

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Ciencias de la Salud

**Efecto de la bST sobre la fertilidad de vacas lecheras de primer
servicio sincronizadas por medio del protocolo Doublesynch**

Michelle Daniela Gallmeier Jaramillo

**Ramiro Diaz B., DMVZ.Msc.,
Director de Tesis**

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

Quito, junio de 2013

Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias de la Salud

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

**Efecto de la bST sobre la fertilidad de vacas lecheras de primer
servicio sincronizadas por medio del protocolo Doublesynch**

Ramiro Díaz B, M.Sc
Director de Tesis

Luz María Granados, M.Sc
Miembro del Comité de Tesis

Juan Carlos Cerón, M.Sc
Miembro del Comité de Tesis

Lenin Vinueza M.Sc
Miembro del Comité de Tesis

Juan Vargas M.Sc
Miembro del Comité de Tesis

Luis Donoso M.Sc
Decano del Colegio de Veterinaria

Quito, junio de 2013

© 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: Michelle Daniela Gallmeier Jaramillo

C. I.: 0201232907

Quito, junio de 2013

DEDICATORIA

A mis padres por alentarme día a día con su amor y apoyo incondicional.

A mis hermanos Gabriela y Max por ser esas personas capaces de calmar en los momentos de angustia.

A mi sobrino por ser la luz más brillante en mi vida.

A Miguel Eduardo, por su apoyo incondicional, cariño y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por todo.

A la Universidad San Francisco de Quito, por haberme acogido en su institución.

A mi tutor Dr. Ramiro Díaz por su infinita paciencia.

Al Dr. Fernando Salas por haber confiado en mí y haberme apoyado en la realización de esta tesis.

A Luz, por su apoyo, ayuda y motivación siempre.

A Sra. Carmen Pallares, por haberme acogido con tanto cariño en su hacienda y haber podido realizar la parte práctica de esta tesis.

A la Dra. Gabriela Chaves por su apoyo en la parte de laboratorio.

A Dr. Lenin Vinueza por su paciencia e invaluable apoyo en la realización de los análisis estadísticos de esta tesis.

A mis padres, por confiar.

A mi Miguel Eduardo, por acompañarme incondicionalmente.

A todas y cada una de las personas que indirectamente siempre estuvieron alentándome a seguir adelante.

Resumen.

En este estudio se evaluó la tasa de preñez en vacas de primer servicio, las que fueron tratadas con la hormona somatotropina bovina (bST), al momento de la inseminación artificial (IA); sincronizadas con el protocolo de Doublesynch, el cual fue comparado con el protocolo de sincronización Presynch-Ovsynch. Este estudio experimental usó 40 vacas lecheras en primer servicio, es decir, de 30 y 40 días post parto en dos hatos lecheros en la provincia de Pichincha - Ecuador. El experimento se dividió en cuatro grupos. Grupo I (Doublesynch mas bST) ;Grupo II (Doublesynch sin bST) (n=10);Grupo III (Presynch-Ovsynch mas bST) (n=10), Grupo IV (Presynch Ovsynch sin bST) (n=10) Las muestras de sangre de todos los grupos se tomaron al inicio del tratamiento, al momento de la inseminación, 7 días después y 14 días después de la inseminación. El análisis estadístico se realizó comparando la tasa de preñez entre grupos, mediante la prueba de Chi cuadrada (X^2) $P= 0,7$ lo cual demostró que no existen diferencias significativas en las tasas de preñez entre los grupos I, II, III, IV. Las concentraciones de progesterona se compararon mediante el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Fisher donde se determinó un $p=0,027$. En los Grupos III y IV su $p=0,035$ por lo cual también existe una diferencia significativa entre las concentraciones de progesterona. Los Grupos I y IV se encontró valores de $p=0,263$ los Grupos II y IV $p=0,454$ y los Grupos I y III $p=0,18$ lo cual muestra que no existe diferencia significativa en cuanto a sus niveles de progesterona durante la toma de la última muestra. El valor obtenido al contrastar las muestras por grupos es de $P=0,85$, lo que significa que los grupos se comportaron de manera muy semejante. La administración de una dosis de 500mg de hormona de somatotropina bovina (bST), al momento de la inseminación no mejor la fertilidad en vacas lecheras de primer servicio sincronizadas con un protocolo Doublesynch y tampoco se encontró un incremento en la tasa de preñez con bST al momento de la IA en vacas de primer servicio.

Abstract

In this study, the pregnancy rate of Doublesynch and Presynch-Ovsynch synchronization protocols, using bovine somatotropin hormone (bST), was compared at artificial insemination (AI) time, using first service cows. This study utilized 4 first service dairy cows, or at 3 to 4 days post-partum, in two dairy herds in the province of Pichincha - Ecuador. The experiment was divided into four groups. Group I Doublesynch plus bST (n=10); Group II Doublesynch without bST (n = 10); Group III Presynch-Ovsynch plus bST (n = 10); and Group IV Presynch-Ovsynch without bST (n = 10). Blood samples of all groups were taken at the beginning of treatment, at the time of insemination, 7 and 14 days after insemination. Statistical analysis was performed by comparing the pregnancy rate between groups using the chi-square test (χ^2) $P = 0.79$, which showed no significant differences in pregnancy rates between groups I, II, III, and IV. Progesterone concentrations were compared by analysis of variance (ANOVA) and Fisher test, which determined a $p = 0.027$. In Groups III and IV, the $p = 0.035$, for which has shown significant difference between the concentrations of progesterone. In Groups I and IV, $p = 0.263$, in Groups II and IV, $p = 0.454$ and Groups I and III, $p = 0.18$, showing no significant difference in their progesterone levels at the time the last sample was taken. The value obtained by comparing the samples in groups is $P = 0.85$, meaning that the groups behaved similarly. The administration of 500mg of bovine growth hormone (bST), at the time of insemination, did not improve fertility using Doublesynch protocol and also did not found an increase in pregnancy rate using bST at the time of AI in first service dairy cows.

Contents

Resumen.	7
Abstract	8
I. INTRODUCCION.	11
II. REVISION DE LITERATURA.	13
1. Hormonas relacionadas con la fertilidad.	13
1.1.1. Progesterona P4	14
1.1.2. Biosíntesis de la Progesterona.	14
1.1.3. Secreción y regulación de la Progesterona.	15
1.1.4. Mecanismo de acción de la Progesterona.	15
1.2. Hormona bovina de crecimiento (bST).	16
1.2.1. Biosíntesis de la bST	16
1.2.2. Secreción y regulación de la bST.	17
1.2.3. Efectos de la bST en fertilidad en vacas lecheras.	17
1.3. Hormona liberadora de Gonadotropinas (GnRH).	17
1.3.1. Biosíntesis de la GnRH	18
1.3.2. Secreción y regulación de la GnRH.	18
1.3.3. Mecanismo de acción de GnRH.	19
1.4. Hormona PGF2α.	20
1.4.1. Biosíntesis de la PGF2α.	21
1.4.2. Secreción y regulación de la PGF2α.	22
1.4.3. Mecanismo de acción de PGF2α.	22
2. Protocolos.	23
2.1. Ovsynch.	23
2.2. Presynch	24
2.3. Doublesynch	25
3. Reinicio de la actividad ovárica de vacas de primer servicio.	26
III. HIPOTESIS	26
IV. OBJETIVOS.	27
V. METODOLOGIA	27
5.1. Animales.	27
5.2. Haciendas	31
5.3. Análisis Estadístico.	32
VI. RESULTADOS.	32

VII. DISCUSION.....	36
VIII. CONCLUSIONES	39
IX. LITERATURA CITADA.....	40
X. ANEXOS.	49

I. INTRODUCCION.

La falla en la concepción o infertilidad es el problema reproductivo más importante en los hatos lecheros. Desde hace unos 40 años, se asocia la baja fertilidad, al aumento en el número de vacas en los hatos (Butler, 2000; Hernández y Morales, 2001), al balance energético negativo (Villa Godoy *et al.*, 1988) y la alta incidencia de la muerte embrionaria temprana (Lazarri *et al.*, 2011).

En hatos con un gran número de vacas; éste incremento de infertilidad conlleva a problemas asociados con el manejo, como es la baja detección de estros (Hernández CJ, *et al.*, 2007). Un estudio realizado por Ducrot *et al.*, (1999) en hatos de gran tamaño en Francia señalan que un 44% de vacas que se encuentran en celo, pasan desapercibidas y que un 11% de animales en anestro es considerado en estro. Dichas fallas están directamente relacionadas con un incremento en los siguientes parámetros reproductivos: el intervalo parto concepción, índice coital y tasas de descarte por infertilidad.

El balance energético negativo (BEN) es otra causa importante de la infertilidad en hatos lecheros (Villa Godoy *et al.*, 1988), ya que afecta el control neuroendocrino de la reproducción (Roche *et al.*, 2000). De esta forma se ha asociado con un retraso en la primera ovulación y con una disminución de las concentraciones séricas de progesterona en el segundo y tercer ciclo posparto. Por otra parte, también afecta el desarrollo folicular y el potencial desarrollo de los ovocitos para desarrollar embriones viables, lo que puede afectar la supervivencia embrionaria más tarde. (Villa-Godoy *et al.*, 1988; Butler, 2000).

La alta incidencia de muerte embrionaria temprana, también es una causa de pérdidas económicas y puede ocurrir en vacas infértiles como en vacas con fertilidad normal

(Hernández-Cerón y Morales, 2001). Se ha observado que cerca del 90% de los ovocitos son fertilizados, sin embargo, antes de los 16 días pos inseminación los embriones mueren (Ayalon, 1978; Lonergan, 2011).

La naturaleza de la muerte embrionaria puede ser resumida en: factores genéticos y ambientales (Hernández-Cerón y Morales, 2001), dentro de los primeros están las anomalías cromosómicas, las cuales pueden ocurrir durante la gametogénesis, fertilización o embriogénesis (Wilmot *et al.*, 1986). Los factores ambientales son: de naturaleza hormonal (Mann y Lamming, 2001), nutricional (Groebner *et al.*, 2011), climática (García-Ispuerto *et al.*, 2006) e infecciosa (Hansen *et al.*, 2004) y son responsables de la mayor parte de las muertes embrionarias tempranas.

Estos problemas que causan infertilidad llevaron a desarrollar los protocolos de sincronización, mediante el cual con el uso de hormonas se trata de sincronizar el estro y aumentar la fertilidad por medio del desarrollo folicular para permitir con esto la inseminación a tiempo fijo (Gutiérrez, 2008). Uno de los protocolos más usados es el llamado Ovsynch (Pursley *et al.*, 1995); en este protocolo de sincronización se debe aplicar un protocolo pre-sincronización “presynch” (Moreira *et al.*, 2001b).

Con el pasar de los años se desarrolló varios protocolos de sincronización los cuales dependían del problema reproductivo de cada hato; también se pretendió con estos métodos optimizar costos, tiempo y sobretodo aumentar los porcentajes de fertilidad (Gutiérrez, 2008).

En el Doublesynch se observó un incremento en los rangos de preñez en vacas primíparas post parto, por medio de su doble sincronización. (Cirit *et al.*, 2007). En un estudio hecho por Öztürk *et al.*, (2010) se demostró que se produce un incremento en las tasas de preñez en vacas postparto, primíparas y en anestro.

La hormona somatotropina bovina (bST), tiene efectos sobre la fertilidad de vacas en lactancia y son similares a los efectos positivos de la hormona de crecimiento (GH) como también a los factores de crecimiento parecidos a la insulina (IGF-I) en la fertilización y desarrollo embrionario (Moreira *et al.*, 2000, 2002b). La hormona del crecimiento (GH) es conocida como uno de los importantes moduladores para el desarrollo folicular, actuando tanto directa o indirectamente (Lucy 2000). Tratamientos con la hormona de crecimiento exógena aumenta en vacas el número de folículos reclutados, y como resultado, hay un incremento en el número de folículos en crecimiento (Yonezawa *et al.*, 2005).

II. REVISION DE LITERATURA.

1. Hormonas relacionadas con la fertilidad.

La reproducción de los animales está controlada por reguladores biológicos, los cuales son producidos y secretados por células del cuerpo y son transportadas en la circulación para cumplir su función. A estos reguladores biológicos se los conoce como hormonas (Zarco, 2009).

Las hormonas que intervienen en la reproducción se las puede clasificar por su naturaleza química: polipeptídicas, constituidas por aminoácidos, dentro de estas, las más importantes en la reproducción son la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), la oxitóxina, prolactina y hormona de crecimiento (Jácome, 2005). Dentro de este grupo se encuentran las glicoproteínas como la hormona leutinizante (LH), folículo estimulante (FSH), la gonadotropina coriónica humana (hCG) y la coriónica equina (eCG).

Existen hormonas esteroides, las cuales se derivan del colesterol e intervienen en la reproducción, estas son progestágenos, estrógenos, andrógenos, glucocorticoides y los mineral corticoides (Zarco, 2008).

No se puede desconocer las aminas y las prostaglandinas. De las aminas las más importantes son: la dopamina, adrenalina y noradrenalina, mientras que las prostaglandinas provienen del ácido araquidónico. En reproducción la más importante es la prostaglandina F_{2α} (PGF_{2 α}; Patiño, 2008).

En definitiva, los procesos endócrinos están muy relacionados con lo que ocurre en el resto del organismo, sobre todo en la reproducción y fertilidad.

1.1.1. Progesterona P4

En 1930, los americanos George W. Corner y su estudiante asistente Willard M. Allen, de la Universidad de Rochester, descubrieron la progesterona, el elemento activo del extracto del cuerpo lúteo, fue llamada de esta manera ya que favorecía el proceso de la gestación. En 1934 Carl Slotta y sus colegas en Breslau identificaron su estructura (Jácome, 2005).

1.1.2. Biosíntesis de la Progesterona.

La progesterona es un esteroide, se sintetiza en los ovarios a partir del colesterol sanguíneo y en pequeña cantidad del acetyl coenzima A, en la fase luteínica del ciclo estral, se produce un exceso de síntesis de progesterona la cual se ve reflejada en la sangre circulante (Guyton y Hall, 2011).

La biosíntesis de la progesterona luteal es en una célula lútea. Tres fuentes de colesterol puede ser utilizado para el sustrato: 1) lipoproteínas de baja densidad (LDL), 2) la

lipoproteína de alta densidad (HDL), o 3) hidrólisis de esteres de colesterol almacenados por la colesterol esterasa (Niswender *et al.*, 2000).

El colesterol es transportado a la mitocondria a través de la membrana citoplasmática y se convierte en pregnenolona por una ruptura de la cadena lateral por medio del citocromo P-450 (P-450_{scc}). La pregnenolona es transportado fuera de la mitocondria, y convertida en progesterona por la 3b-hidroxiesteroide dehydrogenase/D5 y la isomerasa de D4 (3b-HSD), que está presente en el retículo endoplasmático. La progesterona se difunde desde células lúteas (Niswender *et al.*, 2000).

1.1.3. Secreción y regulación de la Progesterona.

La progesterona se secreta durante los periodos de actividad sexual, ciclos estrales y embarazo. Su acción principal es sobre el aparato reproductor, sin descartar otros órganos y el metabolismo (Fernández, 2000).

La progesterona es producida principalmente por las células del cuerpo lúteo (CL) y por la placenta en algunas especies (Rodríguez, 2004). Cuando el cuerpo lúteo involuciona espontáneamente, los niveles de progesterona bajan, lo que permite un incremento rápido y progresivo de la GnRH (Cabero *et al.*, 2007). La progesterona retroalimenta negativamente sobre la GnRH (Gutiérrez, 2004)

1.1.4. Mecanismo de acción de la Progesterona.

Las hormonas son secretadas por las glándulas endocrinas a la circulación, donde se unen a proteínas plasmáticas que constituyen un reservorio (Mendoza, 2008).

Las hormonas esteroides libres se difunden al interior de las células blanco a través de la membrana plasmática, aquí se unen a sus receptores intracelulares, donde se distribuyen en el citoplasma y en el núcleo. Esta unión produce un cambio alostérico

en la conformación del receptor y permite su activación; los receptores activados se dimerizan y se unen selectivamente a secuencias palindrómicas en el ADN.

Cada receptor tiene elementos de respuesta en genes blanco, cuando un gen es activado, la enzima RNA polimerasa, sintetiza una cadena de RNA que posteriormente es procesada en RNAm y en los ribosomas se traduce y produce la respuesta deseada (Mendoza, 2008).

1.2. Hormona bovina de crecimiento (bST).

La Somatotropina fue descubierta hace más de 50 años, las investigaciones iniciales mostraron que cuando las crías de rata fueron inyectadas con un extracto crudo de la hipófisis, la tasa de crecimiento fue mayor (Bauman, 1992). Este extracto fue llamado Somatotropina que en griego significa "crecimiento del tejido", es por ello que a veces se denomina la hormona de crecimiento, o GH (Bauman, 1992).

La hormona bovina de crecimiento (bST) es producida por la glándula pituitaria y está constituida por 190 o 191 aminoácidos y existen cuatro variantes diferentes de bST producidas de forma natural (Wood *et al.*, 1989).

1.2.1. Biosíntesis de la bST.

La hormona del crecimiento o somatotropina es una hormona proteica producida en las células somatotróficas de la pituitaria anterior (Bauman, 1992).

La síntesis de algunas hormonas peptídicas consta de un precursor que es un pre pro hormona, la cual tiene en su extremo de la cadena una N-terminal, en ésta una señal de un péptido dirige la pre pro hormona al retículo endoplasmático. Durante este proceso se elimina el péptido señal y queda una pro hormona; ésta es transferida al aparato de Golgi para continuar con su procesamiento, el proceso continúa con el empaquetamiento en una vesícula o gránulo donde permanecerá almacenada para su

posterior liberación. Para la liberación de esta hormona debe haber una señal específica, esto ocurre mediante un proceso denominado exocitosis (Gal, 2007).

1.2.2. Secreción y regulación de la bST.

La secreción de la Somatotropina bovina (bST) se realiza desde los somatotropos en la hipófisis, esta secreción es pulsátil y episódica (McMahon *et al.*, 2001). La secreción de bST está regulada principalmente por 2 péptidos hipotalámicos: un estimulador denominado somatoliberina (GHRH) y otro inhibidor (somatostatina), estos se liberan bajo la influencia de diferentes neurotransmisores y hormonas, como los glucocorticoides, estrógenos, hormonas tiroideas, entre otras. (Berlanga, 2006)

1.2.3. Efectos de la bST en fertilidad en vacas lecheras.

Los efectos de la bST en la fertilidad de vacas en lactancia son similares a los efectos positivos de la hormona de crecimiento (GH) y a los factores de crecimiento parecidos a la insulina (IGF-I) en la fertilización y desarrollo embrionario (Moreira *et al.*, 2000, 2002b). Un estudio realizado en vacas lecheras, demostró que un tratamiento con la hormona bST mejoró la fertilidad cíclica en vacas inseminadas en tiempo fijo (TAI) (Moreira *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2001a), otro en Florida - Estados Unidos, permitió establecer que: utilizando bST junto con el protocolo Ovsynch se mejora las tasas de concepción en vacas lecheras; además la bST y los IGF-I pueden influir en el desarrollo folicular, función lútea y secreción endometrial de PGF₂ α (Rodríguez *et al.*, 2004).

1.3. Hormona liberadora de Gonadotropinas (GnRH).

En 1972 fue aislada la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), la cual controlaba la liberación de las hormonas gonadotropicas. La GnRH fue caracterizada y sintetizada

de manera independiente por Roger Guillemin y Andrew Schally, quienes fueron galardonados en 1977, con el premio Nobel de la Fisiología (Urbina y Lerner.,2008).

1.3.1. Biosíntesis de la GnRH

La GnRH hipotalámica se localiza en el cromosoma 8 y codifica una proteína de 92 aminoácidos conocida como pre proGnRH, este precursor contiene en su secuencia 10 aminoácidos que constituyen la GnRH madura y un péptido de 56 aminoácidos denominado GAP. Las neuronas productoras de GnRH se encuentran dispersas por todo el hipotálamo, especialmente en el núcleo arcuato y en el hipotálamo anterior (Víctor *et al.*, 2006).

1.3.2. Secreción y regulación de la GnRH.

La secreción de la GnRH se secreta de forma intermitente durante unos minutos, con pulsos de 1 a 3 horas (Guyton, 2011). Estas pulsaciones pueden ser reguladas por señales externas al hipotálamo, tales como las hormonas esteroides (Albanese *et al.*, 1996).

El esteroide neuroactivo alopregnanolona suprime la liberación de GnRH a través de un mecanismo mediado por el receptor GABA (Calogero *et al.*, 1998). Por otro lado el estradiol ejerce up regulation (regulación heteróloga) ya que estimula las neuronas dopaminérgicas y beta-endorfinérgicas que inhiben su secreción. Sin embargo, la Kisspeptina (procedente de neuronas del núcleo arqueado y área ventral del núcleo periventricular) ejerce un efecto estimulador sobre las neuronas del área preóptica que secretan GnRH y es fundamental para iniciar el ciclo LH/FSH en la pubertad (Navarro *et al.*, 2007). Los receptores de la GnRH se encuentran exclusivamente en membrana citoplasmática y el principal sitio de acción es el gonadotropo de la adenohipófisis. Sin

embargo, se puede encontrar en placenta, tejido adrenal y sistema nervioso central (Albanese *et al.*, 1996).

1.3.3. Mecanismo de acción de GnRH.

Al unirse la GnRH a las células de la adenohipófisis, conocidas como gonadotropos, existe una respuesta fisiológica la cual produce la liberación de gonadotropinas (Guyton, 2011). El receptor de la GnRH se encuentra en la superficie de la membrana plasmática de las células del gonadotrópo, existen alrededor de 10.000 receptores sobre cada gonadotrópo, cada uno con una elevada afinidad, permite el total de los receptores (Yen S *et al.*,2001).

La GnRH para poder ejercer su acción tiene que ser reconocida por su receptor específico y acoplarse con él, lo que provoca su dimerización y la formación de invaginaciones de la membrana plasmática, que luego son introducidas, junto al complejo hormona-receptor (el cual posteriormente se degrada) en el interior de la célula por los lisosomas (Urbina y Lerner, 2008). Una fracción significativa de estos receptores es devuelta a la superficie celular donde pueden ser reutilizados. Este proceso se conoce como retroalimentación positiva y está regulado por la propia GnRH (Curtis H *et al.*, 2000)

Un agotamiento de sus receptores ocurre cuando la GnRH es expuesta continuamente a sus agonistas, así como la regulación negativa de su población en la superficie celular; la cual provoca una marcada supresión de la liberación de gonadotropinas (Kronenberg H *et al.*,2009). Cuando ocurre la unión GnRH- Receptor se desencadena una serie de acciones: la primera es la secreción de la LH y FSH y la segunda la síntesis de subunidades α y β de ambas gonadotropinas (Yen Set *al.*, 2001). La unión GnRH-receptor es muy rápida y después de la liberación de las gonadotropinas hay eventos intracelulares como es la formación de AMPc, la fosforilización de la membrana celular

por la protein quinasa C (PKC) al momento de la permeabilidad al Ca y la inducción de cambios en longitud y orientación de micro filamentos de los gonadotrópos, provocando un movimiento de los gránulos de secreción hasta la membrana para ser liberada (Kronenberg H *et al.*, 2009; Urbina y Lerner, 2008). La interacción del complejo GnRH-receptor es una proteína G de la membrana celular, que permite el intercambio de un difosfato de guanosina (GDP) por trifosfato de guanosina. La proteína G unida al GTP, activa a la enzima fosfolipasa C (PLC), la cual hidroliza el fosfatidilinositol 4.5 bifosfato (PIP₂) para generar dos segundos mensajeros el inositol 1-4-5 trifosfanato (IP₃) y el diacilglicerol (DAG), más tarde el IP₃ se difunde hacia el citoplasma, lo que estimula el Ca cistosolico por el flujo de este cation desde el retículo endoplasmático y el medio extracelular hacia el citoplasma (Urbina y Lerner, 2008). El incremento de calcio intracelular desencadena la liberación de las gonadotropinas preformadas. Por otra parte, el DAG activa la PKC, la que modula la síntesis de gonadotropinas a través de la fosforilización de diferentes proteínas. Otro segundo mensajero que participa es el AMPc, este se forma por la vía de las Proteínas G/adenilciclase.(Koolman y Röhn, 2004).

1.4. Hormona PGF₂α.

A finales de los años veinte y a principios de la década de los 30, se buscaba rutinariamente en diferentes órganos del cuerpo y tejidos la presencia de mono aminas activas. En 1930 el investigador Kurzrock y en 1934 Goldlatt, descubrieron que en el semen humano existen unas sustancias que tienen la propiedad de contraer el músculo liso y reducen la presión arterial, años más tarde, el alemán Von Euler, encontró que dichas sustancias correspondían a ácidos grasos, a los cuales los nombró prostaglandinas (PG) (Jácome, 2005).

Berstrom y colaboradores aislaron en 1958 en vesículas seminales de ovinos las prostaglandinas E1 y F1. Para 1962 se complementaron las 6 prostaglandinas primarias y sus estructuras. Lee y Covino en 1965, aislaron de la médula renal del conejo la medulina, que años más tarde se identificaría como prostaglandina A. En 1966 y 1969 se presentaron trabajos sobre la motilidad uterina y se reportó el primer caso de aborto, tras la administración intravenosa de prostaglandinas. Para el año de 1982 Bergstrom y Samuelsson, obtuvieron el premio Nobel por sus investigaciones sobre las prostaglandinas (Colin D, 2001).

1.4.1. Biosíntesis de la PGF₂ α .

Las prostaglandinas son ácidos carboxílicos insaturados de 20 carbonos, tienen un anillo de ciclo pentano detectado en casi todos los tejidos y líquidos orgánicos. Son lípidos mediadores autócrinos y parácrinos que actúan sobre las plaquetas, el endotelio, las células uterinas y los mastocitos entre otros (Peredeo *et al.*, 1999 y Colin D, 2001).

La síntesis de prostaglandinas ocurre en forma gradual por un complejo de enzimas microsómicas de distribución muy amplia. En esta vía de síntesis, la primera enzima es la endoperóxido de prostaglandina, llamada también ciclooxigenasa (Jácome, 2005). Existen 2 isoformas de la enzima que son reconocidas por sus iniciales COX-1, COX2, la primera se expresa en forma constitutiva en todas las células y presenta gran difusión, sin embargo, la COX2 no aparece como parte de las células, pero puede ser inducida por citocinas, factores de crecimiento y endotoxinas (Pérez *et al.*, 1998). Las ciclooxigenasas actúan sobre el ácido araquidónico y provocan 2 acciones diferentes: una que oxigena y produce una estructura en anillo y forma el endoperóxido cíclico PGG₂ y una actividad de peroxidasa que transforma PGG₂ en PGH₂ (Collin, 2001).

Los endoperóxidos G y H son químicamente inestables, pero por acción enzimática se transforman en diversos productos que incluyen prostaglandinas (PGE₂, PGD₂ y PGF₂) o prostaciclina (PGI₂) y tromboxano (TXA₂) (Pérez *et al.*, 1998)

1.4.2. Secreción y regulación de la PGF₂α.

La mayor parte de las prostaglandinas se localizan en la membrana plasmática y algunas están situadas en la envoltura nuclear (Pérez *et al.*, 1998).

Las PGF₂α no son almacenadas, sino que se sintetizan de novo a partir de la liberación del ácido araquidónico de la membrana. Estas células se activan cuando se presenta un trauma mecánico, citoquinas específicas y factores de crecimiento (Colin, 2001)

1.4.3. Mecanismo de acción de PGF₂α.

Dentro del mecanismo de acción de las prostaglandinas, existe un polipéptido conocido como transportador de prostaglandinas (PGT) (Schuster, 1998).

Debido a que las prostaglandinas y los tromboxanos tienen una vida media muy corta deben actuar cerca de los lugares de síntesis (Colin, 2001). Hay por lo menos 9 receptores de prostaglandinas conocidas en el ratón y el hombre (Narumiya *et al.*, 2001), la diversidad de funciones de las prostaglandinas se atribuyen a la unión de cuatro diferentes subtipos de receptores E prostanoides (EP) (Patiño, 2008), entre estos están las PGE₂ con sus receptores EP1 y EP4, de los PGD₂ los DP1 y DP2; finalmente de las PGF₂α, PGI₂ y TXA₂ son FP, IP y TP respectivamente (Colin D, 2001).

Todos los receptores de las prostaglandinas tienen mecanismos efectoros en los cuales intervienen las proteínas G (Patiño, 2008).

Existen 3 grupos dentro de una subfamilia distinta de receptores acoplados a las proteínas G (GPCR), estas abarcan proteínas de transmembrana (Colin D, 2001), solo el DP2 pertenece a un tipo de receptores quimio atrayentes.

Los receptores “relajantes”, es decir el IP, DP1, EP2, EP4, forman un clúster donde su señalización es a través de proteínas G mediadas por el aumento de adenosin monofosfato cíclico (AMPc).

Los receptores “contráctiles” son EP1, FP y TP, estos a su vez forman señales a través de las proteínas Gq mediadas por aumento en el calcio intracelular.

Los receptores “inhibitorios” se acoplan a las proteínas Gi y disminuyen la formación de AMPc (Colin D, 2001).

Toda esta cadena de eventos, trae como resultado la activación de las cinasas que modulan las diferentes funciones celulares (Patiño, 2008).

2. Protocolos.

Los protocolos de sincronización se crearon con el fin de minimizar los requerimientos de mano de obra, detección de celo y sobre todo para mejorar el rendimiento reproductivo del hato (Rabie *et al.*, 2005). En las últimas décadas se han desarrollado diferentes protocolos de sincronización, que enfatizan en el desarrollo folicular y del cuerpo lúteo.

Con los protocolos de sincronización se logró controlar la ovulación y tener mejores tasas de preñez, mejorando la fertilidad (Thatcher *et al.*, 2002). Muchos de estos protocolos se basan en inseminaciones a tiempo fijo (TAI) con el fin de evitar las dificultades prácticas asociadas con la detección del celo (Macmillan, 2010).

Casi todos los programas incluyen estratégicamente inyecciones de prostaglandina F2 alfa (PGF2 α) y la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). Las inyecciones de un Ester de estradiol y el suplemento de progesterona por vagina pueden ser incluidos en algunos programas (Macmillan, 2010).

2.1. Ovsynch.

El Ovsynch fue desarrollado por Pursley *et al.*, en 1995, consiste en la administración de una inyección de GnRH, esta servirá para inducir la ovulación y promover la formación de un nuevo cuerpo lúteo (CL) y una nueva onda folicular; siete días después se administra la prostaglandina; esta se utiliza para regresar el nuevo CL. La última GnRH se administra 48 horas después para inducir la ovulación del nuevo folículo. La inseminación a tiempo fijo (IATF) se lleva a cabo de 16 a 24 horas posteriores. La ventaja de este método es que no se requiere observar el celo (Pursley, 1995).

Más tarde, los estudios demostraron que hay varias etapas del ciclo estral, por lo que al iniciar el protocolo de Ovsynch, las tasas de preñez redujeron (Vasconcelos, 1999).

Por ejemplo, observaron que si se comenzaba el protocolo al inicio de la fase lútea, se producía una regresión más temprana del cuerpo lúteo, es decir prematura. Esta situación hacía que las vacas presentaran celo antes de la segunda inyección de GnRH (Moreira *et al.*, 2000b).

Una segunda problemática ocurre a comienzos del ciclo estral (por ejemplo, los días 2 a 4). En esta etapa, se da una ovulación espontánea por un folículo dominante. El nuevo folículo, que será dominante, es demasiado pequeño para la ovulación en respuesta a la administración de GnRH (Moreira *et al.*, 2000). Como consecuencia de ello, el folículo dominante en la segunda administración de la GnRH se considera maduro (Thatcher *et al.*, 2002). Por esta razón, las vacas que están incluidas en el programa de Ovsynch, a principios de los ciclo estral, presentaran menos fertilidad (Thatcher *et al.*, 2002).

2.2. Presynch

Se requiere realizar una pre-sincronización “Presynch” con dos aplicaciones de $PF2\alpha$, para que el Ovsynch tenga mejores resultados, (Ferguson y Galligan, 1993). El

Presynch es necesario para comenzar un protocolo TAI. Este permitirá que los animales estén en un estado óptimo para el inicio del Ovsynch (Ferguson y Galligan, 1993).

El programa Presynch-Ovsynch aumentó las tasas de preñez de 12 unidades porcentuales (37% vs 49%) (Zarkouny *et al.*, 2001) y 18 unidades porcentuales (25% vs 43%) (Moreira F *et al.*, 2001b) en vacas cíclicas. Sin embargo, en este método de pre-sincronización, la duración entre al comienzo del tratamiento y la IA es de aproximadamente 36 días. Para que el protocolo Presynch-Ovsynch tenga éxito depende de si son vacas lecheras en anestro o son vacas cíclicas (Gümen *et al.*, 2003). Las tasas de preñez fueron menores en las vacas que no estaban cíclicas en el momento de iniciar el Presynch - Ovsynch. Si las vacas en anestro responden a la primera y segunda inyección de GnRH del programa Presynch-Ovsynch entonces, las tasas de preñez parecen ser normales con un 39% (Thatcher *et al.*, 2002).

2.3. Doublesynch

A través de los años se han desarrollado varios protocolos de sincronización, fue en el 2007, cuando se desarrolló un nuevo método de sincronización, se lo conoce ahora como Doublesynch, en el cual se administrara una dosis extra de $PF2\alpha$ antes del protocolo de Ovsynch (es decir la primera inyección es de $PGF2\alpha$), a los 2 días se administra una de GnRH, posteriormente a los 7 días se repite la inyección de $PGF2\alpha$ y a los 2 días la GnRH; para después de 16 horas, poder inseminar (Öztürk *et al.*, 2010).

Para el 2008 Souza *et al.*, realizaron un estudio en el cual observaron un aumento de la fertilidad en las vacas primerizas.

El programa de Doublesynch ha aumentado las tasas de preñez en 22,2 unidades porcentuales (50,0% vs 72,2%) sin embargo, estadísticas importantes no se han obtenido, debido al bajo número de vacas utilizadas (Öztürk *et al.*, 2010).

Los investigadores han atribuido esta mayor tasa de preñez con el aumento significativo de las tasas de ovulación después de la primera administración de GnRH (88,9% vs 38,9%). Esto dio lugar a ovulaciones sincronizadas, tanto después de la primera inyección de GnRH (88,9%) como de la segunda inyección de GnRH (94,5%) (Cirit *et al.*, 2007).

3. Reinicio de la actividad ovárica de vacas de primer servicio.

Después del parto, las vacas deben reiniciar su función reproductiva normal. A partir del post parto temprano, se sabe que la secreción de la hormona folículo estimulante FSH, aumenta a partir del quinto día y se mantiene activa hasta el restablecimiento del ciclo estral (Galina y Valencia, 2008).

Este aumento de la FSH hace que sea posible el desarrollo de una oleada folicular, a los 14 días en vacas se ha observado el primer folículo dominante en vacas lecheras (Shelton *et al.*, 1990). Durante las primera y segunda semanas ya hay pulsos de LH, los mismos que ayudan a la maduración y más tarde, en el pico, se realizará la ovulación (Galina y Valencia, 2008). Es conocido que los ciclos estrales de las vacas postparto son cortos, esto es porque las concentraciones de estradiol y los receptores para LH, FSH y progesterona son menores (Shelton *et al.*, 1990).

Por otra parte, la liberación de $PGF2\alpha$ por parte del endometrio en ciclos cortos puede ser la causa de la baja concentración de progesterona, provocando indirectamente un ciclo estral más corto (Shelton *et al.*, 1990).

III. HIPOTESIS.

Hipótesis 1: La administración de la hormona somatotropina bovina (bST) puede mejorar la fertilidad de vacas lechera de primer servicio, sincronizadas con un protocolo de Doublesynch.

Hipótesis 2: El protocolo de Doublesynch mejora la tasa de fertilidad en vacas de primer servicio en comparación con el protocolo Presynch-Ovsynch.

IV. OBJETIVOS.

Objetivo General: Evaluar la tasa de preñez en vacas de primer servicio, tratadas con una dosis de bST al momento de la inseminación después de un protocolo de Doublesynch.

Objetivos Específicos:

1. Establecer la tasa de preñez de vacas lecheras tratadas con bST al momento de la inseminación al primer servicio.
2. Comparar la tasa de preñez en vacas de primer servicio con los protocolos de Doublesynch y Presynch-Ovsynch.

V. METODOLOGIA.

5.1. Animales.

Para este estudio se tomó en cuenta vacas aparentemente sanas de primer servicio, seleccionadas por medio de registros y palpación rectal es decir, las vacas no presentaron metritis, piometras o adherencias ovario-uterinas; además se tomó en cuenta la condición corporal (BCSs), basada en rangos de 1 a 5 (Edmonson *et al.*, 1989), para este estudio la escala recomendada fue de 2,5 a 3,5 de condición corporal. La dieta de estas vacas se basó en pastoreo, al momento del ordeño se les complementó con sales minerales, balanceado y grasa “by pass”. Las vacas, son ordeñadas dos veces al día (ordeño mecánico), produciendo en promedio 13 litros/día.

La población en estudio fueron 40 vacas, las cuales se encontraron a los 30 y 40 días post parto. El día cero fue al momento de empezar con el tratamiento.

La inseminación artificial la realizó los técnicos propios de la hacienda y ellos decidieron el semen a utilizar.

Las vacas fueron analizadas y seleccionadas en forma aleatoria en cuatro grupos experimentales.

Grupo I: (n=10) Las vacas de este grupo recibieron una dosis luteolítica de PGF2 α IM al día 40, dos días después una dosis de GnRH IM.

Posteriormente se aplicó una segunda dosis de PGF2 α a los siete días después de la inyección de GnRH. La segunda inyección de GnRH, se aplicará dos días después de la segunda aplicación de PGF2 α .

La inseminación artificial se realizó 16 horas después de la segunda aplicación de GnRH, conjuntamente con la aplicación de 500mg de Somatotropina bovina recombinante.

Las muestras de sangre se tomaron al inicio del tratamiento, al momento de la inseminación, 7 días después y 14 días después de la inseminación (Fig. 1).

Grupo II: (n=10) se manejó de la misma manera que el grupo anterior con la diferencia que no se aplicó bST (Fig.2).

Grupo III: (n=10) Las vacas de este grupo recibieron una dosis luteolítica de PGF2 α IM, cada 14 días a partir del día 30 postparto.

Doce días después de la segunda inyección de PGF2 α se aplicó una dosis de GnRH, para luego de siete días se aplicó una tercera dosis de PGF2 α .

Para concluir el proceso dos días después de la última inyección, se administró GnRH. La inseminación artificial se realizó 16 horas después de la última inyección de GnRH más 500mg de Somatotropina bovina recombinante.

Las muestras de sangre se tomaron al inicio del tratamiento, al momento de la inseminación, 7 días después y 14 días después de la inseminación (Fig.3).

Grupo IV: (n=10) se manejó igual que el grupo 3 pero sin la administración de la bST (Fig.4).

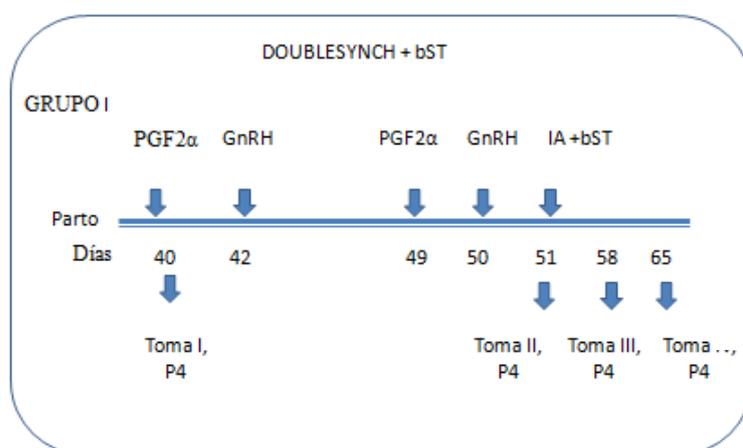


Fig. 1. Grupo experimental con el protocolo de Doublesynch +bST

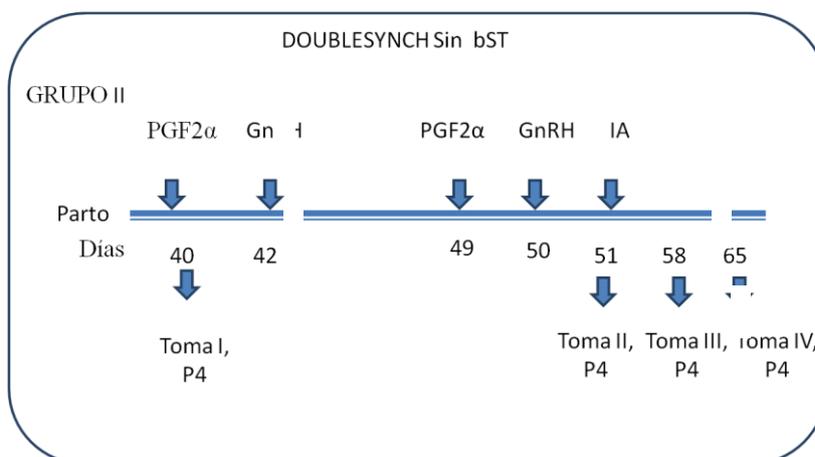


Fig. 2. Grupo experimental con el protocolo de Doublesynch sin bST.

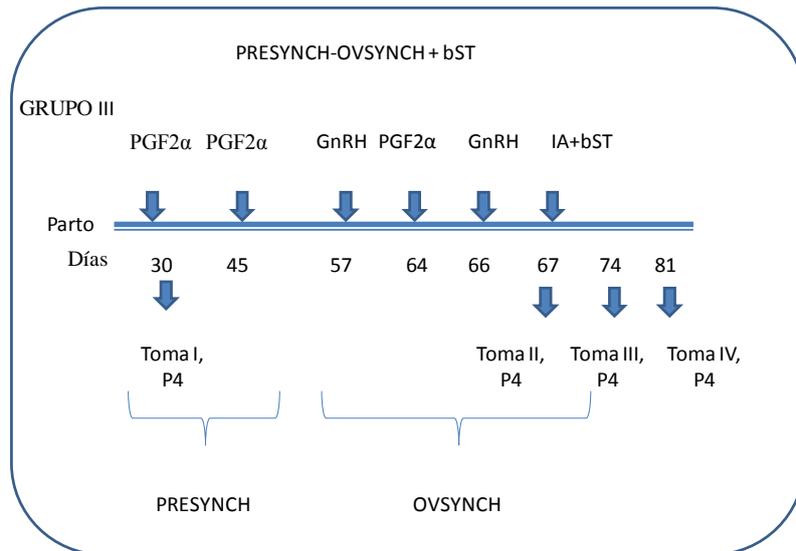


Fig. 3. Grupo experimental con el protocolo de Presynch-Ovsynch con bST.

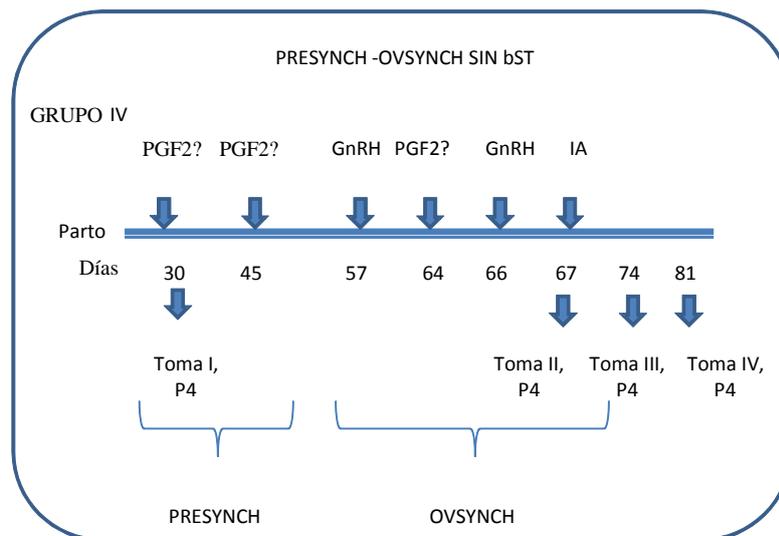


Fig. 4 Grupo experimental con el protocolo de Presynch-Ovsynch sin bST.

Materiales

- Guantes
- Tubos Tapa Roja (Sin anticoagulante)
- Vacutainers
- Centrífuga

- Agujas rosadas
- Hormonas GnRH, PGF₂ α , BST
- Libreta de anotaciones.
- Jeringuillas 3ml
- Tubos eppendorf

Muestras de sangre: Se recolecto 3ml de sangre de los vasos coccígeos en tubos sin anticoagulante.

Las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm por 5 – 10 minutos. El suero formado por la centrifugación fue ser pasado a tubos eppendorf previamente rotulados. Estos se congelaron a -20°C.

La técnica a usar fue ELISA para la medición de las hormonas (Kaneko, 2008). Estas muestras fueron tomadas a los 10 animales de cada grupo para la medición de progesterona (P4), en el día 40 post parto (pp.) en los grupos I y II y día 30 pp. En los grupos III y IV, es decir el día que se comienza con los tratamientos.

A su vez se tomó muestras de sangre a los mismos animales el día de la IA, el día 7 y el día 14 después de la inseminación artificial (IA).

El diagnóstico de gestación se realizó mediante ecografía, a los 40 días post inseminación.

5.2. Haciendas

La investigación se llevó a cabo en haciendas al norte del país. Los nombres de las haciendas son San Fernando de Palugillo en Pifo y de la Sra Carmen de Pallares, Guangoto, Pintag

5.3. Análisis Estadístico.

El análisis estadístico se realizó comparando tasa preñez entre grupos mediante la prueba de Chi cuadrada (X^2) (Steel y Torrie, 1980).

Las concentraciones de progesterona se compararon mediante el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Fisher (Gutiérrez y Salazar, 2008).

VI. RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en este estudio con respecto a la tasa de preñez en vacas de primer servicio, no fue significativo.

En la Tabla 1. Se observa que el 40% de las vacas en el Grupo III se quedó gestante y el 20 % en el Grupo IV.

Tabla 1. Tasa de Preñez de vacas de primer servicio tratadas con bST vs sin bST al momento de IA después de ser sincronizadas con los protocolos de Doublesynch y Presynch-Ovsynch a partir de los días 40 post inseminación.

Grupo	n	Tasa de preñez
Grupo I*	10	30
Grupoll*	10	30
Grupolll*	10	40
Grupollv*	10	20

* $P > 0.79$

El análisis χ^2 de los datos determinó un $P = 0,79$ lo cual demostró que no existen diferencias significativas en las tasas de preñez entre los grupos I, II, III, IV.

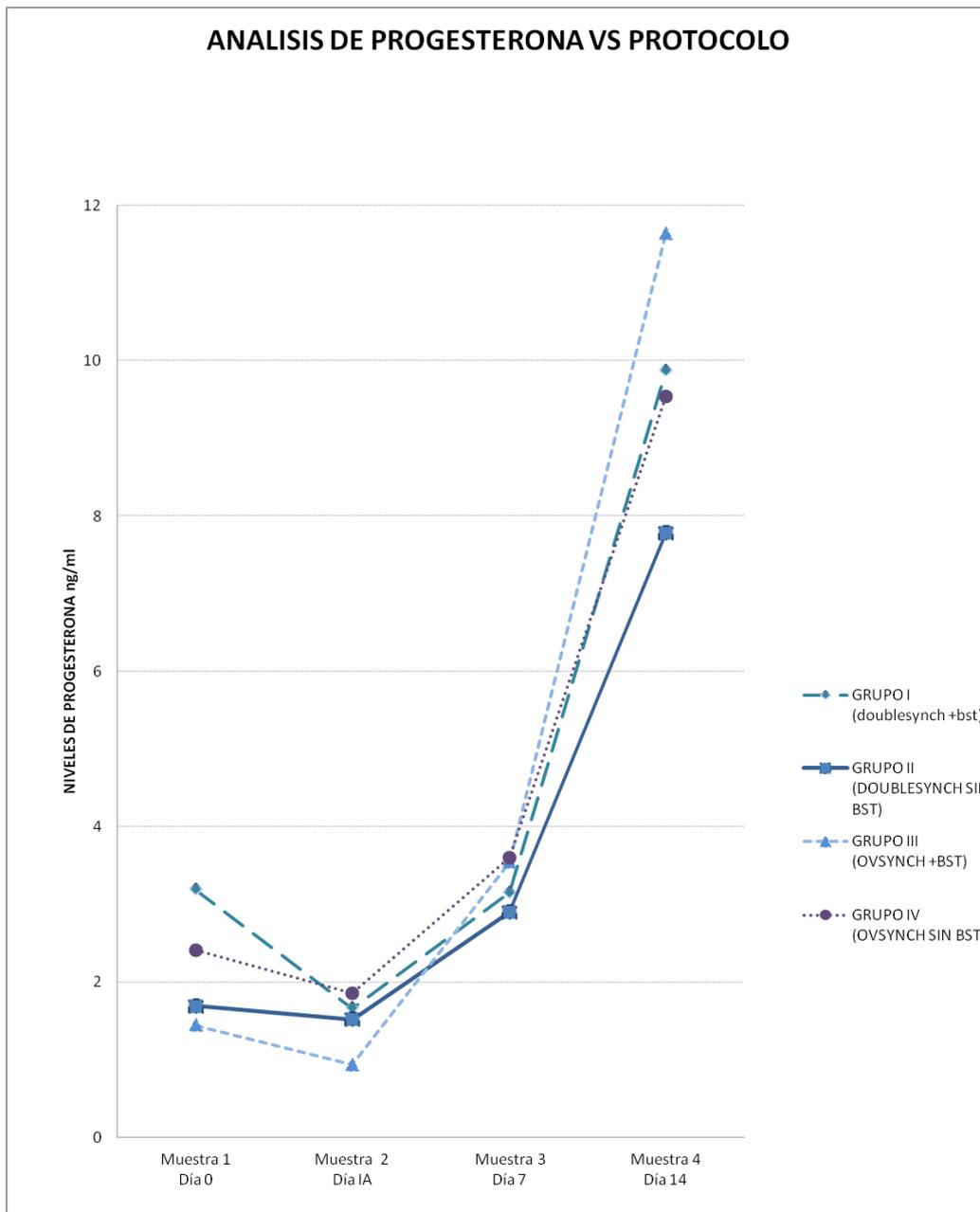


Figura 5. Concentraciones séricas de Progesterona (P4) de vacas de primer servicio, tomadas en los días: inicio del tratamiento (Muestra 1); el día de IA (Muestra 2), finalmente día 7 (Muestra 3) pos IA y día 14 (Muestra 4) pos IA.

La figura 5 se visualiza las curvas de progesterona que siguieron las vacas al ser sometidas a cada una de los tratamientos.

En la Tabla 2. Se observa que en el Grupo I, el 70% se inseminó con valores mayores de 1ng/ml de progesterona, y del Grupo II el 40%, sin embargo la tasa de preñez de los dos grupos fue de un 30%.

Tabla 2. Porcentaje de vacas de primer servicio con concentraciones de Progesterona mayor a 1ng/ml y número de vacas Gestantes de los Grupos I, II, III y IV.

	# de vacas Muestra (P4 >1ng/ml) Día Inicio de tratamiento	# de Muestra (P4 >1ng/ml) Día IA	# de vacas Muestra (P4 Día 7 post-IA	# de vacas Muestra (P4 Día 14 post-	Gestantes
Grupo (Doublesync +bST	7 vacas (70%)	4 vacas (40%)	8 vacas (80%)	8 vacas (80%)	3 vacas (30%)
Grupo (Doublesync sin bST)	4 vacas (40%)	5 vacas (50%)	7 vacas (70%)	8 vacas (80%)	3 vacas (30%)
Grupo III (Presynch- +bST	40vacas (40%)	4 vacas (40%)	6 vacas (60%)	10 vacas (100%)	4 vacas (40%)
Grupo IV (Presynch-Ovsynch sin bST)	5 vacas (50%)	3 vacas (30%)	7 vacas (70%)	10 vacas (100%)	2 vacas (20%)

P4= progesterona; IA= Inseminación Artificial

En la Tabla 4 se visualiza una diferencia significativa entre los grupos, en los Grupos II y III, tomados al día 14 post-inseminación, es decir, en la muestra 4; en donde la prueba de análisis de varianza (ANOVA) y Fisher determinó un $p=0,027$. En los Grupos III y

IV su $p=0,035$ por lo cual también existe una diferencia significativa entre las concentraciones de progesterona.

Los Grupos I y IV se encontró valores de $p=0,263$ los Grupos II y IV $p=0,454$ y los Grupos I y III $p=0,18$ lo cual muestra que no existe diferencia significativa en cuanto a sus niveles de progesterona durante la toma de la última muestra.

Relación	Significancia ($p<0,05$)
GI vs GII	0,227
GI vs GIII	0,118
GI vs GIV	0,263
GII vs GIII	0,027
GII vs GIV	0,254
GIII vs GIV	0,035

Tabla 3. Concentraciones séricas de P4 de vacas de primer servicio.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
Grupo I	3,19	1,663	3,152	9,87
Grupo II	1,69	1,521	2,899	7,78
Grupo III	1,443	0,936	3,545	11,64
Grupo IV	2,411	1,852	3,598	9,54

Tabla 4. Relación entre Grupos y su diferencia significativa.

El valor obtenido al contrastar las muestras por grupos es de $P=0,85$, lo que significa que los grupos se comportaron de manera muy semejante.

VII. DISCUSION.

La administración de una dosis de 500mg de hormona de crecimiento bovina (bST), al momento de la inseminación no mejoró la fertilidad en vacas lecheras de primer servicio sincronizadas con un protocolo Doublesynch. Esto concuerda con Rodríguez *et al.*, (2004) en un estudio similar utilizando bST al momento de la inseminación, pero con otro protocolo de sincronización en vacas de primer servicio y no se encontró incremento en la fertilidad. (Hernández JC 2001), tampoco encontró un incremento en la tasa de preñez con bST al momento de la IA en vacas de primer servicio. En vacas repetidoras, se encontró incremento en la tasa de preñez utilizando bST al momento de la IA (Moreira *et al.*, 2001 ;Vargas *et al.*, 2010).

Sin embargo, Morales-Roura *et al.*, (2000) concluyeron que no hay diferencia en las concentraciones de progesterona en vacas repetidoras como de primer servicio. Las concentraciones de progesterona en sangre afectan las concentraciones de la hormona de crecimiento (Yonezawa *et al.*, 2005) ya que tiene la capacidad de modular el patrón de secreción pulsátil de esta hormona (Hayashi *et al.*, 2008). Probablemente esto explicaría porque del 40% de las vacas del Grupo I que presentó más de un 1ng/ml de progesterona al momento de la inseminación y de la aplicación de bST, solo el 30% estuvo gestante (Yonezawa *et al.*, 2005 y Hayashi *et al.*, 2008). Si se compara con el Grupo III (Presynch-Ovsynch más bST) un 40% de vacas presentó concentraciones de progesterona mayores a 1 ng/ml al momento de la inseminación; en este caso, si se pudo observar un incremento en la fertilidad de vacas de primer servicio. Este incremento en la fertilidad se debe a que en concentraciones menores de progesterona, aumentan los estrógenos séricos; esto favorece a un aumento en la secreción de la hormona de crecimiento (Yonezawa *et al.*, 2005; Hayashi *et al.*, 2008). La hormona de crecimiento tiene un efecto positivo sobre la secreción de factores de crecimiento parecidos a la

insulina (IGFs) (Hayashi *et al.*, 2008). Los IGFs aumentan gradualmente después del parto (Lucy, 2008). Estos IGFs actúan sobre el desarrollo folicular (Lucy, 2000), porque influyen en la GnRH y la secreción de la LH. Las células del ovario tratadas con IGF-1 tienen mayor número de receptores para gonadotropinas y una mayor activación de segundos mensajeros, de esta manera se puede decir que los IGFs actúan sinérgicamente con las gonadotropinas para promover el crecimiento y la esteroidogénesis de las células ováricas (Lucy, 2008), además la bST y los IGF-I pueden influir en la fertilización y desarrollo embrionario (Moreira *et al.*, 2000, 2002b). Los IGFs que están presentes en las secreciones oviductales y uterinas favorece al desarrollo del embrión en fases tempranas ya que evita la apoptosis durante el desarrollo del mismo (Augustin *et al.*, 2003) por esta razón se pudiera explicar porque en otros estudios aumenta la fertilidad en vacas de primer servicio.

En los Grupos I y III, se tomó una muestra sanguínea en el día 14 post inseminación y el 80% de las vacas del Grupo I incrementaron en más de 1ng/ml con media de 9.87ng/ml. Mientras que en el Grupo III el 100% de las vacas aumentó los niveles hasta 11.64 ng/ml; valores mucho más altos que los encontrados por Romo *et al.*, (2002), los cuales fueron 5,9 ng/ml de progesterona a los 14 días. Esto demuestra que valores de progesterona bajos no indican necesariamente que no esté gestante (Matamoros *et al.*, 2002 y Romo *et al.*, 2002), esto explicaría porque en el Grupo III vacas con bajos niveles de progesterona a los 14 días pero a los 45 días se presentaron gestantes. Bartolomé *et al.*, (2009) menciona que desde la ovulación hasta el día 15 del ciclo estral, la secreción de progesterona y el ambiente uterino son similares en vacas gestantes y vacas no gestantes. Razón por la cual al diagnóstico de gestación por ecografía (día 45), el 30% de las vacas del Grupo I y el 40% de vacas del Grupo III estuvieron gestantes. Es probable que la disminución en la fertilidad pueda tener

relación con muerte embrionaria temprana o falla en la implantación (Gonella *et al.*, 2010) ya que se requiere que el embrión emita una señal para evitar la luteólisis a partir del día 16 (Bartolomé *et al.*, 2009; Góngora A *et al.*, 2002 y Gonella *et al.*, 2010).

En el presente trabajo, la tasa de preñez en vacas de primer servicio tratadas con el protocolo de Doublesynch, no se incrementó. El protocolo de Doublesynch incrementa los valores de progesterona circulantes (Herlihy *et al.* 2012), los mismos que tienen un efecto negativo sobre la hormona de crecimiento y los IGFs (Hayashi *et al.*, 2008). Herlihy *et al.* (2012) menciona que el protocolo de Doublesynch funciona en vacas de primer servicio pero siempre que estas sean primíparas y también sugiere que este protocolo funciona mejor al ser aplicado como un protocolo de pre sincronización, se evidencio que, en vacas multíparas la fertilidad disminuía (Souza *et al.*, 2008). En el presente estudio la mayoría de vacas eran multíparas, las mismas que tienen menor fertilidad que la primíparas (Moreira *et al.*, 2001; Gümen *et al.*, 2003 y Silva *et al.*, 2007). Souza *et al.*, (2008) expusieron que el Doublesynch- Ovsynch incrementa la tasa de preñez por inseminación artificial a tiempo fijo, comparado con el protocolo de Presynch-Ovsynch y además que, Double-Ovsynch incrementa la preñez solo en vacas primíparas y no en multíparas. Este incremento se debe a que las vacas primíparas tienden a ser más anovulatorias que las multíparas y este protocolo funciona mejor en vacas anovulatorias (Catmill *et al.*, 2001 y Souza *et al.*, 2008) En el Grupo I y II se usó Doublesynch como protocolo de sincronización en vacas multíparas, las mismas que basandose en los niveles de progesterona nos indican que no pudo haber una regresión del cuerpo luteo completo (Souza *et al.*, 2007). Esta regresión incompleta del cuerpo luteo hace que los niveles de progesterona sean inadecuados en multíparas lo que podria explicar la deficiencia del protocolo de Doublesynch en vacas multíparas dando como

resultado una baja tasa de preñez, esto concuerda con el estudio de Souza *et al.*, (2008) y .Herlihy *et al.*, (2012).

Öztürk *et al.* (2011), realizaron un estudio utilizando Doublesynch para mejorar la fertilidad en vacas anestricas, se comparó con el protocolo de Presynch-Ovsynch, sus resultados demostraron que si hubo un incremento en la fertilidad la misma que si fue significativa en comparación con el grupo Presynch-Ovsynch. En los Grupos I y II (Doublesynch) y en los Grupos III y IV (Presynch-Ovsynch) no hubo diferencia significativa en la fertilidad de las vacas ($P=0,79$). Cirit *et al.* (2010), mencionaron en su estudio que el protocolo de Doublesynch no tendría efecto si se comienza en las etapas tempranas del ciclo estral. En los Grupos I y II la administración de bST o no, al momento de la inseminación no tuvo efecto, esto se puede relacionar con las concentraciones de progesterona al momento de la IA, ya que en el Grupo II el 50% y en el Grupo I el 40% de las vacas tenia concentraciones de más de 1ng/ml.

El estrés provocado por las altas temperaturas (estrés calórico) afecta la eficiencia reproductiva del ganado bovino en general, este estudio fue realizado en un verano con temperaturas elevadas y los animales pasaron por momento de sequia, lo que produjo la falta de buenos pastos en su alimentación, esto pudo haber influenciado en la fertilidad de dichas vacas dando resultados no deseados en la fertilidad.

VIII. CONCLUSIONES

Al evaluar la tasa de preñez en vacas de primer servicio, tratadas con una dosis de 500 mg de bST al momento de la inseminación después de un protocolo de Doublesynch se concluyó que:

1. No hubo un incremento significativo en la tasa de preñez, con la administración de bST.
2. La aplicación de un protocolo de Doublesynch no mostró un incremento significativo en la tasa de preñez en vacas de primer servicio, en relación con el protocolo de Presynch-Ovsynch.
3. Así, basándose en los resultados de este estudio y otros estudios, el incremento en la tasa de preñez con el protocolo de Doublesynch y la administración de la hormona somatotropina bovina al momento de la inseminación en vacas de primer servicio requiere más estudios.

IX. LITERATURA CITADA.

1. Albanese C, Colin IM, Crowley WF, Ito M, Pestell RG, Weiss J, Jameson JL. Gonadotrophin genes: evolution of distinct mechanisms for hormonal control. *Recent progress in hormone res.*1996;51:23-61.
2. Augustin R, Pocar P, Wrenzycki C, Niemann H, Fischer B. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced in vitro. *Reproduction.* 2003;126:91-99.
3. Ayalon N. A review of embryonic mortality in cattle. *J Reprod Fertil.* 1978;54:483-493.
4. Bartolomé J. ENDOCRINOLOGÍA Y FISIOLOGÍA DE LA GESTACIÓN Y EL PARTO EN EL BOVINO. Conferencia dictada en el Curso de Postgrado de Manejo Reproductivo en Bovinos Lecheros, organizado por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNCPBA, 25 al 27 de marzo de 2009, Tandil, provincia de Buenos Aires. 2009
5. Bauman DE. Bovine Somatotropin: review of an emerging animal technology. *J Dairy Sci.*1992;75:3432-3451.

6. Berlanga E. Diagnóstico bioquímico del exceso de secreción de Somatotropina (I). *Endocrinol Nutr.*2006;53:559-64.
7. Bhattacharya M, Peri G, Krishna AG, Ribeiro-da-Silva A, Shichi H, Durocher Y, Abramovitz M, Hou X, Varma DR, Chemtob S. Nuclear localization of prostaglandin E2 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*1998;95:15792-15797.
8. Butler WR. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.*2000;60:449-457.
9. Cabero L, Saldivar D, Cabrillo E. *Obstetricia y medicina Materno-Fetal*. 1era ed.Madrid: Panamericana;2007
10. Calogero AE, Palumbo MA, Bosboom AM, Burrello N, Ferrara E, Palumbo G, Petraglia F, D'Agata R. The neuroactive steroid allopregnanolone suppresses hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release through a mechanism mediated by the gamma-aminobutyric acidA receptor. *J Endocrinol.* 1998 Jul;158:121-5
11. Cartmill JA, El-Zarkouny SZ, Hensley BA, Lamb GC, Stevenson JS. Stage of cycle, incidence, and timing of ovulation, and pregnancy rates in dairy cattle after three timed breeding protocols. *J Dairy Sci.* 2001;84:1051-1059.
12. Cirit U, AK K, Ileri I K. New strategies to improve the efficiency of the Ovsynch protocol in primiparous dairy cows.*Bull Vet Inst Pulawy.*2007;51:47-51.
13. Colin D F. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. *Science.*2001;294:1871-1874.
14. Curtis H, Barnes S, Schnek A, Massarini A. *Biologia*. /am ed. España: Panamericana; 2000
15. Ducrot C, Grohn Y, Bugnard F, Senlis Y, Sulpice P, Gilbert R. A field study on estrus detection in lactating beef cattle. *Veterinary Research.*1999;30:87-98.
16. Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Weber G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J Dairy Sci.*1989;72:68-78.

17. Ferguson JD, Galligan DT. Prostaglandin synchronization programs in dairy herds Part I. *CompContinEducPractVet.*1993;15:646-655.
18. Fernández A. *Mastología*. 2da ed.Barcelona: Masson; 2000..
19. Gal B. *Bases de la Fisiología*. Editorial Tebar. 2da Edicion.Madrid; 2007.
20. Galina C, Valencia J. *Reproducción de los Animales Domésticos*. 3era ed. México: Limusa; 2008.
21. García-Ispuerto I, López-Gatius F, Santolaria P, Yániz JL, Nogareda C, López-Béjar M, De Rensis F. Relationship between heat stress during the peri-implantation period and early fetal loss in dairy cattle. *Theriogenology*. 2006;65:799-807.
22. Gonella A, Grajales H, Hernández A. Ambiente receptivo uterino: control materno, control embrionario, muerte embrionaria. *Rev.MVZ Córdoba*.2010;15: 1976-1984
23. Góngora A. ; Grajales H. ; Hernández A. ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS Y ENDOCRINOS DURANTE LA IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA EN RUMIANTES. *Re. Fac. Med. Vet. Zootec.*2002;48:3-12
24. Groebner AE, Rubio-Aliaga I, Schulke K, Reichenbach HD, Daniel H, Wolf E, Meyer HH, Ulbrich SE. Increase of essential amino acids in the bovine uterine lumen during preimplantation development. *Reproduction*. 2011;141:685-695
25. Gümen A, Guenther JN, Wiltbank MC. Follicular size and response to versus detection of estrus in anovular and ovular lactating dairy cows. *J Dairy Sci.*2003;86:3184–3194.
26. Gutiérrez C. *Endocrinología de la Reproducción*. En: Galina Carlos, Valencia Javier. *Reproducción de los Animales Domésticos*, 3era edc. México: Limusa; 2009: 117-118.

27. Gutiérrez H, Salazar R. Análisis y diseño de experimentos. 2da Edición. México: McGraw Hill; 2008.
28. Guyton A, Hall J. Tratado de Fisiología médica. 12 ed. España: Elsevier; 2011
29. Hansen PJ, Soto P, Natzke RP. Mastitis and fertility in cattle - possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. *Am J Reprod Immunol.* 2004;51:294-301
30. Hayashi KG, Matsui M, Shimizu T, Sudo N, Sato A, Shirasuna K, Tetsuka M, Kida K, Schams D, Miyamoto A. The absence of corpus luteum formation alters the endocrine profile and affects follicular development during the first follicular wave in cattle. *Reproduction.* 2008;136:787-797
31. Herlihy MM, Giordano JO, Souza AH, Ayres H, Ferreira RM, Keskin A, Nascimento AB, Guenther JN, Gaska JM, Kacuba SJ, Crowe MA, Butler ST, Wiltbank MC. Presynchronization with Double-Ovsynch improves fertility at first postpartum artificial insemination in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 2012;95:7003-7014.
32. Hernández CJ, Morales RJS. Falla en la concepción en el ganado lechero: Evaluación de terapias hormonales. *Vet Méx.* 2001; 32:279-287.
33. Hernández-Cerón J. Editores: Hernández Cerón J, Zavala Rayas Jesús. Factores que determinan la fertilidad en programas de inseminación artificial. *Reproducción Bovina. Primera edición. Universidad Nacional Autónoma de México* 2007. Pag.169-180. ISBN: 978-970-32-4568-0.
34. Jácome A. Fisiología Endocrina, 3era Edición. Bogotá; 2005.
35. Koolman, Röhn. *Bioquímica.* 3era ed. España: Panamericana; 2004
36. Kronenber H, Melmed S, Polonsky K, Larsen P. Williams Tratado de Endocrinología. 11ava ed. España: Elsevier; 2009
37. Lazzari G, Colleoni S, Duchi R, Galli A, Houghton FD, Galli C. Embryonic genotype and inbreeding affect preimplantation development in cattle. *Reproduction.* 2011;141:625-632

38. Lonergan P. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. *Theriogenology*. 2011;76:1594-1601.
39. Lucy MC. Nutrient Partitioning and Reproductive Performance in Dairy Cows. Intermountain Nutrition Conference;2008 January 29-30; Salt Lake City, Utah, United States. ANIMAL, DAIRY & VETERINARY SCIENCES DEPARTMENT.
40. Lucy MC. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *Journal of Dairy Science*. 2000;83:1635–1647.
41. Macmillan KL. Recent advances in the synchronization of estrus and ovulation in dairy cows. *J Reprod Dev*.2010;56(Suppl 42):7[abstract].
42. Mann GE, Lamming GE. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction*.2001;121:175-180.
43. Mann GE, Lamming GE. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod Dom Anim*.1999;34:269-274.
44. MATAMOROS R, GOMEZ C, ANDAUR M. Hormonas de utilidad diagnóstica en Medicina Veterinaria. *Arch. med. Vet*.2002; 34: 167-182.
45. Matamoras JR, Hernández J, Molero D. *Reproduccion Humana para enfermería*. 1era ed. España: Medica Panamericana; 2008
46. McMahon CD, Radcliff RP, Lookingland KJ, Tucker HA. Neuroregulation of growth hormone secretion in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol*.2001;20:65-87.
47. Mendoza Patiño N. *Farmacología Médica*.México: Panamericana; 2008

48. Morales-Roura JS, Hernández-Cerón J, Rodríguez TG, Peña FR. Comparación del porcentaje de concepción y la función lútea en vacas de primer servicio, repetidoras y vaquillas Holstein. *Vet Méx.*2000;31:179-184.
49. Moreira F, Badinga L, Burnley C, Thatcher WW. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology.*2002a; 57:1371–1387.
50. Moreira F, Lopes PP, Hansen PJ, Badinga L, Thatcher WW. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology.*2002b;57:895–907.
51. Moreira F, Orlandi C, Risco CA, Mattos R, Lopes F, Thatcher WW. Effects of pre-synchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.*2001a;84:1646–1659.
52. Moreira F, Risco CA, Pires MFA, Ambrose JD, Drost M, Thatcher WW. Use of bovine somatotropin in lactating dairy cows receiving timed artificial insemination. *J Dairy Sci.*2000;83:1237–1247.
53. Moreira, F., Orlandi C, Risco CA, Mattos R, Lopes F, Thatcher WW. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*2001b;84:1646–1659.
54. Narumiya S, FitzGerald GA. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest.*2001;108:25-30.
55. Navarro VM, Castellano J M, Sempere M T. Nuevas señales en pubertad: sistema KiSS-1/GPR54. *Endocrinol Nutr.* 2007;54:299-306
56. Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev.* 2000;80:1-29.

57. Öztürk ÖA, Cirit Ü, Baran A, Ak K. Is Doublesynch protocol a new alternative for timed artificial insemination in anestrous dairy cows. *Theriogenology*.2010;73:568-576.
58. Patiño N, *Farmacología medica*. 1eraEdicion.Mexico; Panamericana:2008.
59. Peredo HA, Adler-Graschinsky E.Síntesis de prostaglandinas en lechos mesentericos de rata. Efectos de la acetilcolina y la bradiquinina. *Revista Argentina De Cardiología*.1999;67:233-239.
60. Pérez Ruiz AO, Cartaya Padrón L,Valencia Fernández V, Sanjurjo Gámez V,Ilisástigui Ortueta T. Biosíntesis de los productos del ácido araquidónico y su repercusión sobre la inflamación. *Journal of Endocrinology*.1998;158:121-125
61. Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2a and GnRH. *Theriogenology*.1995;44:915–923.
62. Rabie AR, Lean IJ, Stevenson MA. Efficacy of Ovsynch program on reproductive performance in dairy cattle: a meta-analysis. *J Dairy Sci*.2005;88:2754-2770.
63. Roche JF, Mackey D, Diskin MD. Reproductive management of postpartum cows. *Anim Reprod Sci*. 2000;60:703-712
64. Rodríguez Castañeda OA, Díaz Bolaños RF, Ortiz González O, Gutiérrez CG, Montaldo HH, García Ortiz C, Hernández Cerón J. Porcentaje de concepción al primer servicio en vacas Holstein tratadas con hormona bovina del crecimiento en la inseminación. *Veterinaria México*.2004;40:1-6.
65. Romo M., Hernández Cerón A., Morales Roura, Rodríguez Trejo G. TAMAÑO FOLICULAR, PROGESTERONA Y ESTRADIOL PLASMÁTICOS EN LOS DÍAS 12-14 POSINSEMINACIÓN Y PORCENTAJE DE CONCEPCIÓN DE VACAS HOLSTEIN. *Arch. Zootec*.2002;51: 327-334. .
66. Schuster VL. Molecular mechanisms of prostaglandin transport. *Annu Rev Physiol*.1998;60:221-242.

67. Shelton K, Gayerie de Abreu MF, Hunter MG, Parkinson T J, Lamming GE. Luteal inadequacy during the early luteal phase of subfertile cows. *J. Reprod. Fertil.*1990;90:1–10.
68. Silva E, Sterry RA, Fricke PM. Assessment of a practical method for identifying anovular dairy cows synchronized for first postpartum timed artificial insemination. *J Dairy Sci.* 2007;90:3255-3262.
69. Souza AH, Ayres H, Ferreira RM, Wiltbank MC. A new presynchronization system (DoubleOvsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology.*2008;70:208-215.
70. Souza AH, Gümen A, Silva EP, Cunha AP, Guenther JN, Peto CM, Caraviello DZ, Wiltbank MC. Supplementation with estradiol-17beta before the last gonadotropin-releasing hormone injection of the Ovsynch protocol in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 2007;90:4623-4634.
71. Steel R, Torrie J. *Bioestadística: principios y procedimientos.* 2nd ed. Nueva York: Mac Graw Gill;1980.
72. Thatcher WW, Moreira F, Pancarci SM, Bartolome JA, Santos J E P. Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. *Domest. Anim. Endocrinol.*2002; 23:243–254.
73. Urbina MT, Lerner JB. *Fertilidad y Reproduccion asistida.* Venezuela: Editorial Panamericana; 2008
74. Vargas JA, Díaz R, Vinueza L, Granados LM. Effect of bovine somatotropin (bST) treatment at the time of artificial insemination on conception rate of repeat-breeding holstein cows after ovulation synchronized with presynch - Ovsynch protocol in grazing systems of Ecuador. *Memorias del Congreso mundial de Buiatria;* 2010 Noviembre 14-18; Santiago de Chile. Chile: Sociedad Chilena de Buiatría. 2010.
75. Vasconcelos JLM, Silcox RW, Pursley JR, Wiltbank MC. 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.*1999;52:1067–1078.

76. Victor M., Arce P, Mallo F. Op/255 –Endocrinología. Santiago de Compostela,2006.
77. Wilmut I, Sales DI, Ashworth CJ. Maternal and embryonic factors associated with prenatal loss in mammals. *J Reprod Fertil.*1986;76:851-864.
78. Wood. D C, Salsgiver WJ, Kasser TR, Lange GW, Rowold E, Violand BN, Johnson A, Leimgruber R M, Parr G R, Siegel NR, Kimack NM, Smith CE, Zobel IF, Ganguli SM, Garbow JR, Bild G,Krivi GG. Purification and characterization of pituitary bovine somatotropin. *J. Biol. Chem.*1989;264:14741-14747.
79. Yen S, Jaffe R, Barbieri R. endocrinología de la Reproducción.4ta ed. Pensylvania: Panamericana; 2001
80. Yonezawa T, Mogi K, Li JY, Sako R, Yamanouchi K, Nishihara M. Modulation of growth hormone pulsatility by sex steroids in female goat, *Endocrinology.* 2005;146:2736-2743
81. Zarco Luis. Endocrinología de la Reproducción. En: Galina Carlos, Valencia Javier. Reproducción de los Animales Domésticos, 3era edc. México: Limusa; 2009: 59-80.

X. ANEXOS.

Anexo 1. Niveles de Progesterona en las diferentes tomas de muestras de sangre.

IDENTIFICACION	MUESTRA 1	MUESTRAS 2	MUESTRAS 3	MUESTRA 4
VACA 11	2	0,5	5,1	25,8
VACA 55	5,1	1,3	0,9	1,2
BRENDA	0,5	1,9	1,7	5,8
ZARUMA	3	0,8	2,1	5,0
BRASILIA	0,9	0,7	1,9	17,5
ESQUINA	2,5	1,1	12,5	14,8
CELIA	7,6	7,5	8	20,8
LADY	1,1	0,5	0,9	0,9
ANITA	4,9	1,2	5,5	0,4
CECILIA	4,2	0,4	1,1	2,9
AMPARO	1	1,0	1,1	2,1
BRUMA	0,5	0,56	6,0	11,5
PRESISA	0,65	1,0	1,5	7,8
COQUETA	0,4	0,9	0,9	8,9
PANCHA	0,4	0,52	0,78	1,2
PAULINA	0,58	1,9	2,0	19,2
TANIA	0,61	0,4	0,5	1,8
DALILA	1,9	0,51	3,5	16,7
CAMILA	0,5	0,89	0,6	2,8
GUAGUA	0,2	0,5	4,1	9,2
VACA 20	0,6	0,8	0,8	1,3
VACA 86	3,2	0,3	2,4	10,9
VACA 78	2,0	0,9	0,3	5,4
VACA 634	8,1	8,1	0,22	3,8
VACA 303	1,1	1,1	4,1	15
BOTICA	1,1	2,8	1,0	16,8
SILVIA	0,1	1,0	0,09	0,5
LAYLA	5,0	2,5	1,8	3,8
VACA 652	10	8,2	11,0	5,0
ILINIZA	0,1	0,21	5,1	17,2
VACA 648	2,8	0,73	8,1	15,1
COCO	0,1	4,2	1,0	7,0
VACA 7	0,1	0,8	7,9	35,8
ERNESTINA	1,0	0,2	5,7	16
TUCAN	0,11	2,5	2,1	1,1
LUZ	4,2	0,1	4,7	21,0
IMBABURA	0,6	0,4	0,25	1,2
SUSANA	0,5	0,1	0,4	0,5
RUMBA	4,0	0,6	2,4	11,9
VACA 288	4,1	0,1	11,9	22,7