

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias de la Salud

Concentraciones de progesterona al momento de la inseminación artificial y su relación con la tasa de concepción y producción láctea en vacas lecheras de raza Holstein en una hacienda de la provincia de Pichincha – Ecuador.

Mayra Alejandra Padilla Calderón

Luz María Granados, MVZ., 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

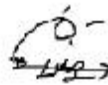
Colegio de Ciencias de la Salud

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Concentraciones de progesterona al momento de la inseminación artificial y su relación con la tasa de concepción y producción láctea en vacas lecheras de raza Holstein de una hacienda de la provincia de Pichincha – Ecuador.

Mayra Alejandra Padilla Calderón

Luz María Granados, M. Sc.,
Director de la tesis



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

Fernando Salas, M. Sc.,
Miembro del Comité de Tesis

Gabriela Chávez, PCV.,
Director del programa

Ivette Dueñas, M. Sc.,
Decano 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: Mayra Alejandra Padilla Calderón

C. I.: 1803642634

Fecha: mayo del 2015.

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a mis padres por la confianza y el apoyo incondicional durante toda mi carrera.

Agradecimientos

Un agradecimiento a mi directora, Luz María Granados, por el apoyo y el tiempo dedicado a este trabajo.

Resumen

Las concentraciones de progesterona (P_4) al momento de la inseminación artificial (IA) en vaquillas (n=20), vacas primíparas (n=21), multíparas (n=22) y repetidoras (n=21) de raza Holstein fueron determinadas por medio de un inmunoensayo enzimático competitivo y relacionados con la tasa de concepción y producción láctea. Los animales fueron sincronizados con el uso de prostaglandina $F_{2\alpha}$ intramuscular (2ml) e inseminados bajo la regla a.m.-p.m. El seguimiento de retorno al estro se realizó diariamente hasta el diagnóstico de gestación por palpación rectal (45 días post-IA). Las concentraciones de progesterona variaron en un rango de 0,05 a 0,72 ng/ml. Éstas fueron significativamente diferentes en el grupo de vaquillas ($P<0,01$) con un comportamiento en promedio superior. Los niveles de P_4 del grupo de vaquillas en esta investigación difirió del promedio reportado en estudios anteriores ($P<0,01$) con concentraciones de $0,50\pm 0,17$ vs. $0,20\pm 0,12$ ng/ml respectivamente. En los grupos de vacas primíparas, multíparas y repetidoras de este estudio (n=64) la tasa de concepción obtenida dependió ($P<0,05$) del nivel bajo (0,05-0,27 ng/ml), medio (0,28-0,50 ng/ml) o alto (0,51-0,72 ng/ml) de concentraciones de P_4 al momento de la IA. Mientras que el grupo de vaquillas alcanzó tasas de concepción (85%) significativamente superiores ($P<0,01$) en relación a los grupos de multíparas (36%) y repetidoras (33%), independientemente del nivel de P_4 presentado. Adicionalmente, las concentraciones de P_4 al momento de la IA en las vacas lactantes gestantes (n=27) fueron en promedio significativamente ($p<0,05$) inferiores ($0,24\pm 0,09$ vs. $0,31\pm 0,41$ ng/ml). Finalmente, el nivel de producción láctea no estuvo relacionado ($P>0,05$) con las concentraciones de progesterona ni la tasa de concepción obtenida ($P>0,05$). En conclusión, se evidencia que las concentraciones de P_4 del grupo de vaquillas muestran un comportamiento superior a las de primíparas, multíparas y repetidoras tanto en este estudio como al ser comparadas con valores referenciales publicados.

Palabras clave: progesterona, concepción, inseminación, producción, Holstein.

Abstract

Progesterone (P₄) concentrations at the time of artificial insemination (AI) in Holstein heifers (n = 20), primiparous (n = 21), multiparous (n = 22) and repeat-breeders cows (n = 21) were determined through a competitive enzyme immunoassay and related to conception rate and milk production. The animals were synchronized with a single intramuscular dose of prostaglandin F_{2α} (2ml) and inseminated under the am-pm rule. Return to estrus observation was performed daily until pregnancy diagnosis by rectal palpation (45 days post-AI). Progesterone concentrations varied in a range of 0,05 to 0,72 ng/ml. These values were different in heifers (P <0.01) with a significantly higher mean. P₄ levels in heifers of this study differed from the reported mean of previous studies (P <0.01) with concentrations of 0,50 ± 0,17 vs. 0,20 ± 0,12 ng/ml respectively. In this study, conception rates in primiparous, multiparous and repeat-breeders were significantly dependent (P <0.05) of low (0,05 to 0,27 ng/ml), medium (0,28 to 0,50 ng/ml) or high (0,51 to 0,72 ng/ml) P₄ concentrations of at the time of AI. In contrast, heifers reached a conception rate (85%) significantly higher (P <0.01) compared to multiparous (36%) and repeat-breeders (33%), regardless of the level of P₄ presented. Additionally, concentrations of P₄ at the time of AI in lactating pregnant cows (n = 27) were on average significantly (P <0.05) lower (0,24 ± 0,9 vs. 0,31 ± 0,41 ng/ml). Finally, milk production was not related (P > 0.05) to progesterone concentrations and conception rate (P > 0.05). In conclusion, it is evident that P₄ concentrations of heifers showed higher levels in comparison with primiparous, multiparous and repeat-breeders either in this study as in comparison with reference values published.

Key words: progesterone, conception, insemination, production, Holstein.

CONTENIDO

Resumen	7
Abstract.....	8
INTRODUCCIÓN.....	14
REVISIÓN DE LITERATURA	18
1. Progesterona	18
1.1. Biosíntesis	18
1.2. Secreción y regulación	21
1.3. Mecanismo de acción.....	24
2. Ciclo estral.....	27
2.1. Fase lútea	28
2.1.1. Metaestro.....	28
2.1.2. Diestro	31
2.2. Fase Folicular	37
2.2.1. Proestro	38
2.2.2. Estro	42
2.2.3. Ovulación	45
3. Importancia de la progesterona en la pérdida embrionaria.....	47
4. Factores envueltos en la eficiencia de la reproducción	50
5. Digitalización de información	53
Identificación Del Problema.....	54
Hipótesis	55
Objetivos.....	56
General.....	56
Específicos.....	56
METODOLOGÍA Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	57
Animales.....	57
Manejo	57
Toma de muestras	58
Análisis hormonal.....	58
Digitalización de referencias bibliográficas	59
Análisis Estadístico	60
RESULTADOS	63
Tasa de concepción.....	63
Concentraciones de progesterona a la IA entre los estados reproductivos.....	66
Concentraciones de progesterona de la investigación versus literatura publicada.....	68
Concentraciones de progesterona al momento de la IA y tasa de concepción	69
Concentraciones de progesterona en gestantes y vacías.....	74
Progesterona al momento de la IA y producción láctea	76

Tasa de concepción y producción láctea	77
DISCUSIÓN	79
Inclusión de animales	79
Concentraciones de progesterona a la IA entre estados reproductivos	80
Tasa de concepción entre estados reproductivos	81
Concentraciones de progesterona y tasa de concepción	82
Concentraciones de progesterona al momento de IA en gestantes y vacías.....	83
Concentraciones de progesterona de la investigación versus literatura	84
Producción láctea y eficiencia reproductiva	87
CONCLUSIONES	88
RECOMENDACIONES	90
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
APÉNDICES	107

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA SÍNTESIS DE ESTEROIDES	21
FIGURA 2. MECANISMO DE RETROALIMENTACIÓN DE ESTRADIOL Y PROGESTERONA.....	24
FIGURA 3. DINÁMICA DEL DESARROLLO FOLICULAR OVÁRICO Y SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS DURANTE EL CICLO ESTRAL BOVINO DE 2 Y 3 ONDAS	34
FIGURA 4. CONCENTRACIONES DE PGFM, PROGESTERONA Y ESTRADIOL DURANTE EL PROCESO DE LUTEÓLISIS.	41
FIGURA 5. PERÍODO PRELUTEOLÍTICO, LUTEOLÍTICO Y POSLUTEOLÍTICO EN BASE A NIVELES DE PROGESTERONA	42
FIGURA 6. VOLUMEN DE TEJIDO LÚTEO Y CONCENTRACIONES SÉRICAS DE PROGESTERONA NORMALIZADOS AL TIEMPO DE LUTEÓLISIS EN VAQUILLAS Y VACAS LACTANTES	42
FIGURA 7. CONCENTRACIONES DE P ₄ , LH, FSH, PRL Y PGFM EN LA FASE FOLICULAR	48
FIGURA 8. TASA DE CONCEPCIÓN TOTAL EN LOS DIFERENTES ESTADOS REPRODUCTIVOS.....	63
FIGURA 9. TASA DE CONCEPCIÓN A LA PRIMERA INSEMINACIÓN.....	63
FIGURA 10. TASA DE CONCEPCIÓN A LA SEGUNDA INSEMINACIÓN	64
FIGURA 11. DIAGRAMA DE CAJA DE LAS CONCENTRACIONES DE P ₄ AL MOMENTO DE LA IA EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO (N=84).....	67
FIGURA 12. DIAGRAMA DE CAJA DE LA RELACIÓN ENTE LAS CONCENTRACIONES DE P ₄ EN LA INVESTIGACIÓN ACTUAL VERSUS LA LITERATURA REPORTADA.....	69
FIGURA 13. DIAGRAMA DE CAJA DE LAS CONCENTRACIONES DE P ₄ AL MOMENTO DE LA IA EN LOS ANIMALES GESTANTES POST-IA DE LOS GRUPOS DE VAQUILLAS, PRIMÍPARAS, MULTÍPARAS Y REPETIDORAS.....	73
FIGURA 14. DIAGRAMA DE CAJA DE LAS CONCENTRACIONES DE P ₄ AL MOMENTO DE LA IA EN LOS ANIMALES NO GESTANTES POST-IA DE LOS GRUPOS DE VAQUILLAS, PRIMÍPARAS, MULTÍPARAS Y REPETIDORAS.....	73
FIGURA 15. DIAGRAMA DE CAJA DE LAS CONCENTRACIONES DE P ₄ AL MOMENTO DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN GESTANTES Y VACÍAS.	75
FIGURA 16. DIAGRAMA DE CAJA DE LAS CONCENTRACIONES DE P ₄ AL MOMENTO DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL DE VAQUILLAS GESTANTES Y VACÍAS.	75
FIGURA 17. DIAGRAMA DE CAJA DE LAS CONCENTRACIONES DE P ₄ AL MOMENTO DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL DE PRIMÍPARAS, MULTÍPARAS Y REPETIDORAS GESTANTES Y VACÍAS..	76
FIGURA 18. GRÁFICO DE DISPERSIÓN DE LA CORRELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA AL MOMENTO DE IA Y LA PRODUCCIÓN LECHERA	76

LISTA DE ILUSTRACIONES

ILUSTRACIÓN 1. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS ORGANELOS CELULARES, PRINCIPALES FUENTES DE COLESTEROL Y LAS ENZIMAS CLAVE INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO DE COLESTEROL POR LOS TEJIDOS GONADALES Y SUPRARRENALES PARA BIOSÍNTESIS DE ESTEROIDES.	20
ILUSTRACIÓN 2. VÍA ESTEROIDOGÉNICA EN UNA CÉLULA LÚTEA GENÉRICA	20
ILUSTRACIÓN 3. FASES DEL CICLO ESTRAL.	28

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. TEJIDOS Y TIPOS CELULARES QUE EXPRESAN RECEPTORES PR	25
TABLA 2. DESCRIPCIÓN DE LOS GRUPOS DE INVESTIGACIÓN.	57
TABLA 3. TASAS DE CONCEPCIÓN EN VAQUILLAS, PRIMÍPARAS, MULTÍPARAS Y REPETIDORAS 64	64
TABLA 4. COMPARACIÓN DE TASA DE CONCEPCIÓN GENERAL ENTRE GRUPOS DE ESTUDIO ..	64
TABLA 5. COMPARACIÓN DE TASA DE CONCEPCIÓN A LA PRIMERA IA ENTRE GRUPOS DE ESTUDIO.....	65
TABLA 6. COMPARACIÓN DE TASA DE CONCEPCIÓN A LA SEGUNDA IA ENTRE GRUPOS DE ESTUDIO.....	65
TABLA 7. MEDIAS Y MEDIANAS DE PROGESTERONA DE LOS ESTADOS REPRODUCTIVOS (NG/ML).....	66
TABLA 8. COMPARACIÓN DE CONCENTRACIONES DE P ₄ AL MOMENTO DE LA IA EN LOS CUATRO ESTADOS REPRODUCTIVOS	66
TABLA 9. MEDIA DE LAS CONCENTRACIONES DE P ₄ EN ESTA INVESTIGACIÓN Y LAS OBTENIDAS MEDIANTE DIGITALIZACIÓN DE REFERENCIAS (NG/ML)	68
TABLA 10. COMPARACIÓN DE CONCENTRACIONES DE P ₄ AL MOMENTO DE LA IA EN ESTA INVESTIGACIÓN Y LAS OBTENIDAS MEDIANTE DIGITALIZACIÓN DE REFERENCIAS GENERAL Y EN VACAS LACTANTES.....	68
TABLA 11. EVALUACIÓN DE DEPENDENCIA DE NIVELES DE P ₄ Y TASA DE CONCEPCIÓN.....	69
TABLA 12. TASAS DE CONCEPCIÓN GENERAL, A LA PRIMERA Y SEGUNDA IA SEGÚN EL NIVEL DE CONCENTRACIONES DE P ₄	70
TABLA 13. COMPARACIÓN DE TASA DE CONCEPCIÓN GENERAL SEGÚN EL NIVEL DE CONCENTRACIONES DE P ₄	70
TABLA 14. COMPARACIÓN DE TASA DE CONCEPCIÓN A LA PRIMERA IA SEGÚN EL NIVEL DE CONCENTRACIONES DE P ₄	70
TABLA 15. COMPARACIÓN DE TASA DE CONCEPCIÓN A LA SEGUNDA IA SEGÚN EL NIVEL DE CONCENTRACIONES DE P ₄	71
TABLA 16. EVALUACIÓN DE DEPENDENCIA DE NIVELES DE P ₄ Y TASA DE CONCEPCIÓN EN VAQUILLAS Y VACAS LACTANTES.	71
TABLA 17. TASAS DE CONCEPCIÓN EN VAQUILLAS SEGÚN LOS NIVELES DE CONCENTRACIONES DE P ₄	71

TABLA 18. COMPARACIÓN DE TASA DE CONCEPCIÓN DE VAQUILLAS SEGÚN EL NIVEL DE CONCENTRACIONES DE P_4	72
TABLA 19. COMPARACIÓN DE TASA DE CONCEPCIÓN DE VACAS LACTANTES SEGÚN EL NIVEL DE CONCENTRACIONES DE P_4	72
TABLA 20. MEDIAS DE LAS CONCENTRACIONES DE P_4 EN GESTANTES Y VACÍAS	74
TABLA 21. COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE P_4 AL MOMENTO DE LA IA EN GESTANTES Y VACÍAS GENERAL Y EN VAQUILLAS	74
TABLA 22. COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE P_4 AL MOMENTO DE LA IA EN VACAS LACTANTES GESTANTES Y VACÍAS.....	74
TABLA 23. EVALUACIÓN DE DEPENDENCIA DE PRODUCCIÓN LÁCTEA Y TASA DE CONCEPCIÓN	77
TABLA 24. TASA DE CONCEPCIÓN EN VACAS LACTANTES SEGÚN EL NIVEL DE PRODUCCIÓN LÁCTEA.....	77
TABLA 25. COMPARACIÓN DE TASA DE CONCEPCIÓN ENTRE NIVELES DE PRODUCCIÓN LÁCTEA.....	77
TABLA 26. COMPARACIÓN DE TASA DE CONCEPCIÓN ENTRE NIVELES DE PRODUCCIÓN LÁCTEA.....	78
TABLA 27. CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA AL DÍA DEL ESTRO DEL CICLO ANTERIOR.....	87

INTRODUCCIÓN

La fertilidad de las vacas lecheras ha declinado en las últimas cinco décadas tanto como el nivel de producción ha incrementado. Se han realizado revisiones de literatura enfocadas en determinar las posibles causas que afectan a su desempeño (Walsh, Williams y Evans, 2011; Wiltbank, Lopez, Sartori, Sangsritavong y Gümen, 2006); sin embargo, este deterioro se encuentra relacionado a la interacción de factores genéticos, ambientales y de manejo que dificultan el establecimiento de una causa específica (Walsh et al., 2011).

Los perfiles de progesterona (P_4) han sido utilizados para evaluar el comportamiento ovárico post parto en vacas lecheras (Lamming y Darwash, 1998; Opsomer, Coryn, Deluyker y Kruif, 1998). Como resultado se ha encontrado que los animales de alto rendimiento en la producción láctea han mostrado una elevada incidencia de disfunciones ováricas, ya que la mitad de éstas han presentado un retraso de la ciclicidad u ovulación y una prolongada fase lútea (Opsomer et al., 1998). De igual manera, se ha reportado un 32% de animales con, por lo menos, un ciclo atípico que contribuye a la disminución de la eficiencia reproductiva por medio del incremento del número de servicios y el retraso de la concepción (Lamming y Darwash, 1998), además de la creciente evidencia de una asociación entre la supervivencia de embriones y las concentraciones de P_4 tanto en el ciclo anterior a la ovulación como la primera fase lútea luego de la inseminación (Diskin, Murphy y Sreenan, 2006; Morris y Diskin, 2008). Este punto tiene gran relevancia, ya que las vacas lecheras modernas pueden tener bajos niveles de ésta como resultado de una alta ingesta de materia seca y su elevada producción de leche (Hommeida, Nakao y Kubota, 2004; Sangsritavong, Combs, Sartori, Armentano y Wiltbank, 2002).

El proestro se caracteriza por elevadas concentraciones de estradiol (E_2) y niveles

basales de progesterona que dependen de la presencia, tamaño y función de un folículo dominante conjuntamente con la regresión del cuerpo lúteo; siendo la inadecuada luteólisis una causa de la reducción de la fertilidad, sobretodo cuando se usa protocolos con inseminación a tiempo fijo (Wiltbank et al., 2014). Los estudios realizados en vaquillas sobre las concentraciones de P_4 en el día de la inseminación artificial (IA) han sugerido que los animales con niveles suprabasales tienen una mayor probabilidad de convertirse en repetidoras (Båge, Gustafsson, Larsson, Forsberg y Rodríguez-Martínez, 2002; Båge, 2003). Resultados similares se han observado en vacas lactantes, las cuales han mostrado niveles de progesterona superiores en no gestantes comparadas con las gestantes (Ambrose, Gobikrushanth, Zuidhof y Kastelic, 2014) y en vacas fuera de la lactancia en donde valores equivalentes se relacionaron con la formación de quistes anovulatorios (Robinson, Hunter y Mann, 2006), lo que sugiere que la aplicación de técnicas que optimicen la longitud del proestro y las concentraciones de P_4 y E_2 durante éste pueden producir mejoras sustanciales en la fertilidad y la reducción de la pérdida embrionaria (Wiltbank et al., 2014).

Por otro lado, el efecto del nivel de producción láctea sobre la fertilidad puede ser cuestionable, ya que los estudios realizados a gran escala han determinado que ésta no se ha visto afectada por el alto rendimiento al momento de la inseminación (García-Ispierto et al., 2007; López-Gatius, Santolaria y Almería, 2005a; López-Gatius, Santolaria, Mundet y Yániz, 2005b). Sin embargo, también se ha reportado información de una menor tasa de concepción y el incremento del número de inseminaciones en vacas de alto nivel productivo lácteo. Sorprendentemente, al evaluar los hatos de alta intensidad, sus animales han mostrado un bajo conteo de células somáticas y menos días al primer servicio. Al mismo tiempo, dentro de estos, las vacas con mayor rendimiento han evidenciado un mal

desempeño en relación a las dos características (Windig, Calus y Veerkamp, 2005). Por este motivo, se ha propuesto que las prácticas de manejo que se aplican en los sistemas de producción de alta intensidad pueden ayudar a mejorar el nivel de salud y fertilidad en vacas de altas productoras. Sin embargo, esta condición también las hace más propensas a desarrollar problemas de salud y reproductivos (Windig, Calus y Veerkamp, 2005; Opsomer et al., 1998).

En el Ecuador, la información publicada sobre temas de producción y reproducción en el ganado vacuno es muy escasa. Los datos del último censo agropecuario fueron colectados en el año 2002 (MAGAP, 2002). En consecuencia, la magnitud actual de la explotación ganadera es incierta, ya que no existen datos reales sobre el crecimiento de éste sector durante los años transcurridos. Los estudios que se han realizado con anterioridad sobre reproducción en vacas lecheras se han enfocado en la mejora de los parámetros reproductivos por medio de la aplicación de hormonas. Los resultados obtenidos han sido variables, ya que no se ha logrado un completo cumplimiento de lo pronosticado según los reportes previos en el tema (Pérez, 2008; Gallmeier, 2013). En dos investigaciones realizadas en haciendas diferentes de la serranía ecuatoriana se observó que las concentraciones de progesterona durante el ciclo y al momento de la inseminación artificial mostraron un patrón diferente (Freile y Añasco, 2011, Datos no publicados; Gallmeier, 2013) generando confusión en cuanto al comportamiento hormonal y reproductivo de las vacas lecheras la zona.

Con base a lo mencionado, es importante establecer las concentraciones de progesterona al momento de la inseminación artificial y compararla con los valores presentados en publicaciones anteriores con el fin de despejar la confusión creada. Del mismo modo, evaluar la su influencia de la producción láctea en cuanto al comportamiento

hormonal y su efecto en la tasa de concepción; para así promover el desarrollo de estrategias adecuadas a su comportamiento reproductivo que permitan alcanzar un mejor nivel productivo.

REVISIÓN DE LITERATURA

1. Progesterona

1.1. Biosíntesis

El sustrato para la esteroidogénesis es el colesterol. En condiciones normales la mayor parte se sintetiza en el hígado (Krisans, 1996) y se transporta en forma de lipoproteínas a los órganos esteroidogénicos tales como la corteza adrenal, el folículo, el cuerpo lúteo y los testículos. Las lipoproteínas de alta y baja densidad (LDL y HDL) son las fuentes más comunes de colesterol para la síntesis de hormonas esteroideas en el cuerpo lúteo (Hwang y Menon, 1983).

La captación de LDL por las células lúteas ocurre por endocitosis mediada por receptores (Brown y Goldstein, 1986). Una vez internalizado, los endosomas se combinan con los lisosomas en donde se disocia de su receptor y es dividido produciendo colesterol libre para la célula. Entonces, este receptor es reciclado o degradado (Grummer y Carroll, 1988). Por otro lado, se ha mencionado que la captación extracelular de HDL se produce mediante una proteína de unión en la membrana plasmática siendo transportada por un mecanismo de endocitosis diferente al de receptores (Ilustración 1) (Johnson, Phillips y Rothblat, 1997). Aunque su importación mediante el receptor scavenger tipo 1, clase B (SR-B1) ha sido dilucidado (Acton et al., 1996). Mostrándose un incremento en su expresión en el CL bovino durante la luteinización tanto in vivo como in vitro (Rajapaksha, McBride, Robertson y O'shaughnessy, 1997).

Una vez presente en el citosol, el colesterol puede ser usado para la esteroidogénesis, la formación de membranas o para ser esterificado en ácidos grasos y así formar ésteres de colesterol por medio de la colesterol esterasa sintetasa y ser almacenados (Johnson et al., 1997). Los ésteres de colesterol a menudo forman gotas de lípidos que han

sido usadas para identificar a las células esteroideogénicas. La colesterol esterasa los hidroliza para producir colesterol libre para la célula. Éste es uno de los primeros pasos de la esteroideogénesis que se encuentra bien controlado por las vías de los segundos mensajeros, ya que la colesterol esterasa se activa cuando es fosforilada por la proteína quinasa (PKA) (Caffrey, Fletcher, Diekman, O'callaghan y Niswender, 1979).

Cuando es necesario, el colesterol es transportado desde el citosol a la mitocondria por medio de la proteína Star (Bose, Whittal, Baldwin y Miller, 1999). Posteriormente, el citocromo P450 (P-450_{scc}), adrenoxodina y adrenoxodina reductasa escinden la cadena lateral del colesterol para convertirlo en pregnenolona (Niswender, Juengel, Silva, Rollyson y McIntush, 2000). Esta es transportada al retículo endoplasmático liso que, normalmente, se encuentra asociado a la mitocondria, donde por medio de la enzima 3 β -HSD, se convierte en progesterona (Hanukoglu, 1992; Niswender, 2002).

Las hormonas luteotrópicas incrementan la síntesis de P₄ en las células luteales pequeñas mediante la activación de la PKA que estimula el transporte de colesterol hacia el complejo enzimático P450_{scc} (Wiltbank, Belfiore, Niswender, 1993). Sin embargo, este efecto no se observa en las células luteales grandes (Ilustración 2).

En el folículo la progesterona está relacionada con la síntesis del estradiol. Éste es dependiente de la producción de andrógenos por las células de la teca y la subsecuente aromatización de éstos a estrógenos en las células de la granulosa en un modelo conocido como dos células/dos gonadotropinas. En este modelo, el ARNm de FSH-R y P450_{arom} se encuentran exclusivamente en las células de la granulosa. El de P450 17 α -hidroxilasa/C17-20liasa (P450_{c17}) y Star en las de la teca. Mientras que el de LH-R, P450_{scc} y 3 β -HSD en ambos tipos celulares (Bao et al., 1997).

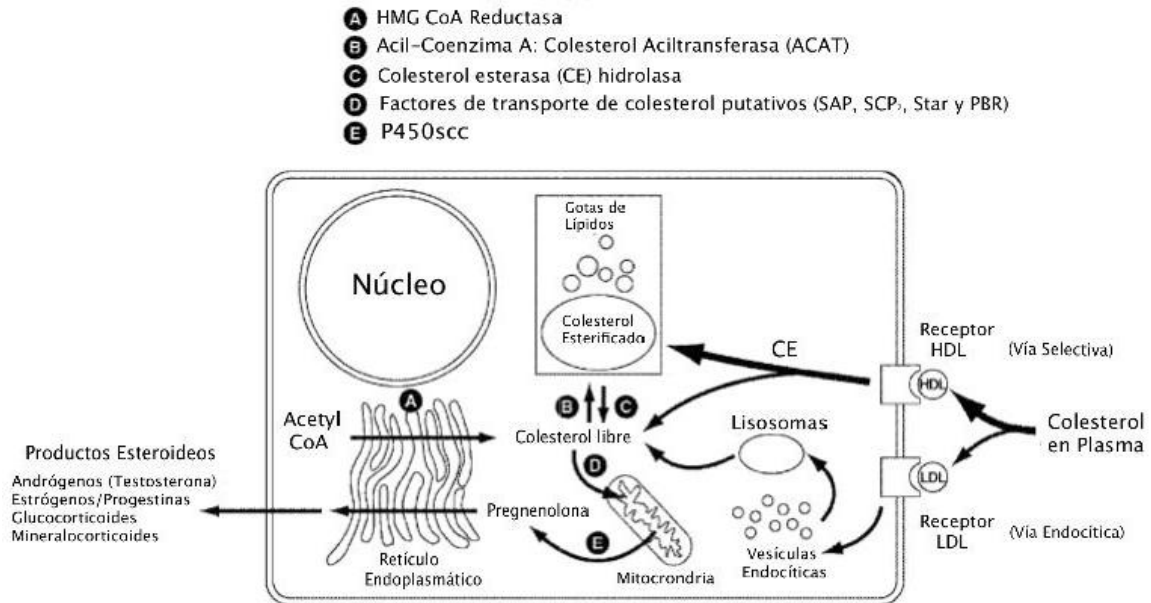


Ilustración 1. Representación esquemática de los organelos celulares, principales fuentes de colesterol y enzimas clave involucradas en el metabolismo de colesterol por los tejidos gonadales y suprarrenales para biosíntesis de esteroides. HDL, lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; CE, colesterol esterasa; SAP, polipéptido activador de esteroidogénesis; SCP₂, proteína transportadora de esteroides 2; Star, proteína reguladora de esteroidogénesis aguda; PBR, receptor benzodiazepínico de tipo periférico; CS, citoesqueleto; VS, vesículas. Tomado de Azhar y Reaven, 2002.

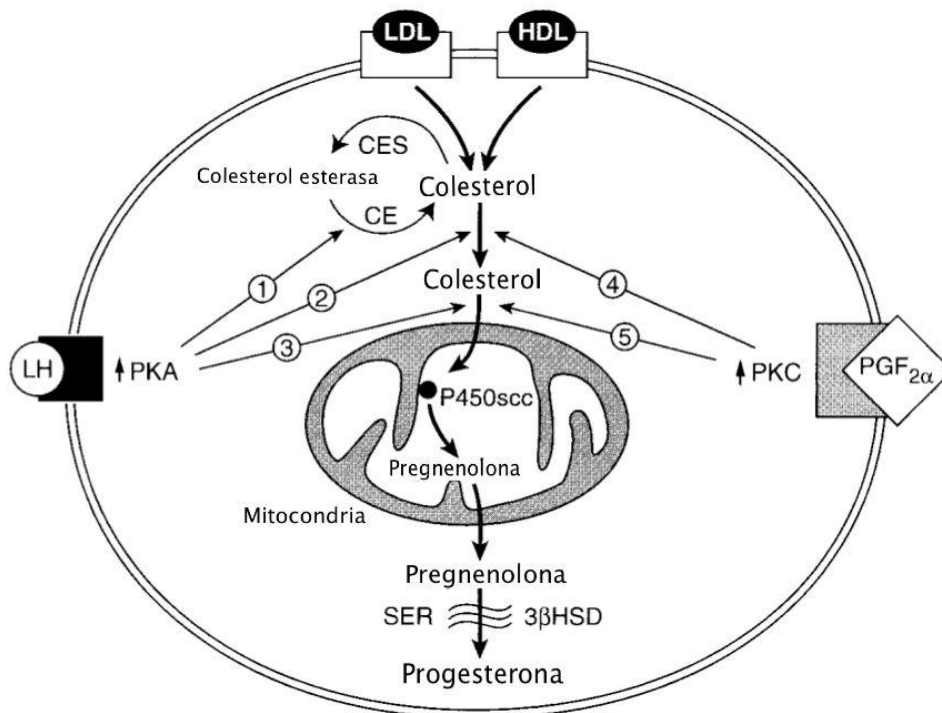


Ilustración 2. Vía esteroidogénica en una célula lútea genérica. La activación de PKA promueve la actividad de la colesterol esterasa (1), el transporte de colesterol a través del citoplasma (2) y transporte de colesterol de afuera hacia adentro de la membrana mitocondrial (3). La activación de PKC disminuye el transporte de colesterol a través del citoplasma (4) y de afuera hacia adentro de la membrana mitocondrial (5). Tomado de Niswender et al., 2000.

Es decir, que los dos pueden convertir el colesterol en progestinas (progesterona o pregnenolona) (Fortune y Quirk, 1988). Pero, como la conversión de la progesterona a androstendiona está mediada por la enzima P450c17 que se encuentra ausente en las células de la granulosa (Pelletier et al., 2001), éstas no pueden convertirlas en andrógenos. Sin embargo, tienen la capacidad de transformar a las progestinas producidas por la teca en estradiol (Bao y Garverick, 1998). En el cuerpo lúteo, ambos tipos celulares la producen y sintetizan andrógenos aromatizables (Stocco, Telleria y Gibori, 2007) (Figura 1).

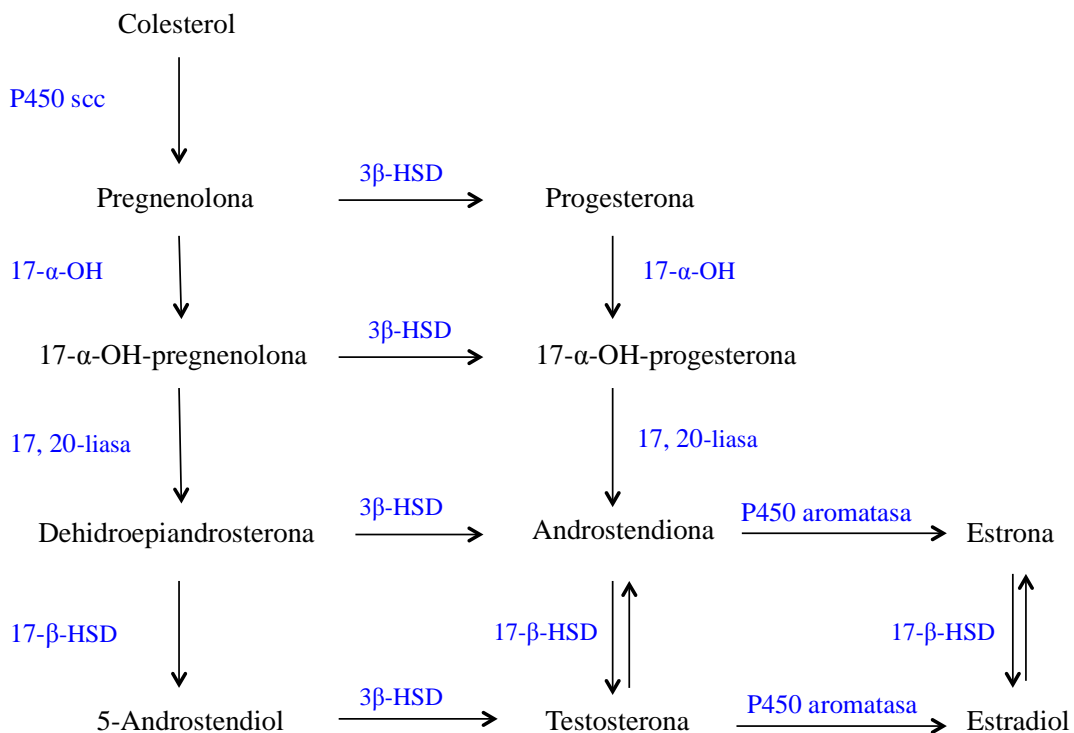


Figura 1. Representación esquemática de la síntesis de esteroides. Tomado de Svensson, 2000.

1.2. Secreción y regulación

Las concentraciones de progesterona en el suero son dependientes del flujo sanguíneo además de la cantidad y capacidad esteroidogénica del tejido. Esta última depende del número y tamaño de las células luteales, que incrementa en la fase lútea del

ciclo. Por otro lado, las hormonas que soportan el crecimiento del cuerpo lúteo y su función han sido nombradas como luteotrópicas e incluyen a LH, GH, prolactina (PRL), IGF-I, oxitocina PGE₂ y PGI₂ (Niswender et al., 2000). Se ha demostrado que la prolactina no cumple un papel esencial en la función del cuerpo lúteo en vacas y ovejas. Sin embargo, un bloqueo de la LH puede producir una pérdida del peso y/o contenido lúteo de progesterona (Fuller y Hansel, 1970). Aunque la LH es luteotrópica en la mayoría de mamíferos, los requerimientos de sus pulsos para regular la secreción de progesterona varían gradualmente. De modo que, su secreción pulsátil es esencial para el mantenimiento del cuerpo lúteo en los primates y para el desarrollo del mismo en bovinos, pero no para su continua secreción de P₄ (Niswender et al., 2000).

En los bovinos, las concentraciones fisiológicas de LH aumentan la secreción de P₄ por parte de las células luteales pequeñas, pero no de las grandes (Alila, Dowd, Corradino, Harris y Hansel, 1988a). Aunque se ha comprobado que existen receptores en los dos tipos (Chegini, Lei, Rao y Hansel, 1991). En ovinos y bovinos, la unión de ésta a su receptor activa el adenilato de ciclasa lo que incrementa los niveles de AMP cíclico (cAMP) y en última instancia produce la activación de PKA (Davis, May y Keel, 1996). Esta activación eleva ligeramente la liberación de colesterol por medio de la colesterol esterasa, pero no influye en las concentraciones de ARNm de P450_{scc} ó 3β-HSD lo que muestra que el efecto de LH sobre la producción de P₄ es independiente de la transcripción. Sin embargo, PKA incrementa la cantidad de Star en la forma fosforilada y parece estimular el transporte de colesterol. Lo que representa un paso clave en la regulación aguda de la síntesis de progesterona (Niswender et al., 2000) (Ilustración 2). Adicionalmente, aunque las células luteales grandes no aumentan su producción mediante la acción de LH estas secretan altos niveles basales de P₄. Ya que su sistema PKA puede estar activado constitutivamente en este tipo de células (Hoyer, Fitz y Niswender, 1984).

Por otro lado, la hormona de crecimiento (GH) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IFG-I) incrementan la secreción de P_4 dentro del tejido luteal (Niswender et al., 2000). La GH podría tener un efecto directo mediante la unión a su receptor y la activación de la tirosina quinasa JAK2 que se encuentra asociada a la membrana (Argetsinger et al., 1993), además de un efecto indirecto al incrementar los niveles de IGF-I o de su ARNm (Juengel, Nett, Anthony y Niswender, 1997). Este IGF-I promueve la producción de P_4 mediante la activación de segundos mensajeros que se relacionan con la modificación del citoesqueleto además de estar envueltos en la prevención de muerte celular. Por lo tanto, el IGF-I simultáneamente estimula su producción a través de la modificación del citoesqueleto, mientras la inhibición de la muerte celular puede ayudar a mantener el peso lúteo (Davis et al., 1996). Se ha encontrado receptores tanto de GH como de IGF-I en las células lúteas grandes, por lo que estos pueden ser importantes para el mantenimiento de los altos niveles basales de progesterona secretados por estas (Niswender et al., 2000).

Adicionalmente, PGI_2 y PGE_2 son producidas tanto en el período temprano como tardío de la fase lútea y se ha propuesto que desempeña un rol importante en el desarrollo del CL (McCracken, Glew y Scaramuzzp, 1970). Se ha observado que la inhibición de la oxitocina suprime la síntesis de PGI_2 . Y la adición de esta al tejido lúteo de vacas, ovejas y humanos incrementa la secreción de progesterona. Los mismos resultados se han encontrado en ovejas y vacas al administrar PGE_2 (Alila, Corradino y Hansel, 1988b). Ya que esta también eleva el AMPc y presumiblemente activa PKA (Niswender et al., 2000).

Por último, la progesterona junto con el estradiol suprimen la liberación de la gonadotropina secretada por la pituitaria en la fase lútea del ciclo (Figura 2). De modo que, después de la ovulación reduce gradualmente la frecuencia e incrementa la amplitud de los pulsos de GnRH/LH. Sin embargo, cuando el cuerpo lúteo involuciona espontáneamente,

los niveles de progesterona bajan, lo que permite un incremento rápido y progresivo de la GnRH (Tomac, Cekinović y Arapović, 2011).

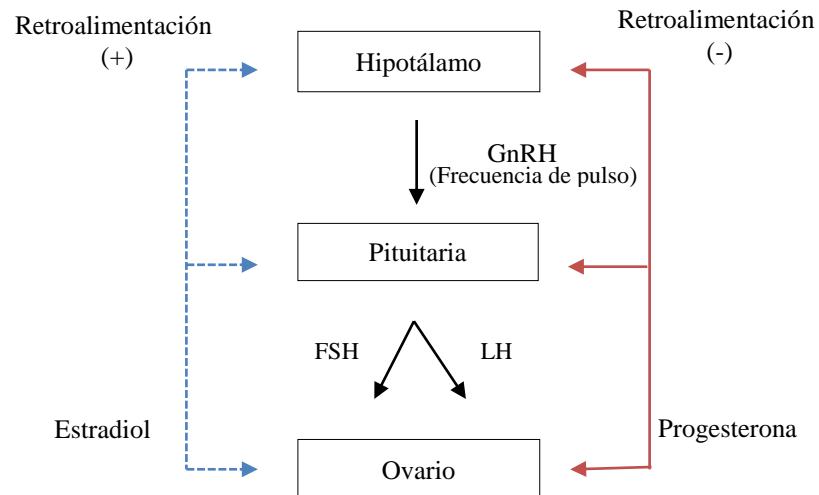


Figura 2. Mecanismo de retroalimentación de estradiol y progesterona. Tomado de Aerts y Bols, 2010.

1.3.Mecanismo de acción

En el caso de los esteroides, sus receptores se localizan en el citoplasma o en el núcleo de las células diana. La interacción de la hormona con su receptor conlleva a la activación de la translocación del complejo hacia el núcleo, donde se une a puntos específicos de la cromatina. El resultado es la producción de un ARNm que atraviesa el núcleo hacia los ribosomas, donde dirige la síntesis de las proteínas que producen el resultado biológico deseado (Cunningham y Klein, 2009). La vía clásica por la que la progesterona realiza su función es por medio de su receptor (PR) que, al igual que el receptor de estrógenos (ER), ha sido descrito como un factor de transcripción nuclear actuando a través de elementos específicos de respuesta a la progesterona (PRE) dentro de la región promotora de los genes objetivo que regulan la transcripción (Conneely y Lydon, 2000). Por otro lado, existen mecanismos alternativos no genómicos descritos para su

acción. Estos pueden ser iniciados rápidamente en la membrana celular activando vías de señales intracelulares, a través de la modulación de receptores putativos de la superficie celular, canales de iones y cascadas de segundos mensajeros citoplasmáticos (Singh, Su, Ng et al., 2013).

Se ha demostrado que a nivel del oviducto la P₄ actúa mediante receptores de la vía clásica (PR) y alternativa durante el período pos ovulatorio. Ya que se detectó la presencia de los componentes de receptores de membrana de progesterona (PGRMC)1 y 2 a lo largo del oviducto (Saint-Dizier, Sandra, Ployart, Chebrouy y Constant, 2012). Sin embargo, los receptores PR se encuentran en varios órganos (Tabla 1).

Tabla 1
Tejidos y tipos celulares que expresan receptores PR.

Tejido	Tipo Celular
Útero	Endometrio Miometrio
Ovario	Granulosa Luteinizante Granulosa Preovulatoria Cuerpo Lúteo
Órganos Reproductivos	Testículos Vagina
Glándula mamaria	Normal y neoplásica Pituitaria
Cerebro	Ventromedial Hipotálamo Área preóptica Endotelio vascular Timo
Otros	Islotes pancreáticos Células similares a osteoblastos Pulmón
Aves	Oviducto Bolsa de Fabricio

Nota: Tomado de Graham y Crakle, 1997.

Las principales funciones de la progesterona en los mamíferos se efectúan en el útero, el ovario, la glándula mamaria y el cerebro. De este modo, es responsable de la liberación de ovocitos maduros, la facilitación del proceso de implantación y el

mantenimiento de la preñez mediante el crecimiento uterino y la supresión de la contractibilidad miometral (Bennett, Watts, Blair, Waldhalm y Fuquay, 1988; Graham y Clarke, 1997). También se relaciona con el desarrollo lóbulo-alveolar en la preparación para la secreción de leche y con la supresión de síntesis de proteínas de la misma antes del parto. Adicionalmente, es una mediadora de las señales necesarias para el comportamiento sexual (Graham y Clarke, 1997).

La exposición previa a los estrógenos induce la secreción de los receptores de P_4 para que pueda actuar en el tracto reproductivo (Ing y Tornesi, 1997). En contraste, la progesterona produce el descenso de los suyos (Evans y Leavitt, 1980) y de este modo bloquea muchas de sus funciones. Un ejemplo de su acción antiestrogénica se encuentra en el oviducto en donde bloquea a proteínas secretoras inducidas por el estradiol (Verhage y Fazleabas, 1988) produciendo deciliación y cesación de la actividad secretora de su epitelio (Brenner, Carlisle, Hess, Sandow y West, 1983). Adicionalmente, se ha sugerido que la P_4 puede mejorar el desarrollo temprano del embrión a través de cambios en el entorno del oviducto durante los primeros días de gestación (Robinson, Hammond, Wathes, Hunter y Mann, 2008). Antes de la llegada al útero la parte proximal, llamada ámpula, ha sido implicada en el transporte del complejo cúmulus-ooocito y la fertilización. Mientras que la parte distal, conocida como istmo, es responsable del almacenamiento de esperma y el transporte del embrión hacia el útero (Hunter, 2012; Kölle, Reese y Kummer, 2010). Su epitelio proporciona nutrientes y factores locales de crecimiento que se pueden modificar cualitativa y cuantitativamente mediante la P_4 secretada por el cuerpo lúteo (Gerena y Killian, 1990).

En el útero actúa en el endometrio como un factor de diferenciación (Cummings y Yochim, 1984). Durante la fase folicular, los estrógenos inducen la proliferación de sus células, mientras que las elevadas concentraciones de progesterona durante la fase lútea del

ciclo inhibe la mitosis en el mismo (Padykula et al., 1989). También estimula la diferenciación estromal, la secreción glandular en asociación con la acumulación de vacuolas basales en el epitelio glandular y el cambio de patrón de proteínas secretadas por las células endometriales que proveen un ambiente adecuado para el desarrollo embrionario temprano (Maslar, Powers-Craddock y Ansbacher, 1986).

2. Ciclo estral

El inicio del ciclo estral tiene lugar hacia la mitad de la pubertad entre los seis y doce meses de edad con un peso aproximado de 200 a 250 kg. Este ciclo en los bovinos tiene una duración de 18 a 24 días (Forde et al., 2011). Aunque se ha reportado un promedio de 23 días en vacas lactantes y 20,8 en vaquillas en donde se diferencia la fase folicular (4 a 6 días) y lútea (14-18 días). Durante todo el ciclo se observan dos, tres y hasta cuatro ondas foliculares (Sartori, Haughian, Shaver, Rosa y Wiltbank, 2004) que tienen un período de emergencia, selección y dominancia que termina en la atresia u ovulación de un folículo dominante (Forde et al., 2011; Fortune, 1994). El ciclo estral está regulado por hormonas del hipotálamo (Hormona liberadora de Gonadotropinas; GnRH), la pituitaria anterior (Hormona folículo estimulante; FSH y Hormona luteinizante; LH), los ovarios (Progesterona; P₄, Estradiol; E₂ e Inhibina; Inh) y el útero (prostaglandina F_{2α}; PGF_{2α}) que lo controlan a través de una retroalimentación positiva o negativa (Roche, 1996) (Ilustración 3).

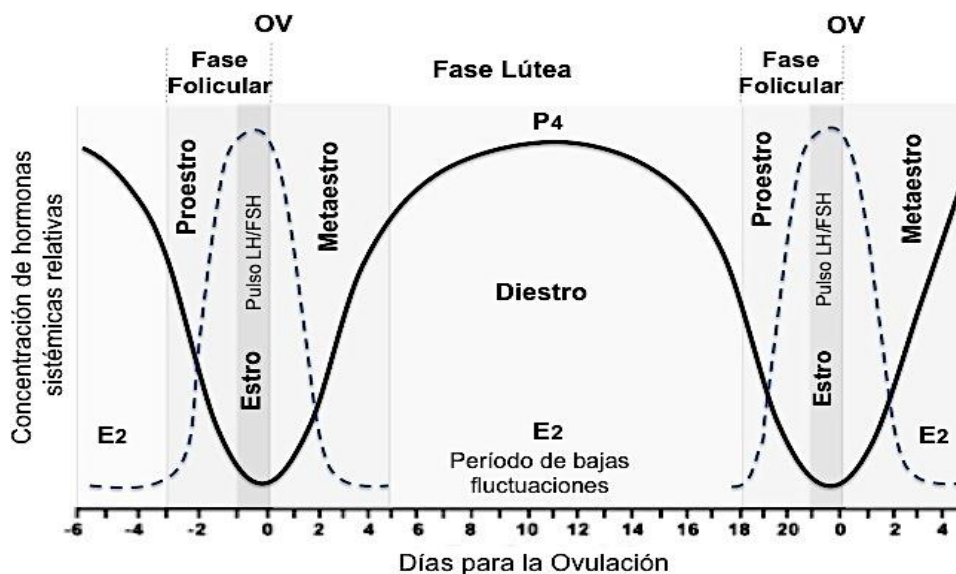


Ilustración 3. Ciclo estral. Términos y conceptos relacionados con las etapas dentro de la fase folicular y lútea en asociación a los cambios de concentraciones circulantes de estradiol (---), progesterona (—) y el aumento preovulatorio (OV) de gonadotropinas durante el ciclo estral bovino. Adaptado de Peter et al., 2009.

2.1. Fase lútea

Es el período de tiempo después de la ovulación en donde se forma el cuerpo lúteo, comprende el 80% del ciclo hasta su regresión y abarca el metaestro y diestro (Forde et al., 2011). En general, se caracteriza por el cambio de la dominancia de estrógeno a la progesterona después de la ovulación y maduración estructural del cuerpo lúteo. Además, se encuentra asociada con la emergencia periódica de ondas foliculares correspondientes a los incrementos transitorios de FSH y fluctuaciones de bajo nivel en las concentraciones sistémicas de estradiol a lo largo de la fase (Peter, Levine, Drost y Bergfelt, 2009).

2.1.1. Metaestro

El metaestro tiene lugar de 5 a 6 días luego de la ovulación. Dentro de éste se produce una intensa angiogénesis, proliferación de las células de la granulosa y teca en la pared del folículo ovulado y su consecuente diferenciación. Lo que resulta en el progresivo incremento de las concentraciones plasmáticas de progesterona desde menos de 1ng/ml al

día tres, hasta aproximadamente 3ng/ml al día seis pos ovulación (Adams, Jaiswal, Singh y Malhi, 2008).

La transformación del folículo ovulado hacia un cuerpo lúteo es el proceso llamado luteinización. En este, las células foliculares se someten a cambios estructurales y genómicos que ayudan a la diferenciación final hacia células luteales que sintetizan y liberan progesterona (Stocco et al., 2007). Como resultado, las células de la granulosa se transforman en células luteales grandes (CLG) y las de la teca en pequeñas (CLP). Adicionalmente, la vía esteroidogénica se altera haciendo que la progesterona sea la hormona esteroidea primaria producida por este tipo de células. En donde las CLP representan el 20% de la población total celular y contribuyen con, aproximadamente, el 15% de producción de progesterona, mientras que el resto es derivado a las CLG (Niswender et al., 2000). Antes de la ovulación, las células de la granulosa en el folículo sintetizan y secretan estrógenos principalmente (Graham y Clarke, 1997).

Adicional a las mencionadas, el cuerpo lúteo tiene en su estructura células no esteroidogénicas que incluyen a las endoteliales (CE), inmunes (CI), pericitos y fibroblastos (Smith y Meidan, 2014). En este complejo tejido, las células deben interactuar para lograr un crecimiento y desarrollo normal. Tanto en el caso del CL como del folículo, su proceso de crecimiento depende de la angiogénesis y el establecimiento de un suministro de sangre funcional. El flujo sanguíneo decrece luego de la ovulación, pero incrementa gradualmente en conjunto con el volumen del CL y los niveles de P₄ en plasma (Acosta, Hayashi, Ohtani y Miyamoto, 2003).

Se ha sugerido que el VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), FGF (factor de crecimiento fibroblástico), IGF (factor de crecimiento similar a la insulina) y los miembros de la familia de angiopoyetina cumplen un rol importante dentro del proceso de angiogénesis en la formación de un nuevo CL. La activación de los factores de crecimiento

habilita la quiescencia o descanso de las células endoteliales para degradar proteolíticamente su matriz extracelular subyacente. Esto con el fin de invadir y direccionalmente migrar hacia el estímulo angiogénico, proliferar y organizarse en nuevos vasos capilares tridimensionales (Augustin, 1998).

Por otro lado, el sistema IGF puede tener un efecto indirecto sobre la angiogénesis temprana del CL por la estimulación de la producción de VEGF en éste (Schams, Kosmann, Berisha, Amselgruber y Miyamoto, 2001). Hallazgos adicionales han demostrado que Ang-1, Ang-2 y sus receptores Tie1 y Tie2 también podrían tener un rol importante en la modulación de la angiogénesis y angiólisis en el CL durante el ciclo estral (Goede, Schmidt, Kimmina, Kozian y Augustin, 1998). Se piensa que el sistema Ang-Tie actúa en conjunto con el crecimiento o supervivencia de factores como el VEGF. El Ang-1 es necesario para mantener y estabilizar los vasos sanguíneos (Yancopoulos et al., 2000). Por otro lado, el Ang-2 que actúa como antagonista natural de Ang-1, parece inducir a las CE a someterse a una remodelación activa. Una alta proporción Ang-2/1 en el microambiente produce la desestabilización de los vasos sanguíneos que es requisito para la formación vascular y regresión. En estas condiciones, la presencia de un factor angiogénico como VEGF puede determinar el destino de estos vasos sanguíneos inestables. Cuando VEGF es alto, resulta en la formación de una nueva red. Mientras que su ausencia tiene lugar su regresión (Hanahan, 1997).

En los bovinos, la formación temprana de la glándula lútea se asocia, a menudo, con la presencia de una cavidad llena de sangre intra-lútea transitoria que se asemeja a un coágulo sanguíneo denominado cuerpo hemorrágico. Éste completa su transformación estructural al final del metaestro y se vuelve morfológicamente homogéneo. En asociación al incremento de P₄, el epitelio del endometrio es denudado, particularmente, en las áreas intercarunculares dando lugar a la aparición de moco con sangre en los labios de la vulva

producto de un proceso de diapédesis. Se ha mencionado que el sangrado se produce de 24 a 48 horas después del estro en el 75 a 90% de las vaquillas y en 48 a 61% de las vacas; sin embargo, no tiene una correlación con la concepción (Peter et al., 2009).

2.1.2. Diestro

El diestro empieza después del metaestro y termina con el inicio de la regresión del cuerpo lúteo (Peter et al., 2009) que se produce a los 17 ó 18 días en ausencia de concepción para dar lugar a un nuevo ciclo estral (Miyamoto, Shirasuna y Sasahara, 2009). Las diferentes fases de vida del CL son acompañadas de cambios dinámicos en la vasculatura, población celular e interacciones célula-célula (Fraser y Wulff, 2003). Sus funciones, tanto en el ciclo como en el mantenimiento de la gestación, están dadas por la progesterona que es el principal esteroide producido por éste (Stocco et al., 2007). Es así que se necesita secretar suficientes concentraciones a lo largo de la fase lútea para mantener la gestación (si la concepción se ha dado) y durante ésta para evitar que el comportamiento de estro ocurra (Forde et al., 2009). Sus niveles máximos se observan a la emergencia de la onda dos y tres en los ciclos estrales, según su número de ondas foliculares. Alcanzando un pico de concentraciones plasmáticas de P_4 alrededor del 10 al 14 pos ovulación, seguidas de una disminución debido a la luteólisis inducida por la $PGF_{2\alpha}$ liberada por el endometrio de las vacas no gestantes (Peter et al., 2009).

Durante la fase lútea de los rumiantes, las hormonas luteotrópicas que soportan el desarrollo y la función del CL incluyen a LH, GH, prolactina, IGF-I, oxitocina, PGE_2 y PGI_2 (Niswender et al., 2000). La mayoría de receptores para LH se encuentran en las células pequeñas (Kölle, Sinowatz, Boie y Lincoln, 1998). En donde ésta incrementa la producción de P_4 mediante la activación de PKA que estimula un mayor transporte de colesterol por el complejo enzimático $P450_{sc}$ (Wiltbank et al., 1993). En contraste, las

CLG responden a factores luteotrópicos como PGI_2 , PGE_2 , GH e IGF-I que no actúan sobre PKA, ya que en este tipo de células puede estar constitutivamente activada. Esto ha sido sugerido debido a su mayor producción basal de P_4 y las altas concentraciones de AMPc existentes (Hoyer et al., 1984).

Adicionalmente, miembros de la familia del factor de crecimiento transformante beta han sido encontrados en el fluido folicular a través de la modulación de la FSH secretada (Knight, 1996). Por un lado, la activina aumenta la secreción de estradiol en el fluido folicular (Knight y Glister, 2003), mientras que la folistatina impide sus efectos positivos en la esteroidogénesis. Ambas pueden modificar el mecanismo de retroalimentación del estradiol con el hipotálamo y la pituitaria (Phillips y Kretser, 1998). Conjuntamente, la inhibina detectada en las células de la granulosa desempeña un rol en la supresión de FSH secretada en la pituitaria anterior regulando también el ciclo estral (Findlay et al., 2002).

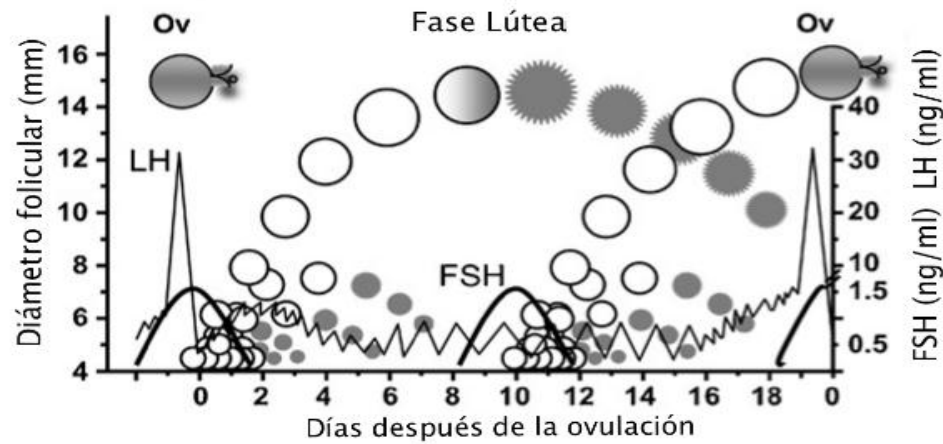
Finalmente, la progesterona liberada durante esta fase controla el desarrollo folicular mediante una retroalimentación negativa sobre los pulsos de LH (Kinder, Kojima, Bergfeld, Wehrman y Fike, 1996). Sus concentraciones medias son relativamente bajas debido a la liberación episódica infrecuente de la misma correspondiente a los pulsos de GnRH que se producen cada 4 a 6 horas. Es decir, sólo permite pulsos de alta amplitud y baja frecuencia que son inadecuados para poder llegar a la ovulación (Rahe, Owens, Fleeger, Newton y Harms, 1980). Además, evita la temprana liberación de $PGF_{2\alpha}$ en la mitad del ciclo (Skarzynski y Okuda, 1999) y desempeña un papel luteotrópico estimulando la síntesis de los receptores de LH en el CL (Jones, Ottobre y Pate, 1992). De este modo, evita el inicio de la apoptosis por un mecanismo dependiente de sus receptores (Skarzynski, Jaroszewski y Okuda, 2001).

2.1.2.1. Dinámica folicular

Durante la fase lútea, los niveles de FSH y estradiol fluctúan en relación con el crecimiento de las ondas foliculares y la atresia (Adams et al., 2008). La primera se desencadena en respuesta al segundo incremento de FSH que sigue el pico preovulatorio. Mientras que las siguientes dependen de elevaciones transitorias de la misma (Adams, Matteri, Kastelic y Ginther, 1992) (Figura 3). Se ha observado que la FSH es esencial para el crecimiento de los folículos desde 2 a 4 hasta los 7 a 9 mm, ya que regula la expresión de enzimas esteroidogénicas en las células de la granulosa durante el reclutamiento. Donde la LH, probablemente, no ejerce efecto o éste se da indirectamente estimulando la conversión de andrógenos a estrógenos, pero secundaria a FSH (Bao y Gaarverick, 1998).

Basados en el día en el que el folículo dominante de una onda alcanzó un diámetro mayor a 4mm, se ha determinado que la emergencia de la onda 1 (anovulatoria) y 2 (ovulatoria) ocurre en los días 0 (ovulación) y 10 respectivamente. Mientras que en un ciclo de tres ondas foliculares se produce alrededor de los días 0, 9 y 16 (Adams et al., 2008). La emergencia folicular ha sido asociada con una disposición jerárquica de los folículos, de manera que el más grande de la cohorte, generalmente, mantiene su posición durante la fase de crecimiento común y se convierte en dominante en la mayoría de las veces (Ginther, Bergfelt, Beg y Kot, 2001). La tasa de crecimiento es igual en todos los folículos de la onda por, aproximadamente, dos días. Luego, uno es seleccionado para continuar creciendo (folículo dominante), mientras que los demás se vuelven atrésicos y sufren regresión (folículos subordinados) (Adams et al., 2008). La desviación ocurre aproximadamente 2.5 días después de la emergencia y representa el mayor evento morfológico en el proceso de selección asociada con la onda ovulatoria y anovulatoria (Peter et al., 2009).

Intervalo interovulatorio 2-ondas



Intervalo interovulatorio 3-ondas

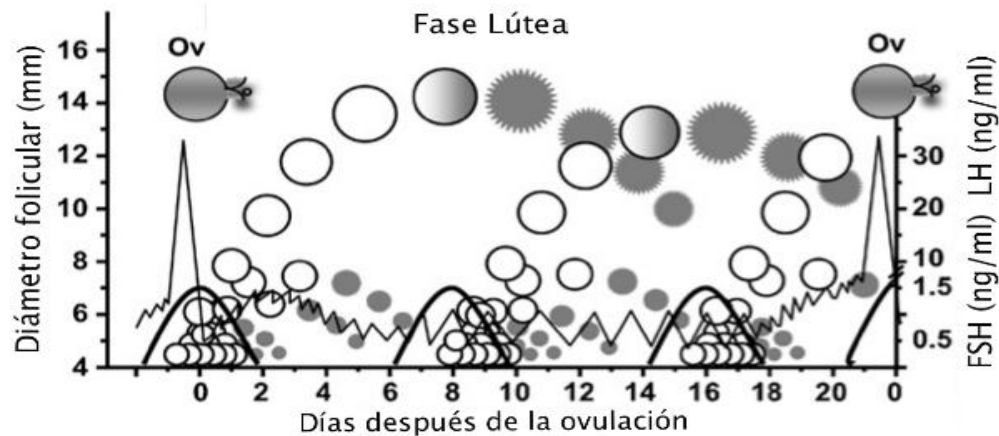


Figura 3. Dinámica del desarrollo folicular ovárico y secreción de gonadotropinas durante el ciclo estral bovino de 2 y 3 ondas. Se muestran folículos dominantes y subordinados viables (○) y atrésicos (◐). Un aumento de FSH (—) sigue a cada onda y uno de LH (—) se observa antes de la ovulación. La cual es precedida y sucedida de pulsos de LH de alta frecuencia como resultado de bajas concentraciones de P_4 . Tomado de Adams *et al.*, 2008.

Conjuntamente con el tamaño del folículo seleccionado, incrementa la producción de estradiol e inhibina que, a través de una retroalimentación negativa con la glándula pituitaria anterior, disminuyen las concentraciones de FSH a niveles basales (Sunderland, Crowe, Boland, Roche y Ireland, 1994). Entonces, este folículo seleccionado se vuelve altamente sensible a la acción de LH. Independientemente del momento del ciclo estral en el que se produce este cambio de dependencia, se lo relaciona con el aumento de los receptores LH-R en las células de la teca y la granulosa (Xu *et al.*, 1995b). Ya que al contar

con una mayor cantidad que los subordinados es capaz de responder a la LH durante el nadir de FSH (Adams et al., 2008). Existe evidencia de que un transitorio incremento en las concentraciones de la hormona luteinizante se da en el momento que la selección ocurre, lo que permite al folículo dominante crecer y continuar produciendo E₂ (Ginther, Beg, Donadeu y Bergfelt, 2003).

La súper familia del factor de crecimiento insulínico (IGF) compuesta por dos ligandos, IGF-I e IGF-II; dos receptores, IGFR-I e IGFR-II y de múltiples proteínas de unión y proteasas (IGFBP 1-6; Proteína plasmática-A asociada a la preñez, PAPP-A) son responsables de la biodisponibilidad del IGF-I en el folículo ovárico el cuál tiene efectos directos sobre sus células. Estos incluyen la estimulación de la mitogénesis en las células de la granulosa, la producción de progesterona por éstas y las células de la teca, además de la producción de andrógenos por las últimas (Spicer y Echterkamp, 1995).

Conjuntamente, el IGF-I contribuye al crecimiento, proliferación y capacidad esteroidogénica del futuro FD indirectamente, ya que afecta al mecanismo de retroalimentación negativa inducido por el estradiol sobre el hipotálamo y la pituitaria (Rosales-Torres, Guzmán y Gutiérrez, 2011). Este hecho, adicional a la temprana adquisición de receptores para LH por las células de la granulosa del folículo seleccionado, son considerados los principales mecanismos que facilitan el proceso de selección (Lucy, 2007).

En conjunto, se cree que este folículo mantiene su crecimiento en un entorno de supresión para los menos desarrollados, probablemente, por una mejor vasculatura (Moor y Seamark, 1986) que le provee mayor cantidad de LH y FSH. Un elevado número de LH-R en las células de la granulosa, que le permiten responder a las dos hormonas (Xu et al., 1995b). Una mayor expresión de ARNm de Star en las células de la teca, que puede asegurar el transporte de colesterol hacia la mitocondria para la producción de andrógenos

(Bao y Gaarverick, 1998). Y también, más ARNm de aromatasa que lo habilitará para secretar altos niveles de estradiol-17 β en la teca (Xu et al., 1995a).

El folículo seleccionado es sometido a tres fases de desarrollo: crecimiento, que incluye un incremento en diámetro; estasis, con pocos cambios en el tamaño y regresión, en donde se ve una disminución en el diámetro ó atresia (Adams et al., 2008). La dominancia morfológica (tamaño) y fisiológica/endocrinológica (capacidad supresora de FSH) se mantiene durante la fase de crecimiento y la mitad de la estática. Sin embargo, el dominio morfológico sigue siendo evidente hasta la regresión (Peter et al., 2009).

La producción de estradiol de los folículos en crecimiento depende de la frecuencia de los pulsos de LH que, al unirse a sus receptores en las células de la teca, estimulan la conversión de colesterol en testosterona. La cual se difunde hacia las células de la granulosa donde se convierte en estrógeno por la acción de la enzima aromatasa. El estradiol tiene un efecto local y uno sistémico que estimula el eje hipotálamo-hipófisis generando la liberación de GnRH (Rathbone et al., 2001). Este efecto de retroalimentación se produce en función de su umbral: cuando sus concentraciones plasmáticas están por debajo de este ejerce una retroalimentación negativa sobre GnRH. Mientras que cuando se encuentra sobre el umbral tienen un efecto de retroalimentación positiva (Wiltbank, Gümen y Sartori, 2002). Finalmente, este estradiol estimula la producción de un pico de LH de amplitud y frecuencia suficiente para estimular la maduración final y ovulación del folículo dominante (Rahe et al., 1980).

Temprano en la fase lútea, los pulsos de LH son de alta frecuencia y baja amplitud (20-30 cada 24 horas). Hacia la mitad de la misma, muestran mayor amplitud y menor frecuencia (6-8 cada 24 horas). Sin embargo, éstas no son adecuadas para que la ovulación ocurra (Rahe et al., 1980). Por lo que el folículo dominante se vuelve atrésico disminuyendo los niveles de estradiol e inhibina que elimina la retroalimentación negativa

sobre el hipotálamo. Como consecuencia, se produce un nuevo pico de FSH que se relaciona con la emergencia de otra onda y la selección de un folículo que podrá madurar y llegar a la ovulación (Forde et al., 2011). Luego del pico preovulatorio de LH, la expresión de P450c17 en las células de la teca, P450_{arom} en las de la granulosa y P450_{scc} y 3 β -HSD en los dos tipos celulares decrece dramáticamente. Ésta se encuentra acompañada de la disminución de los niveles de androstendiona y estradiol, mientras que las concentraciones de progesterona incrementan en el fluido folicular (Voss y Fortune, 1993). El mismo puede estar relacionado al proceso de luteinización luego de la ovulación o a una reducción de la conversión de progestinas hacia andrógenos (Bao y Gaarverick, 1998).

2.2. Fase Folicular

La fase folicular es el período de tiempo que sigue a la luteólisis hasta la ovulación del folículo dominante, dentro del cual se ha designado al proestro y estro (Forde et al., 2011; Peter et al., 2009; Rathbone et al., 2001). El inicio de la fase pos luteólisis se ha caracterizado por la primera concentración de P₄ menor a 1ng/ml (Båge et al., 2002; Ginther et al., 2010). Durante esta fase folicular, las funciones del estradiol en el sistema nervioso central, eje hipotálamo-pituitaria y el tracto reproductivo preparan al animal para el comportamiento de estro, transporte de los gametos y el embrión y para la fertilización del oocito (Rathbone et al., 2001). Existen tres principales cambios que ocurren durante este período e incluyen la maduración del oocito, la ruptura folicular y ovulación y el cambio de la esteroidogénesis de andrógenos/estradiol a progesterona como el principal producto esteroideo (Fortune, Willis, Bridges y Yang, 2009) como resultado de la regresión funcional y estructural de un cuerpo lúteo acompañada del desarrollo de un folículo preovulatorio (Peter et al., 2009).

2.2.1. Proestro

El proestro es la primera porción de la fase folicular que inicia con la regresión del cuerpo lúteo y termina con la presencia del estro y el pulso de GnRH/LH. Se encuentra marcado por un descenso dramático de las concentraciones de progesterona que alcanzan su nivel mínimo de 36 a 48 horas luego de la luteólisis natural o inducida (Wiltbank et al., 2014). Durante este período, un folículo preovulatorio se desarrolla dentro de uno de los ovarios. Bajo la influencia de las gonadotropinas, éste produce concentraciones elevadas de estrógenos para alcanzar su pico en un ambiente basal de progesterona (De Silva, Anderson, Gwazdauskas, McGilliard y Lineweaver, 1981). Los altos niveles hormonales de estradiol, producidos por el folículo preovulatorio, juegan un rol en el incremento del tono uterino (Bonafos, Kot y Ginther, 1995) e inducen la liberación de GnRH hipotalámica dentro de los vasos portales que la transportan hacia la pituitaria para así inducir el pico preovulatorio de LH y FSH (Rathbone et al., 2001).

2.2.1.1. Luteólisis

La luteólisis, en la mayoría de especies mamíferas, se describe como un proceso dependiente uterino. Debido a que la prostaglandina ($\text{PGF}_{2\alpha}$), secretada por el mismo, es su desencadenante (McCracken, Custer y Lamsa, 1999). Esta $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina pasa a la arteria ovárica por medio de un mecanismo de contracorriente evitando la circulación pulmonar y su consecuente inactivación. El estímulo inicial de su producción está dado por la oxitocina (OT) hipofisaria liberada por la presencia del estradiol que se secreta en el folículo preovulatorio en crecimiento. Consecuentemente, se inicia una retroalimentación positiva que envuelve la liberación de OT luteal y $\text{PGF}_{2\alpha}$ de origen lúteo y uterino (Niswender et al., 2000). Adicionalmente, se ha observado que el factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$) está envuelto en el proceso de luteólisis al mismo nivel, ya que a

dosis bajas estimula la producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y óxido nítrico (NO), resultando en la disminución de la duración del ciclo estral (Skarzynski et al., 2003).

Este proceso envuelve a células inmunes y endoteliales. Las primeras se adhieren, rodean y transmigran a través de la capa de células endoteliales por la acción secuencial de las selectinas, moléculas de adhesión celular e integrinas. Su infiltración masiva y activación, eventualmente, producen muerte celular por apoptosis. Mientras que las células endoteliales inducen la secreción de componentes vasoactivos como END-1 que reduce la producción de progesterona y la supervivencia de las células luteales. Además, durante su desarrollo, el apoyo angiogénico para la red vascular se ve disminuido. El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) también se reduce y las acciones del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) se bloquean por niveles elevados de trombospondinas TSP1 (agente apoptótico potente que provoca la muerte en las células endoteliales y lúteas), TPS2, PTX3 y TGFB1 (Smith y Meidan, 2014).

La inducción de la luteólisis por efecto de prostaglandinas exógenas puede darse en cualquier estado de la onda folicular, inclusive en la etapa temprana cuando se encuentra un folículo pequeño (Araujo et al., 2009). Sin embargo, se ha demostrado que el tratamiento es efectivo sólo si se lo aplica, al menos, seis días después de la presencia del estro ya que puede producirse una regresión incompleta, aunque las concentraciones de P_4 disminuyan incluso con cuerpos lúteos más jóvenes (Nascimento, Souza, Keskin, Sartori y Wiltbank, 2014). En contraste, la cascada de eventos dentro del proceso natural se lleva a cabo con la presencia de un folículo dominante que es clave para su activación (Araujo et al., 2009). Estudios realizados sobre el tema han determinado que la luteólisis comienza a un promedio de 16.8 ± 0.4 días [16-19] y finaliza a los 17.8 ± 0.4 en un rango de 17 a 20 días (Ginther et al., 2010) siendo asociada a la presencia de conducta de estro y niveles elevados de estradiol (Figura 4a). Además, se ha reconocido alrededor de cinco pulsos de

PGF_{2α}, con una duración aproximada de cuatro horas por cada uno, en donde su inicio marcó el descenso de los niveles de progesterona, evidenciando su acción luteolítica inmediata (Figura 4b) (Mann y Lamming, 2006). El efecto de los pulsos de PGFM en el período preluteolítico, luteolítico y posluteolítico también ha sido estudiado. Confirmándose que el patrón de disminución de P₄, asociada a la evolución de cada fase, difiere considerablemente. Una vez que sus concentraciones llegan a 1ng/ml, definido como el punto de la final del período luteolítico, ésta decrece paulatinamente hasta llegar a un valor basal de 0.1ng/ml dentro de las 41 horas posteriores (Figura 5) (Ginther et al., 2010).

Por otro lado, las diferencias en la disminución del volumen de tejido lúteo y las concentraciones de P₄ de vaquillas y vacas lactantes se muestran en la Figura 6. En esta se puede observar que las vacas tienen un mayor tejido lúteo relacionado a la ovulación de folículos más grandes. El cual empieza a decrecer un día después del inicio de la luteólisis y luego de tres días muestran un 30% del tamaño inicial. En contraste, los niveles de progesterona disminuyen rápidamente presentando valores menores al 10% de los pre luteolíticos, dos días mas tarde (Sartori et al., 2004). La luteólisis incompleta es uno de los problemas más comunes dentro de los protocolos de sincronización con inseminación a tiempo fijo. Estudios sobre ésta han definido a las concentraciones de P₄ menores a 0,5ng/ml, pos aplicación de PFG_{2α}, como indicativos de su cumplimiento. En donde los niveles superiores de P₄ en el momento de su administración se asociaron con una mayor probabilidad de completarla y de mostrar mejor fertilidad (Martins, Policelli y Pursley, 2011). Adicionalmente, existen reportes de un efecto de la paridad sobre la presencia de luteólisis incompleta, ya su porcentaje ha sido mayor en primíparas que en multíparas (Martins et al., 2011; Giordano et al., 2012). Sin embargo, la causa por la que se produce no ha sido determinada (Wiltbank et al., 2014).

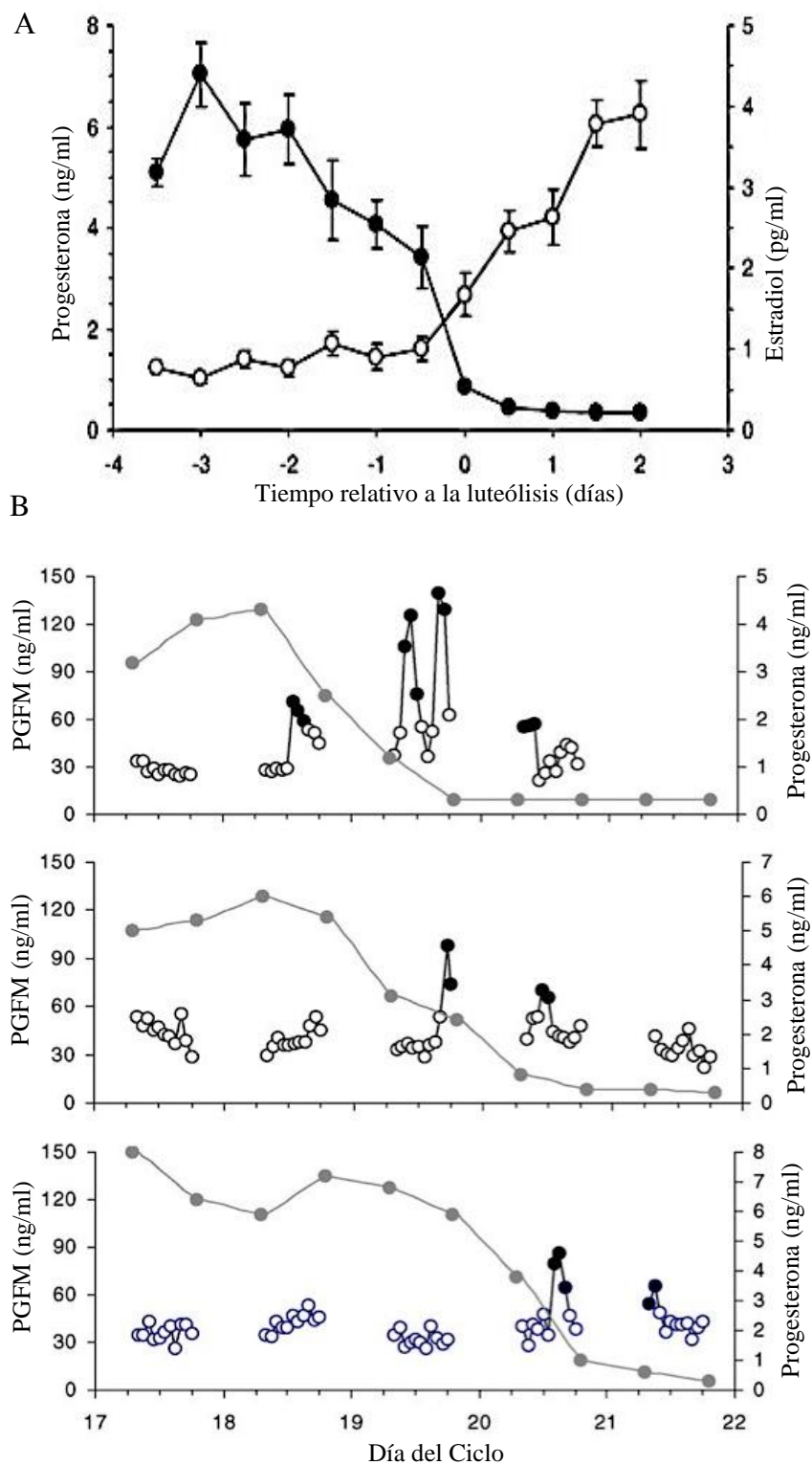


Figura 4. Concentraciones de PGFM, progesterona y estradiol durante el proceso de luteólisis. **A.** Media \pm EE de las concentraciones de P₄ (●) y estradiol (○) durante la luteólisis en vacas no lactantes (n=6). Los ejemplos están alineados con el día de la luteólisis. **B.** Concentraciones plasmáticas de P₄ (○) y PGFM (●/○) tomados en un período de 10 horas (1 muestra por hora) en días consecutivos en tres vacas. Tomado y modificado de Mann y Lamming, 2006.

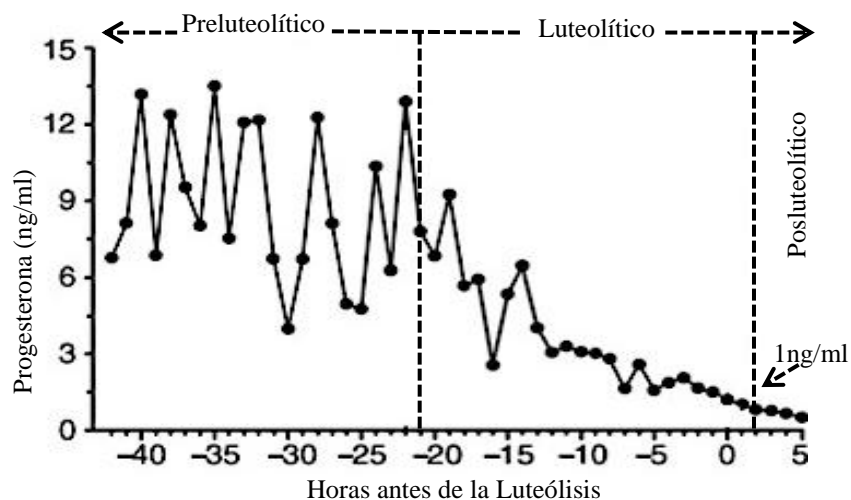


Figura 5. Período preluteolítico, luteolítico y posluteolítico en base a niveles de progesterona. Tomado de Ginther et al., 2010.

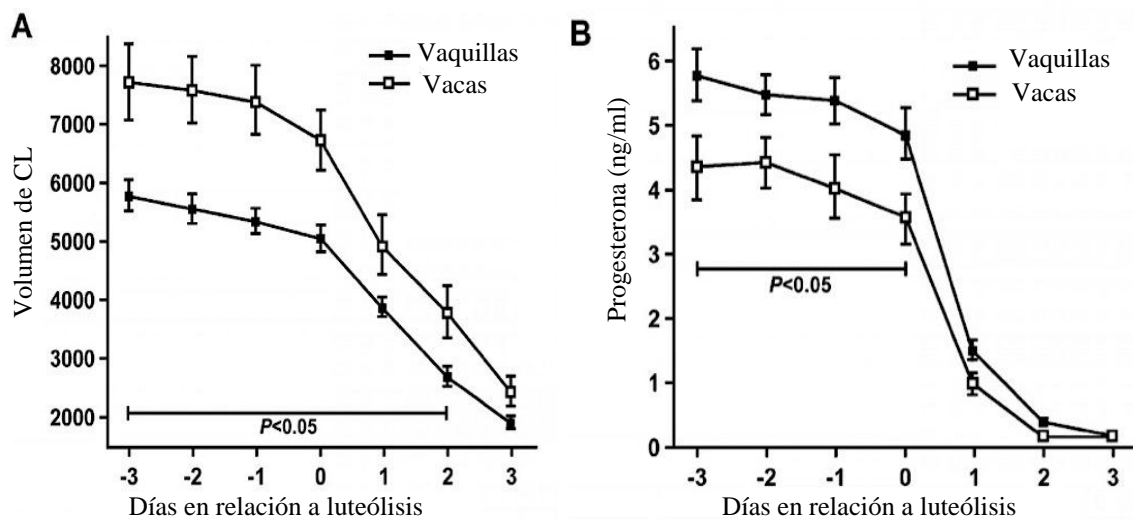


Figura 6. A. Volumen de tejido lúteo y B. Concentraciones séricas de progesterona normalizados al tiempo de luteólisis en vaquillas (n=27) y vacas lactantes (n=14). Se muestran las diferencias entre vaquillas y vacas. Tomado de Sartori et al., 2004.

2.2.2. Estro

El estro es la porción final de la fase folicular que precede a la ovulación del folículo dominante (Peter et al., 2009). Cuando las concentraciones plasmáticas máximas de estradiol se alcanzan, éste se hace evidente acompañado de la liberación del pico preovulatorio de LH y FSH de origen pituitario. Sin embargo, luego de su expresión, un decline en las concentraciones de estradiol secretadas por el folículo dominante es

observado manteniendo, durante este período, niveles inferiores a las encontradas en el proestro (Rathbone et al., 2001).

El promedio de duración del estro reportado en vacas lecheras es de 8 horas, mientras que en novillas se prolonga de 12 a 14. Sin embargo, tanto la duración como la intensidad del mismo se han visto afectados por factores ambientales que incluyen el tipo de superficie en donde se alojan, el tamaño del hato, la presencia de machos (Forde et al., 2008), la paridad y el número de animales en estro al mismo tiempo (Roelofs, Van Eerdenburg, Hazeleger, Soede y Kemp, 2005). Con adicional evidencia de que tiende a acortarse con el incremento de la producción lechera ($6.2\pm 0.5h$ vs. $10.9\pm 0.7h$), probablemente, debido a la disminución en las concentraciones de estrógenos circulantes (Lopez, Satter, Wiltbank, 2004).

Durante el estro se exhibe una conducta característica en donde los animales empiezan a olfatear, poner la barbilla sobre otro, pueden montar y al final permitir ser montados (Roelofs et al., 2005). Sin embargo, los signos secundarios como el olfatear genitales, intento de monta, secreción mucosa, enrojecimiento de la vulva, inquietud y vocalización pueden presentarse antes, durante o después de este período (Rathbone et al., 2001). El estradiol periovulatorio que produce estos signos también coordina varios procesos fisiológicos que contribuyen al establecimiento y mantenimiento de la gestación, incluyendo efectos en las células foliculares, el oocito, transporte de gametos y preparación del ambiente uterino. Dentro del folículo ovárico, el estradiol incrementa la mitosis en las células de la granulosa (Goldenberg, Vaitukaitis y Ross, 1972), promueve la formación de uniones gap en las mismas (Merk, Botticelli y Albright, 1972), incrementa la acción estimulante de FSH en la actividad de la aromatasa (Zhuang, Adashi y Hsueh, 1982) e induce la expresión de los receptores de LH y FSH (Richards et al., 1976).

Por otro lado, la progesterona modula la acción de los estrógenos por una rápida disminución de sus receptores (Evans, Chen, Hendry III y Leavitt, 1980). Por lo que las concentraciones elevadas de ésta pueden evitar la conducta de estro (Davidge, Wiebold, Senger y Hillers, 1987) al suprimir los pulsos de GnRH (Bergfeld et al., 1996). Adicionalmente, niveles elevados de E₂ con valores basales de P₄ son indispensables para la activación del proceso de contracción del oviducto y secreción. Siendo la mayor actividad contráctil, en amplitud y frecuencia, observada en el oviducto ipsilateral del folículo dominante que se ha mantenido hasta el día 3 a 5 pos estro (Bennett et al., 1988). En estudios anteriores, valores inferiores a 1ng/ml se han encontrado en vaquillas (Ginther, Pinaffi, Khan, Duarte y Beg, 2013) así como en vacas lactantes (98 ± 11.1 días pos parto) y fuera del período de lactancia (381 ± 112.1d PP) (Endo, Nagai, Tanaka y Kamomae, 2012a).

La detección del estro es un factor clave para la rentabilidad de las producciones de ganado vacuno; sin embargo, éste se ha tornado cada vez más difícil de identificar por la menor duración e intensidad encontrada en las vacas modernas, en donde las tasas de detección se han reducido a menos del 50%. Lo que ha empujado a buscar alternativas tecnológicas con potencial para mejorar su desempeño (Homer et al., 2013). El reconocimiento del estro para determinar el tiempo adecuado de inseminación es una de las principales restricciones para alcanzar altas tasas de concepción en vacas lecheras, por lo que la falla en su detección afecta la fertilidad de un hato (Thakur Krishna Shankar Rao, Kumar, Chaurasia y Patel, 2013). Durante el ciclo estral normal en los bovinos, se ha establecido que el inicio del estro precede a la ovulación entre 24 a 30 horas (Allrich, 1993; Hansel y Convey, 1983; Hansen, 1985). Sin embargo, este dato no es preciso debido a la variación existente entre cada animal (Roelofs et al., 2005). Adicionalmente, se han realizado intentos por encontrar un sistema ideal para determinar el tiempo de ovulación

aproximado. Con este propósito, se ha demostrado que los niveles de progesterona en leche y en sangre, por sí solos, no son eficientes predictores del tiempo de ovulación en la ganadería lechera, debido a que existe una alta variación en los perfiles hormonales de cada individuo (Roelofs, Van Eerdenburg, Hazeleger, Soede y Kemp, 2006). Por otro lado, signos como permitir la monta o montar a otro animal, se han catalogado como buenos predictores; sin embargo, no siempre ocurren en todos los animales o son difíciles de automatizar, limitando su uso cotidiano en granja (Roelofs et al., 2005).

2.2.3. Ovulación

La ovulación está caracterizada por la ruptura del folículo dominante, evacuación del fluido folicular, células de la granulosa y oocito y la temprana formación del cuerpo lúteo en el sitio de ovulación (Peter et al., 2009). Se ha observado que la mayoría de animales cíclicos normales ovulan entre 4 a 6 días luego de la luteólisis y en promedio las vacas lactantes tienden a tomar mayor tiempo en relación a las vaquillas (Sartori et al., 2004). Para que ésta se pueda desarrollar, los pequeños folículos tienen que madurar hasta el estado preovulatorio, durante este tiempo el oocito, las células de la granulosa y de la teca adquieren características funcionales específicas. Primero, el oocito se vuelve competente para someterse a la meiosis. Segundo, las células de la granulosa producen estrógenos y responden a LH mediante sus receptores. Y tercero, las células de la teca empiezan a sintetizar cantidades elevadas de andrógenos que sirven como sustrato para la enzima aromatasa en las células de la granulosa (Richards, 1994).

En general, la ovulación es un proceso relacionado con una reacción inflamatoria (Fortune, 1994). Muchos de los eventos que suceden durante ésta son espacialmente restringidos a específicos microambientes del folículo o los compartimentos intersticiales que lo rodean y permiten la expulsión exitosa del complejo oocito-cumulus en la ruptura

del folículo (Zhou et al., 2001). La hormona luteinizante cumple un papel fundamental en su maduración final y la consecuente ovulación. Ya que ésta tiene lugar cuando las concentraciones séricas de P_4 son basales y los pulsos de LH ocurren cada 40-70 minutos por 2 a 3 veces al día (Roche, 1996). Adicionalmente, aunque los bovinos son considerados como una especie monótopa, que normalmente ovula un solo folículo dominante, existe un cierto grado de ovulaciones múltiples que pueden estar asociadas a diferentes factores como raza, paridad, nutrición y estado reproductivo. De este modo, se han observado que las vacas lactantes pueden tener mayores ovulaciones múltiples que las vaquillas (Sartori et al., 2004).

La progesterona y las prostaglandinas son factores clave en el proceso de ovulación, ya que la inhibición de una de las dos puede suspenderla en una variedad de especies (Algire, Srikandakumar, Guilbault y Downey, 1992). En el caso de las prostaglandinas, se ha observado que su inhibidor, la indometina, bloquea el proceso en ratas, conejos, ratones, ovejas, cerdos y primates (Murdoch, Peterson, Van Kirk, Vincent y Inskeep, 1986). Por otro lado, existe evidencia de que el incremento de ARNm de ciclooxigenasa-2 (COX-2), PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$ en las células de la granulosa son mediados por el aumento intrafolicular de P_4 y su receptor (PR) inducida por el pico de LH/FSH (Bridges, Komar y Fortune, 2006). Los niveles de $PGF_{2\alpha}$ y PGE_2 aumentan más de 100 veces 25 horas luego del pico endógeno de LH en el líquido del folículo preovulatorio (Algire et al., 1992). El aumento local de PG produce la dilatación de los vasos foliculares, aumenta la permeabilidad vascular y estimula la degradación del colágeno para la ruptura del folículo (Murdoch et al., 1986). Adicionalmente, se ha señalado la liberación de Angiotensina II, endotelina-1 y péptido natriurético auricular en el folículo maduro del bovino sugiriendo que pueden estar envueltos en el proceso de ovulación (Acosta et al., 2000).

Las concentraciones hormonales de P_4 , E_2 , LH, FSH, PRL y PGFM, envueltas en el período preovulatorio y su comportamiento, han sido descritas en vaquillas de raza Holstein y se muestran en la Figura 7 (Ginther et al., 2013). Los niveles de estradiol son mayores en las ondas ovulatorias y alcanzan valores más altos alrededor del estro. Lo que sugiere que el folículo preovulatorio tiene una mayor capacidad de producción y liberación de E_2 , aunque su tamaño máximo no es significativamente diferente a los de las ondas no ovulatorias. Estos niveles superiores se han relacionado con un mayor grado de vascularización presente en el folículo dominante próximo a ovular (Boer et al., 2011). Adicionalmente, al compararse vaquillas con vacas lactantes, se ha evidenciado que el pico de estradiol ocurre aproximadamente dos días antes de la ovulación en los dos grupos. Sin embargo, los niveles séricos máximos a partir de la luteólisis son mayores en vaquillas a pesar de que las vacas lactantes muestran folículos ovulatorios de mayor diámetro. (Sartori et al., 2004; Wolfenson et al., 2004).

3. Importancia de la progesterona en la pérdida embrionaria

Un buen ciclo estral puede ser descrito como un ciclo donde existen una ovulación y fertilización exitosa seguidos del mantenimiento de la gestación. Las concentraciones de P_4 que incrementan pocos días luego del estro y se mantienen elevadas por aproximadamente dos semanas son el sello de un ciclo estral normal. Cualquier desviación de este patrón suele relacionarse con una disminución de la fertilidad (Lamming y Darwash, 1998).

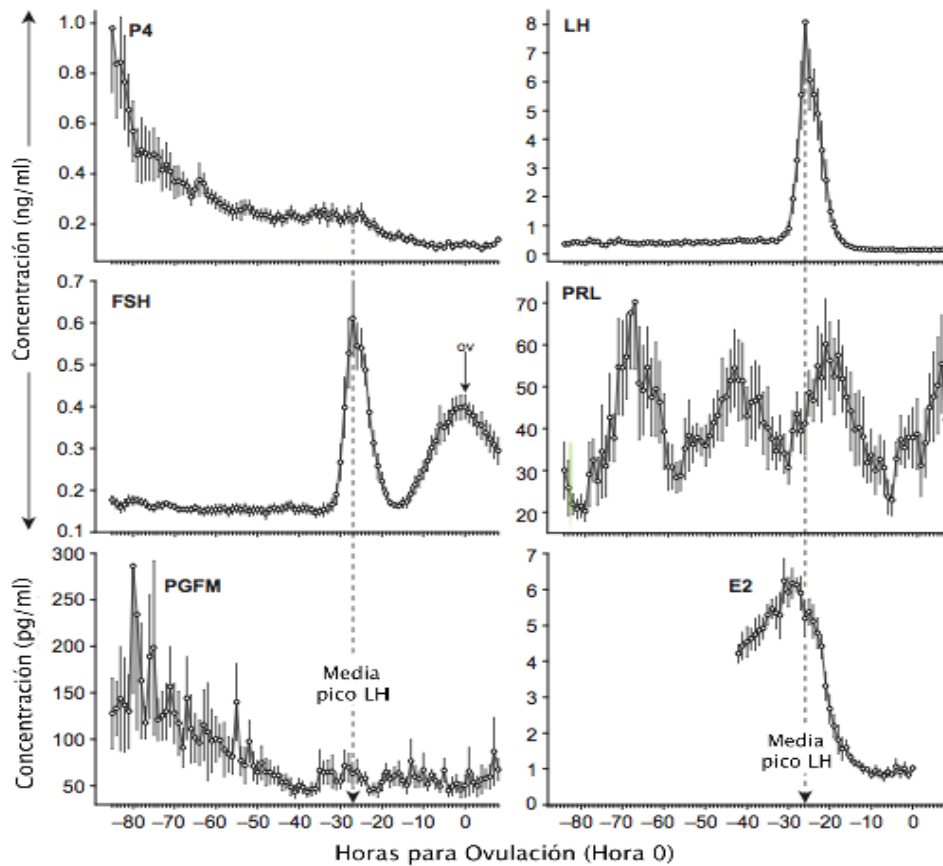


Figura 7. Media \pm EE de las concentraciones de P₄, LH, FSH, PRL y PGFM desde la hora -85 a la 8 (hora 0: ovulación) y la concentración de E₂ desde la hora -42 a la 0. El pico de liberación de LH preovulatorio de las 13 vaquillas está señalado por la línea punteada (---). Se muestra un efecto del transcurso del tiempo en horas sobre la concentración de cada hormona ($P < 0.0001$). Tomado de Ginther et al., 2013.

Existe amplia evidencia de una asociación entre la supervivencia de embriones y las concentraciones de P₄ tanto en el ciclo anterior a la ovulación como la primera fase lútea luego de la inseminación (Diskin et al., 2006; Morris y Diskin, 2008). Algunos mecanismos potenciales por los que las bajas concentraciones de progesterona durante el ciclo previo a la IA pueden reducir la tasa de fertilización o de supervivencia embrionaria se han mencionado. Sin embargo, la opción más probable (Diskin et al., 2006) es que éstas provocan una persistencia del folículo dominante que produce un oocito con un nivel avanzado de maduración en relación a los que se originan en los de duración y tamaño normal. Comprometiendo su capacidad de desarrollo después de la fertilización (Mihm et al., 1999).

Por otro lado, una relación cuadrática positiva entre las concentraciones de progesterona en leche del día 5 al 7 pos inseminación y la tasa de supervivencia embrionaria ha sido evidenciada (Stronge et al., 2005). Ya que la suplementación de la misma durante esta fase, particularmente en animales que tienen niveles bajos, pueden disminuir la pérdida embrionaria (Morris y Diskin, 2008).

Cuando se han comparado los ciclos estrales de vaquillas con vacas lactantes se ha evidenciado menores concentraciones de P_4 y E_2 en las últimas, aunque presentan cuerpos lúteos y folículos de mayor tamaño. Sugiriendo que las frecuentes anomalías reproductivas de las vacas lactantes como la baja tasa de concepción y la falla de una o presencia de múltiples ovulaciones podrían ser producidas por sus inferiores niveles esteroideos (Sartori et al., 2004). Estudios han tratado de explicar este fenómeno y se ha demostrado que las concentraciones tanto de progesterona como de estradiol son disminuidas por el aumento de la tasa de aclaramiento metabólico producido por el incremento de la ingesta de estos animales que se relaciona al flujo sanguíneo hepático. Con base en estos hallazgos, se cree que éste permanece elevado en vacas lactantes y altas productoras, dando lugar a menores concentraciones de progesterona que incrementan el riesgo de la pérdida embrionaria (Sangsrivong et al., 2002).

Adicionalmente, los niveles suprabasales en la fase folicular tardía han sido asociados al desarrollo de quistes foliculares en vacas lecheras. Los resultados de investigaciones sobre el tema han reportado que las medias de vacas quísticas no ovulatorias duplicaron a las de quísticas ovulatorias y normales luego de la administración de una dosis luteolítica de prostaglandinas (Robinson et al., 2006). En el caso de las vaquillas, se ha realizado una serie de estudios sobre el comportamiento hormonal dentro de la fase folicular (Ginther et al., 2013; Båge, 2003; Båge et al., 2002; Duchens, Forsberg, Gustafsson, Edqvist y Rodríguez-Martínez, 1995). Båge, en el año 2003,

relacionó los valores de progesterona al momento de la IA con la expresión del estro y la tasa de concepción obtenida. En este se encontró que las vaquillas que no quedaron gestantes mostraron valores significativamente más altos a los basales ($>0,16$ ng/ml) en comparación a las que concibieron, independientemente del número de inseminaciones recibidas. Mostrándose un mayor riesgo de repetir el celo cuando se presentan niveles suprabasales.

Similar evidencia se ha reportado con anterioridad, ya que vaquillas repetidoras han presentado una mayor duración del estro, retraso en el pico de LH, una vida prolongada del folículo dominante y un pico de progesterona pos ovulatorio retardado. Conjuntamente con una fuerte tendencia a mostrar concentraciones superiores de P_4 ($0,201 \pm 0,14$ ng/ml) en comparación a las vaquillas vírgenes ($0,103 \pm 0,05$ ng/ml) (Båge et al., 2002). Del mismo modo, al inducir niveles suprabasales, por medio de implantes subcutáneos, asincronías compatibles con el comportamiento de repetidoras fueron evidentes. Las que estuvieron acompañadas de una marcada inferior tasa de concepción (Duchens et al., 1995). En conjunto, estos hallazgos sugieren que la progesterona puede ser una herramienta útil en la identificación de posibles vaquillas repetidoras (Båge, 2003).

4. Factores envueltos en la eficiencia de la reproducción

La revisión de información sobre los factores de riesgo en la eficiencia de la fertilidad de altas productoras señala puntos de importancia para la mejora de la reproducción. Entre estos se encuentra la disminución del balance energético negativo e infecciones uterinas pos parto, la expresión y detección del estro seguida de una inseminación con semen de alta calidad, la fertilización de un oocito en un ambiente adecuado para el desarrollo del embrión (Walsh et al., 2011), disminución de la incidencia de mastitis, aplicación de estrategias para mejorar el nivel de progesterona luego de la

monta (Moore, Overton, Chebel, Truscott y BonDurant., 2005; Inskeep, 2004) y la minimización de las influencias luteolíticas del estradiol-17 β o PGF_{2 α} luego del servicio y durante el reconocimiento de preñez (Inskeep, 2004).

La PGF_{2 α} ha sido utilizada con éxito en el tratamiento de vacas anéstricas en donde se insemina posterior a la detección del estro (Archbald, Tran, Massey y Klapstein, 1992). Sin embargo, su uso produce ovulaciones dispersas en un período de 5 días (Lauderdale et al., 1974). Existe información que demuestra que tanto el protocolo Ovsynch como el estándar que usa prostaglandina, en una o dos aplicaciones, son efectivos. Sin embargo, en los rebaños en donde la detección del estro es buena se recomienda el uso de PGF_{2 α} con inseminación luego de su expresión. Mientras que en donde la detección es pobre el protocolo Ovsynch proporciona mayores beneficios. Pudiendo mejorar sus resultados con un servicio temprano a la presencia de signos de estro (Mialot et al., 1999).

El mejor intervalo de tiempo para la IA ha sido ampliamente estudiado. Trabajos realizados años atrás han reportaron una máxima tasa de concepción en vacas lecheras desde la mitad del comportamiento de estro hasta pocas horas luego de terminado el mismo. Lo que condujo al desarrollo de la guía de la regla a.m.-p.m. asumiendo un régimen intensivo de detección visual (Dalton et al., 2001). Sin embargo, similares tasas de no retorno se han encontrado al comparar una IA al día versus la regla en granjas en donde la observación es menos intensiva (Nebel, Walker, McGilliard, Allen y Heckman, 1994). Del mismo modo, un estudio realizado en vaquillas y vacas de raza Jersey no encontró una diferencia significativa entre las dos alternativas, pero la tasa de concepción fue menor en los animales que se inseminaron en la mañana que se detectó el estro (60.5% vs. 57.6%) (Graves et al., 1997). Adicionalmente, con el uso del programas auxiliares se han determinado mayores tasas de concepción con la IA entre 4 a 12 horas después del inicio del celo determinado a partir del primer evento de monta (Dransfield et al., 1998).

Indicando que la inseminación a las 12h después de la presencia de los primeros signos puede optimizar la fertilidad en vacas lecheras a través de una aceptable tasa de fertilización, número de espermatozoides accesorios por embrión y una deseable calidad embrionaria (Dalton et al., 2001).

La fertilidad y los rangos metabólicos y endocrinos también varían de acuerdo al número de lactancias y el tiempo relativo pos parto (Wathes et al., 2007). La calidad del embrión tanto en vacas como en vaquillas, de edad y talla parecida, han sido evaluadas encontrándose una tasa de fertilización similar (88-90%), aunque el porcentaje de embriones viables ha sido mucho menor en las vacas lactantes (52.8% vs. 82.3%) (Sartori et al., 2002). Adicionalmente, se ha reportado evidencia de una tasa de concepción más alta en vaquillas que declina en vacas lactantes (Balendran et al., 2008; Pursley et al., 1997). Al igual que en primíparas (47.6% vs. 34.4%) comparadas con multíparas (Ambrose et al., 2014); López-Gatius et al., 2006). Evidenciándose una relación negativa entre el incremento de número de lactancias con la tasa de concepción (García-Ispuerto et al., 2007; López-Gatius et al., 2005b).

Por otro lado, Windig y colaboradores (2005) observaron que la alta producción estuvo relacionada con menores tasas de concepción y una mayor cantidad de inseminaciones, aunque también se encontró evidencia de una reducción en el número de células somáticas y días al primer servicio. Estudios realizados a gran escala han presentado resultados que demuestran que el alto nivel de producción al día de la IA no afecta la tasa de gestación, fertilidad (García-Ispuerto et al., 2007; López-Gatius et al., 2005a; 2005b) o la tasa de parto obtenida (Fahey, O'Sullivan, Crilly, Mee, 2002). También se ha mostrado que vacas con alta fertilidad producen mayor cantidad de leche al día 50 pos parto y que cada disminución en kg de producción se ha asociado con un aumento en el intervalo parto-concepción. Adicionalmente, vacas con mayor producción lechera han mostrado una mejor

tasa de concepción que las de baja en un protocolo con inseminación a tiempo fijo (Peters y Pursley, 2002). Estos hechos cuestionan por completo su efecto negativo sobre la fertilidad, ya que se pudo relacionar el incremento de la frecuencia de ordeño con su disminución, pero no en sí la alta producción (López-Gatius et al., 2006). En general, estos hallazgos sugieren que las prácticas de manejo que se aplican en hatos de alta intensidad puede hacer que se llegue a un mejor estado de salud y fertilidad (Fetrow, Stewart, Eicker y Rapnicki, 2007). Sin embargo, los niveles elevados de producción también les otorgan una mayor predisposición a mostrar enfermedades y fallas reproductivas (Fahey et al., 2002; Windig et al. 2005).

5. Digitalización de información

La mayoría de la información presentada en publicaciones científicas se representa gráficamente; dando a conocer sus datos por medio del uso de puntos dentro de un plano cartesiano. La interpretación visual de los valores expresados es relativamente fácil; sin embargo, cuando se necesita conocer un valor con precisión, la transformación manual de los datos deja un error de gran magnitud (Aymard y Shirts, 2000). Los programas de digitalización de datos han sido creados con el fin de minimizar este error producido (Rohatgi, 2014); y utilizan el método de conversión de pixeles para extraer las coordenadas de puntos desde un gráfico impreso o una imagen. Estos programas 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 (Aymard y Shirts, 2000):

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

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

Donde X_{min} e Y_{min} son las coordenadas de origen del gráfico que se expresan en las unidades del gráfico; X_{max} es el valor máximo del eje X mostrado en el gráfico; Y_{max} es el valor del eje Y mostrado en el gráfico; pX_{min} , pX_{max} , pY_{min} e pY_{max} , corresponden a las coordenadas, en posiciones de píxeles leídas en la imagen de la pantalla; pX e pY son coordenadas en píxeles de cada punto de interés, leídos desde la imagen en la pantalla; finalmente, X e Y son las coordenadas deseadas. El programa de extracción de datos hace estas relaciones automáticamente (Aymard y Shirts, 2000).

Error en la digitalización

El error de digitalización disminuye cuando se utilizan gráficos con mejor resolución (Tummers, 2006). Por este motivo es recomendable utilizar gráficos con una resolución de 300 píxeles por pulgada (ppp) por 6 pulgadas ó 1800 píxeles; en donde el error máximo de digitalización para una imagen escaneada es de 1 píxel, que equivale a un error de 0,05% (Aymard y Shirts, 2000). Es decir, si se utilizan gráficos con definiciones de 300ppp, el error es de 0,05% del valor obtenido; dando como resultado datos con un alto grado de confianza casi idénticos a los originales (Shadish et al., 2009).

Identificación Del Problema

En el Ecuador, la información sobre el comportamiento productivo y reproductivo es escasa. Sin embargo, dentro de las investigaciones realizadas, dos estudios que tuvieron lugar en tres diferentes haciendas de la serranía ecuatoriana observaron que los patrones de comportamiento de las concentraciones de progesterona durante el ciclo y al momento de la inseminación artificial fueron diferentes (Freile y Añasco, 2011; Datos no publicados; Gallmeier, 2013) generando confusión en cuanto al comportamiento hormonal y reproductivo de las vacas lecheras la zona.

Adicionalmente, los resultados de investigaciones realizadas sobre el efecto del nivel de producción en la tasa de concepción son contradictorios; ya que existen datos que afirman una relación antagónica entre éstas, mientras que otros estudios sugieren que no se evidencia dicho efecto negativo. De acuerdo a lo mencionado, surgen las siguientes preguntas: ¿Es posible, que las concentraciones de progesterona al momento de la inseminación artificial difieran entre los grupos de vaquillas primíparas y repetidoras? ¿Existe una diferencia significativa entre las concentraciones de P_4 encontradas en este estudio con las reportadas en referencias bibliográficas anteriores? ¿Existe una posibilidad de que las concentraciones de progesterona al momento de la inseminación artificial y el nivel de producción láctea influyeran la tasa de concepción obtenida? ¿Es posible, que las concentraciones de progesterona al momento de la IA estén relacionadas con el nivel de producción láctea?

Hipótesis

H1: Las concentraciones de progesterona al momento de la IA difieren entre vaquillas, vacas primíparas, multíparas y repetidoras.

H2: La tasa de concepción no depende de los niveles de progesterona al momento de la IA y de producción láctea.

H3: Las concentraciones de progesterona al momento de la IA no están relacionadas con el nivel de producción láctea animal.

H4: Las concentraciones de progesterona al momento de la IA son diferentes a las reportadas con anterioridad en la literatura.

Objetivos

General

- Establecer la influencia de la progesterona en la tasa de concepción y su relación con la producción láctea en vacas de diferentes estados reproductivos de una hacienda del Cantón Mejía.

Específicos

1. Determinar si las concentraciones de progesterona al momento de la IA difieren significativamente entre los grupos de vaquillas, vacas primíparas, multíparas y repetidoras.
2. Establecer si la tasa de concepción obtenida depende estadísticamente del nivel de concentraciones de progesterona al momento de la IA.
3. Determinar si las concentraciones de progesterona al momento de la IA difieren estadísticamente entre animales gestantes y vacías de los grupos de investigación.
4. Establecer si las concentraciones de progesterona al momento de la IA están correlacionadas con el nivel de producción de láctea de vacas primíparas, multíparas y repetidoras.
5. Establecer si la tasa de concepción depende del nivel de producción láctea de vacas primíparas, multíparas y repetidoras.
6. Determinar si existe una diferencia significativa entre las concentraciones de progesterona encontrados en esta investigación y la información referencial obtenida mediante un software de extracción de datos digital.

METODOLOGÍA Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Animales

La presente investigación se llevó a cabo a partir del 20 de agosto hasta el 29 de octubre del 2013 en la hacienda “Sausalito SCC” ubicada en el cantón Mejía, provincia de Pichincha–Ecuador. Éste se encuentra a una altitud de 2803.03 msnm con una temperatura promedio de 12°C que alcanza un mínimo y máximo de 3 y 21°C respectivamente (GPP, 2000). Para este estudio se incluyeron 88 animales de raza Holstein, aparentemente sanos al chequeo ginecológico veterinario y con una condición corporal entre 2,5 y 3 en un rango de 1 a 5 [Vacas emaciadas=1, Delgadas=2, Promedio=3, Gordas=4 y Obesas=5] (Edmonson, Lean, Weaver, Farver y Webster, 1989; Otto, Ferguson, Fox y Sniffen, 1991). Estos fueron organizados de acuerdo a su estado reproductivo, que ha sido definido en cuanto al número de partos y servicios, en cuatro grupos que se describen en la Tabla 2.

Tabla 2
Descripción de los grupos de investigación.

	Características	Inseminación	Producción (lts.)	DEL(días)
Vaquillas (Grupo I, n= 22)	350 kg y 19±2,4 meses (15-23)	1 ^{ra} ó 2 ^{da}		
Primíparas (Grupo II, n=22)	Primer parto	1 ^{ra} ó 2 ^{da}	20,38±5,6 (11-30,8)	79±38 (47-199)
Múltiparas (Grupo III, n=22)	A partir de tercer parto	1 ^{ra} ó 2 ^{da}	34,88±6,04 (17,9- 47,8)	84±33 (46- 193)
Repetidoras (Grupo IV, n=22)	Vacas de 1 a 7 partos.	3 ^{ra} ó más	22,28±8,88 (7,8- 42,9)	246±138 (92- 582)

Nota: DEL= días en lactancia.

Manejo

Todos los animales tuvieron acceso permanente a fuentes de agua y se mantuvieron al pastoreo con un suplemento dietético de soya, silo de maíz, pepa de algodón, maíz

molido, minerales y melaza, el cual contiene un 17,5% de proteína cruda y 1,63 Mcal/Kg de energía neta. Al ser éste un estudio intencionado descriptivo, comparativo y exploratorio, las condiciones de manejo reproductivo no fueron modificadas manteniéndose grupos intactos. De modo que los animales que presentaron un cuerpo lúteo a la palpación rectal recibieron una dosis de PGF_{2α} (2ml) intramuscular y fueron inseminados conforme la regla a.m.-p.m. La detección de la conducta de estro se realizó durante los ordeños y por medio del software Dairy Plan (Westfalia ®), en las vacas que contaron con podómetro.

Toma de muestras

Las muestras sanguíneas fueron tomadas al momento de la IA de cada animal. Estas fueron extraídas de la vena coccígea (Sartori et al., 2004) por medio del uso de jeringas estériles de 10 ml con agujas número 21. Una vez colectadas, se colocaron en tubos vacutainer y se las dejó reposar por 30 minutos, a temperatura ambiente, hasta la formación del coágulo. Seguidamente, fueron centrifugadas a 2500 rpm en una centrífuga Champion E-33, durante 15 minutos. El suero obtenido fue extraído por medio de pipetas manuales y almacenado en tubos eppendorf de 1,5ml a -20° centígrados, hasta la recolección total de las muestras (Sartori et al., 2004; Savio, Boland y Roche, 1990) conforme las especificaciones del test (Použití y Testu, 2009).

A partir del día de la inseminación se verificó la ausencia de conducta de estro hasta los siguientes 45 días momento en que se realizó el diagnóstico de gestación rutinario por medio de palpación rectal.

Análisis hormonal

La determinación hormonal de progesterona se realizó por medio de un ensayo inmunoenzimático fluorométrico (ST AIA-PACK PROG, TOSOH Com, Ltd., Japan) de

tipo competitivo en un analizador automático, utilizado para la medición cuantitativa de progesterona en suero o plasma heparinizado. La sensibilidad del test de acuerdo a la concentración mínima detectable fue de 0,05ng/ml con un coeficiente de variación intra e inter ensayo de 9,9 y 11,3% respectivamente (Použití y Testu, 2009).

Digitalización de referencias bibliográficas

Con el fin de comparar las concentraciones de P₄ obtenidas en esta investigación con la información reportada en estudios anteriores se utilizó el software DataThief 3.0 (Tummers, 2006) que permite la extracción de datos numéricos a partir de la digitalización de los valores representados gráficamente. Para poder realizar el proceso es necesario escanear el gráfico de la publicación, cargarlo al software y establecer las coordenadas conocidas para obtener las del dato deseado. Al utilizar una imagen con una resolución de 300ppp el error es de $\pm 0,05\%$ del valor obtenido; es decir que si éste es 0,50ng/ml, el error es de $\pm 0,00025$ ng/ml. Este software ha sido utilizado con éxito en investigaciones previas incluyendo a meta-análisis (Angilletta, Huey y Frazier, 2010; Critchley, Yang y Lee, 2011; Richardson, Gardali y Jenkins, 2009; Rowe, Repasky y Palmer, 1997; Shoo y Catterall, 2013).

Los valores que se digitalizaron para la comparación en este estudio se expresaron en ng/ml de progesterona localizados, aproximadamente, al mismo tiempo de la toma de muestra realizada en esta investigación (Período post luteólisis; día del estro, ovulación o inseminación). En conjunto se utilizaron 30 datos digitalizados de 17 investigaciones que fueron seleccionadas en base al estado reproductivo (vaquillas, primíparas, multíparas y repetidoras), propósito (vacas lecheras), raza (Holstein con inclusión de dos estudios de Sueco rojo) y medición de progesterona en plasma. En los estudios que se aplicaron tratamientos hormonales sólo se tomaron los datos de los grupos controles (sin tratamiento

alguno) y no se incluyeron datos que hayan sido transformados o normalizados (transformación logarítmica o de potencia) (Apéndice 3). Las imágenes utilizadas en este estudio, tuvieron una resolución de 150ppp, lo cual permitió extraer datos con un error de $\pm 0,1\%$ del valor; es decir que si el valor obtenido es 0,50 ng/ml de P₄, el error es de $\pm 0,0005$ ng/ml.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico del presente estudio se realizó mediante SPSS Statistics versión 21 (IBM, Boston). Los animales con concentraciones de progesterona superiores a 0,9 ng/ml, que han sido definidos en investigaciones anteriores como el punto de inicio del período post luteolítico (Ginther et al., 2010), no se incluyeron en el análisis. Ya que estos individuos se encuentran en un período diferente del ciclo que pueden modificar las conclusiones de la investigación.

Inicialmente, la normalidad de las variables fue evaluada por medio de la prueba de Shapiro-Wilk (Apéndice 1). Como no se encontró un comportamiento normal en todos los grupos dentro de las concentraciones de progesterona se hizo uso de pruebas no paramétricas. Por otro lado, sí se demostró normalidad en los valores de producción láctea por lo que en este caso sí se utilizaron pruebas paramétricas.

Los datos de progesterona obtenidos al día de la inseminación artificial fueron representados en diagramas de caja y bigotes y comparados por medio de un Kruskal-Wallis.

Las concentraciones de progesterona y el nivel de producción láctea se organizaron en intervalos bajo, medio y alto en base a la serie de datos obtenida (Apéndice 2). Éstos se relacionaron con la variable cualitativa gestación (Si/No) mediante un chi cuadrado de

independencia en una tabla 3x2 con dos grados de libertad. Con el fin de determinar si la tasa de concepción depende de los niveles de progesterona en el momento de la IA.

Los valores de P₄ y producción láctea se relacionaron por medio de una correlación de Pearson que fue evaluada en base al coeficiente de correlación múltiple (r) y de determinación (r²).

La tasa de concepción general y tasa de concepción a la primera y segunda inseminación se calcularon según el grupo de estudio conforme las fórmulas 1 y 2. La tasa de concepción según el nivel de concentración de progesterona y el nivel de producción láctea se obtuvieron conforme las fórmulas 3 y 4. Estos resultados se procesaron independientemente por medio de chi cuadrado de homogeneidad (con corrección de Yates en los casos en donde la tabla de contingencia tenía valores menores a 5) y un grado de libertad con el fin de determinar si existe una diferencia significativa entre las tasas obtenidas.

Fórmulas:

1. $TC = \frac{\text{Gestantes}}{\text{Total Inseminadas}} * 100$
2. $TC (\#IA) = \frac{\text{Gestantes (\#IA)}}{\text{Total Inseminadas (\#IA)}} * 100$
3. $TC = \frac{\text{Gestantes por nivel}}{\text{Total Inseminadas por nivel}} * 100$
4. $TC = \frac{\text{Gestantes por nivel (\#IA)}}{\text{Total Inseminadas por nivel (\#IA)}} * 100$

Las concentraciones de P₄ de gestantes y vacías (general y vaquillas) así como la información de P₄ al momento de la IA obtenida en vaquillas y vacas lactantes de éste estudio y la publicada de investigaciones anteriores fueron comparadas por medio de una prueba U de Mann Whitney para determinar si estas son en promedio significativamente

diferentes. Con el mismo fin, la información de producción láctea de gestantes y vacías se comparó por medio de una prueba z para muestras de dos medias. En todos los casos se utilizó un 95% de confianza.

RESULTADOS

Tasa de concepción

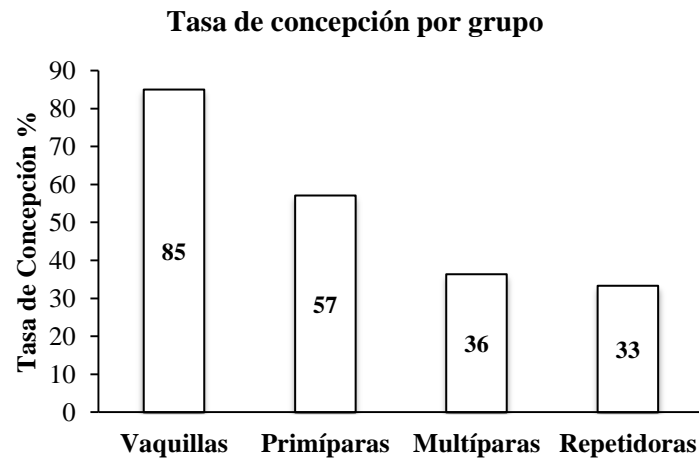


Figura 8. Tasa de concepción total en los diferentes estados reproductivos.

Autor: Mayra Padilla

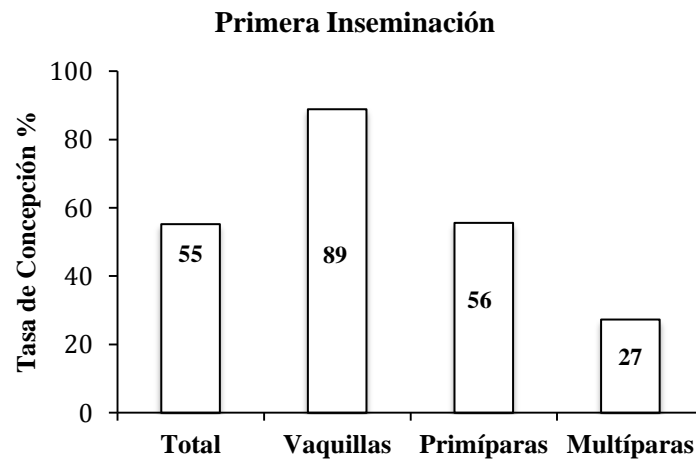


Figura 9. Tasa de concepción a la primera inseminación.

Autor: Mayra Padilla

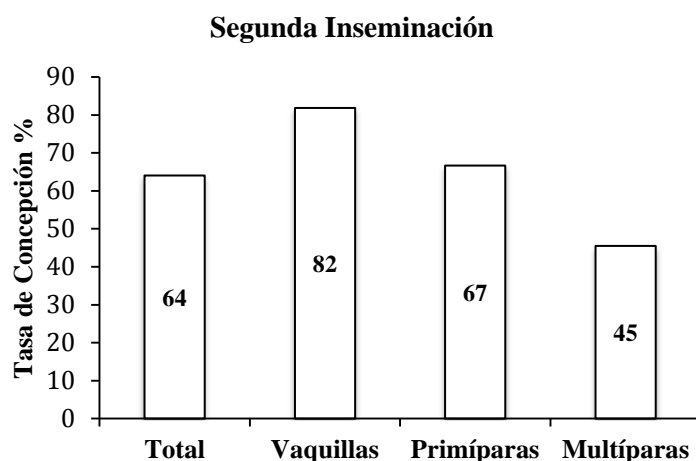


Figura 10. Tasa de concepción a la segunda inseminación

Autor: Mayra Padilla

Tabla 3

Tasas de concepción en vaquillas, primíparas, multíparas y repetidoras.

	Global	N	Vaq.	N	Prim.	N	Mult.	N	Rep.	N
TC	52%	(44)84	85%	(17)20	57%	(12)21	36%	(8)22	33%	(7)21
TC (IIA)	55%	(21)38	89%	(8)9	56%	(10)18	27%	(3)11		
TC (2IA)	64%	(16)25	81%	(9)11	67%	(2)3	45%	(5)11		
TC (3IA)									57%	(4)7
TP (>3IA)									21%	(3)14

Autor: Mayra Padilla

Tabla 4

Comparación de tasa de concepción general entre grupos de estudio.

Ho	Chi obt	Chi crit.	P
V=P	2,61	3,84	0,11
V=M	8,37	3,84	0,004
V=R	9,24	3,84	0,002
P=M	1,12	3,84	0,29
P=R	1,54	3,84	0,22
M=R	0,01	3,84	0,91

Nota: Chi cuadrado de homogeneidad de las tasas de concepción según el grupo de estudio. **Ho:** hipótesis nula; **V=P, V=M, V=R, P=M, P=R, M=R:** distribuciones homogéneas sin diferencia estadística; **Chi obt.:** valor de Chi obtenido; **Chi crit.:** valor de Chi crítico; **P:** probabilidad.

Autor: Mayra Padilla

Tabla 5

Comparación de tasa de concepción a la primera IA entre grupos de estudio

Ho	Chi obt	Chi crit.	P
V=P	1,69	3,84	0,19
V=M	5,31	3,84	0,02
P=M	0,94	3,84	0,33

Nota: Chi cuadrado de homogeneidad de las tasas de concepción a la primera IA según el grupo de estudio con corrección de Yates. **Ho:** hipótesis nula; **V=P, V=M, P=M:** distribuciones homogéneas sin diferencia estadística; **Chi obt.:** valor de Chi obtenido; **Chi crit.:** valor de Chi crítico; **P:** probabilidad.

Autor: Mayra Padilla

Tabla 6

Comparación de tasa de concepción a la segunda IA entre grupos de estudio

Ho	Chi obt	Chi crit.	P
V=P	0,05	3,84	0,82
V=M	1,77	3,84	0,18
P=M	0,00	3,84	1,00

Nota: Chi cuadrado de homogeneidad de las tasas de concepción a la segunda IA según el grupo de estudio con corrección de Yates. **Ho:** hipótesis nula; **V=P, V=M, P=M:** distribuciones homogéneas sin diferencia estadística; **Chi obt.:** valor de Chi obtenido; **Chi crit.:** valor de Chi crítico; **P:** probabilidad.

Autor: Mayra Padilla

Concentraciones de progesterona a la IA entre los estados reproductivos

Existen cuatro animales con concentraciones de P_4 superiores a 0,9 ng/ml al momento de la IA en los grupos de vaquillas (n=2; 1.96 y 0.97 ng/ml), primíparas (n=1; 3,18 ng/ml) y repetidoras (n=1 1.18 ng/ml). Estos individuos (n=4) no se incluyeron en el análisis estadístico, ya que se encuentran aún en período luteolítico, mientras que el resto de animales (n=84) están dentro del período post luteolítico (Ginther et al., 2010).

Tabla 7

Medias y medianas de progesterona de los estados reproductivos (ng/ml).

	Vaquillas	N	Primíparas	N	Múltiparas	N	Repetidoras	N
Media grupal	0,50±0,17	20	0,25±0,12	21	0,28±0,14	22	0,30±0,17	21
Mediana grupal	0,55	20	0,23	21	0,26	22	0,25	21

Autor: Mayra Padilla

Tabla 8.

Comparación de concentraciones de P_4 al momento de la IA en los cuatro estados reproductivos

N	H₀	Chi-cuadrado	Gl	P
84	V=P=M=R	21,7	3	0,000

Nota: Kruskal--Wallis de las concentraciones de P_4 entre los 4 estados reproductivos. **H₀**: hipótesis nula; **V=P=M=R**: no hay diferencia entre los estados reproductivos; **GL**: grados de libertad; **P**: probabilidad.

Autor: Mayra Padilla

Concentraciones de P₄ a la IA

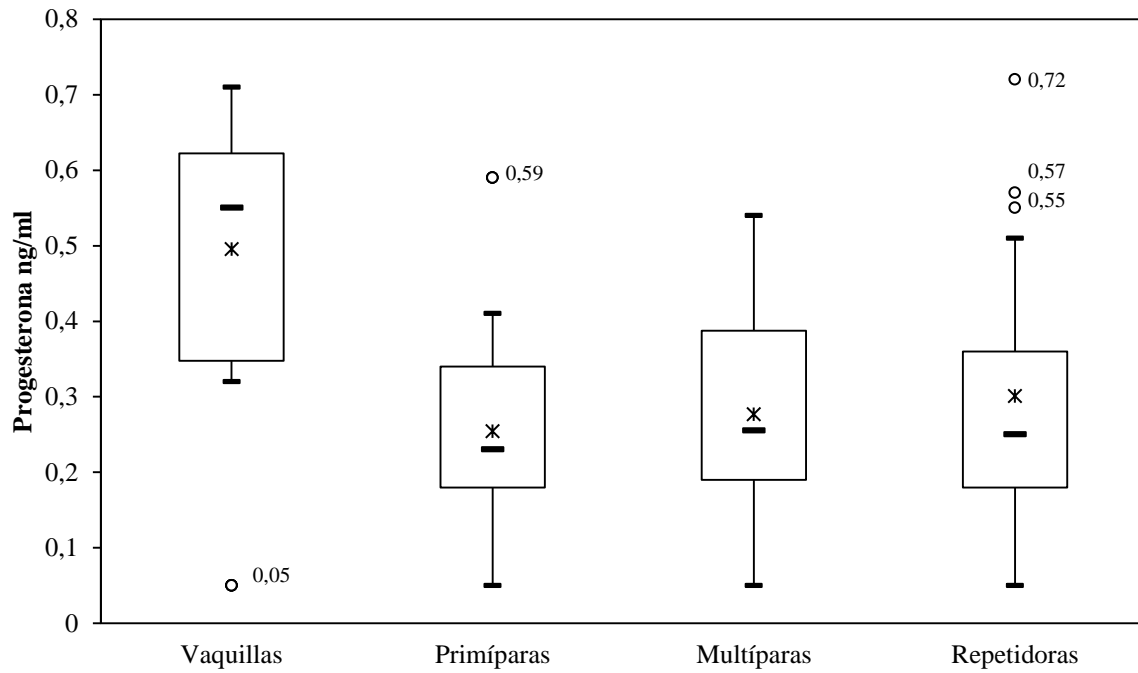


Figura 11. Diagrama de caja de las concentraciones de P₄ al momento de la IA en los diferentes grupos de estudio (n=84). Vaquillas (n=20), Primíparas (n=21), Multíparas (n=22) y Repetidoras (n=21). Se muestran los datos atípicos (o), media (x) y mediana (—). El grupo de vaquillas se comporta de forma diferente en comparación a los demás grupos [P<0,01].

Autor: Mayra Padilla

Concentraciones de progesterona de la investigación versus literatura publicada

Tabla 9

Media de las concentraciones de P_4 en esta investigación y las obtenidas mediante digitalización de referencias (ng/ml).

	General	N	Vaquillas	N	Vacas Lactantes	N
Investigación	0,33±0,18	84	0,50±0,17	20	0,28±0,14	64
Literatura	0,22±0,11	30	0,20±0,12	10	0,23±0,11	20

Autor: Mayra Padilla

Tabla 10

Comparación de las concentraciones de P_4 al momento de la IA en esta investigación y las obtenidas mediante digitalización de referencias bibliográficas general, en vacas lactantes y vaquillas.

Ho	P	Desición
G=Glit.	0,007	Rechazar Ho
VL=VLlit.	0,369	Retener Ho
V=Vlit.	0,000 ¹	Rechazar Ho

Nota: Prueba U de Mann Whitney de muestras independientes para las concentraciones de P_4 generales, en vacas lactantes y vaquillas de esta investigación vs. referencias bibliográficas. **Ho:** hipótesis nula; **G=Git.;** **VL=VLlit.,** **V=Vlit:** no hay diferencia entre las muestras; **P:** probabilidad.

Autor: Mayra Padilla

Concentraciones de P₄ vs. Literatura

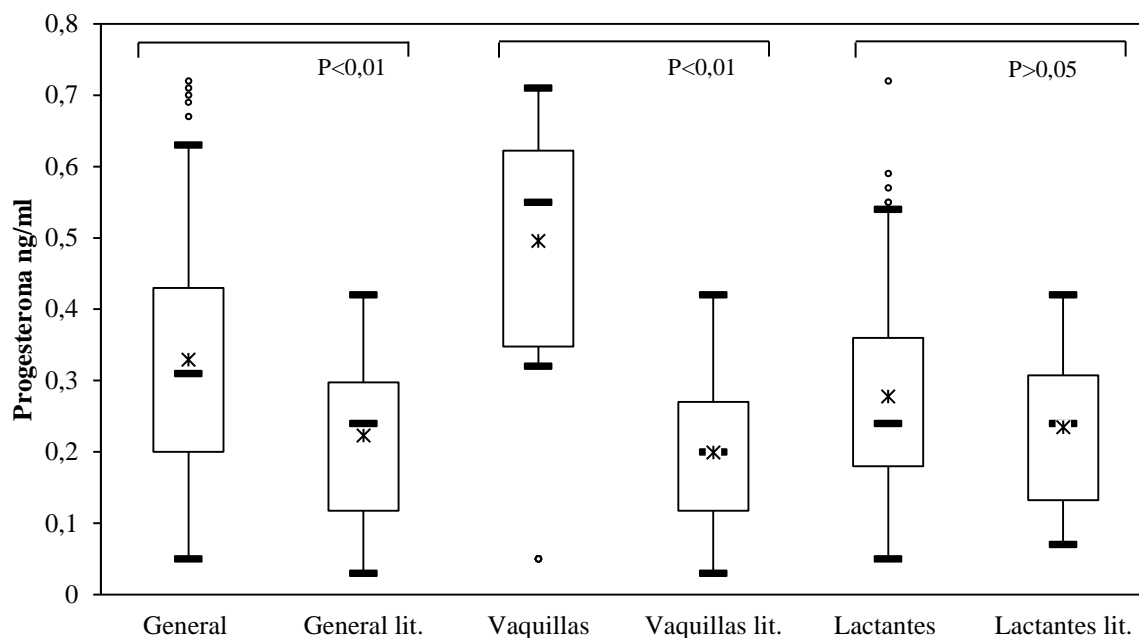


Figura 12. Diagrama de caja de la relación ente las concentraciones de P₄ en la investigación actual versus la literatura reportada. General (n=84), General lit. (n=30), Vaquillas (n=20), Vaquillas lit. (n=10), Lactantes (n=64), Lactantes lit. (n=20). Se muestran los datos atípicos (o), media (x) y mediana (—).

Autor: Mayra Padilla

Concentraciones de progesterona al momento de la IA y tasa de concepción

Tabla 11.

Evaluación de dependencia de niveles de P₄ y tasa de concepción.

Ho	Chi obt	Chi crit.	P
TC es indep. de P ₄	0,0578	5,99	0,9715
Tc1 es indep. de P ₄	0,7756	5,99	0,6786
Tc2 es indep. de P ₄	2,4130	5,99	0,2992

Nota: Chi cuadrado de independencia entre los niveles de P₄ (alto, medio y bajo) y la tasa de concepción general (TC), a la primera (Tc1) y segunda (Tc2) inseminación. **Ho:** hipótesis nula; **indep.:** independiente; **Chi obt.:** valor de Chi obtenido; **Chi crit.:** valor de Chi crítico; **P:** probabilidad.

Autor: Mayra Padilla

Tabla 12

Tasas de concepción general, a la primera y segunda IA según el nivel de concentraciones de progesterona.

Nivel de progesterona	General	N (84)	Primera IA	N (38)	Segunda IA	N (25)
Bajo (0,05-0,27 ng/ml)	52,6%	20(38)	62,5%	10(16)	44,4%	4(9)
Medio (0,28-0,50 ng/ml)	53,6%	15(28)	46,2%	6(13)	72,7%	8(11)
Alto (0,51-0,72 ng/ml)	50,0%	9(18)	55,6%	5(9)	80,0%	4(5)

Nota: gestantes /inseminados en el nivel de progesterona

Autor: Mayra Padilla

Tabla 13

Comparación de tasa de concepción general según el nivel de concentraciones de progesterona

Ho	Chi obt	Chi crit.	P
B=M	0,01	3,84	0,9397
B=A	0,03	3,84	0,8540
M=A	0,06	3,84	0,8129

Nota: Chi cuadrado de homogeneidad de las tasas de concepción según el nivel de P₄. **Ho:** hipótesis nula; **B=M, B=A y M=A:** distribuciones homogéneas sin diferencia estadística; **Chi obt.:** valor de Chi obtenido; **Chi crit.:** valor de Chi crítico; **P:** probabilidad.

Autor: Mayra Padilla

Tabla 14

Comparación de tasa de concepción a la primera IA según el nivel de concentraciones de progesterona

Ho	Chi obt	Chi crit.	P
B=M	0,77	3,84	0,3787
B=A	0,12	3,84	0,7337
M=A	0,19	3,84	0,6646

Nota: Chi cuadrado de homogeneidad de las tasas de concepción según el nivel de P₄. **Ho:** hipótesis nula; **B=M, B=A y M=A:** distribuciones homogéneas sin diferencia estadística; **Chi obt.:** valor de Chi obtenido; **Chi crit.:** valor de Chi crítico; **P:** probabilidad.

Autor: Mayra Padilla

Tabla 15

Comparación de tasa de concepción a la segunda IA según el nivel de concentraciones de progesterona

Ho	Chi obt	Chi crit.	P
B=M	0,68	3,84	0,4090
B=A	0,53	3,84	0,4687
M=A	0,10	3,84	0,7555

Nota: Chi cuadrado de homogeneidad de las tasas de concepción a la segunda IA según el nivel de P₄ con corrección de Yates. **Ho:** hipótesis nula; **B=M, B=A y M=A:** distribuciones homogéneas sin diferencia estadística; **Chi obt.:** valor de Chi obtenido; **Chi crit.:** valor de Chi crítico; **P:** probabilidad

Autor: Mayra Padilla

Al encontrarse diferencia entre vaquillas y el resto de vacas lactantes también se evaluó la dependencia de los niveles alto, medio y bajo de P₄ y la tasa de concepción dentro de estos grupos.

Tabla 16.

Evaluación de dependencia de niveles de P₄ y tasa de concepción en vaquillas y vacas lactantes.

	Ho	Chi obt	Chi crit.	P
Vaquillas	TC es indep. de P ₄	0,3030	5,9915	0,8594
Vacas Lactantes	TC es indep. de P ₄	6,4213	5,9915	0,0403

Nota: Chi cuadrado de independencia entre los niveles de P₄ (alto, medio y bajo) y la tasa de concepción general (TC). **Vacas Lactantes:** incluye a primíparas, multíparas y repetidoras. **Ho:** hipótesis nula; **indep.:** independiente; **Chi obt.:** valor de Chi obtenido; **Chi crit.:** valor de Chi crítico; **P:** probabilidad.

Autor: Mayra Padilla

Tabla 17

Tasas de concepción en vaquillas según el nivel de concentraciones de progesterona.

Nivel de progesterona	Vaquillas	N	Vacas Lactantes	N
Bajo (0,05-0,27 ng/ml)	100%	1(1)	51,4%	19(37)
Medio (0,28-0,50 ng/ml)	87,5%	7(8)	40,0%	8(20)
Alto (0,51-0,72 ng/ml)	88,8%	8(9)	00,0%	0(7)

Autor: Mayra Padilla.

Tabla 18

Comparación de tasa de concepción de vaquillas según el nivel de concentraciones de progesterona

Ho	Chi obt	Chi crit.	P
B=M	1,72	3,84	0,1894
B=A	0,09	3,84	0,7628
M=A	0,87	3,84	0,3502

Nota: Chi cuadrado de homogeneidad de las tasas de concepción de vaquillas según el nivel de P_4 con corrección de Yates. **Ho:** hipótesis nula; **B=M, B=A y M=A:** distribuciones homogéneas sin diferencia estadística; **Chi obt.:** valor de Chi obtenido; **Chi crit.:** valor de Chi crítico; **P:** probabilidad

Autor: Mayra Padilla.

Tabla 19

Comparación de tasa de concepción de vacas lactantes según el nivel de concentraciones de progesterona

Ho	Chi obt	Chi crit.	P
B=M	0,29	3,84	0,5884
B=A	4,41	3,84	0,0358
M=A	3,98	3,84	0,0461

Nota: Chi cuadrado de homogeneidad de las tasas de concepción de vacas lactantes según el nivel de P_4 con corrección de Yates. **Ho:** hipótesis nula; **B=M, B=A y M=A:** distribuciones homogéneas sin diferencia estadística; **Chi obt.:** valor de Chi obtenido; **Chi crit.:** valor de Chi crítico; **P:** probabilidad

Autor: Mayra Padilla

Progesterona en gestantes

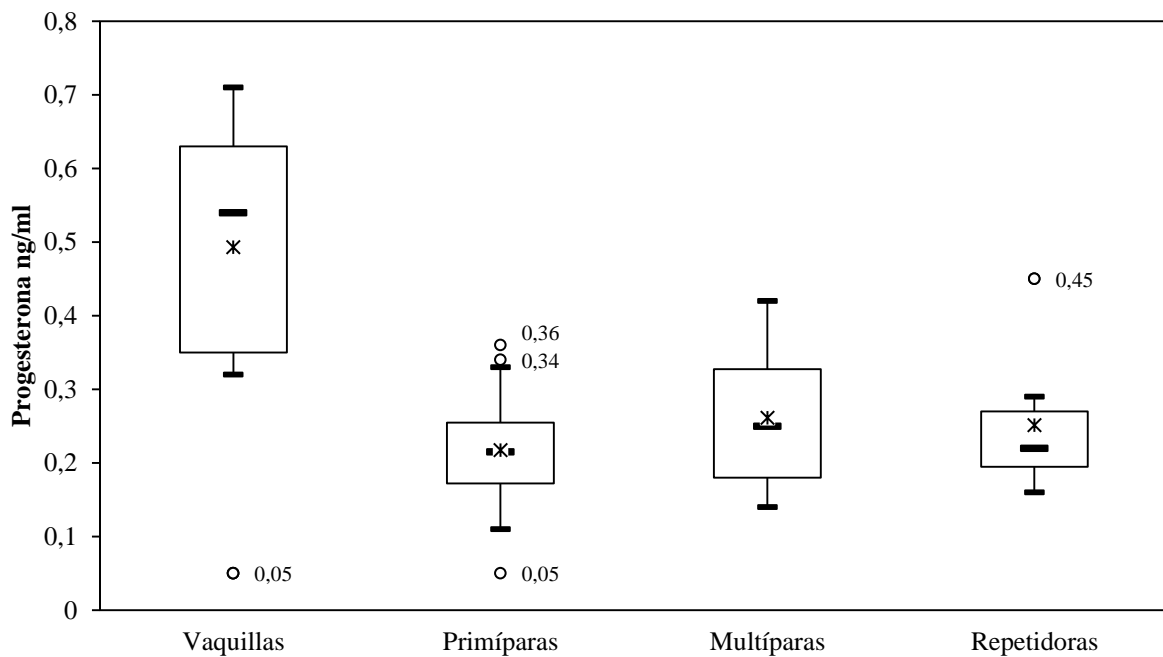


Figura 13. Diagrama de caja de las concentraciones de P_4 al momento de la IA en los animales gestantes post-IA de los grupos de vaquillas ($n=17/20$), primíparas ($n=12/21$), multíparas ($n=8/22$) y repetidoras ($n=7/21$). Datos atípicos (o), media (x) y mediana (■).

Autor: Mayra Padilla

Progesterona en vacías

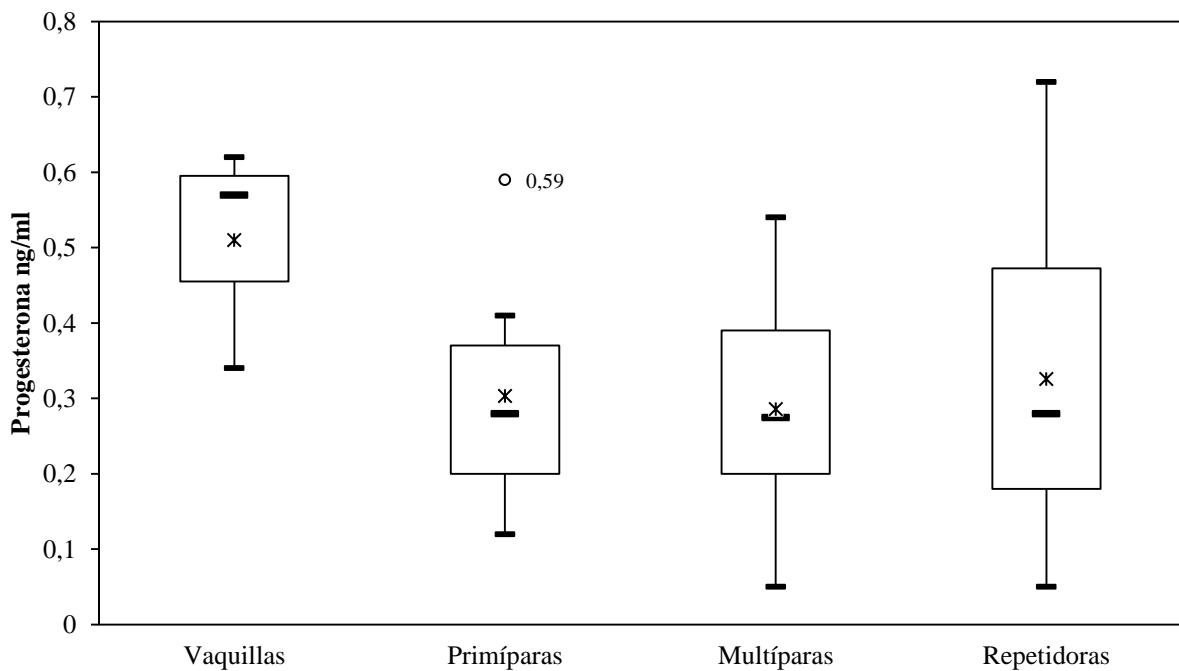


Figura 14. Diagrama de caja de las concentraciones de P_4 al momento de la IA en los animales no gestantes post-IA de los grupos de vaquillas ($n=3/20$), primíparas ($n=9/21$), multíparas ($n=14/22$) y repetidoras ($n=14/21$). Datos atípicos (o), media (x) y mediana (■).

Autor: Mayra Padilla

Concentraciones de progesterona en gestantes y vacías

Tabla 20

Media de las concentraciones de P_4 en gestantes y vacías (ng/ml).

	General	N	Vaquillas	N	Primíparas	N	Múltiparas	N	Repetidoras	N
Gestantes	0.34±0.18	44	0.49±0.18	17(20)	0.22±0.09	12(21)	0.26±0.10	8(22)	0.25±0.10	7(21)
Vacías	0.32±0.17	40	0.51±0.15	3(20)	0.30±0.14	9(21)	0.28±0.15	14(22)	0.33±0.19	14(21)

Autor: Mayra Padilla

Tabla 21

Comparación de las concentraciones de P_4 al momento de la IA en gestantes y vacías general y de vaquillas.

Ho	P	Decisión
Ge=Va	0,764	Retener Ho
GeV=VaV	1,000 ¹	Retener Ho

Nota: Prueba U de Mann Whitney de muestras independientes para las concentraciones de P_4 gestantes y vacías torales y de vaquillas. **Ho:** hipótesis nula; **Ge=Va**, **GeV=VaV:** no hay diferencia entre las muestras; **P:** probabilidad.

Autor: Mayra Padilla

Tabla 22

Comparación de las concentraciones de P_4 al momento de la IA en vacas lactantes gestantes y vacías

Ho	Zcrítico	Tcal	P
GeVL=VaVL	1,64	2,01	0,02

Nota: Prueba Z de las concentraciones de P_4 en vacas lactantes gestantes y vacías. **Ho:** hipótesis nula; **GeVL=VaVL:** no hay diferencia entre gestantes y vacías; **Tcrítico:** valor de T crítico; **Tcal.:** valor de t tabulado; **P:** probabilidad.

Autor: Mayra Padilla

Concentraciones de P₄ en gestantes y vacías

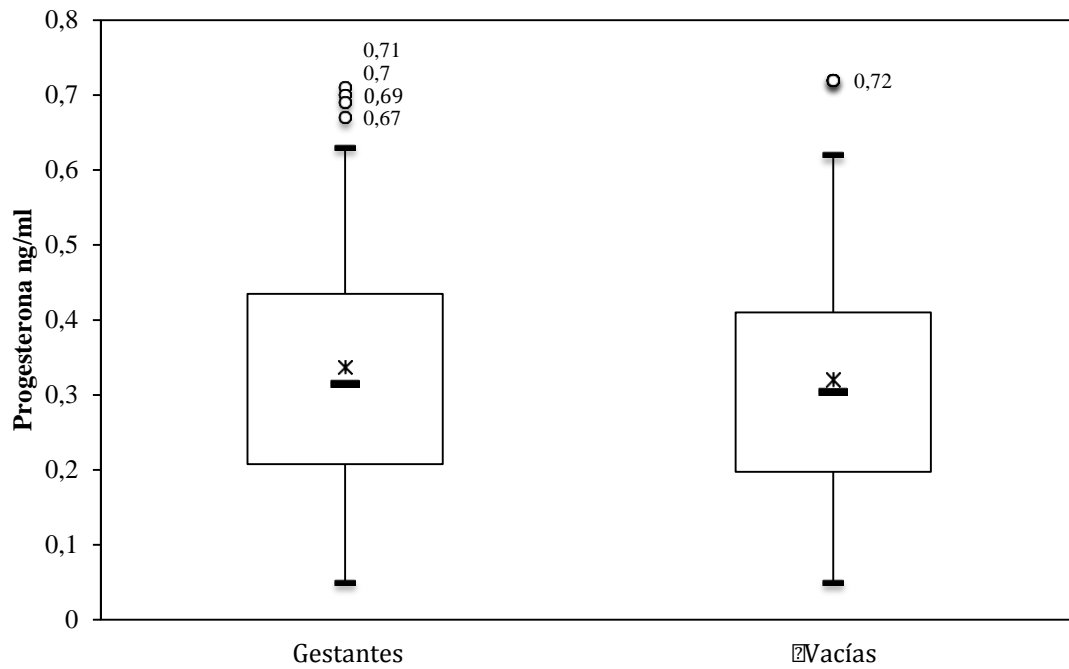


Figura 15. Diagrama de caja de las concentraciones de P₄ al momento de la inseminación artificial en gestantes (n=44) y vacías (n=40). Sin diferencia significativa [P>0,05]. Datos atípicos (○), media (x) y mediana (—).

Autor: Mayra Padilla

P₄ en gestantes y vacías de vaquillas

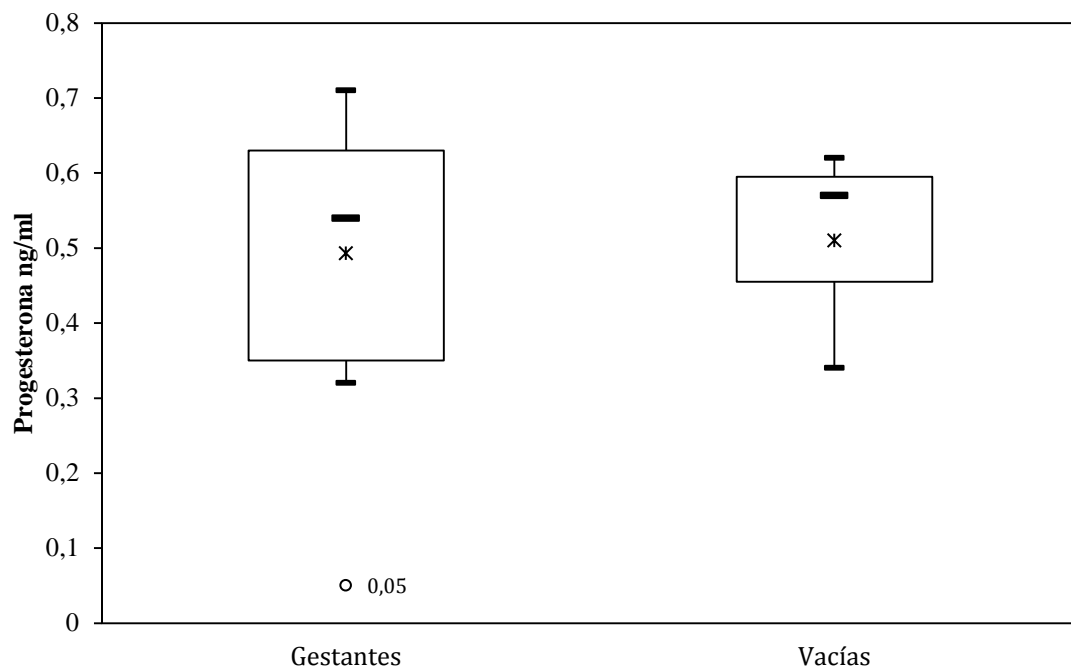


Figura 16. Diagrama de caja de las concentraciones de P₄ al momento de la inseminación artificial de vaquillas gestantes (n=27) y vacías (n=37). No existe diferencia significativa [P>0,01]. Datos atípicos (○), media (x) y mediana (—).

Autor: Mayra Padilla

P₄ de gestantes y vacías en vacas lactantes

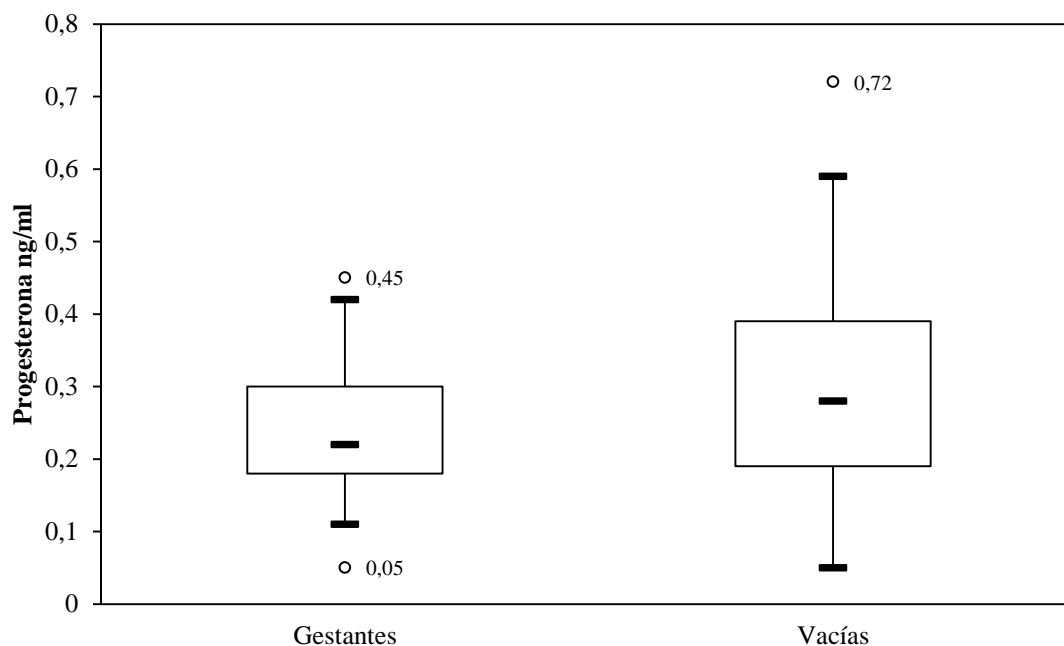


Figura 17. Diagrama de caja de las concentraciones de P₄ al momento de la inseminación artificial de primíparas, múltiparas y repetidoras gestantes (n=27) y vacías (n=37). Diferencia significativa [P<0,05]. Datos atípicos (○), media (x) y mediana (—).

Autor: Mayra Padilla

Progesterona al momento de la IA y producción láctea

Correlación de producción y progesterona

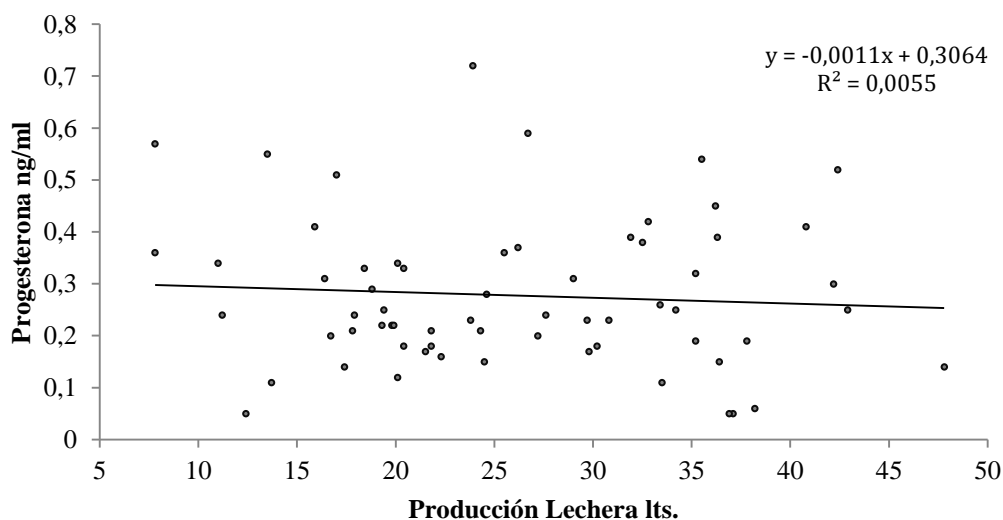


Figura 18. Gráfico de dispersión de la correlación entre las concentraciones de progesterona al momento de IA y la producción lechera. La relación es escasa o nula. [$r=0,07$; $r^2=0,005$].

Autor: Mayra Padilla

Tasa de concepción y producción láctea

Tabla 23.

Evaluación de dependencia de producción láctea y tasa de concepción en vacas lactantes.

Ho	Chi obt	Chi crit.	P
TC es indep. de PL	1,96	5,99	0,38

Nota: Chi cuadrado de independencia entre los niveles de producción láctea (alto, medio y bajo) y la tasa de concepción en vacas lactantes. **Ho:** hipótesis nula; **indep.:** independiente; **Chi obt.:** valor de Chi obtenido; **Chi crit.:** valor de Chi crítico; **P:** probabilidad.

Autor: Mayra Padilla

Tabla 24

Tasas de concepción en vacas lactantes según el nivel de producción láctea.

Nivel de progesterona	General	N
Bajo (7,8-21,1 ng/ml)	45,8%	11(24)
Medio (21,2-34,5 ng/ml)	48,0%	12(25)
Alto (34,6-47,8 ng/ml)	26,7%	4(15)

Nota: (gestantes /inseminados en el nivel de producción láctea)

Autor: Mayra Padilla

Tabla 25

Comparación de tasa de concepción entre niveles de producción láctea

Ho	Chi obt	Chi crit.	P
B=M	0,02	3,84	0,88
B=A	1,43	3,84	0,23
M=A	1,78	3,84	0,18

Nota: Chi cuadrado de homogeneidad de las tasas de concepción según el nivel de producción láctea con corrección de Yates. **Ho:** hipótesis nula; **B=M, B=A, M=A:** distribuciones homogéneas sin diferencia estadística; **Chi obt.:** valor de Chi obtenido; **Chi crit.:** valor de Chi crítico; **P:** probabilidad.

Autor: Mayra Padilla

Tabla 26

Comparación de la producción láctea de gestantes y vacías.

Ho	Zcrítico	Zcal	P
G=V	1,64	0,56	0,29

Nota: Prueba z de producción láctea en gestantes y vacías.

Ho: hipótesis nula; **G=V:** no hay diferencia entre las muestras; **Zcrítico:** valor de z crítico; **Zcal.:** valor de z tabulado; **P:** probabilidad.

Autor: Mayra Padilla

DISCUSIÓN

Inclusión de animales

Las investigaciones anteriores realizadas en la fase folicular del ciclo estral han definido el final del período luteolítico como el momento de descenso de los niveles de P_4 a 1ng/ml; mientras que el inicio del post luteolítico se define a partir de concentraciones menores o iguales a 0,9 ng/ml (Ginther et al., 2010). Con base a esta información, se determinó que los cuatro individuos con concentraciones de progesterona superiores a 0,9 ng/ml en el momento de la IA (0.97, 1.96, 3.18 y 1.18 ng/ml) no se encuentran dentro del mismo período que el resto de los animales en este estudio (n=84). Por esta razón no se incluyeron en el análisis estadístico.

Por otro lado, investigaciones adicionales han mencionado que las vacas con concentraciones de P_4 mayores a 1ng/ml, 48 horas luego de la administración de $PGF_{2\alpha}$, se han clasificado como animales con un cuerpo lúteo con regresión incompleta y una consecuente baja tasa de gestación a la IA (Burke et al., 1996; Moreira et al., 2001). En este estudio, ninguno de los animales con concentraciones superiores a 0,9 ng/ml fueron positivos a la gestación. Es probable que el comportamiento atípico de las concentraciones de progesterona encontrado en estos individuos pueda estar relacionado a la ausencia o retraso del pico de LH. Ya que éste se ve inhibido por la parcial o incompleta luteólisis, la presencia de estructuras luteinizadas en el ovario o los tratamientos con agentes progestacionales (Lee et al., 1988; Sirois y Fortune, 1990; Silvia, Hatler, Nugent y Da Fonseca, 2002).

Concentraciones de progesterona a la IA entre estados reproductivos

Las concentraciones de progesterona al momento de la IA en este estudio variaron desde 0,05 hasta 0,72 ng/ml (n=84) y al ser comparados entre los grupos de investigación se evidenció que las vaquillas (n=20) tienen un comportamiento en promedio superior ($P < 0,01$) al de primíparas (n=21), multíparas (n=22) y repetidoras (n=21) (Tabla 8; Figura 11). Estos resultados no concuerdan con los hallazgos de Balendran et al. (2008) que mostró que las vaquillas y vacas de primero a cuarto parto tuvieron concentraciones debajo de 0,2ng/ml al día de la IA que no difieren significativamente. De igual manera, las investigaciones que han comparado la función ovárica de vaquillas y vacas lactantes no han encontrado una diferencia significativa entre el promedio de P_4 al día de la ovulación (0,29 y 0,42 ng/ml) (Sartori et al., 2004; Wolfenson et al., 2004). Sin embargo, han determinado que las diferencias entre los perfiles de progesterona se dan a partir del día 6 (Sartori et al., 2004) ó del 3 al 16, siendo las vaquillas las que muestran una concentración de progesterona superior en relación a las vacas lactantes, tanto en el ciclo previo como el posterior a la ovulación (Wolfenson et al., 2004).

Este comportamiento de los perfiles de progesterona encontrado en vaquillas ha sido explicado por el estudio de Sangsritavong y colaboradores (2002) en donde se buscó comprobar si el incremento del flujo sanguíneo hepático (FH), producto del alto consumo de materia seca en vacas lactantes, puede elevar el metabolismo de hormonas esteroideas como progesterona y estradiol. Sus resultados determinaron que el continuo alto nivel de nutrición en las vacas en lactancia, aparentemente, eleva el flujo sanguíneo hepático y el metabolismo de hormonas esteroideas al doble del de las vacas no lactantes. Lo que demuestra que aunque exista el mismo nivel de producción hormonal, sus concentraciones plasmáticas serán inferiores (Wiltbank et al., 2006). Este hecho podría explicar el comportamiento diferente encontrado en el grupo de vaquillas de este estudio (n=20) con

niveles de progesterona en un rango significativamente superior (0,32 a 0,71ng/ml) (Figura 11) a las concentraciones de los demás grupos que han tenido al menos una lactancia (n=64).

Tasa de concepción entre estados reproductivos

La tasa de concepción obtenida en la presente investigación muestra una diferencia significativa entre vaquillas y vacas multíparas y repetidoras ($P < 0,05$; Tabla 4); además también evidencia diferencia en la tasa a la primera inseminación, entre vaquillas y vacas multíparas ($P < 0,05$). Estos resultados concuerdan con investigaciones en donde se ha observado que la tasa de concepción disminuye conforme la paridad aumenta (número lactancia) (García-Ispuerto et al., 2007; López-Gatius et al., 2005b). Por ejemplo, Balendran et al. (2008) encontraron que las vaquillas a la primera IA muestran tasa de 67,9% la cual es significativamente mayor a las tasas de vacas de primero, segundo, tercero y cuarto parto (42,9%, 20% y 11,9%, respectivamente). Del mismo modo, de acuerdo a Pursley et al. (1997) las tasas presentadas en vaquillas han sido superiores a las reportadas en vacas lactantes con un 74,4% y 38,9%, respectivamente. Entre las posibles causas de esta disminución en la fertilidad de vacas lactantes comparadas con las vaquillas se ha mencionado a las diferencias en el desarrollo folicular, concentraciones hormonales y el ambiente uterino. El tamaño del folículo preovulatorio ha sido relacionado con la disminución de las tasas de concepción; observándose que las vacas lactantes muestran folículos dominantes más grandes y con un periodo de dominancia más largo en comparación a las vaquillas (Wolfenson et al., 2004). En animales de ésta investigación se ha comprobado que el grupo de vacas lactantes mostró un tamaño máximo del folículo dominante mayor en comparación a las vaquillas (Zapata, 2015); lo que sugiere que estas vacas lactantes están ovulando oocitos provenientes de folículos persistentes que sufren

una maduración meiótica prematura que comprometen su capacidad de desarrollo después de la fertilización (Mihm et al., 1999).

Concentraciones de progesterona y tasa de concepción

En cuanto a la relación entre los niveles de progesterona al momento de la inseminación con la tasa de concepción, la prueba Chi cuadrado que incluye a los cuatro estados reproductivos (n=84) determinó que no existe una dependencia ($P>0,1$; Tabla 11) entre los valores de P_4 con el número de gestaciones totales y con las obtenidas a la primera y segunda IA. Es decir, que la tasa de concepción no depende de los niveles bajos (0,05-0,27ng/ml), medios (0,28-0,50 ng/ml) o altos (0,51-0,72 ng/ml) de progesterona encontrados en el total de animales en esta investigación. Sin embargo, se decidió evaluar la dependencia de las tasas de concepción y niveles de P_4 en vaquillas y en vacas lactantes por separado. Al hacer esto, se evidencia que en el grupo de vaquillas (n=20) no existe una dependencia del número de gestaciones obtenidas de acuerdo a las concentraciones de P_4 al momento de la IA ($P>0,1$; Tabla 11) mientras que en el grupo de vacas lactantes sí se observó una dependencia estadística entre el número de gestaciones logradas y las concentraciones de progesterona ($P<0,05$; Tabla 11). Es decir que la tasa de concepción obtenida en las vacas lactantes disminuye conforme el nivel de progesterona incrementa. Encontrándose una tasa de concepción de 51,4% para el nivel de progesterona bajo (0,05-0,27ng/ml); 40% para el medio (0,28-0,50 ng/ml) y 0% para el alto (0,51-0,72 ng/ml). Bage (2003) estudió la relación entre la tasa de concepción y los niveles hormonales al momento de la IA en vaquillas; determinando que existe un mayor riesgo de repetir el estro cuando se observan concentraciones de P_4 superiores a los basales. Adicionalmente, Balendran et al. (2008) han relacionado la paridad y niveles de P_4 con la tasa de gestación y han encontrado que las vaquillas de primera inseminación tienen una tasa de gestación

significativamente superior que el resto de grupos (primero, segundo, tercero y cuarto parto); sin embargo, en su estudio las concentraciones de P₄ no fueron estadísticamente diferentes entre los grupos experimentales. Estos resultados confirman el comportamiento diferente del grupo de vaquillas en relación al de vacas lactantes en este estudio; en donde las vaquillas muestran concentraciones dentro de un rango superior y mantienen una tasa de gestación elevada. Duchens et al. (1995) ha reportado que existe una reacción individual a los niveles suprabasales de progesterona. Existiendo vaquillas con valores similares post luteólisis que tienen una dinámica folicular, patrones hormonales y fertilidad normal. Mientras que otras tuvieron un crecimiento prolongado del folículo ovulatorio, aumento de la liberación de estradiol, ausencia o prolongación del estro y no fueron positivas luego de la IA. Con base en lo mencionado, al ser este un estudio intencionado y exploratorio, es necesario replicarlo en un mayor número de animales para poder confirmar estadísticamente la ausencia la independencia entre la tasa de concepción obtenida y los niveles de P₄ en las vaquillas.

Concentraciones de progesterona al momento de IA en gestantes y vacías.

El promedio de P₄ en las vacas gestantes y vacías general (4 grupos) no fue estadísticamente diferente ($P > 0,1$; Tabla 21) siendo sus valores muy similares ($0,32 \pm 0,17$ vs. $0,34 \pm 0,18$ ng/ml). Como se puede observar en la Figura 15, existen animales con concentraciones de entre 0,05 a 0,71 ng/ml que fueron positivas al diagnóstico de gestación; y otros con los mismos valores que fueron negativos. Sin embargo, se debe recalcar que todos los animales que tienen este comportamiento se encuentran en el grupo de vaquillas en el cual sus valores varían entre 0,32 a 0,71 ng/ml. Al comparar las concentraciones de P₄ de vaquillas gestantes (n=17) y vacías (n=3) se evidenció que tampoco difieren estadísticamente ($P > 0,1$; Tabla 21).

Por otro lado, al comparar los valores de progesterona de gestantes y vacías en vacas lactantes, se encontró una diferencia significativa ($P < 0,05$; Tabla 22) entre estas con una media de $0,24 \pm 0,09$ y $0,31 \pm 0,16$ ng/ml respectivamente (Figura 17). Este resultado, aunque aparentemente mayor, es semejante a lo encontrado por Ambrose et al. (2014) que observó que los animales que respondieron al protocolo de Ovsynch y fueron inseminados a tiempo fijo mostraron niveles de progesterona de $0,19 \pm 0,02$ y $0,24 \pm 0,02$ ng/ml en gestantes y vacías respectivamente. Aunque no fueron significativamente diferentes, se muestra una tendencia a ser mayores. Del mismo modo, Lopes et al. (2007) muestra una relación entre las concentraciones superiores de P4 y la disminución de la probabilidad de gestación; demostrando una diferencia significativa entre animales gestantes y no gestantes con un promedio de $0,19 \pm 0,01$ vs. $0,24 \pm 0,02$ ng/ml respectivamente.

En definitiva, el comportamiento del grupo vaquillas en relación al de vacas lactantes es diferente. En este estudio se muestran concentraciones de P₄ en vaquillas en un rango superior y aún así mantienen una tasa de gestación elevada. Como se mencionó con anterioridad, se ha reportado una respuesta individual a los niveles suprabasales de progesterona; existiendo vaquillas con valores suprabasales en el momento de la IA que tienen una dinámica folicular, patrones hormonales y fertilidad normal (Duchens et al., 1995). El alcance de este estudio no permite establecer la causa por la que las vaquillas con concentraciones de progesterona elevadas sobre el umbral basal puedan ser positivas a la gestación.

Concentraciones de progesterona de la investigación versus literatura

Las concentraciones de progesterona de este estudio fueron en conjunto ($n=84$) estadísticamente ($P < 0,01$; Tabla 10) diferentes a las recopiladas de investigaciones anteriores ($n=30$). Esta diferencia es evidente debido al comportamiento notoriamente

superior ($P < 0,01$) del grupo de vaquillas de esta investigación ($n=20$) ($0,50 \pm 0,17$ ng/ml) en relación a las concentraciones de P_4 reportadas en vaquillas en estudios anteriores ($n=10$) ($0,20 \pm 0,12$ ng/ml). Ya que los niveles de P_4 de vacas lactantes (primíparas, multíparas y repetidoras; $n=64$) de este estudio no difirieron significativamente del promedio encontrado en animales con características semejantes ($n=20$) de investigaciones previas ($0,28 \pm 0,14$ vs. $0,23 \pm 0,11$ ng/ml; $P > 0,1$) (Tabla 10; Figura 12).

El promedio de las concentraciones de progesterona en este estudio fueron de $0,50 \pm 0,17$ ng/ml en el grupo de vaquillas. Ginther y col. (2013) aproximadamente al mismo tiempo en el que se tomó la muestra (12 horas luego del inicio del estro) encontró valores de P_4 de $0,14$ ng/ml. En el día del estro, Lucy et al. (1994), Ronchi et al. (2001) y Båge et al. (2002) reportaron $0,06$, $0,25$ y $0,27$ ng/ml respectivamente. Y Balendran et al. (2008) en el día de la IA mostró un valor de $0,03$ ng/ml. Inclusive cuando niveles suprabasales han sido inducidos experimentalmente, las concentraciones mínimas alcanzadas post luteólisis ($0,31 \pm 0,094$ ng/ml) fueron menores a los encontrados en la investigación actual (Duchens et al., 1995). Curiosamente, este fue el grupo con mayor tasa de concepción general, a la primera y a la segunda inseminación artificial (Tabla 3). A pesar de que se ha reportado un mayor riesgo de repetir el estro cuando se presentan niveles de progesterona suprabasales en vaquillas (Båge, 2002; Båge, 2003).

Por otro lado, las concentraciones de P_4 de los grupos de primíparas ($n=21$) y multíparas ($n=22$) tuvieron una media de $0,25 \pm 0,12$ ng/ml y $0,28 \pm 0,14$ ng/ml respectivamente. Estos resultados son similares a los publicados por Sartori et al. (2004) ($0,29$ ng/ml) y Wolfenson et al. (2004) ($0,42$ ng/ml) en el día de la ovulación y los de Lopes et al. (2007) y Balendran et al. (2008) en el día de la IA ($0,20 \pm 0,02$ y $0,25 \pm 0,02$ ng/ml vs. $0,08$ y $0,19$ ng/ml). Adicionalmente, en el grupo de vacas clasificadas como repetidoras

(n=21) la media de progesterona fue de $0,30\pm 0,17$ ng/ml con $0,25\pm 0,10$ ng/ml en gestantes y $0,33\pm 0,19$ ng/ml en vacías (Figura 12 y 13). Valores que también concuerdan con los reportados por Robinson et al. (2006) en vacas fuera de lactancia con ciclos normales ($0,22\pm 0,006$ ng/ml) y los de Morales-Roura et al. (2001) y Pérez-Marín y España (2007) que encontraron concentraciones de $0,23\pm 0,48$ y $0,21\pm 0,59$ ng/ml y $0,4\pm 0,2$ y $0,3\pm 0,2$ ng/ml en vacas repetidoras gestantes y vacías respectivamente.

Por otro lado, investigaciones anteriores en vacas fuera de lactancia, han determinado que los animales que desarrollaron quistes anovulatorios presentaron concentraciones suprabasales ($0,69\pm 0,16$ ng/ml) en relación a las vacas normales y con quistes ováricos ovulatorios ($0,22\pm 0,006$ y $0,35\pm 0,04$ ng/ml) (Robinson et al., 2006). Curiosamente, en esta investigación los niveles de P₄ alcanzaron valores tan altos como los de las vacas quísticas anovulatorias ($0,69\pm 0,16$ ng/ml) reportadas anteriormente. Sin embargo, ninguna fue diagnosticada con una patología similar. De todos modos, aunque no se haya obtenido diagnóstico de anormalidades ováricas a los 45 días pos IA no se puede descartar que los animales negativos a la gestación no hayan desarrollado quistes ovulatorios durante el período que fue evaluado. Sin embargo, los datos de las concentraciones en el día del estro de un ciclo anterior que fueron colectadas en un estudio complementario realizado en los mismos animales (n=12) confirman la presencia de concentraciones elevadas de progesterona con ausencia de un quiste o cuerpo lúteo en representantes de los grupos de estudio de esta investigación (Zapata, 2015). Por lo que se podría sugerir que los altos valores de progesterona se han presentado sin patología alguna al menos en estos animales (Tabla 27).

Tabla 27
Concentraciones de progesterona al día del estro del ciclo anterior.

	Día del estro ciclo anterior (ng/ml)	Día de la IA este estudio (ng/ml)	Gestación
Vaquillas	0,83	0,70	Sí
	0,38	0,63	Sí
	0,29	0,57	Sí
	0,24	0,12	No
Primíparas	0,29	0,33	Sí
	0,38	0,18	No
Multíparas	0,47	0,41	No
	0,10	0,05	No
Repetidoras	1,11	0,55	No
	0,05	0,16	Sí

Nota: Los valores de P₄ en el ciclo anterior se tomaron de Zapata, 2015.

Producción láctea y eficiencia reproductiva

En cuanto al nivel de producción láctea en las vacas lactantes no se encontró una correlación ($r=0,07$) con las concentraciones de progesterona en el momento de la IA. Tampoco se evidenció una dependencia de los niveles de producción bajos (7,7-21,1), medios (21,3-34,5) y altos (34,6-47,8) con la tasa de gestación obtenida, aunque ésta fue aparentemente menor en el grupo de altas productoras (45.8, 48 y 26.7%). Finalmente, no existió una diferencia significativa ($P > 0,05$) entre el nivel de producción de vacas gestantes y vacías en donde se mostró un promedio similar de $25,22 \pm 8,78$ y $26,55 \pm 10,04$ lts respectivamente.

La información que relaciona los niveles de producción con la fertilidad son controversiales (Wiltbank et al., 2006). Sin embargo, existe evidencia substancial de que el alto nivel productivo se asocia a cambios en la fisiología reproductiva que podría producir una disminución en la eficiencia de la reproducción (Wiltbank et al., 2006). Una muestra de este hecho es que la duración del estro se ha visto disminuido en vacas altas productoras hasta menos de ocho horas (Lopez et al., 2004). Además de que existen estudios en donde se ha encontrado un efecto sobre la tasa de gestación tanto en vacas primíparas (Faust,

McDaniel, Robison y Britt, 1988) así como en multíparas que se ha visto acompañado de un incremento en el número de inseminaciones por concepción (Windig et al., 2005). Conjuntamente, otros estudios realizados a gran escala han demostrado que el alto nivel de producción al día de la IA no afecta la tasa de gestación, fertilidad (García-Ispuerto et al., 2007; López-Gatius et al., 2005a; 2005b) o la tasa de parto obtenida (Fahey, O'Sullivan, Crilly, Mee, 2002). Estos resultados concuerdan con lo observado en esta investigación en donde la tasa de concepción no dependió de los niveles de producción láctea sin evidenciar una diferencia significativa entre las proporciones de gestantes en bajas, medias y altas productoras.

CONCLUSIONES

En conclusión, las concentraciones de progesterona al momento de la inseminación artificial en el grupo de vaquillas fueron significativamente superiores a las encontradas en primíparas, multíparas y repetidoras dentro de este estudio. A pesar de que existen datos atípicos dentro de las distribuciones, éstas no afectan los resultados obtenidos; ya que el grupo de vaquillas tiene un muy claro rango superior de concentraciones de progesterona en comparación a los grupos restantes. Este comportamiento podría deberse a la diferencia de metabolismo esteroideo asociado a las vacas en producción; por lo que se acepta la hipótesis de la investigación.

Por otro lado, se comprobó que existe una dependencia de la tasa de concepción en el grupo de vacas lactantes en donde ésta tasa disminuye conforme las concentraciones de P_4 aumentan al momento de la IA; mostrándose también concentraciones significativamente inferiores en las vacas gestantes. Sin embargo, en el caso de vaquillas la tasa de concepción no depende de las concentraciones de P_4 al momento de la IA, ya que se encontraron animales con concentraciones muy bajas al igual que animales con

concentraciones muy altas que son positivas a la gestación; además, las concentraciones de P_4 no difieren entre vaquillas gestantes y vacías. Posiblemente las vaquillas de esta localidad tengan un umbral basal superior al conocido que hace que las vaquillas se gesten con concentraciones de P_4 donde las vacas lactantes no. Con base en lo mencionado, se cumple la hipótesis de la investigación para el grupo de vaquillas y no para los grupos de vacas lactantes.

En el caso de la comparación de las concentraciones de P_4 de esta investigación con las digitalizadas de referencias bibliográficas, no se encontró una diferencia significativa en los grupos de vacas lactantes; manteniéndose un promedio similar a las de las concentraciones de progesterona publicadas. Sin embargo, el grupo de vaquillas fue notoriamente superior al grupo de vaquillas de referencia de la literatura. Esto confirma el comportamiento diferente de este grupo en la investigación.

Finalmente, en este estudio el nivel de producción láctea no estuvo relacionado con las concentraciones de progesterona al momento de la IA; y tampoco mostró un afectó sobre la tasa de concepción obtenida en vacas primíparas, multíparas y repetidoras. Por este motivo, no se aceptan las hipótesis propuestas.

Es importante mencionar que la hacienda en donde se llevó a cabo la investigación es atípica en relación al resto de explotaciones en la localidad; ya que el manejo de la nutrición, genética, control de enfermedades y protocolos reproductivos están basados en las recomendaciones internaciones. Por este motivo, los resultados obtenidos en esta investigación no pueden ser extrapolados a otras explotaciones de la región o del país.

RECOMENDACIONES

Se sugiere investigar en esta localidad temas como el metabolismo esteroideo y la capacidad esteroidogénica que podrían explicar las concentraciones elevadas encontradas en vaquillas. Adicionalmente, se requiere hacer un cálculo de tamaño de la muestra para confirmar los resultados obtenidos en esta investigación; de manera que éstos puedan ser extrapolados.

Por otro lado, se recomienda la implementación de métodos de medición hormonal alternativos (RIA ó electroquimioluminiscencia) que permitan comparar y comprobar la variación encontrada en los estados reproductivos en cuanto al comportamiento concentraciones de progesterona. Además de incorporar un monitoreo de LH y E₂ conjuntamente con el seguimiento ultrasonográfico de estructuras ováricas como cuerpo lúteo y folículos que permiten tener una completa interpretación del período de investigación.

Un área interesante de estudio es el ámbito de la producción láctea y su efecto en la fertilidad en relación a la variación de prácticas de manejo. En el Ecuador no se cuenta con información actual exacta sobre la magnitud de la producción lechera, por lo que una investigación sobre su comportamiento en cuanto al manejo podría aportar información valiosa para su desarrollo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, T. J., Hayashi, K. G., Ohtani, M., and Miyamoto, A. (2003). Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction*, 125(5), 759-767.
- Acosta, T. J., Ozawa, T., Kobayashi, S., Hayashi, K., Ohtani, M., Kraetzel, W. D., Sato, K., Schams, D., and Miyamoto, A. (2000). Periovarian changes in the local release of vasoactive peptides, prostaglandin F_{2α}, and steroid hormones from bovine mature follicles in vivo. *Biology of Reproduction*, 63(5), 1253-1261.
- Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K. T., Xu, S., Hobbs, H. H., and Krieger, M. (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*, 271(5248), 518-520.
- 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. (2010). 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.
- 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.
- Algire, J. E., Srikandakumar, A., Guilbault, L. A., and Downey, B. R. (1992). Preovulatory changes in follicular prostaglandins and their role in ovulation in cattle. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 56(1), 67.
- Alila, H. W., Corradino, R. A., and Hansel, W. (1988b). 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. (1988a). Control of progesterone production in small and large bovine luteal cells separated by flow cytometry. *Journal of reproduction and fertility*, 82(2), 645-655.
- Allrich, R. D. (1993). Estrous behavior and detection in cattle. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 9(2), 249-262.
- Ambrose, D. J., Gobikrushanth, M., Zuidhof, S., and Kastelic, J. P. (2014). Low-dose natural prostaglandin F_{2α} (dinoprost) at timed insemination improves conception rate in dairy cattle. *Theriogenology*.

- Angilletta Jr, M. J., Huey, R. B., and Frazier, M. R. (2010). Thermodynamic effects on organismal performance: is hotter better?. *Physiological and Biochemical Zoology*, 83(2), 197-206.
- Araujo, R. R., Ginther, O. J., Ferreira, J. C., Palhão, M. M., Beg, M. A., and Wiltbank, M. C. (2009). Role of follicular estradiol-17beta in timing of luteolysis in heifers. *Biology of reproduction*, 81(2), 426-437.
- Archbald, L. F., Tran, T., Massey, R., and Klapstein, E. (1992). Conception rates in dairy cows after timed-insemination and simultaneous treatment with gonadotrophin releasing hormone and/or prostaglandin F2 alpha. *Theriogenology*, 37(3), 723-731.
- 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.
- Augustin, H. G. (1998). Antiangiogenic tumour therapy: will it work?. *Trends in pharmacological sciences*, 19(6), 216-222.
- Aymard, C., Shirts, R. B. (2000) Pixel Conversion: A Simple Way to Extract Coordinates of Points from a Printed Graph. *Journal of Chemical Education*, 77(9), 1230.
- Azhar, S., and Reaven, E. (2002). Scavenger receptor class BI and selective cholesteryl ester uptake: partners in the regulation of steroidogenesis. *Molecular and cellular endocrinology*, 195(1), 1-26.
- Båge, R. (2003). Conception rates after AI in Swedish red and white dairy heifers: relationship with progesterone concentrations at AI. *Reproduction in Domestic Animals*, 38(3), 199-203.
- Båge, R., Gustafsson, H., Larsson, B., Forsberg, M., and Rodriguez-Martinez, 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). Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biology of Reproduction*, 56(5), 1158-1168.
- Bennett, W. A., Watts, T. L., Blair, W. D., Waldhalm, S. J., and Fuquay, J. W. (1988).

Patterns of oviducal motility in the cow during the oestrous cycle. *Journal of reproduction and fertility*, 83(2), 537-543.

- Bergfeld, E.G.M., Kojima, F.N., Cupp, A.S., Wehrman, M.E., Peters, K.E., Mariscal, V., Sanchez, T., and Kinder, J.E. (1996). Changing Dose of Progesterone Results in Sudden Changes in Frequency of Luteinizing Hormone Pulses and Secretion of 17P-Estradiol in Bovine Females. *Biology of reproduction*, 54(3), 546-553.
- Boer, H. M. T., Stötzel, C., Röblitz, S., Deuflhard, P., Veerkamp, R. F., and Woelders, H. (2011). A simple mathematical model of the bovine estrous cycle: follicle development and endocrine interactions. *Journal of theoretical biology*, 278(1), 20-31.
- Bonafos, L. D., Kot, K., and Ginther, O. J. (1995). Physical characteristics of the uterus during the bovine estrous cycle and early pregnancy. *Theriogenology*, 43(4), 713-721.
- Bose, H. S., Whittal, R. M., Baldwin, M. A., and Miller, W. L. (1999). The active form of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR, appears to be a molten globule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(13), 7250-7255.
- Brenner, R. M., Carlisle, K. S., Hess, D. L., Sandow, B. A., and West, N. B. (1983). Morphology of the oviducts and endometria of cynomolgus macaques during the menstrual cycle. *Biology of reproduction*, 29(5), 1289-1302.
- Bridges, P. J., Komar, C. M., and Fortune, J. E. (2006). Gonadotropin-induced expression of messenger ribonucleic acid for cyclooxygenase-2 and production of prostaglandins E and F₂ α in bovine preovulatory follicles are regulated by the progesterone receptor. *Endocrinology*, 147(10), 4713-4722.
- Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 232(4746), 34-47.
- Bryner, R. W., Garcia-Winder, M., Lewis, P. E., Inskeep, E. K., and Butcher, R. L. (1990). Changes in hormonal profiles during the estrous cycle in old lactating beef cows. *Domestic animal endocrinology*, 7(2), 181-189.
- Burke, J. M., De La Sota, R. L., Risco, C. A., Staples, C. R., Schmitt, E. P., and Thatcher, W. W. (1996). Evaluation of timed insemination using a gonadotropin-releasing hormone agonist in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 79(8), 1385-1393.
- Caffrey, J. L., Fletcher, P. W., Diekman, M. A., O'callaghan, P. L., and Niswender, G. D. (1979). The activity of ovine luteal cholesterol esterase during several experimental conditions. *Biology of reproduction*, 21(3), 601-608.
- Chegini, N., Lei, Z. M., Rao, C. V., and Hansel, W. (1991). Cellular distribution and cycle phase dependency of gonadotropin and eicosanoid binding sites in bovine corpora lutea. *Biology of reproduction*, 45(3), 506-513.
- Conneely, O. M., and Lydon, J. P. (2000). Progesterone receptors in reproduction:

functional impact of the A and B isoforms. *Steroids*, 65(10), 571-577.

- 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.
- 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.
- Cunningham J. G. and Klein B. G. (2009). Fisiología veterinaria. Cuarta Edición. Barcelona:Elsevier.
- Dalton, J. C., Nadir, S., Bame, J. H., Noftsinger, M., Nebel, R. L., and Saacke, R. G. (2001). Effect of time of insemination on number of accessory sperm, fertilization rate, and embryo quality in nonlactating dairy cattle. *Journal of dairy science*, 84(11), 2413-2418.
- Davidge, S. T., Wiebold, J. L., Senger, P. L., and Hillers, J. K. (1987). Influence of varying levels of blood progesterone upon estrous behavior in cattle. *Journal of animal science*, 64(1), 126-132.
- 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 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.
- Dieleman, S. J., Bevers, M. M., Van Tol, H. T. M., and Willemse, A. H. (1986). Peripheral plasma concentrations of oestradiol, progesterone, cortisol, LH and prolactin during the oestrous cycle in the cow, with emphasis on the peri-oestrous period. *Animal Reproduction Science*, 10(4), 275-292.
- Diskin, M. G. (2008). HeatWatch: a telemetric system for heat detection in cattle. *Veterinary Quarterly*, 30, 37-48.
- Diskin, M. G., Murphy, J. J., and Sreenan, J. M. (2006). Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Animal reproduction science*, 96(3), 297-311.
- 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.
- 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.
- Edmonson, A. J., Lean, I. J., Weaver, L. D., Farver, T., and Webster, G. (1989). A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of dairy science*, 72(1), 68-78.
- Endo, N., Nagai, K., Tanaka, T., and Kamomae, H. (2012a). Comparison between lactating and non-lactating dairy cows on follicular growth and corpus luteum development, and endocrine patterns of ovarian steroids and luteinizing hormone in the estrous cycles. *Animal reproduction science*, 134(3), 112-118.
- Endo, N., Nagai, K., Tanaka, T., and Kamomae, H. (2012b). Profiles of Ovarian Steroids, Luteinizing Hormone and Estrous Signs from Luteolysis to Ovulation in Lactating and Non-lactating Dairy Cows. *Journal of Reproduction and Development*, 58(6), 685-690.
- Evans, R. W., and Leavitt, W. W. (1980). Progesterone inhibition of uterine nuclear estrogen receptor: dependence on RNA and protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(10), 5856-5860.
- Evans, R. W., Chen, T. J., Hendry III, W. J., And Leavitt, W. W. (1980). Progesterone Regulation of Estrogen Receptor in the Hamster Uterus during the Estrous Cycle*. *Endocrinology*, 107(2), 383-390.
- Fahey, J., O'Sullivan, K., Crilly, J., and Mee, J. F. (2002). The effect of feeding and management practices on calving rate in dairy herds. *Animal Reproduction Science*, 74(3), 133-150.
- Faust, M. A., McDaniel, B. T., Robison, O. W., and Britt, J. H. (1988). Environmental and yield effects on reproduction in primiparous Holsteins. *Journal of Dairy Science*, 71(11), 3092-3099.
- Fetrow, J., Stewart, S., Eicker, S., and Rapnicki, P. (2007). Reproductive health programs for dairy herds: analysis of records for assessment of reproductive performance. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*, 473-489.
- 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.
- 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.
- Forde, N., Carter, F., Fair, T., Crowe, M. A., Evans, A. C. O., Spencer, T. E., Bazer, F.W., McBride, R., Boland, M.P., Gaora, P. O, Lonergan, P., and Roche, J. F. (2009). Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. *Biology of reproduction*, 81(4), 784-794.

- Fortune, J. E. (1994). Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of reproduction*, 50(2), 225-232.
- Fortune, J. E., and Quirk, S. M. (1988). Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. *Journal of Animal Science*, 66(Supplement 2), 1-8.
- Fortune, J. E., Willis, E. L., Bridges, P. J., and Yang, C. S. (2009). The periovulatory period in cattle: progesterone, prostaglandins, oxytocin and ADAMTS proteases. *Animal reproduction/Colegio Brasileiro de Reproducao Animal*, 6(1), 60.
- Fraser, H. M., and Wulff, C. (2003). Angiogenesis in the corpus luteum. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1(1), 88.
- Fuller, G. B., and Hansel, W. (1970). Regression of sheep corpora lutea after treatment with antiovine luteinizing hormone. *Journal of animal science*, 31(1), 99-103.
- Gallmeier, D. M. (2013). *Efecto de la bST sobre la fertilidad de las vacas lecheras de primer servicio sincronizadas por medio del protocolo Doublesynch*.(Tesis de grado). Universidad San Francisco de Quito, Quito (Pichincha) Ecuador.
- García-Ispierto, I., López-Gatius, F., Santolaria, P., Yániz, J. L., Nogareda, C., and López-Béjar, M. (2007). Factors affecting the fertility of high producing dairy herds in northeastern Spain. *Theriogenology*, 67(3), 632-638.
- Gerena, R. L., and Killian, G. J. (1990). Electrophoretic characterization of proteins in oviduct fluid of cows during the estrous cycle. *Journal of Experimental Zoology*, 256(1), 113-120.
- 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., Beg, M. A., and Kot, K. (2001). Follicle selection in cattle: relationships among growth rate, diameter ranking, and capacity for dominance. *Biology of reproduction*, 65(2), 345-350.
- 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_{2α} and circulating concentrations of progesterone before, during, and after spontaneous luteolysis in heifers. *Theriogenology*, 74(7), 1179-1186.
- Ginther, O., J., Pinaffi, F., L., V., Khan, F., A., Duarte, L., F., Beg, M., A., (2013). Follicular-phase concentrations of progesterone, estradiol-17b, LH, FSH, and a PGF_{2α} metabolite and daily clustering of prolactin pulses, based on hourly blood sampling and hourly detection of ovulation in heifers. *Theriogenology*, 79(6), 918-928.
- Giordano, J. O., Wiltbank, M. C., Guenther, J. N., Pawlisch, R., Bas, S., Cunha, A. P., and Fricke, P. M. (2012). Increased fertility in lactating dairy cows resynchronized with Double-Ovsynch compared with Ovsynch initiated 32 d after timed artificial insemination. *Journal of dairy science*, 95(2), 639-653.

- Gobierno de la Provincia de Pichincha, GPP. (2000). Cantón Mejía. Disponible en http://www.pichincha.gob.ec/phocadownload/pgd/2carcantyparr/3mejia/79_cantonmejia.pdf
- Goede, V., Schmidt, T., Kimmina, S., Kozian, D., and Augustin, H. G. (1998). Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 78(11), 1385-1394.
- Goldenberg, R. L., Vaitukaitis, J. L., and Ross, G. T. (1972). Estrogen and follicle stimulating hormone interactions on follicle growth in rats. *Endocrinology*, 90(6), 1492-1498.
- Graham, J. D., and Clarke, C. L. (1997). Physiological Action of Progesterone in Target Tissues. *Endocrine reviews*, 18(4), 502-519.
- Graves, W. M., Dowlen, H. H., Lamar, K. C., Johnson, D. L., Saxton, A. M., and Montgomery, M. J. (1997). The effect of artificial insemination once versus twice per day. *Journal of dairy science*, 80(11), 3068-3071.
- 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.
- Hanahan, D. (1997). Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science-New York Then Washington*, 48-49.
- Hansel, W., and Convey, E. (1983). Physiology of the estrous cycle. *J Anim Sci* 1983;57(Suppl. 2):404-424.
- Hansen, P. J. (1985). Seasonal modulation of puberty and the postpartum anestrus in cattle: a review. *Livestock Production Science*, 12(4), 309-327.
- 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.
- Homer, E. M., Gao, Y., Meng, X., Dodson, A., Webb, R., and Garnsworthy, P. C. (2013). Technical note: A novel approach to the detection of estrus in dairy cows using ultra-wideband technology. *Journal of dairy science*, 96(10), 6529-6534.
- Hommeida, A., Nakao, T., and Kubota, H. (2004). Luteal function and conception in lactating cows and some factors influencing luteal function after first insemination. *Theriogenology*, 62(1), 217-225.
- Hoyer, P. B., Fitz, T. A., and Niswender, G. D. (1984). Hormone-Independent Activation of Adenylate Cyclase in Large Steroidogenic Ovine Luteal Cells Does Not Result in Increased Progesterone Secretion*. *Endocrinology*, 114(2), 604-608.
- Hunter, R. H. F. (2012). Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biological Reviews*, 87(1), 244-255.
- Hwang, J., and Menon, K. M. (1983). Characterization of low density and high density

- lipoprotein receptors in the rat corpus luteum and regulation by gonadotropin. *Journal of Biological Chemistry*, 258(13), 8020-8027.
- Ing, N. H., and M. B. Tornesi. (1997). Estradiol upregulates estrogen receptor and progesterone receptor gene expression in specific ovine uterine cells. *Biology of reproduction*, 56(5), 1205–1215.
- Inskip, E. K. (2004). Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *Journal of animal science*, 82(13 suppl), E24-E39.
- 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., Anthony, R. V., and Niswender, G. D. (1997). Effects of luteotrophic and luteolytic hormones on expression of mRNA encoding insulin-like growth factor I and growth hormone receptor in the ovine corpus luteum. *Journal of reproduction and fertility*, 110(2), 291-298.
- Kinder, J. E., Kojima, F. N., Bergfeld, E. G., Wehrman, M. E., and Fike, K. E. (1996). Progesterin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. *Journal of animal science*, 74(6), 1424-1440.
- Knight, P. G. (1996). Roles of inhibins, activins, and follistatin in the female reproductive system. *Frontiers in neuroendocrinology*, 17(4), 476-509.
- 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.
- Kölle, S., Reese, S., and Kummer, W. (2010). New aspects of gamete transport, fertilization, and embryonic development in the oviduct gained by means of live cell imaging. *Theriogenology*, 73(6), 786-795.
- Kölle, S., Sinowatz, F., Boie, G., and Lincoln, D. (1998). Developmental changes in the expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary. *Biology of reproduction*, 59(4), 836-842.
- Krisans, S. K. (1996). Cell Compartmentalization of Cholesterol Biosynthesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 804(1), 142-164.
- Lamming, G. E., and Darwash, A. O. (1998). The use of milk progesterone profiles to characterise components of subfertility in milked dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 52(3), 175-190.
- Lauderdale, J. W., Seguin, B. E., Stellflug, J. N., Chenault, J. R., Thatcher, W. W., Vincent, C. K., and Loyancano, A. F. (1974). Fertility of cattle following PGF 2α

- injection. *Journal of animal science*, 38(5), 964-967.
- Lee, C. N., Cook, D. L., Parfet, J. R., Smith, C. A., Youngquist, R. S., and Garverick, H. A. (1988). Induction of Persistent Ovarian Follicular Structures Following Administration of Progesterone Near the Onset of Estrus in Dairy Cattle 1, 2. *Journal of dairy science*, 71(12), 3505-3508.
- Lopes, A. S., Butler, S. T., Gilbert, R. O., and Butler, W. R. (2007). Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. *Animal reproduction science*, 99(1), 34-43.
- López-Gatius, F., Garcia-Ispuerto, I., Santolaria, P., Yániz, J., Nogareda, C., and López-Béjar, M. (2006). Screening for high fertility in high-producing dairy cows. *Theriogenology*, 65(8), 1678-1689.
- López-Gatius, F., Santolaria, P., and Almeria, S. (2005a). Neospora caninum Infection Does Not Affect the Fertility of Dairy Cows in Herds with High Incidence of Neospora-associated Abortions. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 52(1), 51-53.
- López-Gatius, F., Santolaria, P., Mundet, I., and Yániz, J. L. (2005b). Walking activity at estrus and subsequent fertility in dairy cows. *Theriogenology*, 63(5), 1419-1429.
- 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.
- Lucy, M. C. (2007). The bovine dominant ovarian follicle. *Journal of animal science*, 85(13 suppl), E89-E99.
- Lucy, M. C., Byatt, J. C., Curran, T. L., Curran, D. F., and Collier, R. J. (1994). Placental lactogen and somatotropin: hormone binding to the corpus luteum and effects on the growth and functions of the ovary in heifers. *Biology of reproduction*, 50(5), 1136-1144.
- Mann, G. E., and Lamming, G. E. (2006). Timing of prostaglandin F_{2α} release episodes and oxytocin receptor development during luteolysis in the cow. *Animal reproduction science*, 93(3), 328-336.
- Martins, J. P. N., Policelli, R. K., and Pursley, J. R. (2011). Luteolytic effects of cloprostenol sodium in lactating dairy cows treated with G6G/Ovsynch. *Journal of dairy science*, 94(6), 2806-2814.
- Maslar, I. A., Powers-Craddock, P. A. T. T. I., and Ansbacher, R. U. D. I. (1986). Decidual prolactin production by organ cultures of human endometrium: effects of continuous and intermittent progesterone treatment. *Biology of reproduction*, 34(4), 741-750.
- McCracken, J. A., Custer, E. E., and Lamsa, J. C. (1999). Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiological reviews*, 79(2), 263-323.
- McCracken, J. A., Glew, M. E., and Scaramuzzp, R. (1970). Corpus Luteum Regression

- Induced by Prostaglandin F2 α . 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 30(4), 544-546.
- Merk, F. B., Botticelli, C. R., and Albright, J. T. (1972). An Intercellular Response To Estrogen By Granulosa Cells In The Rat Ovary; An Electron Microscope Study. *Endocrinology*, 90(4), 992-1007.
- Mialot, J. P., Laumonnier, G., Ponsart, C., Fauxpoint, H., Barassin, E., Ponter, A. A., and Deletang, F. (1999). Postpartum subestrus in dairy cows: comparison of treatment with prostaglandin F2 α or GnRH+ prostaglandin F2 α + GnRH. *Theriogenology*, 52(5), 901-911.
- 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.
- Ministerio de Agricultura Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP). III Censo Nacional Agropecuario. 2002. Disponible en <http://servicios.agricultura.gob.ec/sinagap/index.php/resultados-nacionales>.
- Miyamoto, A., Shirasuna, K., and Sasahara, K. (2009). Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: Impact of angiogenic and vasoactive factors. *Domestic animal endocrinology*, 37(3), 159-169.
- Moor, R. M., and Seamark, R. F. (1986). Cell signaling, permeability, and microvasculatory changes during antral follicle development in mammals. *Journal of dairy science*, 69(3), 927-943.
- Moore, D. A., Overton, M. W., Chebel, R. C., Truscott, M. L., and BonDurant, R. H. (2005). Evaluation of factors that affect embryonic loss in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226(7), 1112-1118.
- 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.
- Moreira, F., Orlandi, C., Risco, C. A., Mattos, R., Lopes, F., and Thatcher, W. W. (2001). Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 84(7), 1646-1659.
- Morris, D., and Diskin, M. (2008). Effect of progesterone on embryo survival. *Animal: an international journal of animal bioscience*, 2(8), 1112-1119.
- Murdoch, W. J., Peterson, T. A., Van Kirk, E. A., Vincent, D. L., and Inskip, E. K. (1986). Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. *Biology of reproduction*, 35(5), 1187-1194.
- Nascimento, A. B., Souza, A. H., Keskin, A., Sartori, R., and Wiltbank, M. C. (2014). Lack of complete regression of the Day 5 corpus luteum after one or two doses of

PGF 2 α in nonlactating Holstein cows. *Theriogenology*, 81(3), 389-395.

Nebel, R. L., Walker, W. L., McGilliard, M. L., Allen, C. H., and Heckman, G. S. (1994). Timing of artificial insemination of dairy cows: fixed time once daily versus morning and afternoon. *Journal of dairy science*, 77(10), 3185-3191.

Niswender, G. D. (2002). Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction*, 123(3), 333-339.

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.

Opsomer, G., Coryn, M., Deluyker, H., and Kruif, A. D. (1998). An analysis of ovarian dysfunction in high yielding dairy cows after calving based on progesterone profiles. *Reproduction in Domestic Animals*, 33(3- 4), 193-204.

Otto, K. L., Ferguson, J. D., Fox, D. G., and Sniffen, C. J. (1991). Relationship between body condition score and composition of ninth to eleventh rib tissue in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 74(3), 852-859.

Padykula, H. A., Coles, L. G., Okulicz, W. C., Rapaport, S. I., McCracken, J. A., King, N. W., Longcope, J. C., and Kaiserman-Abramof, I. R. (1989). The basalis of the primate endometrium: a bifunctional germinal compartment. *Biology of reproduction*, 40(3), 681-690.

Pagano, M., Gauvreau, K. (2001). *Fundamentos de Bioestadística*. México: Thomson Editores.

Pelletier, G., Li, S., Luu-The, V., Tremblay, Y., Belanger, A., and Labrie, F. (2001). Immunoelectron microscopic localization of three key steroidogenic enzymes (cytochrome P450 scc -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and cytochrome P450 c17 in rat adrenal cortex and gonads. *Journal of Endocrinology*, 171(2), 373.

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, M. T. (2008). *Evaluación del efecto del hCG y GnRH sobre la tasa de concepción en vacas Holstein de primer servicio en tres hatos lecheros localizados en el cantón Mejía* (Tesis de grado). Universidad San Francisco de Quito, Quito (Pichincha) Ecuador.

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, M. W., and Pursley, J. R. (2002). Fertility of lactating dairy cows treated with Ovsynch after presynchronization injections of PGF 2 α and GnRH. *Journal of dairy science*, 85(9), 2403-2406.

- Phillips, D. J., and de Kretser, D. M. (1998). Follistatin: a multifunctional regulatory protein. *Frontiers in neuroendocrinology*, 19(4), 287-322.
- Použití, Ú., and Testu, S. A. V. (2009). St Aia-Pack Prog. <http://medesa.testujeme.cz/Data/files/pdf/české%20návody/TOSOH%20AIA%20soupravy/ST%20AIA%20Pack%20Progesteron.pdf>.
- 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.
- 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.
- Rajapaksha, W. R. A. K. J. S., McBride, M., Robertson, L., and O'shaughnessy, P. J. (1997). Sequence of the bovine HDL-receptor (SR-BI) cDNA and changes in receptor mRNA expression during granulosa cell luteinization in vivo and in vitro. *Molecular and cellular endocrinology*, 134(1), 59-67.
- Rathbone, M. J., Kinder, J. E., Fike, K., Kojima, F., Clopton, D., Ogle, C. R., and Bunt, C. R. (2001). Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. *Advanced drug delivery reviews*, 50(3), 277-320.
- Richards, J. S. (1994). Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine reviews*, 15(6), 725-751.
- Richards, J. S., Ireland, J. J., Rao, M. C., Bernath, G. A., Midgley Jr, A. R., and Reichert, L. E. (1976). Ovarian Follicular Development in the Rat: Hormone Receptor Regulation by Estradiol, Follicle Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone 1. *Endocrinology*, 99(6), 1562-1570.
- Richardson, T., Gardali, T., and Jenkins, S. H. (2009). Review and meta-analysis of camera effects on avian nest success. *The Journal of Wildlife Management*, 73(2), 287-293.
- Robinson, R. S., Hammond, A. J., Wathes, D. C., Hunter, M. G., and Mann, G. E. (2008). Corpus luteum–endometrium–embryo interactions in the dairy cow: underlying mechanisms and clinical relevance. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(s2), 104-112.
- Robinson, R. S., Hunter, M. G., and Mann, G. E. (2006). Supra-basal progesterone concentrations during the follicular phase are associated with development of cystic follicles in dairy cows. *The Veterinary Journal*, 172(2), 340-346.
- Roche, J. F. (1996). Control and regulation of folliculogenesis a symposium in perspective. *Reviews of reproduction*, 1(1), 19-27.
- Roelofs, J. B., Van Eerdenburg, F. J. C. M., Hazeleger, W., Soede, N. M., and Kemp, B.

- (2006). Relationship between progesterone concentrations in milk and blood and time of ovulation in dairy cattle. *Animal reproduction science*, 91(3), 337-343.
- 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. Web Plot Digitizer. ht tp. arohatgi.info/WebPlotDigitizer/app/(*acceso Mayo 12, 2015*).
- Ronchi, B., Stradaoli, G., Supplizi, A. V., Bernabucci, U., Lacetera, N., Accorsi, P. A., Nardone, A., Seren, E., 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.
- Rosales-Torres, A. M., Guzmán Sánchez, A., and Gutiérrez Aguilar, C. G. (2011). Neuroendocrine Effects Of Insulin, Igf-I And Leptin On The Secretion Of The Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15(S1).
- Rowe, L., Repasky, R. R., and Palmer, A. R. (1997). Size-dependent asymmetry: fluctuating asymmetry versus antisymmetry and its relevance to condition-dependent signaling. *Evolution*, 1401-1408.
- Saint-Dizier, M., Sandra, O., Poyart, S., Chebrou, M., and Constant, F. (2012). Expression of nuclear progesterone receptor and progesterone receptor membrane components 1 and 2 in the oviduct of cyclic and pregnant cows during the post-ovulation period. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10(1), 76.
- Sangsrivong, 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., 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., Haughian, J. M., Shaver, R. D., Rosa, G. J. M., and 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.
- Sartori, R., Sartor-Bergfelt, R., Mertens, S. A., Guenther, J. N., Parrish, J. J., and Wiltbank, M. C. (2002). Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of dairy science*, 85(11), 2803-2812.
- Savio, J. D., Boland, M. P., and Roche, J. F. (1990). Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in post-partum dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, 88(2), 581-591.

- 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., Hoffmann, B., and Karg, H. (1977). The oestrous cycle of the cow: hormonal parameters and time relationships concerning oestrus, ovulation, and electrical resistance of the vaginal mucus. *Acta endocrinologica*, 86(1), 180-192.
- 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.
- Shoo, L. P., and Catterall, C. P. (2013). Stimulating natural regeneration of tropical forest on degraded land: approaches, outcomes, and information gaps. *Restoration Ecology*, 21(6), 670-677.
- Silvia, W. J., Hatler, T. B., Nugent, A. M., and Da Fonseca, L. L. (2002). Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis. *Domestic animal endocrinology*, 23(1), 167-177.
- Singh, M., Su, C., and Ng, S. (2013). Non-genomic mechanisms of progesterone action in the brain. *Frontiers in neuroscience*, (7), 159.
- Sirois, J., and Fortune, J. E. (1990). Lengthening the Bovine Estrous Cycle with Low Levels of Exogenous Progesterone: A Model for Studying Ovarian Follicular Dominance*. *Endocrinology*, 127(2), 916-925.
- Skarzynski DJ, Okuda K. (1999). Sensitivity of bovine corpora lutea to prostaglandin F2 α is dependent on progesterone, oxytocin, and prostaglandins. *Biology of reproduction*, 60(6), 1292-8.
- Skarzynski, D. J., Bah, M. M., Deptula, K. M., Woclawek-Potocka, I., Korzekwa, A., Shibaya, M., Pilawski, W., and Okuda, K. (2003). Roles of tumor necrosis factor- α of the estrous cycle in cattle: an in vivo study. *Biology of reproduction*, 69(6), 1907-1913.
- Skarzynski, D. J., Jaroszewski, J. J., and Okuda, K. (2001). Luteotropic Mechanisms in the Bovine Corpus Luteum: Role of Oxytocin, Prostaglandin F2. ALPHA., Progesterone and Noradrenaline. *Journal of Reproduction and Development*, 47(3), 125-137.
- Smith, G. W., and Meidan, R. (2014). Ever-changing cell interactions during the life span of the corpus luteum: Relevance to luteal regression. *Reproductive biology*, 14(2), 75-82.
- Spicer, L. J., and Echtenkamp, S. E. (1995). The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domestic animal endocrinology*, 12(3), 223-245.
- Stocco, C., Telleria, C., and Gibori, G. (2007). The molecular control of corpus luteum

formation, function, and regression. *Endocrine reviews*, 28(1), 117-149.

- Stronge, A. J. H., Sreenan, J. M., Diskin, M. G., Mee, J. F., Kenny, D. A., and Morris, D. G. (2005). Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology*, 64(5), 1212-1224.
- 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.
- Svensson, E. (2000). *Regulation of apoptosis and steroidogenesis in ovarian preovulatory granulosa cells*. (Thesis). Göteborg University, (Göteborg) Sweden.
- 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.
- Thakur Krishna Shankar Rao, N. K., Kumar, P., Chaurasia, S., and Patel, N. B. (2013). Heat detection techniques in cattle and buffalo. *Veterinary World*, 6(6), 363-369.
- Tomac, J., Cekinović, Đ., and Arapović, J. (2011). Biology of the Corpus luteum. *Periodicum biologorum*, 113(1), 43-49.
- Tummers, B. (2006). *DataThief III*. Disponible en: <http://datathief.org/>.
- Verhage, H. G., and Fazleabas, A. T. (1988). The in Vitro Synthesis of Estrogen-Dependent Proteins by the Baboon (*Papio anubis*) Oviduct. *Endocrinology*, 123(1), 552-558.
- 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., 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.
- Wathes, D. C., Bourne, N., Cheng, Z., Mann, G. E., Taylor, V. J., and Coffey, M. P. (2007). Multiple correlation analyses of metabolic and endocrine profiles with fertility in primiparous and multiparous cows. *Journal of dairy science*, 90(3), 1310-1325.
- Wiltbank, M. C., Baez, G. M., Vasconcelos, J. L. M., Pereira, M., Souza, A. H., Sartori, R., and Pursley, J. R. (2014). The physiology and impact on fertility of the period of proestrus in lactating dairy cows. *Official journal of the Brazilian College of Animal Reproduction*, 11(3), 225-236.
- 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., 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.
- Windig, J. J., Calus, M. P. L., and Veerkamp, R. F. (2005). Influence of herd environment on health and fertility and their relationship with milk production. *Journal of dairy science*, 88(1), 335-347.
- 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, Z. H. E. N. G. Z. H. O. N. G., 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. Z., and Burton, L. J. (1999). Reproductive performance of dairy heifers after estrus synchronization and fixed-time artificial insemination. *Journal of dairy science*, 82(5), 910-917.
- 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.
- Zapata Segovia, F. J. (2015). *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*. (Tesis de grado). Universidad San Francisco de Quito, Quito (Pichincha), Ecuador.
- Zhou, L., Yoneda, M., Zhao, M., Yingsung, W., Yoshida, N., Kitagawa, Y., Kawamura, K., Suzuki, T., and Kimata, K. (2001). Defect in SHAP-hyaluronan complex causes severe female infertility: a study by inaction of the bikunin gene in mice. *J Biol Chem* (276):7693-7696.
- Zhuang, L. Z., Adashi, E. Y., and Hsueh, A. J. (1982). Direct enhancement of gonadotropin-stimulated ovarian estrogen biosynthesis by estrogen and clomiphene citrate. *Endocrinology*, 110(6), 2219-2221.

APÉNDICES

APÉNDICE 1. Prueba de normalidad de progesterona y producción láctea.

PROGESTERONA Estadística descriptiva

Estadísticos	Unidades	Vaquillas	Primíparas	Multíparas	Repetidoras
Media	(ng/ml)	0,4955	0,2543	0,2768	0,3010
Intervalo de confianza para la media 95%					
Límite superior	(ng/ml)	0,4156	0,1990	0,2165	0,2239
Límite inferior	(ng/ml)	0,5754	0,3096	0,3371	0,3780
Mediana	(ng/ml)	0,5500	0,2300	0,2550	0,2500
Varianza	σ^2	0,29	0,15	0,018	0,29
Desviación Típica (σ)	(ng/ml)	0,1780	0,12156	0,13601	0,16926
Mínimo	(ng/ml)	0,05	0,05	0,05	0,05
Máximo	(ng/ml)	0,71	0,59	0,54	0,72
Rango	(ng/ml)	0,66	0,54	0,49	0,67
Amplitud intercuartil	(ng/ml)	0,29	0,16	0,21	0,23
Asimetría		-0,856	0,913	0,196	1,018
Curtosis		0,696	1,577	-0,547	0,475

Gráfico Q-Q normales

Gráfico Q-Q normal de Progesterona

Vaquillas

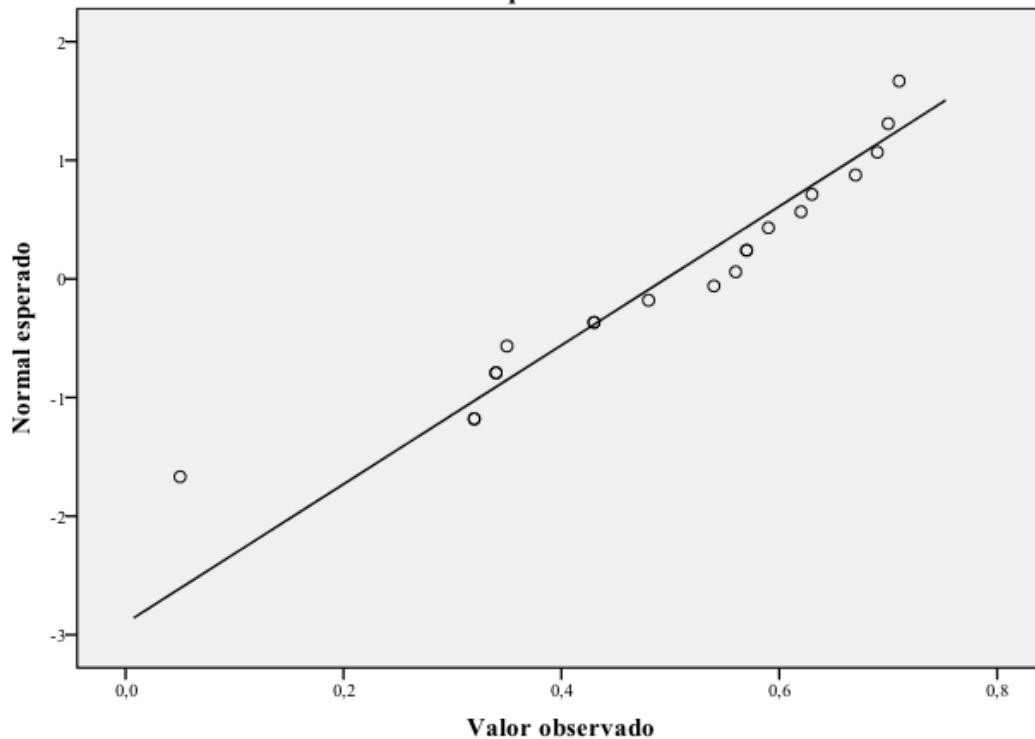


Gráfico Q-Q normal de Progesterona

Primíparas

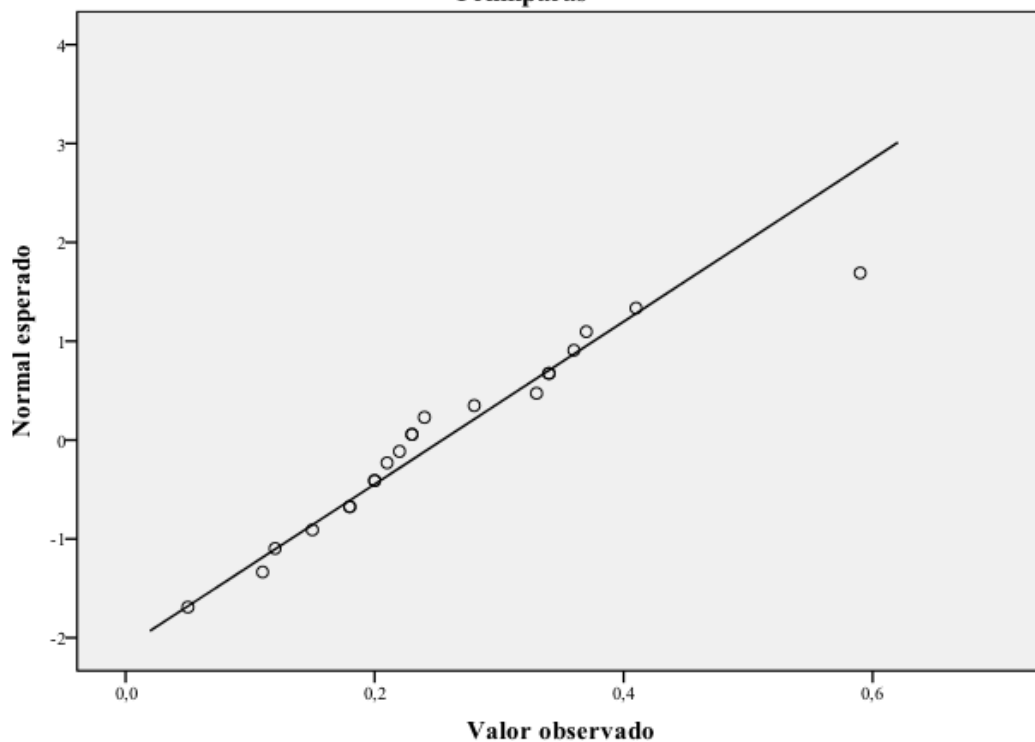


Gráfico Q-Q normal de Progesterona

Multíparas

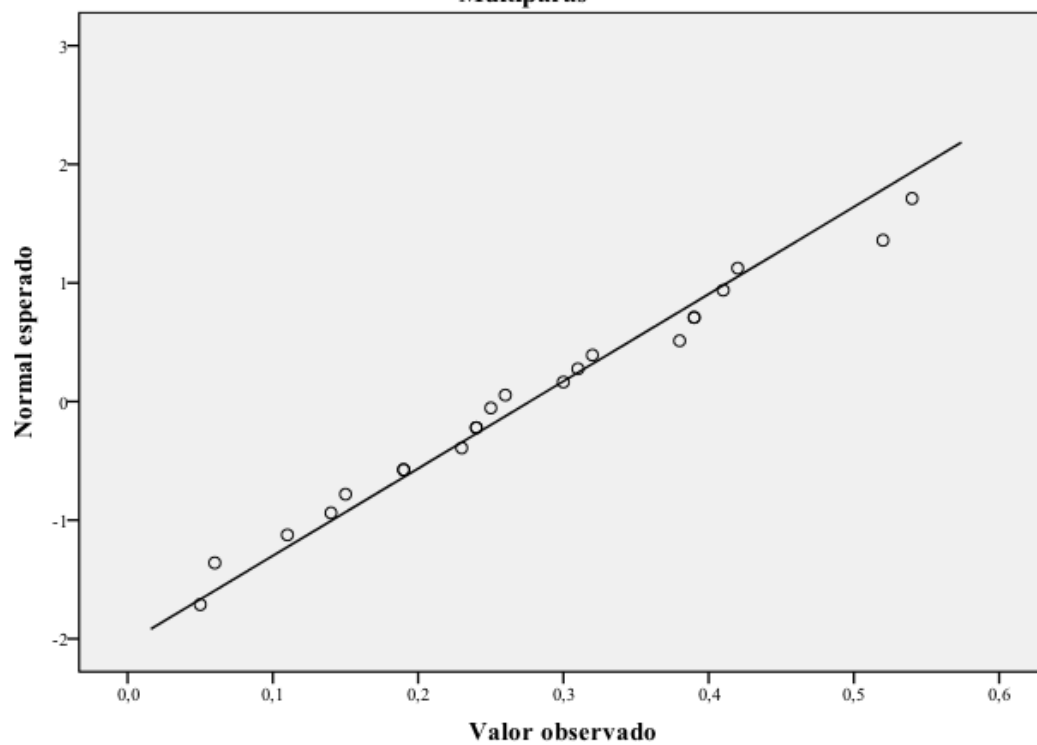
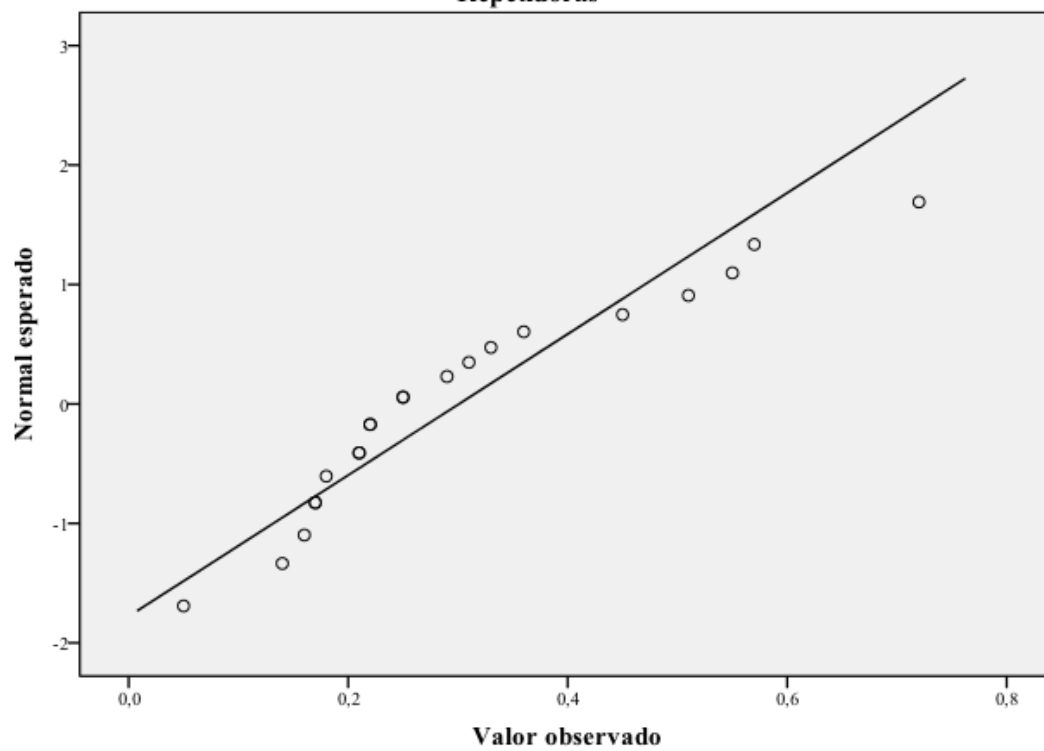


Gráfico Q-Q normal de Progesterona

Repetidoras



Evaluación de normalidad de concentraciones de progesterona

H0: Los datos cumplen con la distribución normal
 H1: Los datos no cumplen con una distribución normal

	Estadístico	Gl.	Sig.	
Vaquillas	0,918	20	0,090	Normal
Primíparas	0,943	21	0,255	Normal
Múltiparas	0,973	22	0,789	Normal
Repetidoras	0,905	21	0,043	No normal
Gestantes	0,937	44	0,018	No normal
Vacías	0,962	40	0,190	Normal
Gestantes Lactantes	0,970	27	0,601	Normal
Vacías Lactantes	0,962	37	0,228	Normal
P ₄ investigación	0,115	84	0,008	No normal
P ₄ literatura	0,960	30	0,305	Normal
P ₄ lactantes investigación	0,139	64	0,004	No normal
P ₄ Lactantes literatura	0,952	20	0,405	Normal
P ₄ Vaquillas literatura	0,951	10	0,684	Normal

PRODUCCIÓN LÁCTEA Estadística descriptiva

Estadísticos	Unidades	Primíparas	Múltiparas	Repetidoras
Media	Lts.	20,386	34,882	22,286
Intervalo de confianza para la media 95%				
Límite superior	Lts.	17,832	32,201	18,242
Límite inferior	Lts.	22,940	37,882	26,329
Media recortada al 5%	Lts.	20,338	35,086	21,961
Mediana	Lts.	20,100	35,200	20,400
Varianza	σ^2	31,484	36,555	78,898
Desviación Típica (σ)	Lts.	5,6111	6,0461	8,8825
Mínimo	Lts.	11,0	17,9	7,8
Máximo	Lts.	30,8	47,8	42,9
Rango	Lts.	19,8	29,9	35,1
Amplitud intercuartil	Lts.	8,8	5,6	9,9
Asimetría		-0,113	-0,574	0,645
Curtosis		-0,805	2,374	0,481

Gráfico Q-Q normales

Gráfico Q-Q normal de Producción

Primíparas

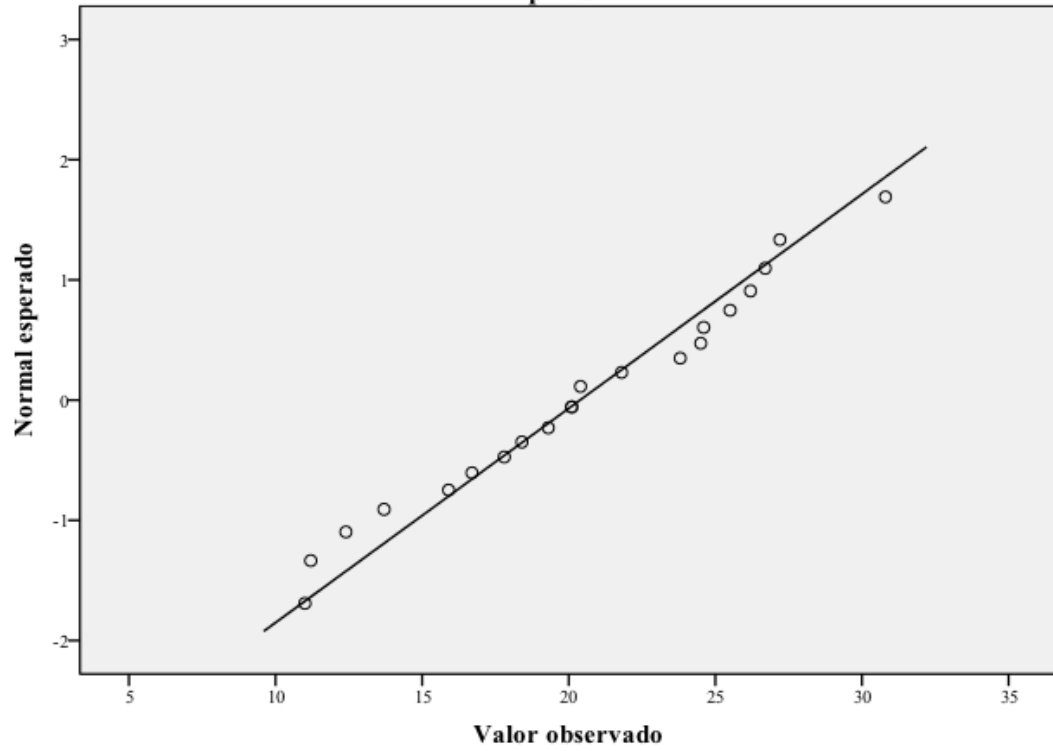
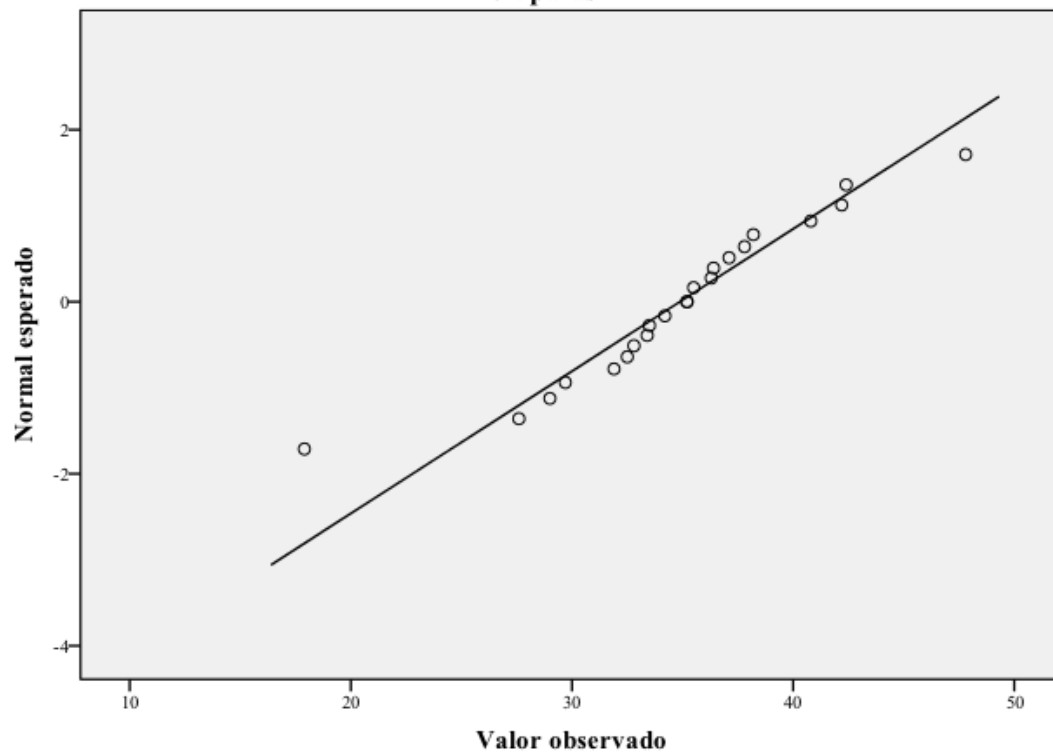
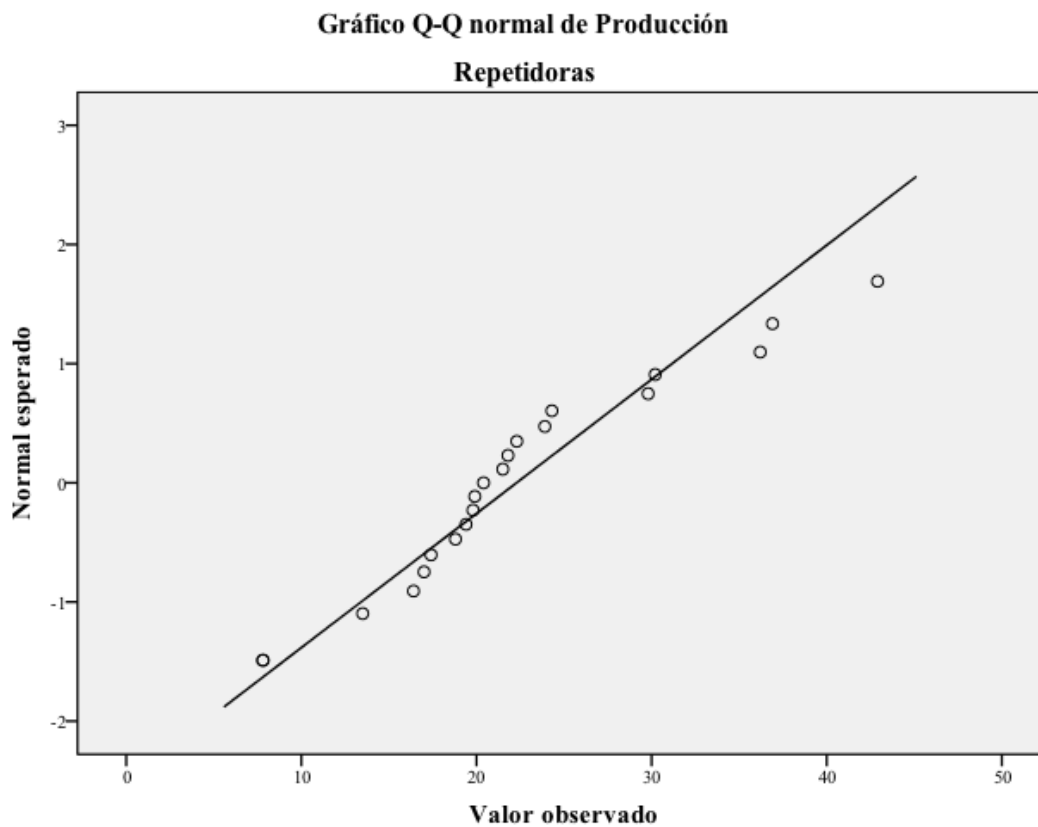


Gráfico Q-Q normal de Producción

Múltiparas





Prueba de Shapiro-Wilk de producción láctea

H0: Los datos cumplen con la distribución normal

H1: Los datos no cumplen con una distribución normal

	Estadístico	Gl.	Sig.
Primíparas	0,968	21	0,684
Múltiparas	0,951	22	0,328
Repetidoras	0,938	21	0,201

APÉNDICE 2. Cálculo de intervalos de progesterona y producción láctea.

Parámetros para cálculo de intervalos

	Progesterona (ng/ml)	Producción Láctea (lts.)
Máximo	0,72	47,8
Mínimo	0,05	7,8
Rango	0,67	40
Número de intervalos	3	3
Amplitud	0,22	13,3
Límite inferior inicial	0,05	7,8
Diferencia	0,01	0,1

Intervalos Obtenidos

	Progesterona (ng/ml)	Producción láctea (lts.)
Bajo	0,05-0,27	7,8-21,1
Medio	0,28-0,50	21,2-34,5
Alto	0,51-0,72	34,6-47,8

APÉNDICE 3. Concentraciones de progesterona recopiladas y digitalizadas

Referencia	Momento de toma de muestra	Individuos y concentraciones en ng/ml	N	Figura/Tabla	Pág.	
Lucy et al. 1994	Ed.	Vaquillas	0,06 ng/ml	7	Fig. 1	1138
Ronchi et al. 2001	Ed.	Vaquillas	0,25 ng/ml	5	Fig. 5	236
Savio et al. 1990	1d pos E	Múltiparas	0,14 ng/ml	5	Fig. 2a	584
Ginther et al. 2013	18-15h antes de OV	Vaquillas	0,14 ng/ml	13	Fig. 4	922
Balendran et al. 2008	IAd.	Vaquillas	0,03 ng/ml	9	Fig. 2	427
		Primíparas	0,07 ng/ml	7		
		Bíparas	0,08 ng/ml	7		
		Tercero y cuarto parto	0,19 ng/ml	7		
Lopes et al. 2007	IAd.	Vacas lactantes en temporada fría y caliente	0,20±0,02 y 0,25±0,02 ng/ml	68 63	Texto	38
Wolfenson et al. 2004	OVd.	Vaquillas y Múltiparas	0,42 ng/ml	39	Fig. 3	1048
Sartori et al. 2004	OVd.	Vaquillas y Múltiparas	0,291 ng/ml	41	Fig. 7	915
Morales-Roura et al. 2001	IAd.	Rep. vacías	0,23±0,48ng/ml	6	Tabla 4	1835
		Rep. gestantes	0,21±0,59ng/ml	4		
Pérez-Marín y España 2007	IAd.	Rep. gestantes	0,4±0,2ng/ml	9	Tabla 1	451
		Rep. vacías con signos de estro:	0,3±0,2ng/ml	6		
Cummins et al. 2012	OVd	Múltiparas	0,34ng/ml	19	Fig. 3	3703
Båge et al. 2002	Ed.	Vaquillas normales	0,27ng/ml	7	Fig. 1	2262
		Vaquillas repetidoras	0,15ng/ml	6		
Endo et al. 2012a	OVd.	Mult. lactantes	0,33ng/ml	10	Fig. 1	114
		Mult. no Lactantes		10		
Endo et al. 2012b	OVd.	Mult. Lactantes	0,30 ng/ml	5	Fig. 1	687
		Mult. no Lactantes	0,36 ng/ml	5		
Duchens et al. 1995	OVd.	Vaquillas	0,11ng/ml	7	Fig. 2	177
		Primíparas	0,11ng/ml	6		
Tanaka et al. 2008	OVd.	Bíparas	0,09ng/ml	4	Fig. 2	138
		Múltiparas	0,11ng/ml	6		
Schams et al. 1977	OVd.	Múltiparas y Vaquillas	0,27 ng/ml	12	Fig. 1	182

Nota: Ed: día del estro; OV: ovulación; IAd: día de la IA; OVd: día de la ovulación; Vaq.: vaquillas; Mult.: múltiparas; Rep.: repetidoras.