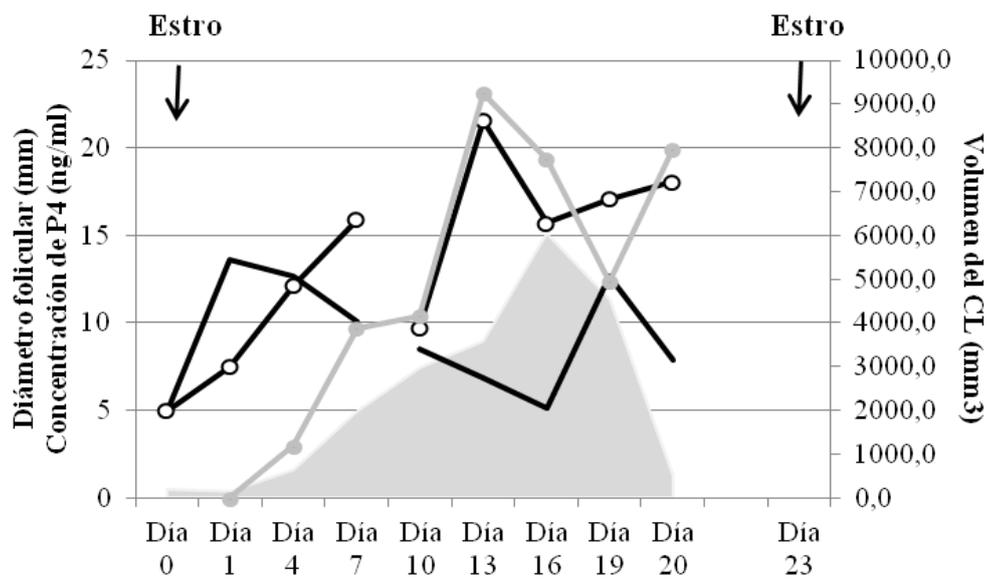


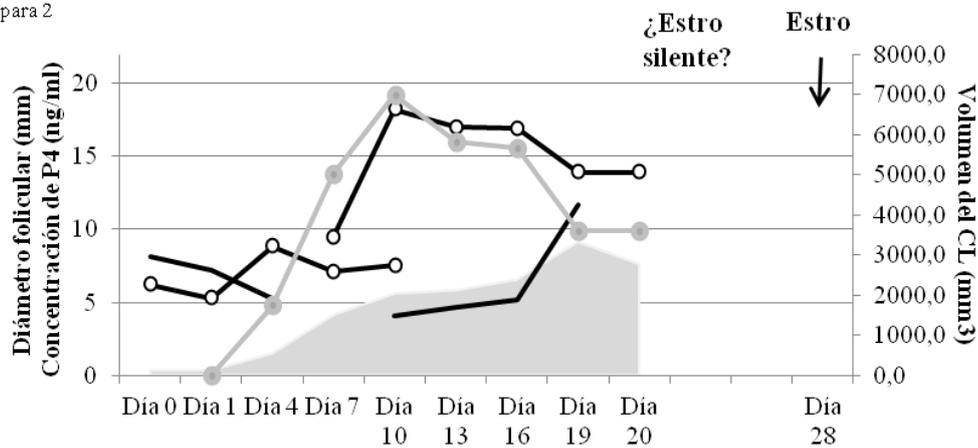
Fig 26. Patrones foliculares (folículos dominantes = líneas negras con círculos blancos, folículos subordinados = líneas grises), desarrollo luteal (líneas grises con círculos grises) y concentración de progesterona (área gris) de vacas primíparas (n=3). Los tres animales tuvieron 2 ondas foliculares (a, b y c).

Autor: Francisco Zapata

a) Multipara 1



b) Multipara 2



c) Multipara 3

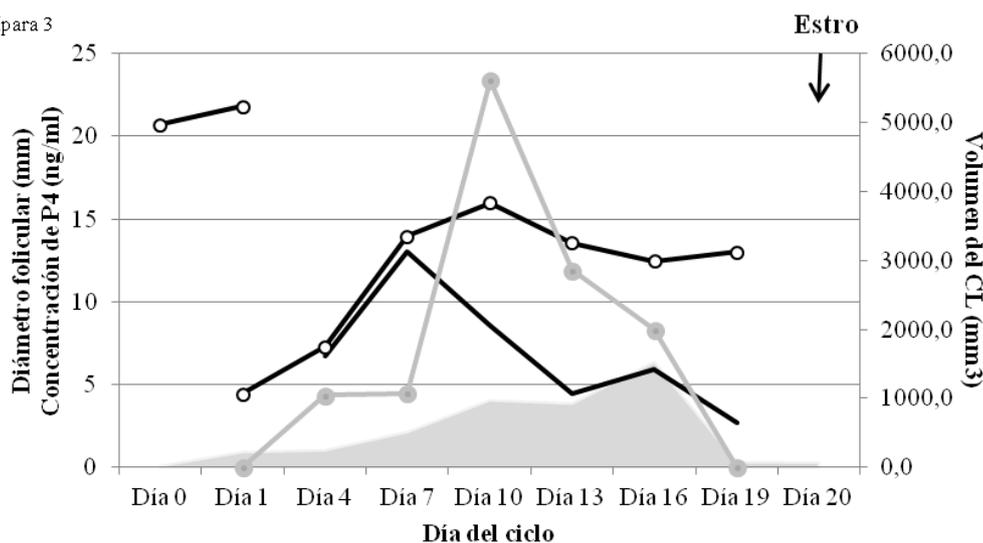
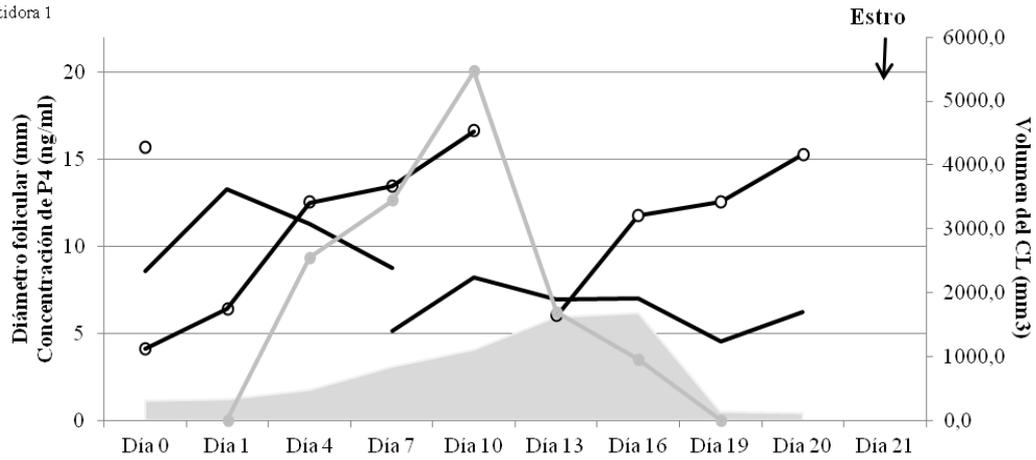


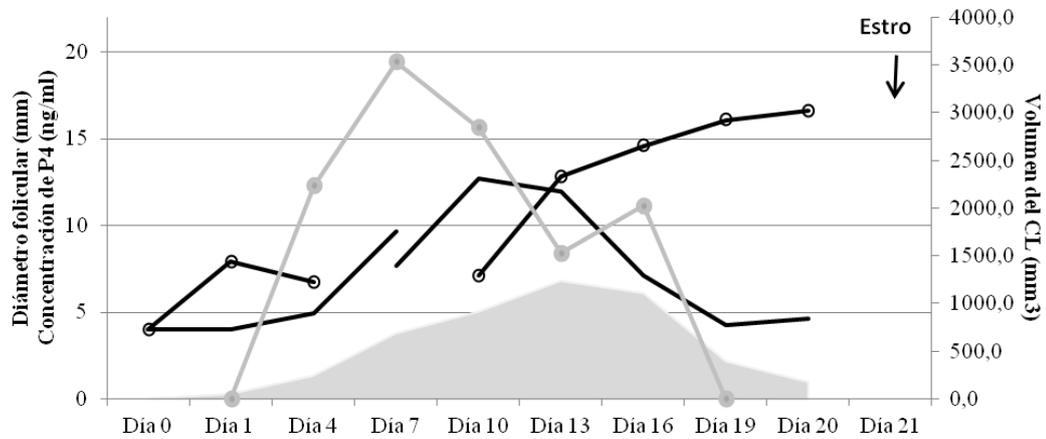
Fig 27. Patrones foliculares (folículos dominantes = líneas negras con círculos blancos, folículos subordinados = líneas negras), desarrollo luteal (líneas grises con círculos grises) y concentración de progesterona (área gris) de vacas multiparas (n=3). Dos animales tuvieron 2 ondas foliculares (a y b) y un animal tuvo 1 sola onda folicular con un intervalo interestro de 19 días (c).

Autor: Francisco Zapata

a) Repetidora 1



b) Repetidora 2



c) Repetidora 3

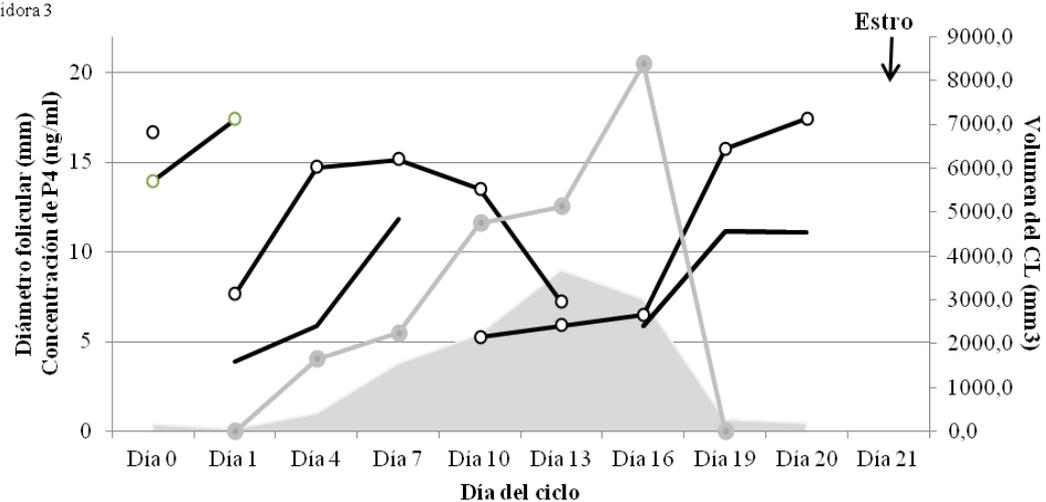


Fig 28. Patrones foliiculares (folículos dominantes = líneas negras con círculos blancos, folículos subordinados = líneas negras), desarrollo luteal (líneas grises con círculos grises) y concentración de progesterona (área gris) de vacas repetidoras ($n=3$). Los tres animales tuvieron 2 ondas foliiculares (Figura 28a, 28b y 28c). Además, como se puede observar presentaron ciclos estrales típicos, con curvas de progesterona aparentemente normales y presentaron signos de estro a los 21 días.

Autor: Francisco Zapata

Cuadro 2.**Parámetros a comparar entre vaquillas, primíparas, multíparas y repetidoras (media \pm desviación estándar).**

Parámetros	Vaquillas (n=3)	Primíparas (n=3)	Multíparas (n=3)	Repetidoras (n=3)
Intervalo interestro (d)	22	24,5 \pm 0,7	21,5 \pm 2,12	21
Tasa de crecimiento durante la primera onda (mm/d)	1,90 \pm 0,24	1,69 \pm 0,58	2,09 \pm 0,27	2,65 \pm 1,96
Tasa de crecimiento durante la onda ovulatoria (mm/d)	1,54 \pm 0,26	2,72 \pm 0,77	6,63 \pm 0,78	1,86 \pm 0,28
Tamaño máximo del folículo dominante independientemente de la onda (mm)	12,56 \pm 2,98	17,58 \pm 3,05	20,52 \pm 1,99	16,88 \pm 0,46
Tamaño máximo del folículo dominante ovulatorio (mm)	10,46 \pm 3,42	12,4 \pm 2,87	14,99 \pm 2,68	16,41 \pm 1,08
Tamaño máximo del folículo subordinado (mm)	8,27 \pm 2,78	15,71 \pm 2,25	12,77 \pm 0,98	12,59 \pm 0,72
Volumen luteal máximo alcanzado durante el ciclo (mm³)	4661,16 \pm 1915,28	7582,26 \pm 1644,84	7280,70 \pm 1834,12	5793,29 \pm 2438,65
Máxima concentración de P₄ durante el ciclo (ng/ml)	11,35 \pm 4,19	8,21 \pm 0,50	10,19 \pm 4,48	7,30 \pm 1,47
AUC de P₄ durante el ciclo (ng/ml)	106,99 \pm 42,49	92,95 \pm 5,30	94,25 \pm 41,95	74,49 \pm 7,55

Autor: Francisco Zapata

Cuadro 3

Análisis de Kruskal-Wallis de los parámetros obtenidos en vaquillas, primíparas, multíparas y repetidoras ($\alpha=0,05$)

Parámetro	Ho	Chi obt	G.l.	P
Intervalo interestro (d)	V=P=M=R	4,725	3	0,193
Tasa de crecimiento durante la primera onda (mm/d)	V=P=M=R	1,564	3	0,668
Tasa de crecimiento durante la onda ovulatoria (mm/d)	V=P=M=R	7,955	3	0,047*
Tamaño máximo del folículo dominante independientemente de la onda (mm)	V=P=M=R	8,774	3	0,032*
Tamaño máximo del folículo dominante ovulatorio (mm)	V=P=M=R	5,667	3	0,129
Tamaño máximo del folículo subordinado (mm)	V=P=M=R	8,744	3	0,033*
Volumen luteal máximo alcanzado durante el ciclo (mm³)	V=P=M=R	5	3	0,172
Máxima concentración de P₄ durante el ciclo (ng/ml)	V=P=M=R	1,974	3	0,578
AUC de P₄ durante el ciclo (ng/ml)	V=P=M=R	2,282	3	0,516

Nota: **Ho** hipótesis nula; **V=P=M=R** no hay diferencia entre las medianas de vaquillas, primíparas, multíparas y repetidoras; **Chi obt** valor de Chi obtenido.

G.l. grados de libertad. **P** probabilidad.

V_{crít} valor crítico para F.

* Estadísticamente significativo

Autor: Francisco Zapata

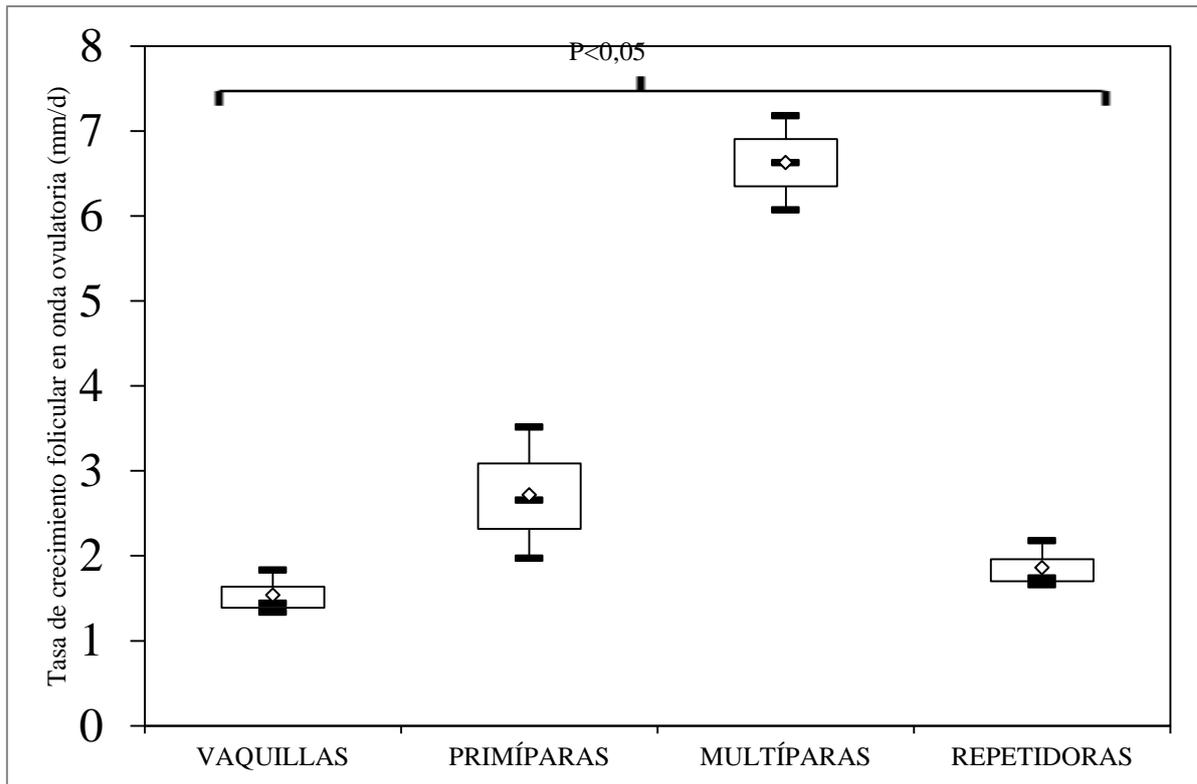


Fig 29. Diagrama de caja y bigotes que compara la tasa de crecimiento folicular (mm/d) en la onda ovulatoria entre los grupos (en animales de 2 ondas foliculares) ($P < 0,05$). Se puede observar además de los rangos intercuartílicos, la media (◇).

Autor: Francisco Zapata

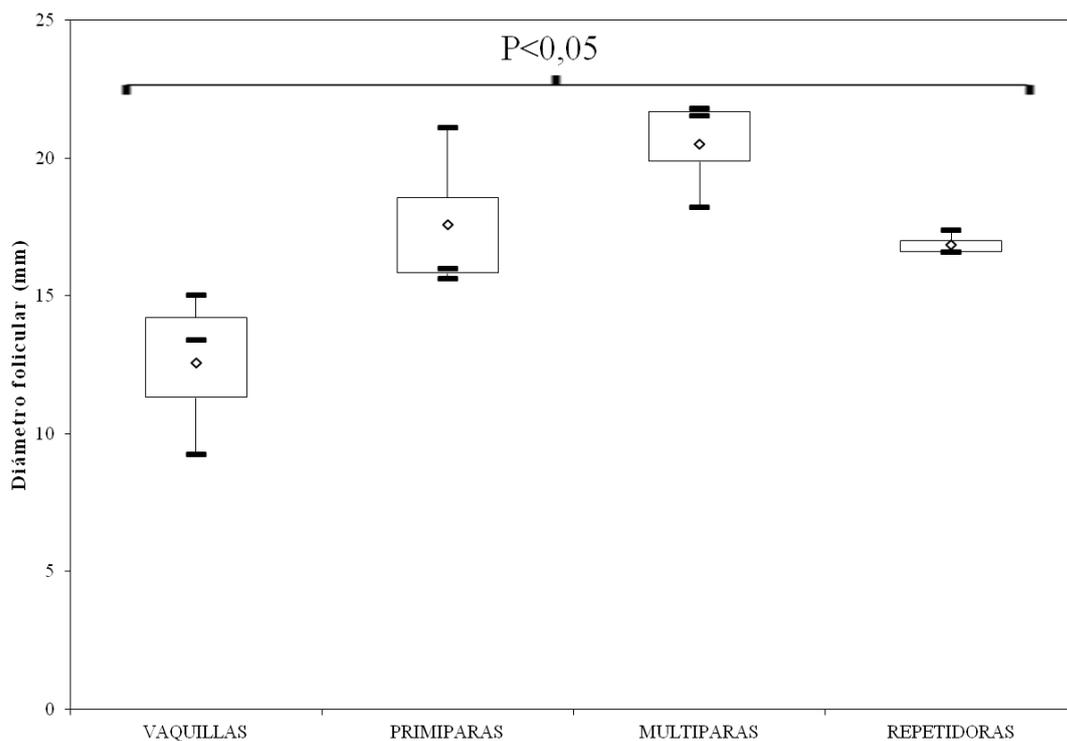


Fig 30. Diagrama de caja y bigotes que compara el diámetro folicular máximo alcanzado (mm) (independientemente de la onda) entre los grupos ($P < 0,05$). Se puede observar además de los rangos intercuartílicos, la media (◇).

Autor: Francisco Zapata

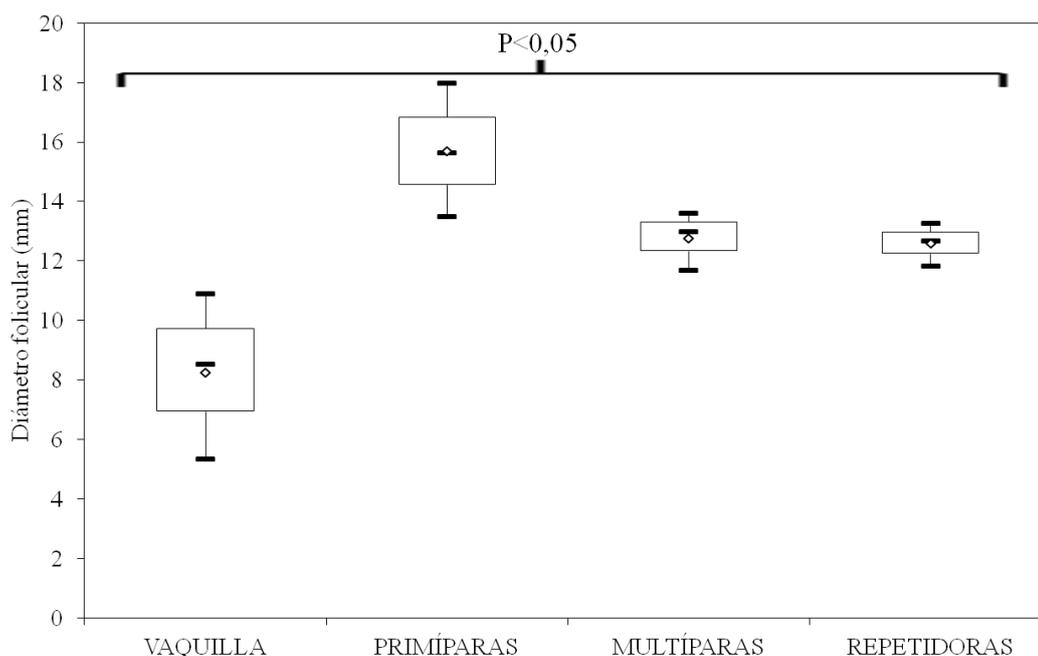


Fig 31. Diagrama de caja y bigotes que compara el diámetro folicular máximo alcanzado por los folículos subordinados (mm) entre los grupos ($P < 0,05$). Se puede observar además de los rangos intercuartílicos, la media (\diamond).

Autor: Francisco Zapata

Día de luteolisis

Cuadro 4.

Estimación del día de luteolisis

		Nivel de progesterona (ng/ml)			Media de las 4 concentraciones máximas de P_4	50%*	25%**	Día de luteolisis estimado
		Día 16	Día 19	Día 20				
Vaquillas	1	13,47	9,53	7,96	10,57	5,29	2,64	Aún no se lisa hasta día 20
	2	6,53	0,59	0,39	4,65	2,33	1,16	Entre 16 y 19
	3	8,62	14,07	4,34	8,73	4,36	2,18	Aún no se lisa hasta día 20
Primíparas	1	6,82	0,85	0,43	6,83	3,42	1,71	Entre 16 y 19
	2	8,71	1,01	0,43	7,45	3,72	1,86	Entre 16 y 19
	3	5,97	1,87	0,45	6,54	3,27	1,63	Entre 16 y 19
Multíparas	1	15,11	11,33	1,21	10,71	5,36	2,68	Día 19
	2	6,53	9,12	7,6	7,27	3,63	1,82	Aún no se lisa hasta día 20
	3	6,34	0,33	0,3	4,09	2,04	1,02	Entre 16 y 19
Repetidoras	1	6,14	0,48	0,4	4,79	2,39	1,20	Entre 16 y 19
	2	6,11	2,19	1	5,44	2,72	1,36	Entre 16 y 19
	3	7,38	0,69	0,48	6,39	3,19	1,60	Entre 16 y 19

*50% del promedio de las cuatro concentraciones máximas de P_4 durante el ciclo estral

** 25% del promedio de las cuatro concentraciones máximas de P_4

Autor: Francisco Zapata

Cuadro 5.
Niveles de P₄ (ng/ml) en animales (n=7) con CL funcional al día 19

	Nivel de progesterona (ng/ml)		Longitud del ciclo (días)
	Día 19	Día 20	
Vaquillas	9,53*	7,96*	Estro silente
	14,07*	4,34*	22
Primíparas	1,01*	0,43	Estro silente
	1,87*	0,45	25
Multíparas	11,33*	1,21*	23
	9,12*	7,6*	28
Repetidoras	2,19*	1*	21

* CL funcional (≥ 1 ng/ml).

Autor: Francisco Zapata

Concentraciones de Progesterona (ng/ml) en los animales estudiados (n=12)

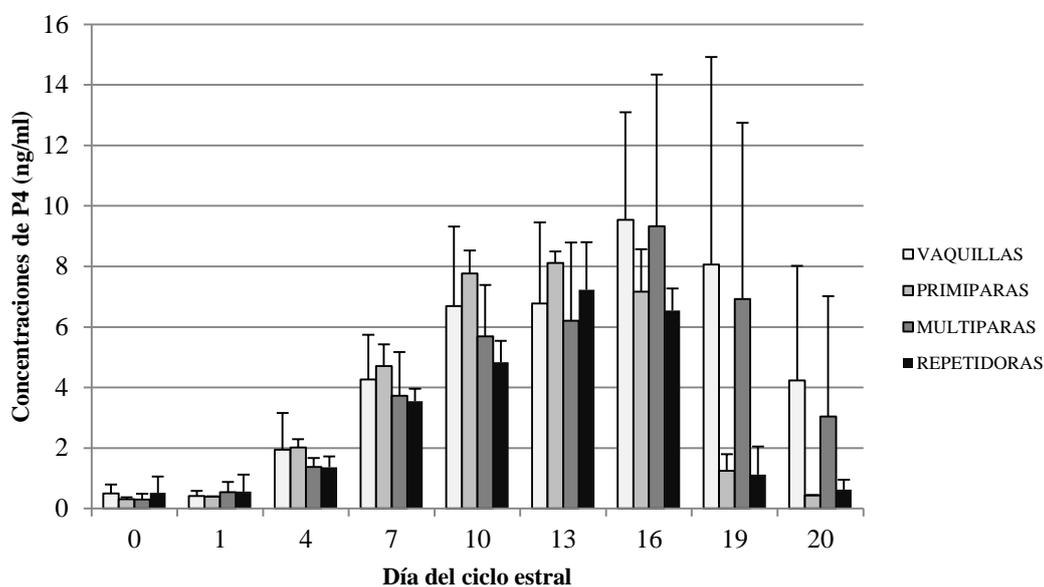


Fig 32. Concentraciones de P₄ (ng/ml) durante el ciclo estral de los diferentes grupos de estudio.

Autor: Francisco Zapata

Comparación de perfiles de P₄, diámetro folicular y volumen luteal con información publicada.

Perfiles de P₄.

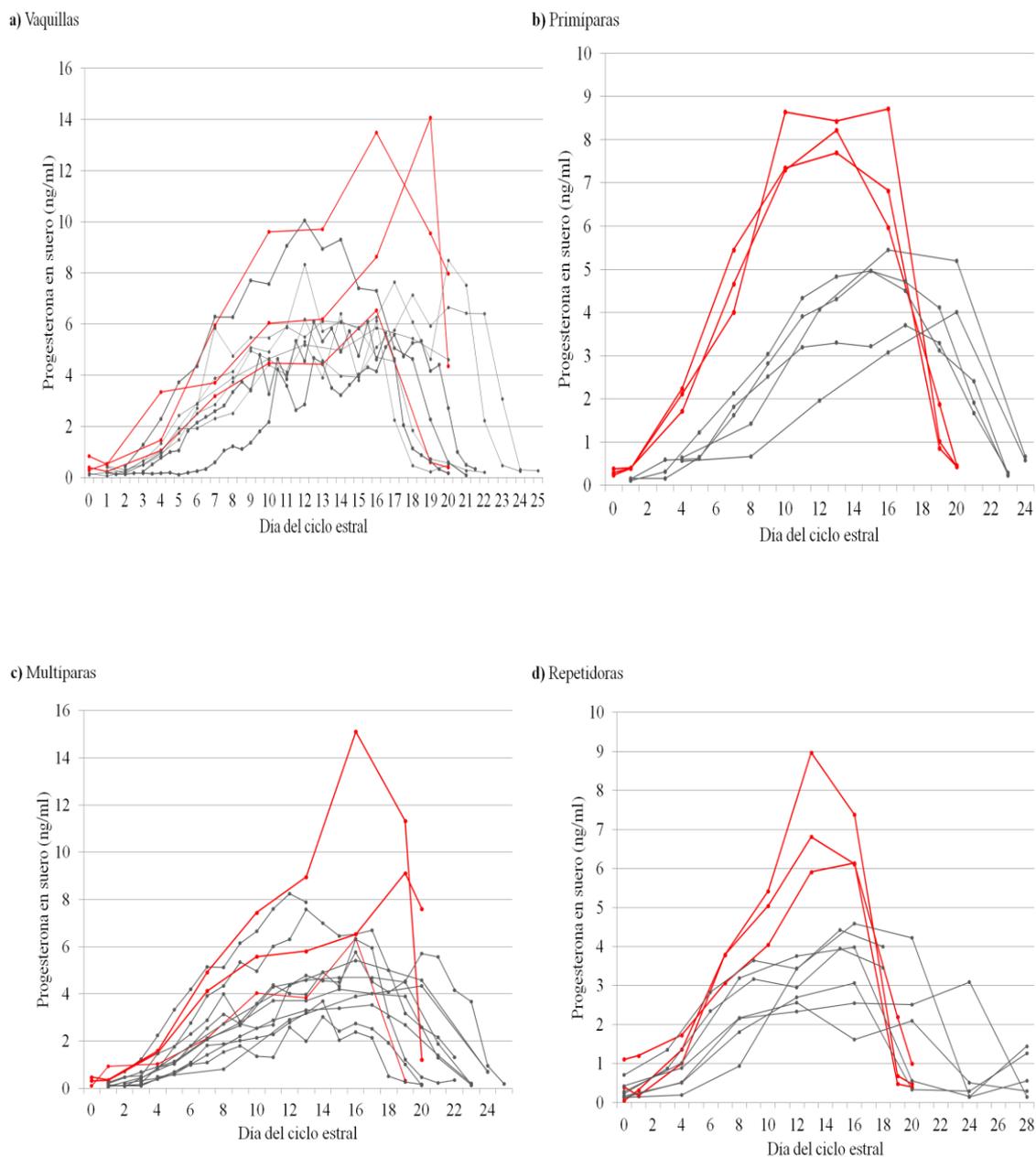


Fig 33. Representación gráfica de los perfiles de P₄ en a) vaquillas, b) primíparas, c) multíparas y d) repetidoras; durante el ciclo estral de la presente investigación (—●—) y de 295 ciclos estrales extraídos digitalmente de 17 publicaciones representados en 31 curvas de P₄ (—●—).

Autor: Francisco Zapata

Cuadro 6.

AUC de P₄ (Media ± D.E.) entre la información publicada para cada grupo y los resultados de esta investigación

AUC de progesterona (ng/ml). Media ± D.E.		
	Info. Publicada (TOTAL: 295 ciclos estresales)	Resultados de la presente investigación (TOTAL: 12 ciclos estresales)
Vaquillas	71,69 ± 20,64	106,99 ± 42,49
Primíparas	55,41 ± 10,74	92,95 ± 5,30
Múltiparas	55,82 ± 17,88	94,25 ± 41,95
Repetidoras	48,64 ± 7,29	74,49 ± 7,55
Global	58,23 ± 17,47	92,16 ± 28,46

Autor: Francisco Zapata

Cuadro 7.

t-Student del AUC (ng/ml) entre vaquillas, primíparas, múltiparas y repetidoras.

Ho	Estadístico t	P	Valor crítico de t
VP=VI	1,93	0,04	1,83
PP=PI	5,53	0,001	1,94
MP=MI	2,49	0,014	1,78
RP=RI	5,09	0,0005	1,86

Nota: Ho hipótesis nula; **VP=VI** no hay diferencia entre las medias de vaquillas de las Publicaciones y las de esta Investigación; **PP=PI** no hay diferencia entre las medias de primíparas de las Publicaciones y las de esta Investigación; **MP=MI** no hay diferencia entre las medias de múltiparas de las Publicaciones y las de esta Investigación; **RP=RI** no hay diferencia entre las medias de repetidoras de las Publicaciones y las de esta Investigación. P probabilidad

Autor: Francisco Zapata

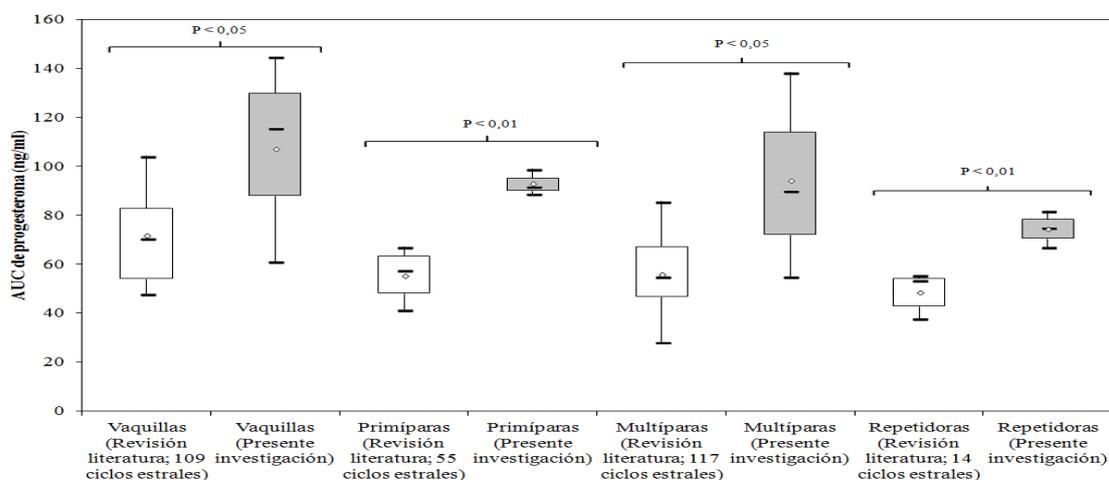


Fig 34. Diagrama de caja y bigotes que comparan las AUC de progesterona entre grupos de referencias publicadas (cajas blancas) y las AUC de los resultados de la presente investigación (cajas grises). Se puede observar la significancia estadística sobre cada grupo comparado. Además de los rangos intercuartílicos, la media está representada dentro de las cajas (◇).

Autor: Francisco Zapata

Cuadro 8.

t-Student del AUC (ng/ml) entre información publicada y la presente investigación

Ho	Estadístico t	P	Valor crítico de t
P=I	-3,8583	0,0009	1,7613

Nota: Ho hipótesis nula; P=I no hay diferencia entre las medias AUC entre lo Publicado y la presente Investigación. P probabilidad

Autor: Francisco Zapata

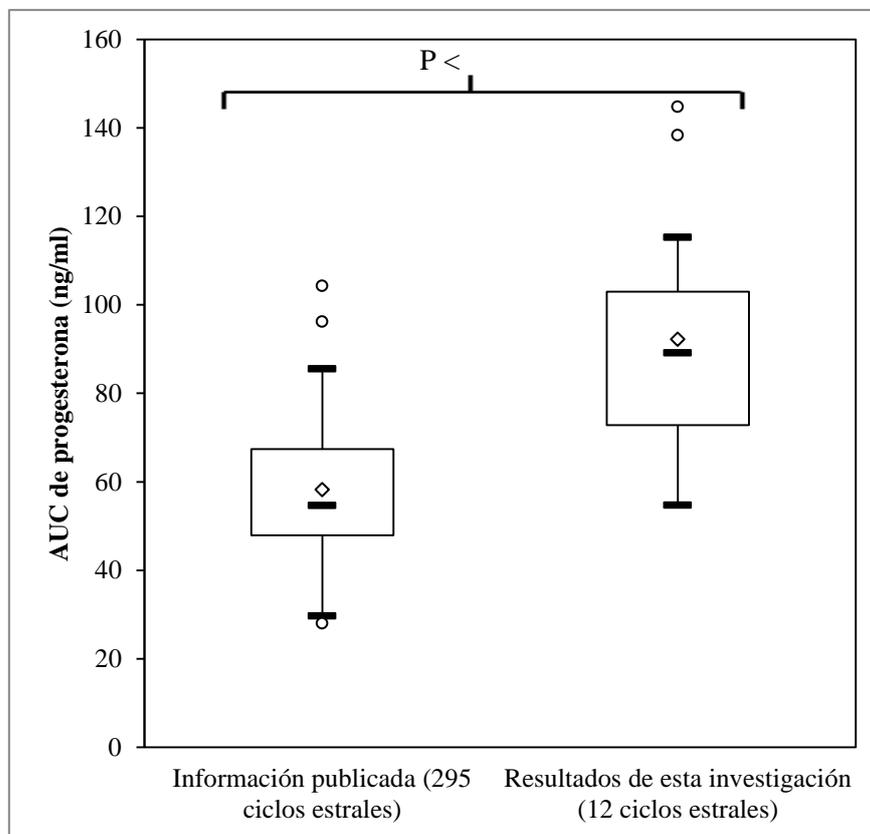


Fig 35. Diagrama de caja y bigotes que comparan las AUC de progesterona de las referencias publicadas y las AUC de los resultados de la presente investigación. Se puede observar la significancia estadística sobre las cajas. Además de los rangos intercuartílicos, la media está representada dentro de las cajas (◇).

Autor: Francisco Zapata

Cuadro 9.

t-Student de las concentraciones de P₄ (ng/ml) entre información publicada y la presente investigación

Ho	Estadístico t	P	Valor crítico de t
P=I	4,1964	0,0004	1,7613

Nota: Ho hipótesis nula; P=I no hay diferencia entre las medias de P₄ entre lo Publicado y la presente Investigación; P probabilidad

Autor: Francisco Zapata

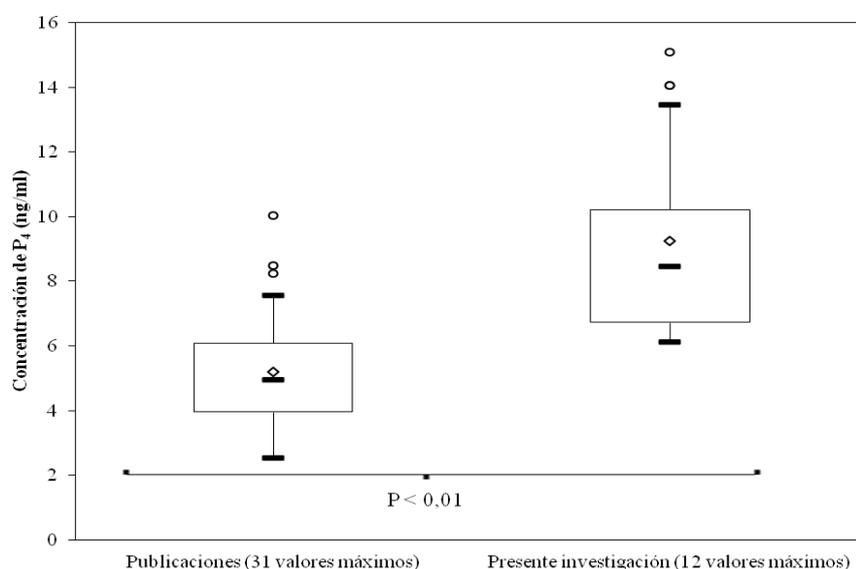


Fig 36. Diagrama de caja y bigotes que comparan las concentraciones máximas de P₄ alcanzadas durante los ciclos estrales de las referencias publicadas y de los resultados de la presente investigación. Se puede observar la significancia estadística debajo de las cajas. Además de los rangos intercuartílicos, la media está representada dentro de las cajas (◊), así como los valores atípicos (○).

Autor: Francisco Zapata

Cuadro 10.

t-Student del diámetro máximo del folículo ovulatorio entre información publicada y la presente investigación

Ho	Estadístico t	P(T<=t) una cola	Valor crítico de t (una cola)
P=I	3,26	0,002	1,74

Nota: Ho hipótesis nula; P=I no hay diferencia entre las medias entre lo Publicado y la presente Investigación. P probabilidad

Autor: Francisco Zapata

Cuadro 11.

t-Student del volumen lúteo máximo durante el ciclo entre información publicada y la presente investigación

Ho	Estadístico t	P	Valor crítico de t
P=I	2,807	0,004	1,697

Nota: **Ho** hipótesis nula; **P=I** no hay diferencia entre las medias entre lo Publicado y la presente Investigación; **P** probabilidad.

Autor: Francisco Zapata

Discusión/análisis de los resultados

Dinámica folicular entre los animales de esta investigación

Uno de los objetivos principales de este estudio fue comparar la función ovárica entre grupos; sin embargo, la variabilidad de los perfiles de los animales individuales debía abordarse previamente con la finalidad de realizar un análisis válido de los datos.

Dos de las vaquillas (n=2) en el presente estudio presentaron 2 ondas foliculares (Figura 25b y 25c), similar a lo reportado en la literatura (Ginther et al., 1989; Knopf, Kastelic, Schallenberger y Ginther, 1989; Kulick, Bergfelt, Kot y Ginther, 2001); sin embargo, también se ha descrito en vaquillas la presencia de 3 (Knopf et al., 1989; Sirois y Fortune, 1988) o 4 ondas foliculares (Sirois y Fortune, 1988; Wolfenson et al., 2004) durante el periodo interovulatorio. Una de las vaquillas de este estudio (n=1; Figura 25a) tuvo 3 ondas foliculares; sin embargo, mantenía niveles de progesterona elevados al día 20 (7,96 ng/ml), presentando además un volumen luteal de 3631,2mm³. De acuerdo a la metodología de esta investigación, los animales fueron estudiados desde el día que presentaron estro (día 0) hasta el día 20, por esta razón asumimos que dicha vaquilla posiblemente tuvo más de 3 ondas foliculares y además pudo haber presentado un estro silente. De acuerdo al manejo reproductivo de la explotación, luego del chequeo ginecológico rutinario, a dicha vaquilla se le aplicó un protocolo de presincronización y demostró signos de celo en el día 40 (Fig. 25a).

La figura 26 representa los perfiles de las vacas de primer parto (n=3). Los tres animales tuvieron 2 ondas foliculares (Fig. 26a, 26b y 26c), tal y como se ha descrito en varios reportes similares (Taylor y Rajamahendran, 1991; Townson et al., 2002; Wilson et al., 1998; Wolfenson et al., 2004); sin embargo, también se han reportado patrones de crecimiento de 3 (Savio et al., 1990) y 4 ondas foliculares (Sartori et al., 2004).

La figura 27 representa los perfiles de las vacas multíparas (n=3). Dos animales tuvieron 2 ondas foliculares (Fig. 27a y 27b); y un animal tuvo 1 sola onda folicular con un intervalo interestro de 19 días (Fig. 27c). Previamente, se ha demostrado la posibilidad de ocurrencia de ciclos con 1 y 4 ondas foliculares (De Rensis y Peters, 1999). De acuerdo a Roche (1996), generalmente una o dos ondas foliculares no ovulatorias ocurren en la fase lútea. La presencia de dichos ciclos cortos aparentemente es más común en el período postparto temprano (Savio et al., 1990) y durante la pubertad (Evans, Adams y Rawlings, 1994). Sin embargo, esta vaca multípara presentaba al inicio de la investigación 46 días postparto. Tanaka et al. (2008) indican que en promedio la reactivación ovárica en vacas multíparas es relativamente rápida, presentado la primera ovulación postparto a los $17,3 \pm 6,3$ días. De acuerdo a Peter et al. (2009) el 95% de los ciclos estrales bovinos se presentan con 2 o 3 ondas de crecimiento folicular. A pesar de que ciertos estudios reportan que el patrón más común es el de 2 ondas foliculares (Roth, Meidan, Braw-Tal and Wolfenson, 2000; Taylor y Rajamahendran, 1991; Townson et al., 2002; Wilson et al., 1998; Wolfenson et al., 2004), hay otros que indican mayor predominancia de 3 ondas en vacas lecheras (Pursley et al., 1993; Savio et al., 1990). Cummins, Lonergan, Evans y Butler (2012) encuentran que vacas Holstein con buen mérito genético para fertilidad tienen menores ondas foliculares respecto a vacas con mérito genético malo (2,2 vs. 2,7).

En la Fig. 28 los patrones foliculares se observa que los tres animales del grupo de repetidoras tuvieron 2 ondas foliculares (Figura 28a, 28b y 28c). Además, como se puede observar presentaron ciclos estrales típicos, con curvas de progesterona aparentemente normales y con signos de estro a los 21 días. De acuerdo a Sartori et al. (2004) un ciclo estral típico es aquel que empieza y termina con signos de estro y con

una ovulación natural del folículo que ha emergido (≥ 4 mm) antes o en el momento del día de luteolisis.

Por otro lado, se pudo identificar la presencia de folículos codominantes en dos vaquillas de la presente investigación. En una de ellas (Fig. 25a) se observa codominancia folicular durante la primera oleada de desarrollo; mientras que en la otra (Fig. 25b) se observa durante la segunda oleada folicular. Estos resultados coinciden con lo hallazgos de Sartori et al. (2004), donde se observa codominancia folicular en una sola vaquilla (1 de 29); sin embargo, identifican un 35,7% de vacas con más de un folículo dominante durante la primera onda y 21,4% durante la última onda folicular. Kulick et al. (2001) reportan una incidencia de codominancia de 35, 4 y 10% durante la primera, segunda y tercera onda folicular en ciclos estrales de vaquillas nulíparas.

De acuerdo a Fricke y Wiltbank (1999), Santos et al. (2000) y Vasconcelos et al. (2001) existe alta incidencia (10 a 39%) de ovulaciones múltiples en vacas lecheras de alta producción. Varios estudios han observado una mayor tasa de ovulaciones dobles en vacas comparado con vaquillas; se asume que cerca del momento de desviación, hay una mayor secreción de FSH en vacas con doble ovulación comparado con vacas de una sola (Wolfenson et al., 2004). Dicho aumento relativo de FSH alrededor del momento de la desviación permitiría al folículo subordinado más grande convertirse en codominante lo cual le da la capacidad de ovular conjuntamente con el folículo dominante (Kulick et al., 2001). De hecho, Wolfenson et al. (2004) observan una pequeña pero significativamente mayor concentración de FSH durante el ciclo estral de vacas comparado con vaquillas. Dicho nivel elevado de FSH puede ser resultado de la disminución de la influencia inhibitoria del estradiol, ya que es probable que los estrógenos estén disminuidos en mayor proporción en vacas en comparación con vaquillas. Sartori et al. (2004) demuestran que la concentración máxima de estradiol

antes de la ovulación es menor en vacas comparado con vaquillas ($7,9 \pm 0,8$ vs. $11,3 \pm 0,6$ pg/ml).

Intervalo interestro

Sin tomar en cuenta los animales que aparentemente tuvieron un estro silente con un intervalo interestro mayor a 28 d (Fig. 25a, 25b y 27b); no se encontró diferencia significativa en la longitud del intervalo interestro ($P=0,193$; Cuadro 3) en vaquillas (22d), vacas primíparas ($24,5 \pm 0,70$ d), vacas multíparas ($23,6 \pm 4,04$ d) y vacas repetidoras (21 d). Según Royal et al. (2000), los intervalos interovulatorios se clasifican en cortos (<18 d), normales (18-24d) y en largos (>24 d). De acuerdo a esto, los animales de la presente investigación tuvieron longitudes de ciclos dentro de los rangos normales. A pesar de que en esta investigación no se realizó un monitoreo de la ovulación para comparar intervalos interovulatorios y se define a un ciclo estral desde que el animal presenta estro hasta que vuelve a presentar estro; se puede contrastar con literatura como Wolfenson et al. (2004) que reportan haber observado menor intervalo interovulatorio en vaquillas (2,5 días más corto). Sin embargo, de acuerdo a Sartori et al. (2004) las vaquillas nulíparas y las vacas lactantes tuvieron intervalos interovulatorios similares (22 y 22,9 d, respectivamente). Está bien establecido que las vacas o vaquillas de 3 ondas foliculares tienden a tener intervalos interovulatorios más largos que las hembras de las mismas categorías con 2 ondas foliculares (Ginther et al., 1989; Knopf et al., 1989; Sartori et al., 2004 y Savio et al, 1988), como consecuencia de un retraso en el momento de luteolisis. Cummins, Lonergan, Evans y Butler (2012) en su investigación encuentran además que las vacas Holstein de mérito genético bueno para fertilidad tienen ciclos estrales más cortos comparados con los ciclos de Holsteins de mérito genético malo (21,0 vs 25,1d, respectivamente).

Emergencia

En lo que al día de emergencia folicular se refiere, en esta investigación se detectaron folículos desde 2,7 mm. En el caso de la primera onda folicular en animales de 2 ondas, la emergencia ocurrió entre el día 0 (n=9) y el día 1 (n=3) del ciclo para todos los grupos. La emergencia de la segunda onda folicular fue entre los días 7 (n=4), 10 (n=6) y 13 (n=1). En el caso de la vaca múltipara con una sola onda, la emergencia ocurrió en el día 1 del ciclo. Por otro lado, en la vaquilla con 3 ondas foliculares la emergencia de la primera onda se dio en el día 0, la segunda onda en el día 7 y la tercera en el día 13 del ciclo. La aparición, reclutamiento o “emergencia” de una cohorte de 5 a 20 folículos de más de 5mm y se correlaciona con el aumento de las concentraciones de FSH (Adams, Matteri, Kastelic, Ko y Ginther, 1992). De acuerdo a Adams et al. (2008) la emergencia dura entre 2 a 3 días y se caracteriza por la presencia de 8 a 41 folículos pequeños que pueden ser detectados mediante ultrasonografía cuando tienen un diámetro de 3 a 4mm. De acuerdo a Peter et al. (2009), la emergencia ocurre cuando los folículos alcanzan un diámetro ≥ 4 mm en los días 0 (para la primera onda; anovulatoria) y 9 o 10 (para la 2^{da} onda; ovulatoria) en una ciclo estral de 2 ondas foliculares (Adams et al., 2008). En ciclos estrales de 3 ondas foliculares, la emergencia de la 1^{ra} onda (anovulatoria), 2^{da} onda (anovulatoria) y 3^{ra} onda (ovulatoria) ocurren aproximadamente en los días 0, 9 y 15 o 16, respectivamente (Adams et al., 2008; Peter et al., 2009). En esta investigación la emergencia folicular ocurrió conforme se indica en la literatura; únicamente, en la vaquilla con 3 ondas foliculares el día de emergencia de la 3ra onda fue 2 días antes de lo que indica la literatura (día 13; Figura 25a).

Tasa de crecimiento folicular

Al comparar la tasa de crecimiento de los folículos dominantes de la primera onda folicular no se observó diferencia significativa entre grupos (P = 0,67; Cuadro 3);

sin embargo, al comparar los folículos dominantes de la onda ovulatoria se encontró diferencia significativa ($P < 0,05$; Cuadro 3) entre vaquillas ($1,54 \pm 0,26$ mm/d), vacas primíparas ($2,72 \pm 0,77$ mm/d), vacas multíparas ($6,63 \pm 0,78$ mm/d) y vacas repetidoras ($1,86 \pm 0,28$ mm/d). Al realizar un diagrama de caja (Fig. 29) se observa que todos los grupos son diferentes entre sí; sin embargo, el grupo de multíparas es el que más difiere, presentando la mayor tasa de crecimiento a nivel de folículo ovulatorio. En promedio la tasa de crecimiento de los folículos dominantes en la presente investigación fue de $2,87 \pm 1,97$ mm/d (rango de 1,34 a 7,18 mm/d), lo cual indica una tasa más alta comparada con reportes como Townson et al. (2002) que observó una tasa de 1,2mm/d en vacas lactantes y Sartori et al. (2004) que observa una tasa en vacas y vaquillas de $1,20 \pm 0,7$ y $0,95 \pm 0,04$ mm/d, respectivamente. Sin embargo, Savio et al. (1990) reporta tasas de crecimiento del folículo ovulatorio de $3 \pm 1,4$ mm/d en vacas de 2 ondas foliculares y de $3,4 \pm 1,1$ en vacas de 3 ondas.

Máximo tamaño folicular

Se analizó el máximo diámetro folicular alcanzado (independientemente de la onda folicular), y se encuentra también una diferencia significativa ($P=0,032$; Cuadro 3) entre vaquillas ($12,56 \pm 2,98$ mm), vacas primíparas ($17,58 \pm 3,05$ mm), vacas multíparas ($20,52 \pm 1,99$ mm) y vacas repetidoras ($16,88 \pm 0,46$ mm). De acuerdo al diagrama de caja (Fig. 30) se puede observar que el grupo que más difiere del resto es el de vaquillas. Sin embargo, cuando se comparó únicamente los folículos dominantes de la onda ovulatoria, no se encontró diferencia significativa entre los grupos ($P=0,129$; Cuadro 3). Sartori et al. (2004) reporta no haber encontrado diferencias significativas en el máximo tamaño alcanzado por el folículo dominante entre la primera onda y la segunda ovulatoria. Sin embargo, encuentra diferencias cuando compara únicamente el folículo ovulatorio. En contraste, en la presente investigación no se encontró diferencia

significativa en la comparación del tamaño del folículo dominante entre los grupos. Sirois y Fortune (1988) realizan un estudio en vaquillas donde observa que el tamaño máximo y la tasa de crecimiento del folículo dominante en la segunda onda fue significativamente menor que las otras ondas. Cummins, Lonergan, Evans y Butler (2012) observan que el diámetro máximo del folículo preovulatorio fue mayor en vacas Holstein de alto mérito genético en comparación con las de bajo mérito genético (17,9 vs 16,8mm, respectivamente); sin embargo, las concentraciones de estradiol no fueron diferentes entre los genotipos.

Wolfenson et al. (2004) indican que los folículos preovulatorios más grandes pueden ser resultado de una mayor duración de la dominancia; sin embargo, comenta que otra posibilidad sería que la presencia de menores diámetros foliculares podría deberse a altas concentraciones de progesterona durante el ciclo estral, lo cual está asociado a una baja frecuencia de secreción del pulso de LH, lo cual se asocia con folículos dominantes de menor tamaño. De acuerdo a Wolfenson et al. (2004) los folículos preovulatorios en vaquillas son más pequeños que en vacas no solo al final del ciclo sino también los folículos dominantes de la 1era y 2da onda a través de todo el ciclo.

Sartori et al. (2002) comparó las concentraciones circulantes de esteroides entre vacas lactantes y vacas secas no preñadas, y observó que las concentraciones de E_2 y P_4 fueron similares entre los grupos a pesar de que las vacas lactantes tenían estructuras ováricas más grandes. Concluyen que aparentemente, las vacas lactantes requieren tener folículos más grandes y mayor producción de E_2 para lograr las concentraciones necesarias para producir un pico de LH y la subsecuente ovulación; sin embargo las concentraciones circulantes medidas son menores debido a un alto metabolismo esteroideo presente en vacas lactantes.

Tamaño de subordinados

Adicionalmente, al comparar los folículos subordinados se obtuvo diferencia estadísticamente significativa ($P=0,033$; Cuadro 3) entre vaquillas ($8,27 \pm 2,78\text{mm}$), vacas primíparas ($15,71 \pm 2,25 \text{ mm}$), vacas multíparas ($12,77 \pm 0,98 \text{ mm}$) y vacas repetidoras ($12,59 \pm 0,72 \text{ mm}$).

Al realizar el diagrama de caja (Fig. 31) se observa que el grupo que más difiere del resto, con diámetros menores de folículos subordinados es el grupo vaquillas, lo cual se relaciona también con los resultados anteriormente mencionados donde las vaquillas alcanzan menores tamaños máximos de folículos dominantes. En Sartori et al. (2004) encuentran resultados similares, en los cuales las vacas lecheras tienen folículos subordinados 1,5mm más grandes que las vaquillas del mismo estudio.

Día de luteolisis

Como se indica el Cuadro 4 en esta investigación el 75% de animales ($n=9$) posiblemente lisaron su cuerpo lúteo entre los días 16 y 19 del ciclo; mientras que el 25% restante ($n=3$) aparentemente no lisaron completamente al cuerpo hasta el día 20. La literatura indica que la luteolisis completa puede demostrarse al observar que la P_4 circulante alcanza concentraciones nadir al día 3 luego de la iniciación de la regresión del CL (Sartori et al., 2004). En este contexto podemos indicar que dichos 3 animales tuvieron una tasa de regresión lútea menor o más lenta que el resto de animales. El 66,67% de los animales ($n=8$) alcanzan valores $\leq 1\text{ng/ml}$ al día 20 del ciclo; mientras que los 4 animales restantes se mantienen con niveles de superiores a 1ng/ml , lo cual ratifica la menor tasa de luteolisis anteriormente señalada. De acuerdo a Sirois y Fortune (1988) y Ginther et al. (2010), la finalización del período luteolítico se define como la disminución de progesterona a menos de 1ng/ml . En el Cuadro 3 se puede observar que 7 de 12 animales (2 vaquillas, 2 primíparas, 2 multíparas y 1 repetidora) presentan

concentraciones de progesterona al día 19 mayores a 1 ng/ml, indicando que aún en el día 19 existen CL funcionales en animales de ciclos de 21 a 28 días de longitud. Estos resultados aparentemente concuerdan con lo publicado; Ginther et al. (2010) indican que el inicio de la luteolisis puede ocurrir entre el día 16 al 19 ($16,8 \pm 0,4d$) y el final de la luteolisis entre los días 17 al 20 ($17,8 \pm 0,4d$).

Volumen del CL

No se encontró diferencia al analizar el volumen lúteo máximo durante el ciclo ($P=0,172$; Cuadro 3). Sin embargo, se observa una tendencia a que las vaquillas tengan volúmenes luteales más bajos ya que en promedio las vaquillas tienen $4661,16 \pm 1915,28 \text{ mm}^3$, comparado con primíparas ($7582,26 \pm 1644,84 \text{ mm}^3$), multíparas ($7280,70 \pm 1834,12 \text{ mm}^3$) y repetidoras ($5793,29 \pm 2438,65 \text{ mm}^3$). En contraste a los hallazgos de esta investigación, Sartori et al. (2004) reporta que vacas lactantes desarrollan mayor volumen de tejido lúteo que vaquillas y demuestra que las diferencias de tamaño se hacen evidentes desde el día 4 del ciclo. El mayor tamaño del CL podría ser consecuencia de la ovulación de folículos de gran tamaño. Habría una correlación positiva entre el tamaño del CL y el del folículo ovulatorio. Eso significaría que en nuestro estudio al haber encontrado que las vaquillas alcanzan menores tamaños máximos de folículos dominantes, alcanzarían menores tamaños de cuerpos lúteos producto de dichos folículos; sin embargo, nuestros resultados no lo demuestran.

Por otro lado, Cummins et al. (2012) observa que durante los 13 primeros días del ciclo, las vacas Holstein de alto mérito genético desarrollan cuerpos lúteos 16% más grandes que las vacas de bajo mérito genético.

Progesterona

De acuerdo a Nyman et al. (2014) un ciclo estral de 21 días en promedio (rango de 18 a 24) se define como el período iniciado por el incremento de P₄ sobre un valor umbral y la subsecuente terminación con la siguiente disminución de P₄ por debajo de dicho valor umbral. El primer incremento de la concentración de P₄ se debe dar antes de los 56 días postparto, seguido de una ciclicidad regular definida como dos semanas de altas concentraciones de P₄ (sobre el umbral de la fase lútea; >1ng/ml) seguido de aproximadamente una semana de bajas concentraciones de P₄ (debajo del umbral de la fase lútea; <1ng/ml). Los perfiles de P₄ de los animales de esta investigación cumplen con dichos requisitos, con un incremento de P₄ sobre 1ng/ml en el día 4 y 15,8 días después una disminución de P₄ por debajo de 1ng/ml. Varios aspectos pueden ser descritos en base a un perfil de progesterona como la longitud del ciclo estral, comienzo de la actividad luteal, intervalo interluteal, longitud de la fase lútea e intervalo interovulatorio; y en base a dichos aspectos se pueden describir perfiles de P₄ atípicos (retraso de la ciclicidad, fase lútea prolongada y suspensión de la ciclicidad (Nyman et al., 2014). Sin embargo, para poder realizar dicho análisis es necesario evaluar los perfiles durante todo el postparto y luego del reinicio de la actividad ovárica.

Al realizar la comparación de concentración progesterona durante cada día no se detecto diferencias significativas entre los grupos. Tampoco hubo diferencia significativa al comparar entre grupos la máxima concentración de progesterona presentada durante el ciclo estral (P = 0,578; Cuadro 3); a pesar de que hay una tendencia a que en vaquillas los niveles alcanzados sean más altos (11,35 ± 4,19 ng/ml) en comparación a primíparas, multíparas y repetidoras (8,21 ± 0,50 ng/ml, 10,19 ± 4,48 ng/ml y 7,30 ± 1,47 ng/ml, respectivamente). Investigaciones como la de Wolfenson et al. (2004) han encontrado que pueden presentarse diferencias interesantes en los

patrones de concentración esteroideogénica; de hecho se observa concentraciones de estradiol alrededor del estro menores en vacas que en vaquillas. De igual manera un estudio en vacas lecheras realizado por Sangsritavong et al. (2002) demuestra que la alta ingesta de alimento (característica de las vacas en lactación) aumenta el flujo sanguíneo en el hígado y a su vez el metabolismo esteroideo lo cual resulta en una disminución de las concentraciones de progesterona y estradiol en la circulación. Sin embargo, otro estudio contrasta dichos resultados al indicar que el metabolismo de progesterona es similar tanto en vacas en lactación como en vacas que no están en lactación (De La Sota, Lucy, Staples y Thatcher, 1993). La menor concentración de progesterona en vacas, puede también estar relacionada a un bajo pulso preovulatorio de LH que se traduce en menor secreción de progesterona post-ovulación (Wolfenson et al., 2004). En vacas se ha demostrado que la administración de una dosis alta de un agonista de GnRH induce un pulso mayor de LH y subsecuentemente un nivel más alto de progesterona durante la fase lútea (Rajamahendran, Ambrose, Schmitt, Thatcher y Thatcher, 1998). De hecho se han realizado experimentos en los cuales células de la granulosa luteinizadas fueron expuestas a dosis más altas y sostenidas de LH y como resultado las células produjeron más progesterona 8 días después (Less, Wolfenson, D., Shaham-Albalancy, Roth, y Meidan, 1998). Por lo tanto debe haber una relación de causa y efecto entre un bajo pulso de LH y baja secreción de progesterona luteal post-ovulación (Wolfenson et al., 2004). Además, se ha encontrado que la capacidad de progesterona secretada por el CL en la fase lútea media está determinada no solo por el pulso preovulatorio de LH sino también por el patrón de secreción pulsátil de LH post-ovulación durante la luteinización del CL en la etapa temprana del ciclo (Peters et al., 1994). Los bajos niveles de progesterona antes o después de la IA pueden estar involucrados en la baja fertilidad de vacas (Wolfenson et al., 2004).

Wolfenson et al. (2004) reporta mayores concentraciones de P₄ en vaquillas comparado con vacas desde el día 2 del ciclo estral. Por otro lado, De La Sota et al., (1993) reportan menor concentración de P₄ en vacas en lactación comparada con vacas que no están en lactación. Por otro lado, Cummins, Lonergan, Evans y Butler (2012) indican que las concentraciones de P₄ en vacas de alto mérito genético fue 34% mayores en vacas con mayor mérito genético para fertilidad en comparación con vacas de menor mérito genético (5,15 vs. 3,84 ng/ml, respectivamente) desde el día 5 al 13 del ciclo. Kimura, Nakao, Moriyoshi y Kawata (1987) y Shelton, Gayerie De Abreu, Hunter, Parkinson y Lamming (1990) indican que las vacas repetidoras tuvieron valores de progesterona menores que vacas con fertilidad normal durante los primeros 7 días después de la ovulación.

De acuerdo a Cummins et al. (2012) se demuestra por primera vez que el mérito genético para fertilidad tienen efectos en el desarrollo del cuerpo lúteo, la concentración de P₄, diámetro del folículo preovulatorio y comportamiento de estro.

Por otro lado, al analizar las curvas de progesterona de las vacas repetidoras podemos observar que estas presentaron tanto ciclos estrales como curvas de progesterona regulares. Pérez-Marín y España (2007) reportan que en vacas repetidoras existen diferencias individuales considerables en el ambiente hormonal; de hecho existen dos grandes grupos de animales con el síndrome de vaca repetidora: aquellos que presentan función ovárica atípica (fase lútea prolongada, quistes ováricos, anestro, disfunción luteal) y aquellos que presentan función ovárica fisiológica. En dicha investigación, algunos animales con función ovárica fisiológica presentan curvas de progesterona regulares similares a las encontradas en la presente investigación, con la presentación de estro al día 0, seguido del desarrollo del CL y un aumento progresivo de los niveles de progesterona.

Progesterona AUC

Al comparar el área bajo la curva (AUC por sus siglas en inglés: Area under the curve) entre los grupos no obtuvimos una diferencia significativa ($P=0,64$; Cuadro 3). Sin embargo, hay una tendencia a que en el grupo vaquillas el AUC sea mayor ($106,98 \pm 42,4$ ng/ml) en comparación a primíparas ($92,95 \pm 5,30$ ng/ml), multíparas ($94,24 \pm 41,95$ ng/ml) y repetidoras ($74,49 \pm 7,54$ ng/ml). Existe una diferencia aparente; sin embargo, la gran variabilidad entre los animales hace que los resultados no sean significativamente diferentes. Por ejemplo, el nivel de P_4 más alto en vaquillas fue de $14,07$ ng/ml, hay otra vaquilla de $13,47$ ng/ml y una de $6,53$ ng/ml. Si comparamos con el grupo multíparas que tiene valores de $15,11$ ng/ml, $9,12$ ng/ml y $6,34$ ng/ml. Dicha variabilidad (presencia de valores altos y bajos dentro de los grupos) hace que las diferencias no sean significativas.

Como se indicó anteriormente, Wolfenson et al. (2004) indican que hay evidencia de diferencias en la función ovárica y en la concentración de hormonas en vacas de estados reproductivos distintos (vaquillas nulíparas vs. vacas multíparas). Balendran et al., (2008) indican que las concentraciones de progesterona no son significativamente diferentes entre animales de diferente paridad (vaquillas y vacas de primer, segundo y tercer parto) en ninguno de los días post IA; y concluyen que las concentraciones periféricas de P_4 no son afectadas por la paridad. Sin embargo, en dicho estudio, la P_4 en vaquillas fue medida en sangre mientras que en vacas fue medida en leche. Sartori et al. (2004) indica que las concentraciones máximas de progesterona fueron menor en vacas multíparas en relación a vaquillas ($5,6 \pm 0,5$ vs. $7,3 \pm 0,4$ ng/ml, respectivamente). De igual manera demuestran que dichas diferencias en la circulación de P_4 entre vacas y vaquillas se hace evidente a partir del día 6 del ciclo y persiste hasta el día de la luteolisis. De La Sota et al. (1993) reporta también bajas

concentraciones de P₄ circulante en vacas lactantes en comparación con vacas no lactantes.

Comparación con información publicada

Los datos extraídos de las 17 investigaciones fueron representados en 31 curvas de progesterona (Fig. 33). Al comparar, mediante t-Student las áreas bajo dichas curvas (AUC) de progesterona de la información publicada recopilada con las AUC de los animales de la presente investigación se obtuvo diferencias significativas en todos los grupos de estudio (Cuadro 7). En vaquillas el promedio de AUC encontrado en esta investigación difiere significativamente ($P < 0,05$) del promedio de la información publicada en vaquillas ($106,99 \pm 42,49$ ng/ml vs. $71,69 \pm 20,64$ ng/ml, respectivamente). De igual manera en primíparas, multíparas y repetidoras, los promedios de las AUC encontradas en la presente investigación son significativamente diferentes a los promedios de la información publicada en dichos grupos ($P < 0,01$, $P < 0,05$ y $P < 0,01$, respectivamente) (Cuadro 7 y Fig. 34). Al realizar una comparación general entre las AUC de la información publicada (295 ciclos estrales representados en 31 curvas de P₄) con las AUC de la presente investigación (12 ciclos estrales), independientemente del grupo o estado reproductivo, se observó una diferencia muy significativa ($P < 0,01$; Cuadro 8), siendo la media del AUC de esta investigación estadísticamente mayor que la media del AUC de la información publicada ($92,17 \pm 28,46$ ng/ml vs. $63,89 \pm 17,47$ ng/ml, respectivamente). Finalmente, se encontró una diferencia muy significativa ($P < 0,01$) al comparar la concentración máxima alcanzada durante las curva de P₄ de los animales de este estudio ($n=12$ valores máximos) con las concentraciones máximas descritas en las publicaciones analizadas ($=31$ valores máximos). En el diagrama de caja y bigotes (Fig. 36) se puede observar que los niveles máximos de P₄ encontrados en esta investigación son mayores en relación a lo

publicado ($9,26 \pm 3,17$ ng/ml vs. $5,19 \pm 1,76$ ng/ml), lo cual se ha comprobado estadísticamente.

Como se pudo observar en las publicaciones digitalizadas, existe una cantidad considerable de publicaciones alrededor de los perfiles hormonales incluidos los de P_4 durante el ciclo estral en vacas lecheras; sin embargo, de acuerdo a Martin et al. (2013) no hay una indicación de en qué medida dichos datos pueden ser reales. Martin y sus colaboradores realizan en el 2013 una investigación cuyo objetivo era generar perfiles estándar de las principales hormonas reproductivas en vacas, para que puedan ser propuestos como referencias fidedignas y representen las dinámicas normales de dichas hormonas durante el ciclo estral. Durante este estudio utilizan información de animales con diferentes propósitos zootécnicos (leche y carne), razas, paridades e incluyen investigaciones donde los animales fueron sincronizados. Posteriormente presentan datos en bruto de las diferentes hormonas, incluidos los perfiles de P_4 y se puede observar que el valor máximo alcanzado es de 13,08 ng/ml (dato extraído digitalmente de la Fig. 1C de Martin et al. 2013). Finalmente presentan los perfiles de referencia e indican que el valor máximo de P_4 es alcanzado al día 14 del ciclo con un valor promedio de 5,7 ng/ml mostrando también los cuartiles 25% y 75% (6,01 y 5,33 ng/ml, respectivamente; datos extraído digitalmente de la Fig. 3C de Martin et al. 2013). Valores por debajo del promedio encontrado en la presente investigación.

En una investigación realizada por Báez, Grajales y Pérez (2007) en el trópico colombiano, se estudió la dinámica hormonal en vacas postparto de doble propósito (Costeño con cuernos) y se encuentra datos similares a los de la presente investigación, con promedios de P_4 al día 15 de $8,64 \pm 1,43$ ng/ml, alcanzando valores extremos de 13,2 ng/ml (datos extraídos digitalmente de la Fig. 3 de Báez et al. 2007); valores que sobrepasan también a los referenciales presentados por Martin et al. (2013). De igual

manera, en otra investigación realizada por Báez (2010) en la cual se evalúa las relaciones hormonales y dinámica folicular durante el postparto de vacas doble propósito (Sanmartinero) se encuentra una media de P_4 al día 15 de $10,23 \pm 2,44$ ng/ml, con valores máximos de P_4 de 15ng/ml.

Como se indicó anteriormente, no solo las concentraciones de P_4 difieren estadísticamente de la información publicada; al realizar la comparación de los diámetros foliculares máximos alcanzados en la onda ovulatoria entre esta investigación y la información publicada, se obtuvo una diferencia muy significativa ($P = 0,002$). Claramente, la media del diámetro folicular máximo alcanzado en la onda ovulatoria es significativamente menor en los animales de la presente investigación en comparación con la información publicada ($13,5 \pm 3,3$ mm vs. $17,18 \pm 2,3$ mm, respectivamente). Un tamaño folicular incrementado puede tener efectos importantes en la fertilidad. Vasconcelos et al. (1999) observa que vacas que ovulan folículos más grandes tienen menor tasa de concepción y una mayor tendencia para pérdida embrionaria que vacas que ovulan folículos de menor tamaño.

De igual manera, el volumen luteal es significativamente menor ($P = 0,004$) en los animales de la presente investigación respecto a la información publicada ($6329,35 \pm 2089,04$ vs. $8515,01 \pm 2127,37$, respectivamente). Es posible que estos resultados estén relacionados a los hallazgos encontrados por Sartori et al. (2004) donde observan que el grupo vaquillas tiene menores diámetros foliculares y menor volumen luteal pero mayores concentraciones de E_2 y P_4 ; y concluyen que dicha disminución en la circulación puede estar relacionada ya sea a una menor producción de hormonas mediante la esteroidogénesis o a un mayor metabolismo hormonal.

Conclusiones

A pesar de que se realizó un análisis de los datos con estadística no paramétrica el tamaño reducido de la muestra por grupo ($n=3$) afecta el poder estadístico de los resultados, pues no hay un número de observaciones necesarias para tener una buena probabilidad y por ende confiabilidad de observar los efectos que se están buscando. Tomando en cuenta eso, en esta investigación se comprobó que la tasa de crecimiento folicular difiere en los estados reproductivos; siendo las multíparas las que tienen las tasas más elevadas y las vaquillas las más bajas. Se concluye también que tanto el diámetro máximo del folículo dominante como el diámetro de los subordinados también difieren en grupos; encontrándose los menores diámetros en vaquillas y los mayores en multíparas.

Por otro lado, no se encontró diferencia en el diámetro máximo del folículo dominante de la onda ovulatoria entre grupos. Tampoco se observó diferencia entre el volumen luteal máximo alcanzado, ni entre las áreas bajo las curvas (AUC) de P_4 entre los grupos. Sin embargo, se pueden observar tendencias similares a los resultados descritos en la literatura; como por ejemplo, el hecho de que las vaquillas sean propensas a tener niveles más elevados de P_4 respecto al resto de los grupos y estructuras ováricas de menor tamaño.

Por otro lado, antes de comparar los resultados de esta investigación con la información publicada, se pudo comprobar normalidad en ambos grupos a comparar, por lo que se hizo uso de estadística paramétrica. Sin embargo, comparar entre datos de otras latitudes incrementa las variables confusorias; a pesar de que la selección de los estudios a comparar en esta investigación fue realizada con el objetivo de disminuir al máximo dicha variabilidad. Tomando en cuenta estos aspectos, se obtuvieron resultados

interesantes al realizar la comparación con la información publicada. Los resultados indican que las concentraciones máximas de P_4 y las áreas bajo las curvas de P_4 son mayores en los animales del presente estudio en comparación con lo publicado; además, se concluye que el diámetro folicular y el volumen luteal en este estudio son menores en comparación a las referencias.

Si se confirma que los perfiles hormonales en esta localidad son significativamente mayores, quizás los protocolos de sincronización establecidos requieran de modificaciones específicas para los animales de esta localidad; por ejemplo, cambios en la dosis de hormonas administradas, días de aplicación, entre otras. Sin embargo, es importante recalcar que, en esta hacienda, aspectos de nutrición, estado de salud, genética y manejo reproductivo son muy similares a estándares internacionales recomendados. Todos estos factores colaboran en conjunto para que la fertilidad en esta hacienda sea diferente que en otras haciendas de esta localidad por lo que los resultados que tenemos aquí no pueden ser generalizados y tendrían que ser comprobados en un sistema de manejo diferente y con un mayor número de animales.

Recomendaciones

Se puede establecer recomendaciones desde varios puntos de vista a partir de esta investigación. Primeramente, se listarán las recomendaciones para tratar de mejorar esta investigación en el caso de se requiera replicarla; en segundo lugar, se sugerirá la investigación de ciertos tópicos y finalmente recomendará un direccionamiento de futuras investigaciones.

Para lograr mejorar esta investigación en caso de ser replicada y resolver inconvenientes que pueden suceder se recomienda:

- Realizar un cálculo de tamaño de muestra para lograr demostrar significativamente aspectos que se presentaron únicamente como tendencias.
- Dejar que los ciclos estrales empiecen y terminen con ovulaciones naturales de los folículos (no inducidos).
- Realizar el monitoreo y muestreo diariamente para poder entre otras cosas analizar las distintas etapas de la dinámica folicular como emergencia, selección y dominancia con mayor exactitud.
- Investigar la función ovárica durante varios ciclos estrales consecutivos; además, realizar la evaluación de los perfiles de P_4 conjuntamente con E_2 desde el postparto hasta que haya reinició de la actividad ovárica y del ciclo estral subsecuente; con la finalidad de analizar los perfiles tomando en cuenta aspectos como: el comienzo de la actividad luteal, intervalo luteal, longitud de la fase lútea e intervalo interovulatorio
- Realizar un escaneo minucioso de cada ovario, varias veces y en más de un plano; realizar el escaneo de lateral a medial y luego de medial a lateral, dorso-ventral, oblicua intermedia y en algunos casos cráneo-caudal, para así conocer la localización relativa de los folículos.

- Realizar los análisis hormonales conjuntamente con un grupo control conformado de analitos de un valor conocido, para asegurarse de la precisión del resultado.

Por otro lado se sugiere la investigación de ciertos tópicos en los animales de esta localidad; como por ejemplo, el metabolismo esteroide en vacas lecheras, así como su capacidad esteroideogénica. En último lugar, se recomienda que la dirección de futuras investigaciones sea hacia el desarrollo de biotecnologías aplicables de manera específica a los diferentes estados reproductivos en esta localidad, Sería necesario investigar más acerca del efecto de progesterona en el éxito de los métodos de sincronización.

Referencias

- Acosta, T. J., Yoshizawa, N., Ohtani, M., and Miyamoto, A. (2002). Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F_{2α} injection in the cow. *Biology of Reproduction*, 66(3), 651-658.
- Adams, G. P., Jaiswal, R., Singh, J., and Malhi, P. (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, 69(1), 72-80.
- Adams, G. P., Matteri, R. L., Kastelic, J. P., Ko, J. C. H., and Ginther, O. J. (1992). Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, 94(1), 177-188.
- Aerts, J. M. J., and Bols, P. E. J. (2010a). Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development. *Reproduction in domestic animals*, 45(1), 171-179.
- Aerts, J. M. J., and Bols, P. E. J. (2010b). Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. *Reproduction in domestic animals*, 45(1), 180-187.
- Ahmad, N., Beam, S. W., Butler, W. R., Deaver, D. R., Duby, R. T., Elder, D. R., ... and Milvae, R. A. (1996). Relationship of fertility to patterns of ovarian follicular development and associated hormonal profiles in dairy cows and heifers. *Journal of animal science*, 74(8), 1943-1952.
- Ahmad, N., Schrick, F. N., Butcher, R. L., and Inskeep, E. K. (1995). Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biology of reproduction*, 52(5), 1129-1135.
- Albihn, A., Gustafsson, H., Hurst, M., and Rodriguez-Martinez, H. (1991). Embryonic ability to prolong the interoestrous interval in virgin and repeat breeder heifers. *Animal Reproduction Science*, 26(3), 193-210.
- Alila, H. W., and Hansel, W. (1984). Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. *Biology of reproduction*, 31(5), 1015-1025.
- Alila, H. W., Corradino, R. A., and Hansel, W. (1988). A comparison of the effects of cyclooxygenase prostanoids on progesterone production by small and large bovine luteal cells. *Prostaglandins*, 36(2), 259-270.
- Alila, H. W., Dowd, J. P., Corradino, R. A., Harris, W. V., and Hansel, W. (1988). Control of progesterone production in small and large bovine luteal cells separated by flow cytometry. *Journal of reproduction and fertility*, 82(2), 645-655.

- Allen, W. M., and Wintersteiner, O. (1934). Crystalline progestin. *Science*, 80(206), 191-192.
- Allrich, R. D. (1993). Estrous behavior and detection in cattle. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 9(2), 249-262.
- Anderson, W. J., Forrest, D. W., Goff, B. A., Shaikh, A. A., and Harms, P. G. (1986). Ontogeny of ovarian inhibition of pulsatile luteinizing hormone secretion in postnatal Holstein heifers. *Domestic Animal Endocrinology*, 3(2), 107-116.
- Arakane, F., King, S. R., Du, Y., Kallen, C. B., Walsh, L. P., Watari, H., ... and Strauss, J. F. (1997). Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 272(51), 32656-32662.
- Argetsinger, L. S., Campbell, G. S., Yang, X., Witthuhn, B. A., Silvennoinen, O., Ihle, J. N., and Carter-Su, C. (1993). Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell*, 74(2), 237-244.
- Armstrong, D.T., Goff, A.K. and Dorrington, J.H. (1979) in Ovarian Follicular Development and Function (Midgley, A.R. and Sadler, W.A. eds.), pp. 169-182, Raven Press, New York.
- Attardi, B., and Happe, H. K. (1986). Modulation of the Estradiol-Induced Luteinizing Hormone Surge by Progesterone or Antiestrogens: Effects on Pituitary Gonadotropin-Releasing Hormone Receptors. *Endocrinology*, 119(1), 274-283.
- Ayalon, N. (1978). A review of embryonic mortality in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, 54(2), 483-493.
- Ayalon, N. (1984). The repeat breeder problem. In *10. international congress an animal reproduction and artificial insemination, University of Illinois at Urbana-Champaign (USA), 10-14 Jun 1984*. University of Illinois at Urbana-Champaign.
- Aymard, C., Shirts, R. (2000) Pixel Conversion: A Simple Way to Extract Coordinates of Points from a Printed Graph. *Journal of Chemical Education*, 77(9), 1230-1232.
- Azmi, T. I., and O'shea, J. D. (1984). Mechanism of deletion of endothelial cells during regression of the corpus luteum. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 51(2), 206-217.
- Badinga, L., Driancourt, M. A., Savio, J. D., Wolfenson, D., Drost, M., De La Sota, R. L., and Thatcher, W. W. (1992). Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. *Biology of reproduction*, 47(5), 871-883.

- Báez, G. M. (2010). *Relaciones hormonales y dinámica folicular durante el periodo posparto en vacas Sanmartinero/Hormone relationship and follicular dynamics during postpartum period in Sanmartinero breed cows*. Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Báez, G. M., Grajales, H., and Pérez, J. E. (2007). Caracterización del ciclo estral mediante perfiles de esteroides (progesterona, 17 β -estradiol) en la raza Costeño con Cuernos (*Bos taurus*) en el trópico Colombiano. *Livestock Research for Rural Development [en línea]*, 19(9).
- Båge, R., Forsberg, M., Gustafsson, H., Larsson, B., and Rodríguez-Martínez, H. (2000). Effect of ACTH-challenge on progesterone and cortisol levels in ovariectomised repeat breeder heifers. *Animal reproduction science*, 63(1), 65-76.
- Båge, R., Gustafsson, H., Larsson, B., Forsberg, M., and Rodríguez-Martínez, H. (2002). Repeat breeding in dairy heifers: follicular dynamics and estrous cycle characteristics in relation to sexual hormone patterns. *Theriogenology*, 57(9), 2257-2269.
- Balendran, A., Gordon, M., Pretheeban, T., Singh, R., Perera, R., and Rajamahedran, R. (2008). Decreased fertility with increasing parity in lactating dairy cows. *Canadian journal of animal science*, 88(3), 425-428.
- Bao, B., and Garverick, H. A. (1998). Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *Journal of animal science*, 76(7), 1903-1921.
- Bao, B., Garverick, H. A., Smith, G. W., Smith, M. F., Salfen, B. E., and Youngquist, R. S. (1997). Expression of messenger RNA encoding 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase during recruitment and selection of bovine ovarian follicles: identification of dominant follicles by expression of 3 β -HSD mRNA within the granulosa cell layer. *Biology of Reproduction*, 56, 1446-1473.
- Bartlett, P. C., Kirk, J. H., and Mather, E. C. (1986). Repeated insemination in Michigan Holstein-Friesian cattle: incidence, descriptive epidemiology and estimated economic impact. *Theriogenology*, 26(3), 309-322.
- Batra, S. (1986). Effect of estrogen and progesterone treatment on calcium uptake by the myometrium and smooth muscle of the lower urinary tract. *European journal of pharmacology*, 127(1), 37-42.
- Bauer, M., Reibiger, I., and Spaniel-Borowski, K. (2001). Leucocyte proliferation in the bovine corpus luteum. *Reproduction*, 121(2), 297-305.

- Bauer-Dantoin, A. C., Weiss, and Jameson, J. L. (1995). Roles of estrogen, progesterone, and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the control of pituitary GnRH receptor gene expression at the time of the preovulatory gonadotropin surges. *Endocrinology*, 136(3), 1014-1019.
- Beam, S. W., and Butler, W. R. (1997). Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biology of Reproduction*, 56, 133-142.
- Beam, S. W., and Butler, W. R. (1998). Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 54, 411-424.
- Beg, M. A., Bergfelt, D. R., Kot, K., and Ginther, O. J. (2002). Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. *Biology of reproduction*, 66(1), 120-126.
- Behrman, H. R., MacDonald, G. J., and Greep, R. O. (1971). Regulation of ovarian cholesterol esters: Evidence for the enzymatic sites of prostaglandin-induced loss of corpus luteum function. *Lipids*, 6(11), 791-796.
- Bello, N. M., Steibel, J. P., and Pursley, J. R. (2006). Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of Ovsynch in lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 89(9), 3413-3424.
- Berardinelli, J. G., Dailey, R. A., Butcher, R. L., and Inskeep, E. K. (1979). Source of progesterone prior to puberty in beef heifers. *Journal of animal science*, 49(5), 1276-1280.
- Bergfelt, D. R., Sego, L. H., Beg, M. A., and Ginther, O. J. (2003). Calculated follicle deviation using segmented regression for modeling diameter differences in cattle. *Theriogenology*, 59(8), 1811-1825.
- Berisha, B., and Schams, D. (2005). Ovarian function in ruminants. *Domestic animal endocrinology*, 29(2), 305-317.
- Berisha, B., Schams, D., and Miyamoto, A. (2002). The expression of angiotensin and endothelin system members in bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. *Endocrine*, 19(3), 305-312.
- Berridge, M. J., and Irvine, R. F. (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction.
- Boer, H. M. T., Veerkamp, R. F., Beerda, B., and Woelders, H. (2010). Estrous behavior in dairy cows: identification of underlying mechanisms and gene functions. *Animal*, 4(03), 446-453.

- Bottari, S. P., Vokaer, A., Kaivez, E., Lescrainier, J., and Vauquelin, G. P. (1983). Differential Regulation of α -Adrenergic Receptor Subclasses by Gonadal Steroids in Human Myometrium. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 57(5), 937-941.
- Bowen-Shauver, J. M., and Telleria, C. M. (2003). Luteal regression: a redefinition of the terms. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 24(1), 28.
- Braden, T. D., Gamboni, F., and Niswender, G. D. (1988). Effects of prostaglandin F₂ alpha-induced luteolysis on the populations of cells in the ovine corpus luteum. *Biology of reproduction*, 39(2), 245-253.
- Brann, D. W., O'Conner, J. L., Wade, M. F., Zamorano, P. L., and Mahesh, V. B. (1993). Regulation of anterior pituitary gonadotropin subunit mRNA levels during the preovulatory gonadotropin surge: A physiological role of progesterone in regulating LH- β and FSH- β mRNA levels. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 46(4), 427-437.
- Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 232(4746), 34-47.
- Butler, W. R., and Smith, R. D. (1989). Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *Journal of dairy science*, 72(3), 767-783.
- Canty, M. J., Boland, M. P., Evans, A. C. O., and Crowe, M. A. (2006). Alterations in follicular IGFBP mRNA expression and follicular fluid IGFBP concentrations during the first follicle wave in beef heifers. *Animal reproduction science*, 93(3), 199-217.
- Chakravorty, A., Joslyn, M. I., and Davis, J. S. (1993). Characterization of insulin and insulin-like growth factor-I actions in the bovine luteal cell: regulation of receptor tyrosine kinase activity, phosphatidylinositol-3-kinase, and deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology*, 133(3), 1331-1340.
- Channing, C. P. (1969). Steroidogenesis and morphology of human ovarian cell types in tissue culture. *Journal of Endocrinology*, 45(2), 297-NP.
- Clark, J. A., and Covey, K. R. (2012). Tree species richness and the logging of natural forests: A meta-analysis. *Forest Ecology and Management*, 276, 146-153.
- Critchley, L. A., Yang, X. X., and Lee, A. (2011). Assessment of trending ability of cardiac output monitors by polar plot methodology. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia*, 25(3), 536-546.
- Crowe, M. A. (2011). Reproduction, Events and Management. Estrous cycle: Characteristics. *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*. Academic Press, San Diego, California, 428-433.

- Crowe, M. A., Goulding, D., Baguisi, A., Boland, M. P., and Roche, J. F. (1993). Induced ovulation of the first postpartum dominant follicle in beef suckler cows using a GnRH analogue. *Journal of reproduction and fertility*, 99(2), 551-555.
- Crowe, M. A., Padmanabhan, V., Mihm, M., Beitins, I. Z., and Roche, J. F. (1998). Resumption of follicular waves in beef cows is not associated with periparturient changes in follicle-stimulating hormone heterogeneity despite major changes in steroid and luteinizing hormone concentrations. *Biology of reproduction*, 58(6), 1445-1450.
- Cummings, A. M., and Yochim, J. M. (1984). Differentiation of the uterus in preparation for gestation: a model for the action of progesterone. *Journal of theoretical biology*, 106(3), 353-374.
- Cummins, S. B., Lonergan, P., Evans, A. C. O., and Butler, S. T. (2012). Genetic merit for fertility traits in Holstein cows: II. Ovarian follicular and corpus luteum dynamics, reproductive hormones, and estrus behavior. *Journal of dairy science*, 95(7), 3698-3710.
- Davis, J. S., and Rueda, B. R. (2002). The corpus luteum: an ovarian structure with maternal instincts and suicidal tendencies. *Frontiers in Bioscience*, (7), d1949-78.
- Davis, J. S., May, J. V., and Keel, B. A. (1996). Mechanisms of hormone and growth factor action in the bovine corpus luteum. *Theriogenology*, 45(7), 1351-1380.
- De La Sota, R. L., Lucy, M. C., Staples, C. R., and Thatcher, W. W. (1993). Effects of recombinant bovine somatotropin (somatotribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 76(4), 1002-1013.
- De Rensis, F., and Peters, A. R. (1999). The control of follicular dynamics by PGF₂ α , GnRH, hCG and oestrus synchronization in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 34(2), 49-59.
- De Silva, A. W. M. V., Anderson, G. W., Gwazdauskas, F. C., McGilliard, M. L., and Lineweaver, J. A. (1981). Interrelationships with estrous behavior and conception in dairy cattle. *Journal of dairy science*, 64(12), 2409-2418.
- Desjardins, C., and Hafs, H. D. (1969). Maturation of bovine female genitalia from birth through puberty. *Journal of animal science*, 28(4), 502-507.
- Diskin, M. G. (2008). HeatWatch: a telemetric system for heat detection in cattle. *Veterinary Quarterly*, 30, 37-48.

- Diskin, M. G., and Sreenan, J. M. (1980). Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *Journal of Reproduction and Fertility*, 59(2), 463-468.
- Donaldson, L. E., and Hansel, W. (1965a). Prolongation of life span of the bovine corpus luteum by single injections of bovine luteinizing hormone. *Journal of dairy science*, 48(7), 903-904.
- Donaldson, L., and Hansel, W. (1965b). Histological study of bovine corpora lutea. *Journal of dairy science*, 48(7), 905-909.
- Doraiswamy, V., Grazulbilska, A., Ricke, W. A., Redmer, D. A., and Reynolds, L. P. (1995, January). Immunoneutralization of Angiogenic Activity from ovine corpora-lutea (CL) with Antibodies Against Fibroblast Growth-factor (FGF)-2 and Vascular Endothelial Growth-factor (VEGF). In *Biology of Reproduction* (Vol. 52, pp. 112-112). 1526 Jefferson St, Madison, WI 53711-2106: Soc Study Reproduction.
- Dransfield, M. B. G., Nebel, R. L., Pearson, R. E., and Warnick, L. D. (1998). Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. *Journal of dairy science*, 81(7), 1874-1882.
- Drummond, A. E. (2006). The role of steroids in follicular growth. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4(16), 678.
- Duchens, M., Forsberg, M., Gustafsson, H., Edqvist, L. E., and Rodríguez-Martínez, H. (1995). Reproductive performance of heifers induced to oestrous asynchrony by suprabasal plasma progesterone levels. *Animal Reproduction Science*, 39(3), 171-182.
- Duffy, P., Crowe, M. A., Boland, M. P., and Roche, J. F. (2000). Effect of exogenous LH pulses on the fate of the first dominant follicle in postpartum beef cows nursing calves. *Journal of reproduction and fertility*, 118(1), 9-17.
- Eppig, J. J. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122(6), 829-838.
- Evans, A. C. O., Adams, G. P., and Rawlings, N. C. (1994). Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. *Journal of reproduction and fertility*, 100(1), 187-194,
- Fairclough, R. J., Moore, L. G., McGowan, L. T., Peterson, A. J., Smith, J. F., Tervit, H. R., and Watkins, W. B. (1980). Temporal relationship between plasma concentrations of 13, 14-dihydro-15-keto-prostaglandin F and neurophysin I/II around luteolysis in sheep. *Prostaglandins*, 20(2), 199-208.

- Farin, C. E., Moeller, C. L., Sawyer, H. R., Gamboni, F., and Niswender, G. D. (1986). Morphometric analysis of cell types in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. *Biology of reproduction*, 35(5), 1299-1308.
- Farnworth, P. G. (1995). Gonadotrophin secretion revisited. How many ways can FSH leave a gonadotroph?. *Journal of Endocrinology*, 145(3), 387-395.
- Ferguson, J. D. (1996). Diet, production and reproduction in dairy cows. *Animal feed science and technology*, 59(1), 173-184.
- Findlay, J. K., Drummond, A. E., Dyson, M. L., Baillie, A. J., Robertson, D. M., and Ethier, J. F. (2002). Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor- β superfamily. *Molecular and cellular endocrinology*, 191(1), 35-43.
- Folman, Y., Rosenberg, M., Herz, Z., and Davidson, M. (1973). The relationship between plasma progesterone concentration and conception in post-partum dairy cows maintained on two levels of nutrition. *Journal of reproduction and fertility*, 34(2), 267-278.
- Forde, N., Beltman, M. E., Lonergan, P., Diskin, M., Roche, J. F., and Crowe, M. A. (2011). Oestrous cycles in *Bos Taurus* cattle. *Animal reproduction science*, 124(3), 163-169.
- Fortune, J. E., and Quirk, S. M. (1988). Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. *Journal of Animal Science*, 66(Supplement 2), 1-8.
- Freile, D., y Añasco, G. (2011) Niveles de progesterona en vacas Holstein cíclicas y anéstricas en un ciclo estral. (Datos no publicados).
- Fricke, P. M., and Wiltbank, M. C. (1999). Effect of milk production on the incidence of double ovulation in dairy cows. *Theriogenology*, 52(7), 1133-1143.
- Gallmeier M. Efecto de la bST sobre la fertilidad de vacas lecheras de primer servicio sincronizadas por medio del protocolo Doublesynch (tesis de pregrado). Quito (Pichincha) Ecuador: Universidad San Francisco de Quito, 2013.
- Garrido, C., Saule, S., & Gospodarowicz, D. (1993). Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ovarian bovine granulosa cells. *Growth factors*, 8(2), 109-117.
- Geisert, R. D., Morgan, G. L., Short, E. C., and Zavy, M. T. (1992). Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. *Reproduction, fertility and development*, 4(3), 301-305.
- Ginther, O. J. (1974). Internal regulation of physiological processes through local venoarterial pathways: a review. *Journal of animal science*, 39(3), 550-564.

- Ginther, O. J. (1998). Ultrasonic imaging and animal reproduction: book 4, color-Doppler ultrasonography. *Cross Plains, WI: Equiservices Publishing*, p. 9-72.
- Ginther, O. J., Beg, M. A., Donadeu, F. X., and Bergfelt, D. R. (2003). Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Animal reproduction science*, 78(3), 239-257.
- Ginther, O. J., Bergfelt, D. R., Kulick, L. J., and Kot, K. (2000). Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. *Biology of reproduction*, 63(2), 383-389.
- Ginther, O. J., Knopf, L., and Kastelic, J. P. (1989). Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *Journal of Reproduction and Fertility*, 87(1), 223-230.
- Ginther, O. J., Shrestha, H. K., Fuenzalida, M. J., Shahiduzzaman, A. K. M., Hannan, M. A., and Beg, M. A. (2010). Intrapulse temporality between pulses of a metabolite of prostaglandin F 2 α and circulating concentrations of progesterone before, during, and after spontaneous luteolysis in heifers. *Theriogenology*, 74(7), 1179-1186.
- Ginther, O. J., Wiltbank, M. C., Fricke, P. M., Gibbons, J. R., and Kot, K. (1996a). Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of reproduction*, 55, 1187-1194.
- Ginther, O., Kot, K., Kulick, L. J., Martin, S., and Wiltbank, M. C. (1996b). Relationships between FSH and ovarian follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle. *Journal of reproduction and fertility*, 108(2), 271-279.
- Girsh, E., Wang, W., Mamluk, R., Arditi, F., Friedman, A., Milvae, R. A., and Meidan, R. I. N. A. (1996). Regulation of endothelin-1 expression in the bovine corpus luteum: elevation by prostaglandin F 2 alpha. *Endocrinology*, 137(12), 5191-5196.
- Glencross, R. G. (1984). A note on the concentrations of plasma oestradiol-17 β and progesterone around the time of puberty in heifers. *Animal Production*, 39(01), 137-140.
- Gonzalez-Heydrich, J., Steingard, R. J., Putnam, F., Beardslee, W., & Kohane, I. S. (1999). Using 'off the shelf', computer programs to mine additional insights from published data: diurnal variation in potency of ACTH stimulation of cortisol secretion revealed. *Computer methods and programs in biomedicine*, 58(3), 227-238.

- Gospodarowicz, D., Cheng, J., Lui, G. M., Baird, A., Esch, F., and Bohlen, P. (1985). Corpus Luteum Angiogenic Factor Is Related to Fibroblast Growth Factor*. *Endocrinology*, 117(6), 2383-2391.
- Graves, P. E., Pierce, K. L., Bailey, T. J., Rueda, B. R., Gil, D. W., Woodward, D. F., ... and Regan, J. W. (1995). Cloning of a receptor for prostaglandin F2 alpha from the ovine corpus luteum. *Endocrinology*, 136(8), 3430-3436.
- Grazul-Bilska, A. T., Redmer, D. A., Jablonka-Shariff, A., Biondini, M. E., and Reynolds, L. P. (1995). Proliferation and progesterone production of ovine luteal cells from several stages of the estrous cycle: effects of fibroblast growth factors and luteinizing hormone. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 73(4), 491-500.
- Grummer, R. R., and Carroll, D. J. (1988). A review of lipoprotein cholesterol metabolism: importance to ovarian function. *Journal of animal science*, 66(12), 3160-3173.
- Gustafsson, H., Larsson, K., Kindahl, H., and Madej, A. (1986). Sequential endocrine changes and behaviour during oestrus and metoestrus in repeat breeder and virgin heifers. *Animal Reproduction Science*, 10(4), 261-273.
- Gustafsson, U. and Emanuelsson, U. (2000) Has a repeat breeder cow in the present lactation a higher risk to become a repeat breeder in the next lactation? *Proceedings. 14th International Congress of Animal Reproduction*, 2, p. 100.
- Hanahan, D. (1997). Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science-New York Then Washington-*, 48-49.
- Hansel, W. (1966). Luteotrophic and luteolytic mechanisms in bovine corpora lutea. In *Journal of Reproduction and fertility*, 33-48.
- Hansel, W., and Asdell, S. A. (1952). The causes of bovine metestrous bleeding. *Journal of Animal Science*, 11(2), 346-354.
- Hanukoglu, I. (1992). Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 43(8), 779-804.
- Haughian, J. M., Sartori, R., Guenther, J. N., Gümen, A., and Wiltbank, M. C. (2002). Extending the postpartum anovulatory period in dairy cattle with estradiol cypionate. *Journal of dairy science*, 85(12), 3238-3249.
- Hayashi, K., and Miyamoto, A. (1999). Angiotensin II interacts with prostaglandin F2 α and endothelin-1 as a local luteolytic factor in the bovine corpus luteum in vitro. *Biology of reproduction*, 60(5), 1104-1109.

- Hiles, S. A., Baker, A. L., de Malmanche, T., and Attia, J. (2012). A meta-analysis of differences in IL-6 and IL-10 between people with and without depression: exploring the causes of heterogeneity. *Brain, behavior, and immunity*, 26(7), 1180-1188.
- Hillier, S. G. (1994). Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Human Reproduction*, 9(2), 188-191.
- Hixon, J. E., Pijanowski, G. J., Weston, P. G., Shanks, R. D., and Wagner, W. C. (1983). Evidence for an oscillator other than luteinizing hormone controlling the secretion of progesterone in cattle. *Biology of reproduction*, 29(5), 1155-1162.
- Homeida, A. M., and Al-Eknaah, M. M. (1992). Inhibition of luteal function by oxytocin antagonist in goats (*Capra hircus*). *Journal of reproduction and fertility*, 94(1), 279-285.
- Ing, N. H., and Tornesi, M. B. (1997). Estradiol up-regulates estrogen receptor and progesterone receptor gene expression in specific ovine uterine cells. *Biology of reproduction*, 56(5), 1205-1215.
- Ireland, J. J., and Roche, J. F. (1982). Development of Antral Follicles in Cattle after Prostaglandin-Induced Luteolysis: Changes in Serum Hormones, Steroids in Follicular Fluid, and Gonadotropin Receptors. *Endocrinology*, 111(6), 2077-2086.
- Isobe, N., Yoshimura, T., Yoshida, C., and Nakao, T. (2004). Incidence of silent ovulation in dairy cows during post partum period. *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 111(1), 35-38.
- Iwai, M., Kanzaki, H., Fujimoto, M., Kojima, K., Hatayama, H., Inoue, T., ... and Fujita, J. (1995). Regulation of sex steroid receptor gene expression by progesterone and testosterone in cultured human endometrial stromal cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 80(2), 450-454.
- Jablonka-Shariff, A., Grazul-Bilska, A. T., Redmer, D. A., and Reynolds, L. P. (1993). Growth and cellular proliferation of ovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Endocrinology*, 133(4), 1871-1879.
- Jaiswal, R. S., Singh, J., and Adams, G. P. (2004). Developmental pattern of small antral follicles in the bovine ovary. *Biology of reproduction*, 71(4), 1244-1251.
- Johnson, W. J., Phillips, M. C., and Rothblat, G. H. (1997). Lipoproteins and cellular cholesterol homeostasis. In *Cholesterol* (pp. 235-276). Springer US.
- Jones, L. S., Ottobre, J. S., and Pate, J. L. (1992). Progesterone regulation of luteinizing hormone receptors on cultured bovine luteal cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 85(1), 33-39.

- Juengel, J. L., Nett, T. M., Tandeski, T. R., Eckery, D. C., Sawyer, H. R., and Niswender, G. D. (1995). Effects of luteinizing hormone and growth hormone on luteal development in hypophysectomized ewes. *Endocrine*, 3(5), 323-326.
- Kakar, S. S., Rahe, C. H., and Neill, J. D. (1993). Molecular cloning, sequencing, and characterizing the bovine receptor for gonadotropin releasing hormone (GnRH). *Domestic animal endocrinology*, 10(4), 335-342.
- Kasa-Vubu, J., Dahl, G. E., Evans, N. P., Thrun, L. A., Moenter, S. M., Padmanabhan, V., and Karsch, F. J. (1992). Progesterone blocks the estradiol-induced gonadotropin discharge in the ewe by inhibiting the surge of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology*, 131(1), 208-212.
- Kimmins, S., and MacLaren, L. A. (2001). Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta*, 22(8), 742-748.
- Kimura, M., Nakao, T., Moriyoshi, M., and Kawata, K. (1987). Luteal phase deficiency as a possible cause of repeat breeding in dairy cows. *British Veterinary Journal*, 143(6), 560-566.
- Kindahl, H., Edqvist, L. E., Granström, E., and Bane, A. (1976). The release of prostaglandin F_{2α} as reflected by 15-keto-13, 14-dihydroprostaglandin F_{2α} in the peripheral circulation during normal luteolysis in heifers. *Prostaglandins*, 11(5), 871-878.
- Kinder, J. E., Day, M. L., and Kittok, R. J. (1986). Endocrine regulation of puberty in cows and ewes. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 34, 167-186.
- Kinsel, M. L., Marsh, W. E., Ruegg, P. L., and Etherington, W. G. (1998). Risk factors for twinning in dairy cows. *Journal of dairy science*, 81(4), 989-993.
- Knickerbocker, J. J., Wiltbank, M. C., and Niswender, G. D. (1988). Mechanisms of luteolysis in domestic livestock. *Domestic animal endocrinology*, 5(2), 91-107.
- Knight, P. G., and Glister, C. (2003). Local roles of TGF-β superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Animal reproduction science*, 78(3), 165-183.
- Knopf, L., Kastelic, J. P., Schallenberger, E., and Ginther, O. J. (1989). Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Domestic animal endocrinology*, 6(2), 111-119.
- Koos, R. D., and LeMaire, W. (1983). Evidence for an angiogenic factor from rat follicles. *Factors regulating ovarian function*, 191-195.
- Krisans, S. K. (1996). Cell Compartmentalization of Cholesterol Biosynthesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 804(1), 142-164.

- Kulick, L. J., Bergfelt, D. R., Kot, K., and Ginther, O. J. (2001). Follicle selection in cattle: follicle deviation and codominance within sequential waves. *Biology of reproduction*, 65(3), 839-846.
- Lafi, S. Q., and Kaneene, J. B. (1992). Epidemiological and economic study of the repeat breeder syndrome in Michigan dairy cattle. I. Epidemiological modeling. *Preventive Veterinary Medicine*, 14(1), 87-98.
- Lafi, S. Q., Kaneene, J. B., Black, J. R., and Lloyd, J. W. (1992). Epidemiological and economic study of the repeat breeder syndrome in Michigan dairy cattle. II. Economic modeling. *Preventive Veterinary Medicine*, 14(1), 99-114.
- Lamming, G. E., and Darwash, A. O. (1998). The use of milk progesterone profiles to characterize components of subfertility in milked dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 52(3), 175-190.
- Lamothe, P., Bousquet, D., and Guay, P. (1977). Cyclic variation of F prostaglandins in the uterine fluids of the cow. *Journal of reproduction and fertility*, 50(2), 381-382.
- Lawson, R. A. S., and Cahill, L. P. (1983). Modification of the embryo–maternal relationship in ewes by progesterone treatment early in the oestrous cycle. *Journal of reproduction and fertility*, 67(2), 473-475.
- Less, M., Wolfenson, D., Shaham-Albalancy, A., Roth, Z., and Meidan, R. (1998). Effects of LH surge patterns on progesterone secretion during development of the corpus luteum and in vitro luteinization of granulosa and theca cells in cows. In *Journal of Reproduction and Fertility Abstract Series* (Vol. 21, p. 33).
- Lestavel, S., and Fruchart, J. C. (1994). Lipoprotein receptors. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 40(4), 461-481.
- Levasseur, M. C. (1977). Thoughts on puberty. Initiation of the gonadotropic function. In *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique* (Vol. 17, No. 3A, pp. 345-361). EDP Sciences.
- Liebermann, J., and Schams, D. (1994). Actions of somatotrophin on oxytocin and progesterone release from the microdialysed bovine corpus luteum in vitro. *Journal of endocrinology*, 143(2), 243-250.
- Lin, D., Sugawara, T., Strauss, J., Clark, B. J., Stocco, D. M., Saenger, P., ... and Miller, W. L. (1995). Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science*, 267(5205), 1828-1831.
- Lopez, H., Satter, L. D., and Wiltbank, M. C. (2004). Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Animal reproduction science*, 81(3), 209-223.

- López-Gatius, F. (2003). Is fertility declining in dairy cattle?: a retrospective study in northeastern Spain. *Theriogenology*, *60*(1), 89-99.
- López-Gatius, F., López-Béjar, M., Fenech, M., and Hunter, R. H. F. (2005). Ovulation failure and double ovulation in dairy cattle: risk factors and effects. *Theriogenology*, *63*(5), 1298-1307.
- Lucy, M. C. (2000). Regulation of Ovarian Follicular Growth by Somatotropin and Insulin-Like Growth Factors in Cattle¹. *Journal of Dairy Science*, *83*(7), 1635-1647.
- Lucy, M. C. (2001). Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end?. *Journal of dairy science*, *84*(6), 1277-1293.
- Lucy, M. C., Savio, J. D., Badinga, L., De La Sota, R. L., and Thatcher, W. W. (1992). Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *Journal of animal science*, *70*(11), 3615-3626.
- Magnus, V. (1901). Ovariets betydning for svangerskabet med saerligt hensyn til corpus luteum. *Nor. Mag. Laegevidensk*, *62*, 1138-1145.
- Martin, T. L., Fogwell, R. L., and Ireland, J. J. (1991). Concentrations of inhibins and steroids in follicular fluid during development of dominant follicles in heifers. *Biology of reproduction*, *44*(4), 693-700.
- Matthews, J. N., Altman, D. G., Campbell, M. J., and Royston, P. (1990). Analysis of serial measurements in medical research. *Bmj*, *300*(6719), 230-235.
- McCracken, J. A., Custer, E. E., Lamsa, J. C., and Robinson, A. G. (1994). The central oxytocin pulse generator: a pacemaker for luteolysis. *Advances in experimental medicine and biology*, *395*, 133-154.
- McDougall, S., Burke, C. R., Macmillan, K. L., and Williamson, N. B. (1995). Patterns of follicular development during periods of anovulation in pasture-fed dairy cows after calving. *Research in veterinary science*, *58*(3), 212-216.
- McGuire, W. J., Juengel, J. L., and Niswender, G. D. (1994). Protein kinase C second messenger system mediates the antisteroidogenic effects of prostaglandin F₂ alpha in the ovine corpus luteum in vivo. *Biology of reproduction*, *51*(4), 800-806.
- McNatty, K. P. (1979). Follicular determinants of corpus luteum function in the human ovary. In *Ovarian Follicular and Corpus Luteum Function* (pp. 465-481). Springer US.
- Mihm, M., Austin, E. J., Good, T. E. M., Ireland, J. L. H., Knight, P. G., Roche, J. F., and Ireland, J. J. (2000). Identification of potential intrafollicular factors

- involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biology of reproduction*, 63(3), 811-819.
- Mihm, M., Baker, P. J., Ireland, J. L. H., Smith, G. W., Coussens, P. M., Evans, A. C. O., and Ireland, J. J. (2006). Molecular evidence that growth of dominant follicles involves a reduction in follicle-stimulating hormone dependence and an increase in luteinizing hormone dependence in cattle. *Biology of reproduction*, 74(6), 1051-1059.
- Mihm, M., Curran, N., Hyttel, P., Knight, P. G., Boland, M. P., and Roche, J. F. (1999). Effect of dominant follicle persistence on follicular fluid oestradiol and inhibin and on oocyte maturation in heifers. *Journal of reproduction and fertility*, 116(2), 293-304.
- Milvae, R. A., and Hansel, W. (1980). The effects of prostacyclin (PGI₂) and 6-keto-PGF₁ α on bovine plasma progesterone and LH concentrations. *Prostaglandins*, 20(4), 641-647.
- Milvae, R. A., and Hansel, W. (1983). Prostacyclin, prostaglandin F₂ alpha and progesterone production by bovine luteal cells during the estrous cycle. *Biology of reproduction*, 29(5), 1063-1068.
- Milvae, R. A., and Hansel, W. (1985). Inhibition of bovine luteal function by indomethacin. *Journal of animal science*, 60(2), 528-531.
- Miyamoto, A., Kobayashi, S., Arata, S., Ohtani, M., Fukui, Y., and Schams, D. (1997). Prostaglandin F₂ α promotes the inhibitory action of endothelin-1 on the bovine luteal function in vitro. *Journal of Endocrinology*, 152(2), R7-R11.
- Moenter, S. M., Brand, R. C., and Karsch, F. J. (1992). Dynamics of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion during the GnRH surge: insights into the mechanism of GnRH surge induction. *Endocrinology*, 130(5), 2978-2984.
- Morales-Roura, J. S., Zarco, L., Hernandez-Ceron, J., and Rodríguez, G. (2001). Effect of short-term treatment with bovine somatotropin at estrus on conception rate and luteal function of repeat-breeding dairy cows. *Theriogenology*, 55(9), 1831-1841.
- Moran, C. (1988). Effect of anabolic agents on reproduction and growth in heifers. In *M. An. Sc. Thesis*. National University of Ireland.
- Moran, C., Quirke, J. F., and Roche, J. F. (1989). Puberty in heifers: a review. *Animal Reproduction Science*, 18(1), 167-182.
- Moutsatsou, P., and Sekeris, C. E. (1997). Estrogen and progesterone receptors in the endometrium. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 816(1), 99-115.

- Neuvians, T. P., Schams, D., Berisha, B., and Pfaffl, M. W. (2004). Involvement of pro-inflammatory cytokines, mediators of inflammation, and basic fibroblast growth factor in prostaglandin F₂ α -induced luteolysis in bovine corpus luteum. *Biology of reproduction*, 70(2), 473-480.
- Nishizuka, Y. (1986). Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, 233(4761), 305-312.
- Niswender, G. D., and Nett, T. M. (1994). Corpus luteum and its control in infraprimates species. *The physiology of reproduction*, 1, 781-816.
- Niswender, G. D., Juengel, J. L., Silva, P. J., Rollyson, M. K., and McIntush, E. W. (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological reviews*, 80(1), 1-29.
- Nogueira, G. P. (2004). Puberty in south american bos indicus (Zebu) cattle. *Animal reproduction science*, 82, 361-372.
- Nyman, S., Johansson, K., de Koning, D. J., Berry, D. P., Veerkamp, R. F., Wall, E., and Berglund, B. (2014). Genetic analysis of atypical progesterone profiles in Holstein-Friesian cows from experimental research herds. *Journal of dairy science*, 97(11), 7230-7239.
- O'shea, J. D., Nightingale, M. G., and Chamley, W. A. (1977). Changes in small blood vessels during cyclical luteal regression in sheep. *Biology of reproduction*, 17(2), 162-177.
- Padykula, H. A., Coles, L. G., Okulicz, W. C., Rapaport, S. I., McCracken, J. A., King, N. W., ... and Kaiserman-Abramof, I. R. (1989). The basalis of the primate endometrium: a bifunctional germinal compartment. *Biology of reproduction*, 40(3), 681-690.
- Papadopoulos, V., and Brown, A. S. (1995). Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the polypeptide diazepam binding inhibitor in steroidogenesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 53(1), 103-110.
- Parr, R. A., Davis, I. F., Miles, M. A., and Squires, T. J. (1993a). Feed intake affects metabolic clearance rate of progesterone in sheep. *Research in Veterinary Science*, 55(3), 306-310.
- Parr, R. A., Davis, I. F., Miles, M. A., and Squires, T. J. (1993b). Liver blood flow and metabolic clearance rate of progesterone in sheep. *Research in Veterinary Science*, 55(3), 311-316.
- Pate, J. L. (1994). Cellular components involved in luteolysis. *Journal of animal science*, 72(7), 1884-1890.

- Pate, J. L., and Condon, W. A. (1982). Effects of serum and lipoproteins on steroidogenesis in cultured bovine luteal cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 28(3), 551-562.
- Pawson, A. J., and McNeilly, A. S. (2005). The pituitary effects of GnRH. *Animal reproduction science*, 88(1), 75-94.
- Penny, L. A., Armstrong, D., Bramley, T. A., Webb, R., Collins, R. A., and Watson, E. D. (1999). Immune cells and cytokine production in the bovine corpus luteum throughout the oestrous cycle and after induced luteolysis. *Journal of reproduction and fertility*, 115(1), 87-96.
- Pepper, M. S., Ferrara, N., Orci, L., and Montesano, R. (1991). Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 181(2), 902-906.
- Perez-Marin, C. (2009). Formation of corpora lutea and central luteal cavities and their relationship with plasma progesterone levels and other metabolic parameters in dairy cattle. *Reproduction in domestic animals*, 44(3), 384-389.
- Pérez-Marín, C. C., and España, F. (2007). Oestrus expression and ovarian function in repeat breeder cows, monitored by ultrasonography and progesterone assay. *Reproduction in domestic animals*, 42(5), 449-456.
- Pérez-Marín, C. C., Rodríguez, I., España, F. E., Dorado, J., Hidalgo, M., Corral, S. C., Sanz, J. S., (2004). Dinámica folicular ovárica en vacas repetidoras: estudio ecográfico y perfil de progesterona. *Archivos de zootecnia*, 53(201), 35-46.
- Peter, A. T., Levine, H., Drost, M., and Bergfelt, D. R. (2009). Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. *Theriogenology*, 71(9), 1343-1357.
- Peters, K. E., Bergfeld, E. G., Cupp, A. S., Kojima, F. N., Mariscal, V., Sanchez, T., ... and Kittok, R. J. (1994). Luteinizing hormone has a role in development of fully functional corpora lutea (CL) but is not required to maintain CL function in heifers. *Biology of reproduction*, 51(6), 1248-1254.
- Piper, P. J., Vane, J. R., and Wyllie, J. H. (1970). Inactivation of prostaglandins by the lungs. *Nature*, 225, 600-604.
- Pluess, A. R. (2013). Meta-analysis reveals microevolution in grassland plant species under contrasting management. *Biodiversity and conservation*, 22(10), 2375-2400.
- Prenant, A. (1898). La valeur morphologique du corps jaune. Son action physiologique et therapeutique possible. *Rev. Gen. Sci. Pure Appl.*, 9, 646-650.

- Pryce, J. E., Royal, M. D., Garnsworthy, P. C., and Mao, I. L. (2004). Fertility in the high-producing dairy cow. *Livestock Production Science*, 86(1), 125-135.
- Pursley, J. R., Wiltbank, M. C., Stevenson, J. S., Ottobre, J. S., Garverick, H. A., and Anderson, L. L. (1997). Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *Journal of Dairy Science*, 80(2), 295-300.
- Rabiee, A. R., Macmillan, K. L., and Schwarzenberger, F. (2001a). The effect of level of feed intake on progesterone clearance rate by measuring faecal progesterone metabolites in grazing dairy cows. *Animal reproduction science*, 67(3), 205-214.
- Rabiee, A. R., Macmillan, K. L., and Schwarzenberger, F. (2001b). Excretion rate of progesterone in milk and faeces in lactating dairy cows with two levels of milk yield. *Reproduction Nutrition Development*, 41(4), 309-319.
- Rahe, C. H., Owens, R. E., Fleeger, J. L., Newton, H. J., and Harms, P. G. (1980). Pattern of Plasma Luteinizing Hormone in the Cyclic Cow: Dependence upon the Period of the Cycle. *Endocrinology*, 107(2), 498-503.
- Rajamahendran, R., Ambrose, J. D., Schmitt, E. P., Thatcher, M. J., and Thatcher, W. W. (1998). Effects of buserelin injection and deslorelin (GnRH-agonist) implants on plasma progesterone, LH, accessory CL formation, follicle and corpus luteum dynamics in Holstein cows. *Theriogenology*, 50(7), 1141-1155.
- Ramirez, D. V., and McCann, S. M. (1963). Comparison of the regulation of luteinizing hormone (LH) secretion in immature and adult rats. *Endocrinology*, 72(3), 452-464.
- Redmer, D. A., and Reynolds, L. P. (1996). Angiogenesis in the ovary. *Reviews of Reproduction*, 1(3), 182-192.
- Revah, I., and Butler, W. R. (1996). Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *Journal of reproduction and fertility*, 106(1), 39-47.
- Reynolds, L. P., Grazul-Bilska, A. T., Killilea, S. D., and Redmer, D. A. (1994). Mitogenic factors of corpora lutea. *Progress in growth factor research*, 5(2), 159-175.
- Richards, J. S., Jahnsen, T., Hedin, L., Lifka, J., Ratoosh, S., Durica, J. M., and Goldring, N. B. (1986). Ovarian follicular development: from physiology to molecular biology. *Recent progress in hormone research*, 43, 231-276.
- Roche, J. F. (1996). Control and regulation of folliculogenesis--a symposium in perspective. *Reviews of reproduction*, 1(1), 19-27.

- Roche, J. F., Bolandl, M. P., and McGeady, T. A. (1981). Reproductive wastage following artificial insemination of heifers. *The Veterinary Record*, 109(18), 401-404.
- Roelofs, J. B., Van Eerdenburg, F. J. C. M., Soede, N. M., and Kemp, B. (2005). Various behavioral signs of estrous and their relationship with time of ovulation in dairy cattle. *Theriogenology*, 63(5), 1366-1377.
- Rohatgi, A. (2011). WebPlotDigitizer. URL <http://arohatgi.info/WebPlotDigitizer/app>.
- Ronchi, B., Stradaioli, G., Supplizi, A. V., Bernabucci, U., Lacetera, N., Accorsi, P. A., ... and Seren, E. (2001). Influence of heat stress or feed restriction on plasma progesterone, oestradiol-17 β , LH, FSH, prolactin and cortisol in Holstein heifers. *Livestock Production Science*, 68(2), 231-241.
- Rosenberg, M., Folman, Y., Herz, Z., Flamenbaum, I., Berman, A., & Kaim, M. (1982). Effect of climatic conditions on peripheral concentrations of LH, progesterone and oestradiol-17 β in high milk-yielding cows. *Journal of reproduction and fertility*, 66(1), 139-146.
- Rosenberg, M., Herz, Z., Davidson, M., and Folman, Y. (1977). Seasonal variations in post-partum plasma progesterone levels and conception in primiparous and multiparous dairy cows. *Journal of reproduction and fertility*, 51(2), 363-367.
- Roth, Z., Meidan, R., Braw-Tal, R., and Wolfenson, D. (2000). Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, 120(1), 83-90.
- Royal, M. D., Darwash, A. O., Flint, A. P. F., Webb, R., Woolliams, J. A., and Lamming, G. E. (2000). Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. *Animal science*, 70(3), 487-501.
- Rueda, B. R., Hendry, I. R., Hendry, W. J., Stormshak, F., Slayden, O. D., and Davis, J. S. (2000). Decreased progesterone levels and progesterone receptor antagonists promote apoptotic cell death in bovine luteal cells. *Biology of reproduction*, 62(2), 269-276.
- Rueda, B. R., Tilly, K. I., Botros, I. W., Jolly, P. D., Hansen, T. R., Hoyer, P. B., and Tilly, J. L. (1997). Increased bax and interleukin-1beta-converting enzyme messenger ribonucleic acid levels coincide with apoptosis in the bovine corpus luteum during structural regression. *Biology of reproduction*, 56(1), 186-193.
- Sangsitavong, S., Combs, D. K., Sartori, R., Armentano, L. E., and Wiltbank, M. C. (2002). High feed intake increases liver blood flow and metabolism of

- progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 85(11), 2831-2842.
- Santos, J. E. P., Huber, J. T., Theurer, C. B., Nussio, C. B., Nussio, L. G., Tarazon, M., and Fish, D. (2000). Effects of grain processing and bovine somatotropin on metabolism and ovarian activity of dairy cows during early lactation. *Journal of dairy science*, 83(5), 1004-1015.
- Santos, J. E. P., Thatcher, W. W., Chebel, R. C., Cerri, R. L. A., and Galvao, K. N. (2004). The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Animal Reproduction Science*, 82, 513-535.
- Sartori, R. G. J. M., Rosa, G. J. M., and Wiltbank, M. C. (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(11), 2813-2822.
- Sartori, R., Fricke, P. M., Ferreira, J. C., Ginther, O. J., and Wiltbank, M. C. (2001). Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biology of Reproduction*, 65(5), 1403-1409.
- Sartori, R., Haughian, J. M., Shaver, R. D., Rosa, G. J. M., & Wiltbank, M. C. (2004). Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *Journal of dairy science*, 87(4), 905-920.
- Savio, J. D., Boland, M. P., and Roche, J. F. (1990a). Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in post-partum dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, 88(2), 581-591.
- Savio, J. D., Boland, M. P., Hynes, N., and Roche, J. F. (1990). Resumption of follicular activity in the early post-partum period of dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, 88(2), 569-579.
- Savio, J. D., Keenan, L., Boland, M. P., and Roche, J. F. (1988). Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, 83(2), 663-671.
- Sawyer, H. R., Niswender, K. D., Braden, T. D., and Niswender, G. D. (1990). Nuclear changes in ovine luteal cells in response to PGF_{2 α} . *Domestic animal endocrinology*, 7(2), 229-237.
- Schally, A. V., Arimura, A., Kastin, A. J., Matsuo, H., Baba, Y., Redding, T. W., and White, W. F. (1971). Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science*, 173(4001), 1036-1038.
- Schams, D., and Berisha, B. (2004). Regulation of corpus luteum function in cattle—an overview. *Reproduction in domestic animals*, 39(4), 241-251.

- Schams, D., Kosmann, M., Berisha, B., Amselgruber, W. M., and Miyamoto, A. (2001). Stimulatory and synergistic effects of luteinising hormone and insulin like growth factor 1 on the secretion of vascular endothelial growth factor and progesterone of cultured bovine granulosa cells. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*, 109(03), 155-162.
- Schams, D., Schallenberger, E., Gombe, S., and Karg, H. (1980). Endocrine patterns associated with puberty in male and female cattle. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 30, 103-110.
- Schomberg, D. W., Coudert, S. P., and Short, R. V. (1967). Effects of bovine luteinizing hormone and human chorionic gonadotrophin on the bovine corpus luteum in vivo. *Journal of reproduction and fertility*, 14(2), 277-285.
- Shadish, W. R., Brasil, I. C., Illingworth, D. A., White, K. D., Galindo, R., Nagler, E. D., and Rindskopf, D. M. (2009). Using UnGraph to extract data from image files: Verification of reliability and validity. *Behavior Research Methods*, 41(1), 177-183.
- Shelton, K., De Abreu, M. G., Hunter, M. G., Parkinson, T. J., and Lamming, G. E. (1990). Luteal inadequacy during the early luteal phase of subfertile cows. *Journal of reproduction and fertility*, 90(1), 1-10.
- Shirasuna, K., Wijayagunawardane, M. P. B., Watanabe, S., Yamamoto, D., Matsui, M., Ohtani, M., and Miyamoto, A. (2004, January). A blood flow in the corpus luteum acutely increases together with endothelin-1 mRNA expression at early stage of regression during spontaneous luteolysis in the cow. In *Biology of Reproduction* (pp. 137-137). 1603 Monroe St, Madison, WI 53711-2021 USA: Soc Study Reproduction.
- Simpson, E. R., and Waterman, M. R. (1983). Regulation by ACTH of steroid hormone biosynthesis in the adrenal cortex. *Canadian journal of biochemistry and cell biology*, 61(7), 692-707.
- Sirois, J., and Fortune, J. E. (1988). Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biology of reproduction*, 39(2), 308-317.
- Skarzynski, D. J., and Okuda, K. (1999). Sensitivity of bovine corpora lutea to prostaglandin F_{2α} is dependent on progesterone, oxytocin, and prostaglandins. *Biology of reproduction*, 60(6), 1292-1298.
- Skarzynski, D. J., Jaroszewski, J. J., and Okuda, K. (2001). Luteotropic Mechanisms in the Bovine Corpus Luteum: Role of Oxytocin, Prostaglandin F_{2α}, Progesterone and Noradrenaline. *Journal of Reproduction and Development*, 47(3), 125-137.

- Skyer, D. M., Garverick, H. A., Youngquist, R. S., and Krause, G. F. (1987). Ovarian follicular populations and in vitro steroidogenesis on three different days of the bovine estrous cycle. *Journal of animal science*, 64(6), 1710-1716.
- Smith, M. F. (1986). Recent advances in corpus luteum physiology. *Journal of dairy science*, 69(3), 911-926.
- Smith, M. F., McIntush, E. W., and Smith, G. W. (1994). Mechanisms associated with corpus luteum development. *Journal of animal science*, 72(7), 1857-1872.
- Sorensen, M., Hansel, W., Hough, W., Armstrong, D., McEntee, K., and Bratton, R. (1959). Causes and Prevention of Reproductive Failures in Dairy Cattle. I. Influence of Underfeeding and Overfeeding on Growth and Development of Holstein Heifers. Cornell Expt. Sta., Bull., February 1959, Bulletin 936.
- Spell, A. R., Beal, W. E., Corah, L. R., and Lamb, G. C. (2001). Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*, 56(2), 287-297.
- Spencer, T. E., Sandra, O., and Wolf, E. (2008). Genes involved in conceptus–endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction*, 135(2), 165-179.
- SPSS, I. (2012). IBM SPSS statistics version 21. *Boston, Mass: International Business Machines Corp.*
- Stevens, V. L., Xu, T., and Lambeth, J. D. (1993). Cholesterol trafficking in steroidogenic cells. *European Journal of Biochemistry*, 216(2), 557-563.
- Stocco, D. M., and Clark, B. J. (1996). Regulation of the Acute Production of Steroids in Steroidogenic Cells. *Endocrine reviews*, 17(3), 221-244.
- Stone, D., and Hechter, O. (1954). Studies on ACTH action in perfused bovine adrenals: the site of action of ACTH in corticosteroidogenesis. *Archives of biochemistry and biophysics*, 51(2), 457-469.
- Sun, F. F., Chapman, J. P., and McGuire, J. C. (1977). Metabolism of prostaglandin endoperoxide in animal tissues. *Prostaglandins*, 14(6), 1055-1074.
- Sunderland, S. J., Crowe, M. A., Boland, M. P., Roche, J. F., and Ireland, J. J. (1994). Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, 101(3), 547-555.
- Tanaka, T., Arai, M., Ohtani, S., Uemura, S., Kuroiwa, T., Kim, S., and Kamomae, H. (2008). Influence of parity on follicular dynamics and resumption of ovarian cycle in postpartum dairy cows. *Animal reproduction science*, 108(1), 134-143.

- Taylor, C., and Rajamahendran, R. (1991). Follicular dynamics, corpus luteum growth and regression in lactating dairy cattle. *Canadian journal of animal science*, 71(1), 61-68.
- Tezuka, N., Ali, M., Chwalisz, K., and Garfield, R. (1995). Changes in transcripts encoding calcium channel subunits of rat myometrium during pregnancy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 38(4), 1008.
- Tian, X. C., Berndtson, A. K., and Fortune, J. E. (1995). Differentiation of bovine preovulatory follicles during the follicular phase is associated with increases in messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 side-chain cleavage, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and P450 17 alpha-hydroxylase, but not P450 aromatase. *Endocrinology*, 136(11), 5102-5110.
- Townson, D. H., Tsang, P. C. W., Butler, W. R., Frajblat, M., Griel, L. C., Johnson, C. J., ... and Pate, J. L. (2002). Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. *Journal of animal science*, 80(4), 1053-1058.
- Trzeciak, W. H., and Boyd, G. S. (1974). Activation of cholesteryl esterase in bovine adrenal cortex. *European Journal of Biochemistry*, 46(1), 201-207.
- Tsai, S. J., and Wiltbank, M. C. (1997). Prostaglandin F2alpha induces expression of prostaglandin G/H synthase-2 in the ovine corpus luteum: a potential positive feedback loop during luteolysis. *Biology of reproduction*, 57(5), 1016-1022.
- Tummers, B. (2006). DataThief III. *Shareware Software DataThief III*. Available online: <http://datathief.org/> (accessed on 26 December 2009).
- Vailes, L. D., Washburn, S. P., and Britt, J. H. (1992). Effects of various steroid milieus or physiological states on sexual behavior of Holstein cows. *Journal of animal science*, 70(7), 2094-2103.
- Vasconcelos, J. L. M., Sartori, R., Oliveira, H. N., Guenther, J. G., and Wiltbank, M. C. (2001). Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*, 56(2), 307-314.
- Vasconcelos, J. L. M., Silcox, R. W., Rosa, G. J. M., Pursley, J. R., and Wiltbank, M. C. (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(6), 1067-1078.
- Voss, A. K., and Fortune, J. E. (1993). Levels of messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and P450 aromatase in preovulatory bovine follicles decrease after the luteinizing hormone surge. *Endocrinology*, 132(5), 2239-2245.
- Walsh, S. W., Mehta, J. P., McGettigan, P. A., Browne, J. A., Forde, N., Alibrahim, R. M., ... and Evans, A. C. (2012). Effect of the metabolic environment at key

- stages of follicle development in cattle: focus on steroid biosynthesis. *Physiological genomics*, 44(9), 504-517.
- Walsh, S. W., Williams, E. J., and Evans, A. C. O. (2011). A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal reproduction science*, 123(3), 127-138.
- Walters, D. L., Schams, D., and Schallenberger, E. (1984). Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the luteal phase of the oestrous cycle in the cow. *Journal of reproduction and fertility*, 71(2), 479-491.
- Washburn, S. P., Silvia, W. J., Brown, C. H., McDaniel, B. T., and McAllister, A. J. (2002). Trends in reproductive performance in southeastern Holstein and Jersey DHI herds. *Journal of Dairy Science*, 85(1), 244-251.
- Webb, R., Garnsworthy, P. C., Gong, J. G., and Armstrong, D. G. (2004). Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences^{1, 2}. *Journal of Animal Science*, 82, E63-74.
- Weck, J., Fallest, P. C., Pitt, L. K., and Shupnik, M. A. (1998). Differential gonadotropin-releasing hormone stimulation of rat luteinizing hormone subunit gene transcription by calcium influx and mitogen-activated protein kinase-signaling pathways. *Molecular Endocrinology*, 12(3), 451-457.
- Wettemann, R. P., Hafs, H. D., Edgerton, L. A., and Swanson, L. V. (1972). Estradiol and progesterone in blood serum during the bovine estrous cycle. *Journal of animal science*, 34(6), 1020-1024.
- Wilson, S. J., Marion, R. S., Spain, J. N., Spiers, D. E., Keisler, D. H., and Lucy, M. C. (1998). Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 81(8), 2124-2131.
- Wiltbank, M. C., Belfiore, C. J., and Niswender, G. D. (1993). Steroidogenic enzyme activity after acute activation of protein kinase (PK) A and PKC in ovine small and large luteal cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 97(1), 1-7.
- Wiltbank, M. C., Dysko, R. C., Gallagher, K. P., and Keyes, P. L. (1988). Relationship between blood flow and steroidogenesis in the rabbit corpus luteum. *Journal of reproduction and fertility*, 84(2), 513-520.
- Wiltbank, M. C., Gümen, A., and Sartori, R. (2002). Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology*, 57(1), 21-52.
- Wiltbank, M., Lopez, H., Sartori, R., Sangsritavong, S., and Gümen, A. (2006). Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*, 65(1), 17-29.

- Wolfenson, D., Inbar, G., Roth, Z., Kaim, M., Bloch, A., and Braw-Tal, R. (2004). Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology*, 62(6), 1042-1055.
- Xu, Garverick, H. A., Smith, G. W., Smith, M. F., Hamilton, S. A., and Youngquist, R. S. (1995a). Expression of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P450 side-chain cleavage, cytochrome p450 17 alpha-hydroxylase, and cytochrome P450 aromatase in bovine follicles during the first follicular wave. *Endocrinology*, 136(3), 981-989.
- Xu, Z., Garverick, H. A., Smith, G. W., Smith, M. F., Hamilton, S. A., and Youngquist, R. S. (1995b). Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biology of reproduction*, 53(4), 951-957.
- Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J., and Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407(6801), 242-248.
- Zambrano, A., Avila, O. y Albi, E. (1982). La repetición de servicio de IA en el ganado vacuno y su repercusión económica. Conf. ISCAB, Cuba.

Apéndices

Apéndice 1.Referencias utilizadas para digitalización de perfiles de P₄

Cuadro de Referencias a digitalizar

N	Año	Autor	Raza	Estado Reproductivo	n	N. Ciclos estudiados	Test	N. ondas foliculares	Días postparto	Lugar
1	2004	Sartori et al. (2004)	Holstein-Friesian	Vaquillas	27	27	ELISA	2	-	EE.UU.
2	2004	Sartori et al. (2004)	Holstein-Friesian	Vaquillas	9	9	ELISA	3	-	EE.UU.
3	1987	Sirois y Fortune (1988)	Holstein-Friesian	Vaquillas	10	10	RIA	2	-	EE.UU.
4	2004	Wolfenson et al. (2004)	Holstein-Friesian	Vaquillas	20	20	RIA	2	-	Israel
5	2008	Balendran et al. (2008)	Holstein-Friesian	Vaquillas	9	9	RIA	-	-	Canadá
6	2002	Båge et al. (2002)	Swedish red/White breed	Vaquillas	6	34	Inmunoensayo	2 y 3	-	Suecia
7	1977	Rosenberg et al. 1977	Holstein-Friesian	Primíparas	9	14	RIA	-	80	Israel
8	1977	Rosenberg et al. 1977	Holstein-Friesian	Primíparas	7	12	RIA	-	80	Israel
9	1982	Rosenberg et al. 1982	Holstein-Friesian	Primíparas	29	29	RIA	-	80	Israel
10	2004	Sartori et al. (2004)	Holstein-Friesian	Multíparas	11	14	ELISA	2	55,9 ± 3,5	EE.UU.
11	2004	Wolfenson et al. (2004)	Holstein-Friesian	Multíparas	19	19	RIA	2 y 3	77 ± 7	Israel
12	2012	Cummins et al. (2012)	Holstein-Friesian	Multíparas	19	19	RIA	2 y 3	95	Irlanda
13	1977	Rosenberg et al. (1977)	Holstein-Friesian	Multíparas	10	14	RIA	-	75	Israel
14	1990	Savio et al. (1990)	Holstein-Friesian	Multíparas	18	18	RIA	-	41	Irlanda
15	1982	Rosenberg et al. (1982)	Holstein-Friesian	Multíparas	33	33	RIA	-	40	Israel
16	2007	Pérez-Marín y España (2007)	Holstein-Friesian	Repetidoras	5	8	RIA	-	113 ± 37	España
17	2000	Morales-Roura et al. (2001)*	Holstein-Friesian	Repetidoras	6	6	RIA	-	221 ± 6,6	México

*En Morales-Roura et al. (2001) investigan el efecto del tratamiento con bST en vacas repetidoras. En este caso, se tomó en cuenta únicamente los perfiles de animales control (no recibieron tratamiento).

Apéndice 2. Análisis de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk en la información publicada

Prueba de Normalidad con Shapiro-Wilk en Info. Publicada

Parámetro	Estadístico	G.I.	Significancia
AUC	0,956	31	0,229
Diámetro folicular máximo	0,957	19	0,523
Volumen Luteal máximo	0,936	20	0,203
Concentración máxima de P4	0,945	31	0,116

Apéndice 3. Análisis de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk en los animales de la presente investigación.

Prueba de Normalidad con Shapiro-Wilk en la presente investigación

Parámetro	Estadístico	G.I.	Significancia
AUC	0,931	12	0,39
Diámetro folicular máximo	0,964	12	0,834
Volumen Luteal máximo	0,96	12	0,779
Concentración máximo de P4	0,834	12	0,023

Apéndice 4. Concentraciones de P₄ (ng/ml) durante el ciclo estral de vaquillas. Datos extraídos digitalmente de información publicada. Cálculo de la concentración máxima de P₄ durante el ciclo y área bajo la curva AUC en cada publicación (media y desviación estándar).

Concentraciones de P₄ (ng/ml) durante el ciclo estral de vaquillas (datos extraídos digitalmente)
Publicaciones

Fig. (pág.) Día	Bâge et al. (2002)* 1 (2262)	Sartori et al. (2004) 1A (907)	Wolfenson et al. (2004) 3 (1048)	Sartori et al. (2004) 1B (907)	Sartori et al. (2004) 1C (907)	Balendran et al. (2008) 2 (427)	Sirois y Fortune (1988) 1A (310)	Sirois y Fortune (1988) 1B (310)
0	0,15578					0,10471		
0,5								
1	0,05608	0,43634		0,40451			0,18473	
1,5							0,1139	
2	0,20563	0,29423	0,41990	0,15573	0,173	0,25829	0,11811	
2,5							0,17017	
3	0,64804	0,5034	1,27566	0,50229	0,47847		0,15583	0,21635
3,5							0,1414	0,50481
4	1,32724	0,97276	2,28911	0,94577	0,85314	1,02618	0,16509	0,75962
4,5							0,17446	0,99519
5	2,42392	1,91048	3,71558	1,47232	1,72628		0,10321	1,05288
5,5							0,17433	1,8125
6	2,87256	1,91149	4,34606	2,70498	2,50247	2,89005	0,24526	2,14423
6,5							0,33052	2,35577
7	3,86954	2,30278	6,27566	5,83442	2,84947		0,59123	2,59135
7,5							1,04159	2,79808
8	4,13748	2,51194	6,26783	4,75492	3,73643	3,89529	1,21696	3,34135
8,5							1,10302	3,74038
9	5,07839	3,44967	7,70181	5,47532	4,94199		1,34959	3,39423
9,5							1,80066	4,77885
10	4,91014	4,40039	7,55881	5,46191	4,61041	4,64921	2,15564	3,25962
10,5							4,22329	4,62981
11	5,89467	4,01111	9,04537	5,86385	4,12669		3,57345	3,83172
11,5							2,62008	5,33654
12	5,49587	5,31311	10,04380	8,31488	6,1767	5,17976	2,85235	4,53846
12,5							4,66388	6,07692
13	6,10653	3,89601	8,92459	5,71242	4,57147		4,46458	5,30769
13,5							3,50173	5,81731
14	6,06291	6,39495	9,29224	6,10052	3,96316	4,97033	3,20759	4,90865
14,5							3,60585	5,71635
15	5,86351	3,80695	7,39956	5,81021	3,90864		4,02784	4,75481
15,5							4,30753	6,08173
16	4,69206	6,12373	7,30163	6,26753	5,1002	5,84293	4,14142	4,59615
16,5							5,08034	5,62981
17	4,53628	2,24775	5,04849	7,63864	5,76563		5,57345	4,625
17,5							4,7339	2,03365
18	1,83196	0,46637	4,63517	6,07457	7,13718	5,43106	5,25548	1,12019
18,5							5,3265	0,875
19	0,72281	0,22017	2,25438	4,62124	5,91967		4,15972	0,62019
19,5							4,39673	0,3125
20	0,56081	0,5074	0,57947	8,4845	6,65436	4,60733	2,70353	0,16827
20,5							0,99609	
21	0,26794		0,08354	7,51576	6,41983		0,49329	
21,5							0,31774	
22	0,19316			2,2135	6,40686			
22,5								
23				0,46944	3,07098			
23,5								
24				0,2345	0,30298			
24,5								
25					0,26234			
Valor máximo P₄	6,10653	6,39495	10,0438	8,4845	7,13718	5,84293	5,57345	6,08173
Media val. máx.	6,95813							
D. estándar	1,55171							
AUC	67,7236	51,2252	104,212382	96,15616	72,9982	78,318775	47,65511	55,26683
Media AUC	71,6945							
D. estándar	20,6463							

*En Bâge et al. (2002) los datos se encuentran expresados en nmol/L y fueron transformados a ng/ml.

Apéndice 5. Concentraciones de P₄ (ng/ml) durante el ciclo estral de primíparas. Datos extraídos digitalmente de información publicada. Cálculo de la concentración máxima de P₄ durante el ciclo y área bajo la curva AUC en cada publicación (media y desviación estándar).

Concentraciones de P₄ (ng/ml) durante el ciclo estral de primíparas (datos extraídos digitalmente)

Fig. Símbolo (pág.)	Rosenberg et al. (1977) 1b (365)	Rosenberg et al. (1977) 1b (365)	Rosenberg et al. (1982) 1 O (142)	Rosenberg et al. (1982) 1 • (142)	Rosenberg et al. (1982) 1 Δ (142)
Día					
0					
1			0,10372	0,15494	0,14062
2					
3			0,31403	0,15397	0,58504
4	0,63778	0,56			
5			1,21822	0,64349	0,61273
6					
7			2,1244	1,61541	1,81036
8	1,42	0,66222			
9			3,03267	2,81307	2,51748
10					
11			4,3289	3,904	3,19793
12	4,06667	1,95556			
13			4,8328	4,30941	3,29747
14					
15			4,96719	4,96719	3,21165
16	5,44667	3,07111			
17			4,71492	4,49959	3,70386
18					
19			4,10993	3,11731	3,29573
20	5,19333	4,00667			
21			1,9032	2,40361	1,6653
22					
23			0,22354	0,22354	0,28917
24	0,66222	0,57778			
Valor máximo P₄	5,44667	4,00667	4,96719	4,96719	3,70386
Media val. máx.	4,618316				
D. estándar	0,731426191				
AUC	67,10668	41,0578	63,41978	57,23258	48,22489
Media AUC	55,408346				
D. estándar	10,74595428				

Apéndice 7. Concentraciones de P₄ (ng/ml) durante el ciclo estral de repetidoras. Datos extraídos digitalmente de información publicada. Cálculo de la concentración máxima de P₄ durante el ciclo y área bajo la curva AUC en cada publicación (media y desviación estándar).

Concentraciones de P₄ (ng/ml) durante el ciclo estral de repetidoras (datos extraídos digitalmente)

	Pérez-Marín y España (2007)	Morales-Roura (2001)	Morales-Roura (2001)				
Fig. Símbolo (pág.)	1• (451)	1■ (451)	20(451)	20(451)	20(451)	Tabla 4 (media)	Tabla 4 (media + D.E)
Día							
0	0,13357	0,27875	0,13325	0,17027	0,42566	0,23	0,71
3						0,87	1,35
4	0,19578	1,0146	0,5145	0,5108	0,88834		
6						2,35	2,83
8	0,93164	3,19064	2,15423	1,80999	2,16903		
9						3,16	3,64
12	3,43869	3,75809	2,3356	2,69833	2,55398	2,95	3,43
15						3,94	4,42
16	4,58686	3,9771	2,54287	3,05737	1,61382		
18						3,46	3,99
20	4,22515	0,56081	2,50586	0,33683	2,095		
24	0,14103	0,15845	3,08328	0,28871	0,5108		
28	0,5633	1,44599	0,14436	1,26589	0,28871		
Valor máximo P₄	4,58686	3,9771	3,08328	3,05737	2,55398	3,94	4,42
Media val. máx.	3,659798571						
D. estándar	0,767536177						
AUC	55,47034	54,08824	53,10058	37,68044	40,75262	45,345	54,06
Media AUC	48,64246						
D. estándar	7,289144198						

Apéndice 8. Valores referenciales de diámetro máximo del folículo dominante ovulatorio (mm)

Diámetro máximo del folículo dominante ovulatorio (mm) en la literatura

Referencia	Estado reproductivo	N	Diámetro máximo del folículo dominante ovulatorio (mm)	Rótulo (pág.)
Båge et al. (2002)	Vaquillas	19	15,4	Tabla 2 (pág. 2262)
Sartori et al. (2004)	Vaquillas	53	15,2	Tabla 3 (pág. 913)
Sirois y Fortune (1988)	Vaquillas	7	14	Tabla 1 (pág. 314)
Wolfenson et al. (2004)	Vaquillas	24	13,3	Tabla 1 (pág. 1046)
Ginther et al. (1989)	Vaquillas	20	16,9*	Tabla 1 (pág. 225)
Ginther et al. (1989)	Vaquillas	4	14,3*	Tabla 1 (pág. 225)
Knopf et al. (1989)	Vaquillas	10	16,6*	Abstract (pág. 111)
Tanaka et al. (2008)	Primíparas	6	17,2	Tabla 1 (pág. 139)
Sartori et al. (2004)	Multíparas	23	17,7	Tabla 3 (pág. 913)
Wolfenson et al. (2004)	Multíparas	24	17	Tabla 1 (pág. 1046)
Cummins et al. (2012)	Multíparas	19	17,9	Abstract (pág. 3698)
Cummins et al. (2012)	Multíparas	12	16,8	Abstract (pág. 3698)
Savio et al. (1990)	Multíparas	7	18,5*	Tabla 3 (pág. 586)
Savio et al. (1990)	Multíparas	6	18,4*	Tabla 3 (pág. 586)
Tanaka et al. (2008)	Multíparas	4	19,3	Tabla 1 (pág. 139)
Tanaka et al. (2008)	Multíparas	6	22,3	Tabla 1 (pág. 139)
Båge et al. (2002)	Repetidoras	7	17	Tabla 2 (pág. 2262)
Pérez-Marín et al. (2004)	Repetidoras	13	19*	Tabla 2 (pág. 38)
Pérez-Marín et al. (2004)	Repetidoras	3	17,3*	Tabla 3 (pág. 39)

*Media + D.E.

Apéndice 9. Valores referenciales de volumen luteal máximo (mm³) durante el ciclo estral e la literatura

Referencia	Estado reproductivo	N	Volumen luteal máximo alcanzado durante el ciclo (mm ³)	Rótulo (pág.)
Sartori et al. (2004)	Vaquillas	27	7611	Tabla 3 (pág. 913)
Wiltbank et al. (2006)	Vaquillas		7611*	Tabla 1 (pág. 23)
Wiltbank et al. (2006)	Vaquillas	27	7303	Tabla 1 (pág. 23)
Wiltbank et al. (2006)	Vaquillas		6995**	Tabla 1 (pág. 23)
Sartori et al. (2002)	Vaquillas	28	5515,2	Abstract (2813)
Sartori et al. (2004)	Múltiparas	12	12024*	Tabla 3 (pág. 913)
Cummins et al. (2012)	Múltiparas	19	10300	Fig. 3a (pág. 3703)
Cummins et al. (2012)	Múltiparas	11	8800	Fig. 3a (pág. 3703)
Lopez et al. (2005)	Múltiparas		8291	Abstract (pág. 2783)
Lopez et al. (2005)	Múltiparas	15	5198	Tabla 1 (pág. 2790)
Lopez et al. (2005)	Múltiparas		12370	Tabla 1 (pág. 2790)
Lopez et al. (2005)	Múltiparas		6563*	Tabla 1 (pág. 2790)
Lopez et al. (2005)	Múltiparas	71	8181	Tabla 1 (pág. 2790)
Lopez et al. (2005)	Múltiparas		6405	Tabla 1 (pág. 2790)
Lopez et al. (2005)	Múltiparas		8807*	Tabla 1 (pág. 2790)
Wiltbank et al. (2006)	Múltiparas		11120	Tabla 1 (pág. 23)
Wiltbank et al. (2006)	Múltiparas	14	11798*	Tabla 1 (pág. 23)
Wiltbank et al. (2006)	Múltiparas		10442**	Tabla 1 (pág. 23)
Sartori et al. (2002)	Múltiparas	27	7599	Abstract (pág. 2813)
Sartori et al. (2002)	Múltiparas	27	7293	Abstract (pág. 2813)

*Media + D.E

**Media - D.E.