



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

01674
30

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INFLUENCIA DEL TAMAÑO FOLICULAR,
CONCENTRACION DE PROGESTERONA Y ESTRADIOL
EN EL DIA 12, 13 O 14 POSTINSEMINACION SOBRE EL
PORCENTAJE DE CONCEPCION DE VACAS HOLSTEIN

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTADA POR:

*de la
Produccion
y Salud Animal*

MVZ ALBINO MATEOS ROMO

TUTOR PRINCIPAL: DCV JOEL HERNANDEZ CERON

COMITE TUTORAL:

PhD. HECTOR VERA AVILA

MPAL. RAUL ULLOA ARVIZU



MEXICO, D. F.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis está dedicada a mi padre Ing. Albino Mateos Cisneros y especialmente con mucho amor a mi madre Profa. Magdalena Romo López; a mis hermanas Dra. Graciela Mateos Romo, Ing. Cristina Mateos Romo, C.P. Lucía Mateos Romo y Paula Mateos Romo.

A todos los que creen que la vida siempre da oportunidades y recompensas, si no hay que buscarlas a pesar de las circunstancias adversas.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y a la División de Estudios de Posgrado e Investigación, por brindarme la oportunidad de seguir estudiando y culminar una meta más en mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo financiero al otorgarme la beca durante mis estudios de posgrado.

Al doctor Joel Hernández Cerón, porque a pesar de no conocerme me brindo su confianza, amistad y apoyo durante todo el proceso que culmina con este trabajo.

Al MPA Eduardo Posadas Manzano que durante todos estos años de conocerlo siempre me ha brindado su amistad y consejos que han sido parte importante en mi vida.

Al MVZ Javier Flores Covarrubias por su ayuda y consejos que me otorgo en forma desinteresada.

A mis profesores, Dr. Luis Zarco Quintero, Dr. Javier Valencia Méndez, Dr. Carlos Galina Hidalgo, Dra. Myriam Boeta y Adriana Ducoing.

Al departamento de Reproducción, especialmente a la MVZ Susana Rojas y MVZ Clara Murcia, por el trabajo invertido en las determinaciones hormonales para el presente trabajo.

A los doctores Gustavo Rodríguez Trejo por su amistad y que sin su ayuda no se podría haber terminado el presente trabajo y a Salvador Morales Roura por su amistad y por su muy valiosa ayuda.

A mis compañeros de generación especialmente a Rafael Rodríguez Sosa, Omar Francisco Prado Rebolledo y a Isaac Castro Reyes.

A los dueños y encargados de los establos de la cuenca lechera de Tizayuca, Hgo. en los que se realizó el presente trabajo.

A mi comité tutorial, PhD Héctor Vera Ávila y al MPA Raúl Ulloa Arvizu.

A mi Honorable Jurado, , PhD Carlos Galina Hidalgo, PhD Héctor Vera Ávila, Dr. Carlos Vásquez Peláez, DCV Joel Hernández Cerón y MPA Raúl Ulloa Arvizu, por su contribución a mi formación como M.C y al presente trabajo.

A mis amigos de siempre.

A la vida por la oportunidad de conocer personas que han contribuido a ser lo que soy y darme esta oportunidad de seguirme preparando.

A todos aquellos que de alguna u otra forma contribuyeron al éxito de este trabajo.

INDICE GENERAL

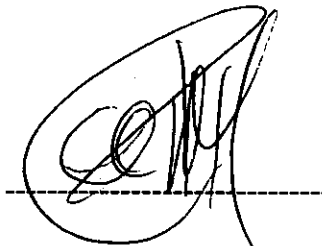
	PÁGINA
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
CAPITULO I: INTRODUCCION	1
1.1 OBJETIVO	2
CAPITULO II: REVISION DE LITERATURA	3
2.1 Formación y función del cuerpo lúteo en los bovinos	3
2.2 Regresión del cuerpo lúteo y lúteolisis en los bovinos	5
2.3 Reconocimiento materno de la gestación	10
2.4 Muerte embrionaria	13
CAPÍTULO III: MATERIAL Y METODOS	17
3.1 Localización	17
3.2 Animales experimentales	17
3.3 Obtención y análisis de las muestras de sangre	17
3.4 Examen de los ovarios por ultrasonografía	18
3.5 Análisis estadístico	18
CAPITULO IV: RESULTADOS	21
CAPITULO V: DISCUSION	26
CAPITULO VI: LITERATURA CITADA	31

INDICE DE CUADROS

Número		Página
1	Porcentaje de concepción en vacas Holstein de acuerdo al diámetro del folículo mayor durante los días 12, 13 o 14 postinseminación.	21
2	Porcentaje de gestación en vacas Holstein de acuerdo al diámetro del folículo mayor clasificado en dos clases durante los días 12, 13 o 14 postinseminación	22
3	Concentraciones plasmáticas de P_4 , E_2 y diámetro del folículo mayor entre los días 12, 13 o 14 postinseminación en vacas gestantes y no gestantes.	22
4	Concentraciones plasmáticas de P_4 , E_2 y diámetro del folículo mayor entre los días 12, 13 o 14 postinseminación en vacas de uno a cinco partos.	23
5	Concentraciones plasmáticas de P_4 , E_2 y diámetro del folículo mayor entre los días 12, 13 o 14 postinseminación en vacas de uno a cinco servicios.	23
6	Concentraciones plasmáticas de P_4 , E_2 y diámetro del folículo mayor durante los días en que se realizó la ultrasonografía.	23
7	Coefficientes de correlación y niveles de (P) en la prueba de Pearson entre el diámetro del folículo mayor y las concentraciones plasmáticas de P_4 , E_2 en vacas gestantes.	24
8	Coefficientes de correlación y niveles de (P) en la prueba de Pearson entre el diámetro del folículo mayor y las concentraciones plasmáticas de P_4 , E_2 en vacas no gestantes.	24
9	Coefficientes de correlación y niveles de (P) en la prueba de Spearman entre el diámetro del folículo mayor y las concentraciones plasmáticas de P_4 , E_2 en vacas gestantes.	25
10	Coefficientes de correlación y niveles de (P) en la prueba de Spearman entre el diámetro del folículo mayor y las concentraciones plasmáticas de P_4 , E_2 en vacas no gestantes.	25

DECLARACION

El autor da consentimiento a la División de estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que la presente tesis este disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, overlapping loops and lines, positioned above a horizontal dashed line.

Albino Mateos Romo

RESUMEN

MATEOS ROMO ALBINO: INFLUENCIA DEL TAMAÑO FOLICULAR, CONCENTRACION DE PROGESTERONA Y ESTRADIOL EN EL DIA 12, 13 o 14 POSTINSEMINACION SOBRE EL PORCENTAJE DE CONCEPCION DE VACAS HOLSTEIN. (Bajo la dirección de: Dr. Joel Hernández Cerón).

El objetivo del presente estudio fue evaluar la relación del tamaño folicular y las concentraciones de progesterona (P_4) y estradiol (E_2) en los días 12, 13 o 14 después de la Inseminación Artificial (IA) sobre el porcentaje de concepción en vacas Holstein. En los días 12, 13 o 14 postinseminación se realizaron estudios ultrasonográficos de los ovarios midiéndose y registrándose el tamaño de los folículos. Al mismo tiempo se obtuvieron muestras sanguíneas en las cuales se determinaron las concentraciones de P_4 y E_2 por radioinmunoanálisis. Se compararon por χ^2 cuadrada los porcentajes de concepción a 45 días postservicio entre los grupos con diferente clasificación de tamaño del folículo mayor, para este análisis se utilizaron 335 vacas con 2.8 ± 0.1 partos y 2.7 ± 0.09 servicios. El porcentaje de concepción fue similar entre las vacas que tuvieron diámetro del folículo mayor de < 5 mm (53.4%; 31/58); 5-9.9 mm (47.4%; 18/38); 10-14.9 mm (48.7%; 56/115) y ≥ 15 mm (37.1%; 46/124); ($P > 0.05$). Al reagrupar a las vacas con diámetro del folículo mayor en < 15 mm y ≥ 15 mm, se encontró que las vacas con folículo < 15 mm tuvieron un porcentaje de concepción mayor (49.7%; 105/211) comparado con las vacas con folículos ≥ 15 mm (37.1%; 46/124) ($P < 0.05$). Para analizar la relación entre el porcentaje de concepción con el tamaño folicular y las concentraciones de P_4 y E_2 en los días 12, 13 o 14 postinseminación, se utilizaron 208 vacas que promediaron 2.14 ± 0.09 partos y 2.48 ± 0.09 servicios recibidos. Mediante un ANDEVA en el cual se consideraron como variables dependientes el diámetro del folículo mayor, las concentraciones plasmáticas de P_4 y E_2 . Las variables independientes en este análisis fueron el resultado de la IA (gestante, no gestante), el número de parto y el día postinseminación en que se realizó la ultrasonografía. Se encontró que las vacas gestantes tuvieron un diámetro folicular menor (13.03 ± 0.52 mm) que las vacas no gestantes (14.37 ± 0.54 mm) ($P < 0.05$); así mismo las concentraciones plasmáticas de P_4 y E_2 no difirieron ($P > 0.05$) entre estos grupos (5.89 ± 0.30 ng/ml; 3.71 ± 0.45 pg/ml vs 5.85 ± 0.31 ng/ml; 3.84 ± 0.46 pg/ml de P_4 y E_2 en vacas gestantes y no gestantes respectivamente). Los resultados del presente trabajo indican que existe una asociación entre el tamaño folicular durante el diestro medio y el porcentaje de concepción.

Palabras clave: Tamaño folicular, progesterona, estradiol, porcentaje de concepción, ganado lechero.

SUMMARY

MATEOS ROMO ALBINO: Influence of follicular size, progesterone and oestradiol concentration on days 12, 13 or 14 postinsemination on the Holstein cows conception rate. (Under the direction of Dr. Joel Hernandez Ceron).

The aim of this study was to evaluate the relationship between largest follicle size and plasmatic concentrations of progesterone (P4) and oestradiol (E2) on days 12, 13 or 14 after artificial insemination (AI) on conception rate of Holstein cows. Ultrasound imaging of the ovaries was employed to measure and record follicle size and blood samples were taken to determine hormone levels using RIA. Conception rate at day 45 post-AI was analyzed on 335 cows with 2.8 ± 0.1 parturitions and 2.7 ± 0.09 inseminations, using a χ^2 analysis, comparing groups by largest follicle size. There was no difference found on conception rate between cows with a largest follicle diameter of $<5\text{mm}$ (53.4%;31/58); 5-9.9mm (47.4%;18/38); 10-14.9mm (48.7%;56/115) and $\geq 15\text{mm}$ (37.1%;46/124) ($p > 0.05$). When cows were regrouped and largest follicle size was considered as either $<15\text{mm}$ or $\geq 15\text{mm}$, it was found that animals with a largest follicle diameter of $<15\text{mm}$ had a greater conception rate (49.7%; 105/211) when compared to cows with largest follicle diameter of $\geq 15\text{mm}$ (37.1%;46/124) ($p < 0.05$). To evaluate the relationship between conception rate, follicular size and P4 and E2 concentrations at days 12, 13 or 14 after AI, 208 cows with 2.14 ± 0.09 parturitions and 2.48 ± 0.09 inseminations were tested. An ANOVA analysis was used, considering largest follicle size and plasmatic concentrations of P4 and E2 as independent variables and result of the AI (pregnant/non pregnant), number of parturition and day post-AI in which ultrasound assessment was performed as independent variables. It was found that pregnant cows had a smaller largest follicle diameter ($13.03 \pm 0.52\text{mm}$) than non-pregnant cows ($14.37 \pm 0.54\text{mm}$) ($P < 0.05$). Plasmatic concentrations of P4 and E2 were not different between groups (5.89 ± 0.30 ng/ml; 3.71 ± 0.45 pg/ml vs 5.85 ± 0.31 ng/ml; 3.48 ± 0.46 pg/ml of P4 and E2 on pregnant and non-pregnant cows respectively) ($p > 0.05$). The results of this study show that there is a relationship between largest follicle size at mid-diestrus and conception rate in Holstein cows.

Key words: Follicular size, progesterone, oestradiol, conception rate, dairy cattle.

CAPITULO I

INTRODUCCION

En la hembra bovina la mortalidad embrionaria es una de las principales causas de infertilidad (Ayalon, 1978). La mayor parte de las muertes embrionarias ocurren durante los primeros 16 días postinseminación de tal forma que las vacas regresan a estro en un período equivalente a un ciclo estral normal (Thatcher *et al.*, 1994)

La supervivencia embrionaria depende de una correcta sincronía entre el embrión y la madre. Thatcher *et al.* (1995) mencionan que se debe establecer un diálogo estrecho entre el embrión en desarrollo y el ambiente materno (ovario, oviducto y útero), en el cual participan factores autocrinos, paracrinos y endocrinos. En el día 15 o 16 después de la Inseminación Artificial (IA), el embrión debe establecer los mecanismos que evitan la regresión del cuerpo lúteo, lo cual se conoce como reconocimiento materno de la gestación. Este efecto lo logra mediante la producción de una proteína embrionaria conocida como interferón τ (tau) (IFN τ), la cual tiene como función bloquear la síntesis de la PGF2 α (Thatcher *et al.*, 1995). Se ha propuesto que una de las posibles causas de infertilidad consiste en la incapacidad del embrión para promover eficientemente el reconocimiento materno de la gestación (Thatcher *et al.*, 1994; Albiñ *et al.*, 1991) ya que se ha observado que los embriones que provienen de vacas subfértiles se encuentran retrasados en su crecimiento y diferenciación (Linares, 1982; Gustafsson, 1985)

La modificación de la dinámica folicular en los días 12 y 13 postinseminación ha favorecido la fertilidad (Humblot y Thibier, 1981; Lajili *et al.*, 1991; Macmillan *et al.*, 1986). Macmillan *et al.* (1986) encontraron que la administración de GnRH en el día 12 y 13 postinseminación provocó un incremento significativo del porcentaje de concepción en vacas en lactación. Macmillan y Thatcher (1991) observaron que

el tratamiento con GnRH provocó luteinización y atresia folicular retrasando la lúteolisis. Así, este efecto estaría favoreciendo a los embriones retrasados ya que se les daría más tiempo para alcanzar el estado óptimo de desarrollo que les permita establecer eficientemente los mecanismos de reconocimiento materno de la gestación (Thatcher *et al.*, 1994).

Existen evidencias que indican que las características de la población folicular en el diestro medio y tardío y en consecuencia la actividad estrogénica durante este periodo puede estar influyendo en el establecimiento de la gestación. Pritchard *et al.* (1994) observaron que las vacas que tuvieron concentraciones bajas de estradiol en el diestro tardío presentaron un porcentaje de concepción mayor que las vacas con concentraciones elevadas. Por otra parte, Mann *et al.* (1995) encontraron que las vacas tratadas con GnRH en el día 12 postinseminación que quedaron gestantes tuvieron menores concentraciones de estradiol que las vacas que no concibieron.

Aunque se tiene evidencia del efecto positivo de la eliminación hormonal de los folículos dominantes y estrogénicamente activos en los días 12 y 13 posteriores al servicio sobre el porcentaje de concepción, no se conoce del todo la influencia de la población folicular y su relación con las concentraciones de progesterona y estradiol en ese período sobre el porcentaje de concepción en vacas lecheras.

1.1 OBJETIVO

Determinar si existe asociación entre el porcentaje de concepción con las características foliculares y concentración plasmática de esteroides ováricos durante el diestro medio postinseminación en vacas Holstein.

CAPITULO II

REVISION DE LITERATURA

2.1 FORMACIÓN Y FUNCIÓN DEL CUERPO LÚTEO EN LOS BOVINOS.

El cuerpo lúteo (CL) es un órgano endocrino transitorio indispensable para mantener la preñez en la vaca. El pico preovulatorio de Hormona Luteinizante (LH) provoca una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que dan como resultado la ovulación y una reorganización de las células foliculares (Niswender *et al.*, 1994). Cuando ocurre la ovulación, que es en promedio 30 horas después del inicio del pico preovulatorio de LH en los bovinos, (Karsch *et al.*, 1992) la membrana basal entre la teca interna y las células de la granulosa se rompe y los vasos sanguíneos invaden el espacio folicular antral desarrollándose una extensa red vascular. Igualmente durante la luteinización hay una significativa hipertrofia e hiperplasia de las células tecales las cuales migran hacia adentro de la cavidad folicular y se dispersan entre las células luteinizadas de la granulosa (Niswender *et al.*, 1994).

La mayor parte del parénquima del CL esta formado por células esteroideogénicas que constituyen el 80% del total celular, mientras que las células de soporte aportan el 20% restante (Wiltbank y Niswender, 1992). Hay dos tipos de células luteales esteroideogénicas en el CL de la vaca siendo el tamaño la diferencia más obvia entre estos dos tipos celulares, por lo que se designan como células chicas y grandes. Las células lúteas chicas contienen en abundancia retículo endoplásmico liso, mitocondrias y gotas de lípidos dentro del citoplasma y representan el 20% de volumen total del CL. Las células lúteas grandes representan el 40% del volumen total del CL y contienen numerosas mitocondrias, abundante retículo endoplásmico rugoso y gránulos secretorios electrodensos que contienen oxitocina y/o relaxina, las cuales son liberadas por exocitosis (Niswender *et al.*, 1994).

Bioquímicamente se observa que después del pico preovulatorio de LH la producción de androstenediona y 17β estradiol (E_2) disminuye y en contraste comienza a incrementarse la síntesis de progesterona (P_4) que es el principal producto de secreción del CL. Así, en los días 4 a 6 después de la ovulación las concentraciones de P_4 en sangre son mayores de 1 ng/ml, lo que indica que el CL ha adquirido su plena funcionalidad, a partir de este momento y hasta el día 18 aproximadamente del ciclo estral el CL secretará P_4 (Hernández-Cerón y Zarco, 1998)..

La principal hormona que estimula la producción de P_4 por el CL es la LH. Se ha observado que en el CL, el número de receptores para LH se encuentra en su número máximo hasta el diestro medio del ciclo estral. Sin embargo, las células lúteas grandes no obstante que tienen receptores para LH no responden adecuadamente al estímulo de la LH aunque son ellas las que secretan cantidades considerables de P_4 (arriba del 80 % de la P_4 que secreta el CL durante el diestro medio) mientras que las células lúteas pequeñas si responden a dosis crecientes de LH, incrementándose así la secreción de P_4 (Niswender *et al.*, 1994). Esto quiere decir que aunque las células lúteas grandes aparentemente no necesitan LH para producir la mayor cantidad de P_4 durante el diestro medio, la producción de esta se maximiza ya que la LH provoca que las células lúteas pequeñas produzcan P_4 que de otra manera no se produciría. El incremento de P_4 se presenta aun cuando las concentraciones circulantes de LH sean bajas y esto parece estar mas bien relacionado con el aumento y afinidad en el número total de receptores a LH en el CL sobre todo en células pequeñas (Niswender *et al.*, 1994).

La elevación en la concentración de P_4 asegura un útero ideal para mantener la gestación, evitando sus contracciones, cerrando el cérvix y modificando las características del moco cervical, volviéndolo más viscoso, lo que evita el paso de agentes extraños al interior del útero. Además, estimula la secreción oviductal y uterina de sustancias que son importantes para la nutrición y desarrollo del embrión hasta el momento en que se da la implantación y desarrollo de la

circulación placentaria. Por otra parte la P_4 estimula el desarrollo del sistema alveolar de la glándula mamaria preparándola para la síntesis y secreción de leche, por lo que la necesidad de cantidades adecuadas de P_4 durante la preñez temprana esta bien sustentada. Como consecuencia, una cantidad insuficiente de P_4 puede ser una causa de mortalidad embrionaria temprana. (Bazer *et al.*, 1994; Hernández-Cerón y Zarco, 1998; Hernández-Cerón, 1999).

2.2 REGRESIÓN DEL CUERPO LÚTEO Y LÚTEOLISIS EN LOS BOVINOS.

La regresión lútea es ocasionada por la liberación pulsátil de $PGF2\alpha$ desde el útero, la cual actúa sobre el CL ocasionando cambios que conducen a su degeneración. La $PGF2\alpha$ actúa directamente en las células grandes, ya que sólo ellas poseen receptores para esta hormona; las células chicas carecen de receptores para la $PGF2\alpha$, a pesar de lo cual degeneran como consecuencia de los cambios provocados por la $PGF2\alpha$ en las células grandes (Wiltbank y Niswender, 1992).

El mecanismo por el cual se inicia la síntesis y secreción de la $PGF2\alpha$ depende de una interacción entre el cuerpo lúteo, los folículos ováricos y el útero (McCracken *et al.*, 1984).

El desarrollo del mecanismo lúteolítico es influenciado por el E_2 . La circulación de estrógenos en bovinos está presente en forma de estrona, sulfato de estradiol, 17α y 17β estradiol (Singh *et al.*, 1992). La evidencia directa de la importancia del E_2 en el control de la regresión lútea en la vaca, se muestra en el estudio en que la destrucción de los folículos bovinos (electrocauterización y aplicación de rayos "X" en los folículos visibles en ambos ovarios) prolongaron la vida media del CL (Villa-Godoy *et al.*, 1985). Adicionalmente (Salfen *et al.*, 1999) demostraron la influencia del E_2 sobre el CL al administrarlo tres veces al día durante cuatro días antes de que empezará la segunda onda folicular (día 15 del ciclo estral) provocando lúteolisis temprana. Además Pritchard *et al.* (1994) encontraron que altas concentraciones de E_2 en los días 14 a 17 postservicio

afectan negativamente el porcentaje de concepción. Por esto es probable que además de bajos niveles de P_4 altos niveles de E_2 puedan estar asociados con muerte embrionaria temprana, sin embargo en el trabajo hecho por (Mann *et al.*, 1995) las concentraciones plasmáticas de E_2 y P_4 entre vacas preñadas y vacías fueron similares.

La aplicación de GnRH o gonadotropina coriónica humana (hCG) se ha venido utilizando en el diestro temprano o medio para causar luteinización y/o atresia del folículo y consecuentemente alargar la fase progestacional (Macmillan *et al.*, 1986). La luteinización del folículo se da al alterar la integridad funcional de células de la teca y granulosa disminuyendo su capacidad de producir E_2 (Macmillan y Thatcher, 1991) dando oportunidad para que el embrión produzca a tiempo $IFN\tau$, se logre el reconocimiento materno de la gestación y sobreviva. Por otro lado una sola inyección de GnRH o hCG durante el diestro temprano o medio puede producir un pulso grande de LH y FSH, pero es poco probable que el folículo con el diámetro mayor pueda continuar desarrollándose en la ausencia de un estímulo prolongado de gonadotropinas provocando atresia folicular (Macmillan *et al.*, 1986). Por lo tanto en algunas ocasiones este tratamiento ha dado resultado (Macmillan *et al.*, 1986; Macmillan y Thatcher, 1991; Lajili *et al.*, 1991) y en otras ocasiones no (Jubb *et al.*, 1990). Adicionalmente (Salfen *et al.*, 1999) al inyectar líquido folicular bovino tres veces al día durante cuatro días empezando el día 12 del ciclo estral provocó que el crecimiento folicular se suprimiera y la lúteolisis se retrasara.

El crecimiento folicular ovárico en las vacas ocurre en ondas cíclicas, seguido de atresia u ovulación del folículo dominante. El patrón normal de crecimiento consiste en el reclutamiento de un número de folículos de los cuales uno es seleccionado a continuar creciendo volviéndose a través de cambios hormonales y estructurales en el folículo dominante (Salfen, 1999). La dominancia se caracteriza entre otras cosas por la gran diferencia en diámetro entre el folículo dominante y los subordinados. El número de los subordinados disminuye mientras que el

dominante aumenta de tamaño, además de estar altamente irrigado y mantener su capacidad aromatizante (Sirios y Fortune, 1988).

En las vacas durante la preñez temprana (día 0 al 20 de gestación), el desarrollo de ondas foliculares continua de manera normal (Ginther *et al.*, 1989b) ya que los niveles sanguíneos de P_4 de origen lúteo promueven la sucesión de ondas foliculares y desarrollo del folículo dominante. Sin embargo Stock y Fortune (1993) observaron que el crecimiento folicular durante la preñez temprana estuvo asociado con baja fertilidad.

En vacas preñadas el folículo dominante de la primera onda folicular esta altamente diferenciado y su tamaño es similar a un folículo ovulatorio (10 a 14mm) (Ahmad *et al.*, 1997; Driancourt *et al.*, 1991), es capaz de producir E_2 y contiene receptores funcionales para LH en las células de la granulosa, por lo que una inyección de $PGF2\alpha$ en el día 9 postservicio lo puede hacer ovular (Driancourt *et al.*, 1991; Ginther *et al.*, 1989a). Sin embargo Thatcher *et al.* (1986) en un experimento, examinaron el folículo dominante y los subordinados presentes en el día 17 después del estro tanto en vacas preñadas como ciclando, en estas ultimas encontró que el folículo dominante tiene una gran actividad de la enzima aromatasa y contiene más E_2 y menos P_4 en el líquido folicular que los folículos subordinados, mientras que en la vaca preñada esta relación fue al revés.

En cuanto a la fertilidad asociada al número de ondas foliculares, se ha encontrado que durante la gestación cada onda se presenta entre 8.5 y 9.8 días, y vacas que tuvieron dos ondas foliculares presentaron menor porcentaje de gestación que los animales con tres (Ahmad *et al.*, 1997). Esto se da posiblemente por que las vacas con dos ondas tienen concentraciones sanguíneas más altas de E_2 al momento del reconocimiento materno de la gestación (día 14-17 postservicio) lo cual compromete la tasa de preñez (Ahmad *et al.*, 1997; Ginther *et al.*, 1989a). Además la iniciación de la regresión lútea en animales con dos ondas de crecimiento folicular ocurre en menos tiempo postovulación (16.5 días) en comparación con animales con tres ondas foliculares (19 días), provocando que el embrión al tener más días con concentraciones elevadas de P_4 tenga más

oportunidades de secretar cantidades adecuadas de $\text{IFN}\tau$, evitando la lúteolisis y en consecuencia elevando la probabilidad de sobrevivencia embrionaria (Sirois y Fortune, 1988).

La P_4 influye en el control del desarrollo del mecanismo lúteolítico, inhibiendo el desarrollo de receptores a E_2 y a oxitocina en el endometrio que son necesarios para la liberación de $\text{PGF}_2\alpha$ (Salfen *et al.*, 1999). Esta inhibición dura 12 días del diestro, inmediatamente después hay "down regulation" en los receptores de P_4 , finalizando así este bloqueo, permitiendo entonces un rápido incremento en los receptores endometriales para oxitocina, que es una de las tres principales hormonas implicadas en el control de la secreción de $\text{PGF}_2\alpha$ (Robinson *et al.*, 1989; Lamming y Mann, 1995 y Pritchard *et al.*, 1994).

En vacas con bajas concentraciones sanguíneas de P_4 esta inhibición es menos efectiva y el mecanismo lúteolítico se desarrolla más temprano, permitiendo menos tiempo para que el embrión produzca suficiente $\text{IFN}\tau$ para evitar la lúteolisis (Mann *et al.*, 1995). Sin embargo, en algunos estudios la baja concentración de P_4 no afectó la gestación. Esta variabilidad puede ser debida a un delicado balance de muchos factores como puede ser: una posible estimulación luteotrópica por parte del embrión, un aumento crónico del efecto luteolítico del útero, un incremento de la función lútea, y por la calidad del folículo que óvulo (Robinson *et al.*, 1989; Kastelic, 1994; Singh *et al.*, 1992 y Lamming y Mann, 1993)

El número de pulsos de $\text{PGF}_2\alpha$ y la frecuencia con que se presentan es determinante para ocasionar la regresión lútea (Hernández-Cerón, 1999). En vacas (Schramm *et al.*, 1983) encontraron que la administración de 4 pulsos de $\text{PGF}_2\alpha$ en dosis bajas no fue suficiente para ocasionar lúteolisis, mientras que 5 pulsos con las mismas características si destruyeron el cuerpo lúteo. Cuando no se establece el patrón lúteolítico de secreción de $\text{PGF}_2\alpha$ el cuerpo lúteo no se destruye y persiste.

Al principio de la lúteolisis hay una declinación precipitada en la concentración de P_4 en la sangre y hay pérdida de peso lúteo, durante este proceso hay cambios morfológicos que incluyen, acumulación de gotas lipídicas en el citoplasma de las células lúteas chicas y grandes, degeneración de capilares y un incremento en el número de lisosomas primarios (Braden *et al.*, 1988; Farin *et al.*, 1986; Knickerbocker *et al.*, 1988).

McCracken *et al.* (1984) propusieron un modelo que explica el mecanismo por el cuál se establece la secreción pulsátil de $PGF2\alpha$: la neurohipofisis libera oxitocina en forma pulsátil y uno de estos pulsos estimula la liberación de $PGF2\alpha$. Este primer pulso de $PGF2\alpha$, el cual es de baja magnitud, estimula la liberación de oxitocina de origen lúteo. Así se establece un mecanismo de retroalimentación positivo entre estas dos hormonas. La oxitocina estimula la liberación de $PGF2\alpha$, pero al mismo tiempo la alta concentración de oxitocina provoca la pérdida de la sensibilidad del endometrio, con lo que después de un tiempo deja de secretar $PGF2\alpha$. El intervalo entre pulsos de $PGF2\alpha$ está determinado por la pérdida de la sensibilidad del endometrio, a la oxitocina y por el tiempo que tarda en recuperarla. Así el mecanismo de retroalimentación positiva se interrumpe y vuelve a establecerse hasta que pasan 6 horas, tiempo suficiente para que el endometrio recupere la sensibilidad a la oxitocina, por este motivo los pulsos de $PGF2\alpha$ se presentan con intervalo de 6-8 horas.

La acción luteolítica de la $PGF2\alpha$ es local, ya que se ha comprobado que la remoción del cuerno uterino ipsilateral al CL detiene la regresión lútea, mientras que la remoción del cuerno uterino contralateral no tiene efecto alguno en la vida media de ese CL (Flint *et al.*, 1990; Niswender *et al.*, 1994).

Actualmente algunos investigadores proponen que la lúteolisis puede ser el resultado de un riego sanguíneo ovárico disminuido. El CL es una glándula altamente vascularizada que recibe más del 80% de sangre de la que recibe normalmente el ovario. Inyecciones de $PGF2\alpha$ en ratas no causan disminución en el riego sanguíneo ovárico, pero sí en vacas y ovejas. Sin embargo, no esta

todavía claro, si esta disminución en el riego sanguíneo lúteo es un factor importante en el inicio de la regresión lútea o si simplemente es un signo de lúteolisis (Niswender *et al.*, 1994; Wiltbank *et al.*, 1990).

El CL no siempre mantiene su duración normal, porque puede haber una regresión lútea prematura. Esta fase lútea corta ha sido bastante estudiada en la pubertad y durante la transición del anestro posparto a la ciclicidad. Este fenómeno se da como resultado de una liberación prematura de PGF2 α desde el útero o como consecuencia de la ovulación de un folículo desarrollado en un ambiente hormonal inadecuado (Hernández-Cerón y Zarco, 1998).

La asociación de la función lútea con la falla en la concepción no sólo depende del efecto que pudiera tener la P₄ sobre el desarrollo embrionario, sino que se asocia con la falla en el reconocimiento materno de la gestación de tal forma que una vaca que tiene buena función del CL mantiene una relación P₄-E₂ dentro de cierto rango que hace menos probable que se active el mecanismo de inicio de secreción de PGF2 α , mientras otra vaca con una fase lútea subnormal no bloquea la acción del estradiol en el útero por lo cual el mecanismo que inicia la secreción de la PGF2 α es más sensible (Lamming y Mann, 1993; Mann *et al.*, 1995). Bajo estas circunstancias, el establecimiento y mantenimiento de la gestación en las vacas con fases lúteas subnormales se encuentra doblemente en desventaja, ya que por un lado al haber menos P₄ el desarrollo del embrión será más lento y tendrá menor capacidad para producir IFN τ , y por otra parte, los mecanismos que inician la secreción pulsátil de PGF2 α son más sensibles debido a la relación anormal entre P₄ y E₂. (Lamming *et al.*, 1989; Thatcher *et al.*, 1994).

2.3 RECONOCIMIENTO MATERNO DE LA GESTACIÓN.

El reconocimiento materno de la gestación se considera como una interacción entre la unidad materna (útero) y el embrión, que produce las señales necesarias que la madre necesita para mantener la preñez. Este diálogo ocurre en varias etapas críticas durante la preñez, pero una muy importante para los rumiantes en general, se da por una regulación paracrina por parte del embrión

en desarrollo con el endometrio que evita la secreción de $\text{PGF2}\alpha$. El efecto antiluteolítico del embrión es la causa primaria para mantener el CL, la producción de P_4 y para que la preñez continúe (Bazer *et al.*, 1994; Thatcher *et al.*, 1994).

El signo necesario para mantener la preñez es un interferón de origen trofoblástico que es producido justo cuando el embrión empieza a alargarse aproximadamente a los 15mm de longitud (entre los días 14 a 19 de gestación). Esta sustancia se conoce como interferón tau ($\text{IFN}\tau$) que es una proteína compuesta de 172 aminoácidos. El incremento en su producción ocurre al mismo tiempo de la lúteolisis en animales ciclando, pero puede ser detectado desde el día 12 hasta por lo menos el día 38 de la gestación (Bazer *et al.*, 1994; Thatcher *et al.*, 1994). En un experimento donde se aplicaron inyecciones uterinas de $\text{IFN}\tau$ en vacas (en los días 14-17 postinseminación) se provocó alteración en la función endometrial y una reducción en la secreción de $\text{PGF2}\alpha$, lo que trajo como consecuencia un aumento en la fertilidad (Thatcher *et al.*, 1989).

Las principales acciones del $\text{IFN}\tau$ son: 1).- Establización o "up regulation" de los receptores endometriales a progesterona. 2).- "Down regulation" a receptores de oxitocina y estradiol. 3).- Inhibición de los mecanismos postreceptor los cuales evitan la inducción provocada por la oxitocina en la liberación pulsátil de $\text{PGF2}\alpha$. 4).- Una potente actividad antiviral y antiproliferativa. (Bazer *et al.*, 1994).

Por lo que la producción de $\text{IFN}\tau$ es regulada y desarrollada por el embrión, pero su producción sostenida requiere de la exposición de este al medio ambiente uterino (Hernández-Ledezma *et al.*, 1992).

Un mecanismo antiluteolítico complementario inducido por el $\text{IFN}\tau$ puede ser la regulación del metabolismo lípido dentro del endometrio. Se ha encontrado que el $\text{IFN}\tau$ secretado por el embrión inhibe la actividad endometrial de la fosfolipasa A y/o la cicloxigenasa, que son enzimas necesarias para la formación de la $\text{PGF2}\alpha$. (Thatcher *et al.*, 1994).

La administración en vacas inseminadas de $\text{IFN}\tau$ antes de que se produzca la lúteolisis, se ha usado como una manera para compensar la deficiencia

potencial en la secreción de IFN τ por un embrión que está retardado en su desarrollo. Una alternativa ha sido usar el interferón recombinante bovino (rbIFN τ) que tiene una similaridad aproximadamente del 50% en la secuencia de la cadena de aminoácidos que el IFN τ producido naturalmente por el embrión de la vaca. (Bazer *et al.*, 1994). Sin embargo hasta la fecha, las cantidades de bIFN τ y de rbIFN τ producidos en el laboratorio han sido insuficientes para comprobar en campo sus efectos potenciales para aumentar la fertilidad en las vacas. (Bazer *et al.*, 1994).

La acción del rbIFN τ para disminuir la secreción de PGF2 α en cultivos de células endometriales demuestra el efecto antiluteolítico del IFN τ en vivo (Helmer *et al.*, 1989; Meyer *et al.*, 1994). A pesar de estos resultados alentadores, en una serie de experimentos para evaluar la fertilidad usando rbIFN τ en ovejas dieron buenos resultados, sin embargo en vacas se redujo alrededor del 10%, esto se atribuye a una hipertermia y un decremento agudo en la P $_4$ plasmática, estos efectos colaterales se pueden reducir si se disminuye la dosis. (Thatcher *et al.*, 1994). En otro experimento, los efectos antiluteolíticos no se expresaron en 20% de vacas que recibieron IFN τ o rbIFN τ , el cual indica que una inadecuada respuesta endometrial a esta proteína también puede contribuir a la mortalidad embrionaria temprana (Plante *et al.*, 1991).

Por otro lado hay otras proteínas secretadas por el endometrio, como los componentes del sistema Factor de Crecimiento parecido a la Insulina (IGF), que estimula el desarrollo del embrión y juega un papel importante en el proceso del reconocimiento materno de la gestación, por lo que receptores para IGF se encuentran en embriones en desarrollo temprano en bovinos y ovinos (Lucy *et al.*, 1995).

2.4 MUERTE EMBRIONARIA.

La mortalidad embrionaria es la pérdida del embrión durante el período que va desde la fertilización hasta la completa diferenciación de los órganos la cuál ocurre aproximadamente a los 45 días de gestación (Manspeaker *et al.*, 1989).

Se acepta generalmente que los porcentajes de fertilización después del servicio son cercanos al 90%, sin embargo los porcentajes de concepción se sitúan entre un 40%-50% (Diskin y Sreenan, 1980). Kastelic. (1994) calculó que la incidencia de muerte embrionaria en las vacas es del 15% en el primer servicio y del 28% en vacas repetidoras.

El tiempo exacto en que ocurre la muerte embrionaria es todavía controversial, pero muchas pérdidas ocurren entre los días 14 a 17 de preñez que es el período que va desde el alargamiento del trofoblasto hasta cuando hay unión de la microvellosidad de la membrana externa del trofoblasto (corión) al endometrio materno (Kastelic, 1994).

Desde 1921 los efectos del medio ambiente, nutrición, genética, edad, enfermedades y factores endocrinos han sido estudiados con relación a la muerte embrionaria. Sin embargo hasta la fecha no ha habido un sólo factor que pueda ser manipulado para aumentar en forma consistente la supervivencia embrionaria. Por lo tanto el exitoso establecimiento y mantenimiento de la preñez es la combinación exitosa de muchos eventos endocrinológicos, morfológicos, fisiológicos, inmunológicos y medio ambientales. (Ayalon, 1978; King, 1991; Thatcher *et al.*, 1994)

Los factores que pueden causar mortalidad embrionaria se clasifican dentro de dos categorías principales: a).- Factores genéticos; raza, familia, entrecruzamientos y grupos sanguíneos; b).- Factores medioambientales; nutrición, edad, clima, infecciones, asincronía hormonal y medio ambiente uterino adverso (Thatcher *et al.*, 1994).

Las anomalías genéticas parecen representar sólo un porcentaje pequeño (0-4%) de muerte embrionaria en ganado bovino; causada

probablemente por la formación de una meiosis trivalente que da como resultado un cigoto con un número anormal de cromosomas, lo que le provoca la muerte (Thatcher *et al.*, 1994)

Existe escasez de datos experimentales que correlacionan el efecto de la nutrición en la mortalidad embrionaria y los que existen se basan principalmente en los efectos de los niveles de energía y proteína. Sin embargo se conoce desde hace tiempo que vacas que tienen mayores ganancias de peso logran altas tasas de preñez comparadas con aquellas que tienen bajas o nulas ganancias. Por ejemplo vacas con bajos niveles de glucosa (<30 mg/dl) tuvieron una baja tasa de preñez a primer servicio, sugiriendo una asincronía hormonal en este tipo de vacas, particularmente con respecto a la concentración de P_4 . Por lo tanto vacas con un balance energético negativo tienden a tener bajos niveles sanguíneos de P_4 (McClure, 1970; Villa-Godoy *et al.*, 1988).

Para mantener una producción de leche alta las dietas de las vacas tienen que tener altos niveles de proteína cruda (Peters, 1996). Se han hecho trabajos para correlacionar estos altos niveles de proteína con respecto a la tasa de concepción pero los resultados han sido variables (Chandler *et al.*, 1976; Elrod y Butler, 1993). Sin embargo en un estudio hecho por Ferguson *et al.* (1988) sugieren que dietas con una cantidad excesiva de proteína degradable en el rumen pueden provocar falla en la fertilización o muerte embrionaria temprana además de alterar la producción de hormonas ováricas. Una explicación es que los productos producidos por el metabolismo proteico, por ejemplo el amoníaco, se incrementa en la sangre y en el útero de las vacas cuando sus dietas son altas en proteína degradable. En una investigación, se demostró que hubo una reducción en la fertilidad la cual coincidió con una alteración en el pH uterino en vaquillas que consumieron una excesiva cantidad de proteína degradable que se convirtió en amoníaco que altero el pH (Elrod y Butler, 1993).

Aunque la hipotermia y la hipertermia pueden probablemente afectar al embrión, se ha observado que la hipertermia tiene mayores efectos negativos en su proceso de desarrollo (Zusman y Ornoy, 1990). Se ha comprobado que una

exposición corta al estrés calórico durante el servicio provoca tasas de concepción bajas esto debido al efecto directo de la elevación en la temperatura uterina sobre el desarrollo embrionario o indirectamente debido a la modificación en la condición endocrina de la madre que provoca un medio ambiente uterino inadecuado (Bandinga *et al.*, 1985). En un estudio Ulberg y Sheenan (1973) encontraron que una pequeña elevación en la temperatura se manifiesta por una falla en el desarrollo embrionario, provocando embriones que se cultivaban y parecían morfológicamente normales pero subsecuentemente morían. El periodo más termosensible de los embriones en ese estudio fue durante las primeras divisiones meioticas.

Para entender el papel de la infección uterina específica y la no-específica en la muerte embrionaria hay que hacer una distinción entre ellas; es muy común que las infecciones uterinas estén presentes durante el período posparto, sin embargo la infección es eliminada del útero alrededor del primer estro posparto en la mayoría de las vacas (Zavy, 1994). Con relación a lo anterior Hartigan. (1978) demostró que la tasa de infección en una población de vacas repetidoras fue la misma que en vacas "fértil"; estas observaciones apoyan la idea que las infecciones no específicas, o quizás más exactamente, la contaminación del útero no afecta la función reproductiva normal. Por lo tanto, las infecciones uterinas no específicas probablemente no son un factor importante que contribuye a la mortalidad embrionaria temprana en las vacas. Sin embargo, hay situaciones en las cuales una bacteria infecciosa y/o un organismo viral pueden disminuir los mecanismos de defensa uterinos y causar infecciones específicas las cuales pueden ser tan severas como para causar muerte embrionaria temprana o aborto (Bane, 1980). Hay una gran variedad de organismos bacterianos los cuales están implicados en la mortalidad embrionaria en el ganado, entre los que se encuentran los siguientes:

- a).- *Corynebacterium pyogenes*.
- b).- *Campylobacter fetus*.
- c).- *Brucella abortus*.
- d).- *Haemophilus somnus*.
- e).- *Mycoplasmas spp.*
- f).- *Ureaplasma*.
- g).-

Mycobacterium paratuberculosis. h).- *Chlamydia psittaci* y el protozooario *Tritrichomona foetus* (Griffin et al., 1974).

Bowen (1984) revisó la literatura respecto al efecto de agentes virales en la pérdida embrionaria y encontró que el porcentaje pérdida embrionaria debida a los virus tanto en el embrión como en la madre no se conoce con certeza. También observó que aunque muchos de los virus comunes de los animales domésticos han infectado y matado embriones preimplantados *in vitro*, estudios *in vivo* no han mostrado esta característica. Diez años más tarde aunque se han hecho algunos progresos en identificar a los componentes virales envueltos en la muerte embrionaria temprana, muchos trabajos son necesarios para apreciar su grado y responsabilidad en ésta. Sin embargo, los siguientes virus son los responsables principales de muerte embrionaria temprana: Virus de la rinotraquitis infecciosa bovina (IBR), vulvovaginitis pustular infecciosa (VPI), y diarrea viral bovina (DVB) (Zavy, 1994).

El diagnóstico de una infección que causa muerte embrionaria temprana debe estar asociado realmente a un título alto de anticuerpos en respuesta a un microorganismo y/o virus en particular (Gaines, 1989)

Por lo explicado anteriormente, la muerte embrionaria temprana se considera como una barrera fisiológica que impide la utilización eficaz de los avances tecnológicos en la producción bovina, como es la manipulación embrionaria para la transferencia de embriones o la fertilización *in vitro* (Peters, 1996).

CAPITULO III

MATERIAL Y METODOS

3.1 LOCALIZACIÓN.

El presente trabajo se realizó en establos del Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca (CAIT), ubicado en el municipio de Tizayuca, Hidalgo, localizado geográficamente en las coordenadas 19° 5' 25" latitud norte y 98° 58' 8" longitud oeste a 2200 m.s.n.m. De acuerdo a la clasificación climática de Köppen, modificada por García. (1987) tiene un clima BS1kw (semiseco templado con lluvias en verano), con promedio de precipitación anual de 624 mm y temperatura media anual de 16.3° C.

3.2 ANIMALES EXPERIMENTALES.

Se utilizaron 335 vacas Holstein con 2.8 ± 0.1 partos y con 2.7 ± 0.09 servicios recibidos, las cuales provenían de 10 establos con una población promedio de 200-300 bovinos, que tienen un manejo alimenticio, reproductivo y sanitario semejante. Estas vacas fueron detectadas en celo en dos períodos al día de 6:00 a 8:00 y de 18:00 a 20:00 h e inseminadas artificialmente en promedio 12 horas después de detectado el celo. De acuerdo a las posibilidades de visita a los establos en los días 12, 13, o 14 postinseminación se realizó un examen ultrasonográfico de los ovarios y se tomaron muestras sanguíneas. Posteriormente se determinó el resultado de la inseminación artificial con base a los hallazgos en el diagnóstico de gestación hecho por palpación rectal a los 45 días postinseminación.

3.3 OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE SANGRE.

Las muestras de sangre se obtuvieron directamente de la vena coccígea utilizando tubos al vacío heparinizados. Inmediatamente después de la obtención las muestras fueron centrifugadas a 1500 g para la separación del plasma el cual

fue conservado en congelación a -20° C hasta su análisis. Se determinaron las concentraciones de estradiol plasmático por radioinmunoanálisis en fase sólida (Turzillo y Fortune, 1990) utilizando un "kit" para estradiol con doble anticuerpo de los laboratorios Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA, USA; con número de catalogo KE2D1 que mostró una variación intraensayo y un coeficiente de variación en dosis alta y en dosis baja de 2.5115 ± 0.0530 pg/ml (2.11%) y 41.3475 ± 2.2727 pg/ml (5.49%) respectivamente con una sensibilidad de 0.156 pg/ml. Para la concentración de progesterona plasmática se realizó un radioinmunoanálisis en fase sólida (Pulido *et al.*, 1991) utilizando un "kit" de ImmuChem TM Coated Tube Progesterone de ICN Pharmaceuticals, Inc. Diagnostics División. Costa Mesa, CA 92626; con número de catalogo 07-270102, que mostró una variación intraensayo y un coeficiente de variación en dosis alta y en dosis baja de 0.4075 ± 0.0249 ng/ml (6.13%) y 20.063 ± 1.323 ng/ml (6.59%) respectivamente y una sensibilidad de 0.150 ng/ml.

3.4 EXAMEN DE LOS OVARIOS POR ULTRASONOGRAFÍA

Se realizó un examen ultrasonográfico de los ovarios, para lo cual se utilizó un ultrasonido de tiempo real, ALOKA 210, con un transductor lineal de 5 Mhz. El examen se hizo por planos desde el polo craneal hasta el polo caudal de cada ovario hasta localizar el folículo mayor el cual fue clasificado de acuerdo a su tamaño en: 1. Folículos <5 de diámetro; 2. Folículos entre 5-9.9 mm de diámetro; 3. Folículos entre 10-14.9 mm de diámetro; 4. Folículos ≥ 15 mm de diámetro (Rangel *et al.*, 1997; Driancourt *et al.*, 1991 y Lucy *et al.*, 1992).

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se compararon por χ^2 cuadrada las frecuencias de concepción a 45 días postservicio entre los grupos con diferente clasificación de tamaño folicular durante el diestro medio (día 12, 13 o 14) postinseminación. Para estos análisis se incluyeron a las 335 vacas.

Para analizar la relación entre el porcentaje de concepción con el tamaño folicular y las concentraciones de P₄ y E₂ en los días 12, 13 o 14 postinseminación, se realizó un ANDEVA para un diseño completamente al azar en el cual se consideraron como variables dependientes, el diámetro folicular las concentraciones plasmáticas de progesterona y estradiol. Las variables independientes en este análisis fueron el resultado de la I.A. (gestante, no gestante), el número de parto, el número de servicio y el día postservicio en que se realizó la ultrasonografía. Así mismo se integró como covariable el número de días en leche con el fin de controlarla como fuente de variación. Para este análisis se incluyeron 208 vacas de las 335.

Utilizándose el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + G_i + P_j + S_k + U_l + G*P_{ij} + G*S_{ik} + G*U_{il} + P*S_{jk} + P*U_{jl} + S*U_{kl} + \beta X_{ijklm} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde:

Y_{ijkl}= Es el valor de las observaciones del diámetro folicular, concentraciones plasmáticas de P₄, concentraciones plasmáticas de E₂

μ= media general

G_i= efecto del i-ésimo estado reproductivo (i= 0 vacía, 1 gestante)

P_j= efecto del j-ésimo número de parto (j= 1,2,3,4,5)

S_k= efecto del k-ésimo número de servicio (k= 1,2,3,4,5)

U_l= efecto del l-ésimo día de ultrasonido (l= 12, 13,14)

X_m= efecto del m-ésimo día de lactancia

G*P_{ij}= interacción entre el i-ésimo estado reproductivo con el j-ésimo número de parto

G*S_{ik}= interacción entre el i-ésimo estado reproductivo con el k-ésimo número de servicio

G*U_{il}= interacción entre el i-ésimo estado reproductivo con el l-ésimo día de ultrasonido

P*S_{jk}= interacción entre el j-ésimo número de parto con el k-ésimo número de servicio

$P*U_{jl}$ = interacción entre el j-ésimo número de parto con el l-ésimo día de ultrasonido

$S*U_{kl}$ = interacción entre el K-ésimo número de servicio con el l-ésimo día de ultrasonido

βX_{ijklm} = efecto de la covariable días de lactancia

ε_{ijkl} = error experimental NID (0, σ^2)

Se efectuaron análisis de correlación (Pearson y Spearman) entre el tamaño folicular y las concentraciones sanguíneas de P_4 y E_2 en vacas gestantes y no gestantes.

En todos los casos los análisis fueron efectuados mediante el programa estadístico computacional S.A.S (Statistical Analysis System) (1991).

CAPITULO IV

RESULTADOS

En los porcentajes de concepción de acuerdo a las diferentes categorías en que se clasificó el diámetro del folículo mayor no hubo diferencia estadística ($P>0.05$), sin embargo las vacas con diámetro del folículo ≥ 15 mm tuvieron un porcentaje de concepción inferior (37.1%;46/124) a las vacas de los otros grupos (Cuadro 1). Por esta razón se reagruparon a las vacas de acuerdo al tamaño del folículo <15 mm o ≥ 15 mm de diámetro (Cuadro 2) en donde se observa que el porcentaje de concepción fue mayor en las vacas que tuvieron diámetro del folículo de <15 mm (49.7%;105/211) que en las vacas con diámetro del folículo de ≥ 15 mm (37.1%;46/124) habiendo una diferencia estadística de ($P<0.05$).

Cuadro 1. Porcentaje de concepción en vacas Holstein de acuerdo al diámetro del folículo mayor durante los días 12, 13 o 14 postinseminación.

Diámetro del folículo mayor (mm)	Número	Gestantes.	No gestantes	Porcentaje de concepción *
<5	58	31	27	53.4 ^a
5-9.9	38	18	20	47.4 ^a
10-14.9	115	56	59	48.7 ^a
≥ 15	124	46	78	37.1 ^a
Total	335	151	184	45.1

* Diferente literal en la columna indica diferencia estadística ($P<0.05$).

Cuadro 2. Porcentaje de gestación en vacas Holstein de acuerdo al diámetro del folículo mayor clasificado en dos clases durante los días 12, 13 o 14 postinseminación.

Diámetro del folículo mayor (mm)	Número	Gestantes	No gestantes	Porcentaje de concepción*
< 15	211	105	106	49.7 ^a
≥15	124	46	78	37.1 ^b
Total	335	151	184	45.1

* Diferente literal en la columna indica diferencia estadística ($P < 0.05$).

Por otro lado las vacas gestantes tuvieron menor diámetro del folículo mayor (13.03 ± 0.52) en comparación de las no gestantes (14.37 ± 0.54) ($P < 0.05$) (Cuadro 3). En la concentración plasmática de P_4 y E_2 no hubo diferencia estadística ($P > 0.05$).

Cuadro 3. Concentraciones plasmáticas de P_4 , E_2 y diámetro del folículo mayor entre los días 12, 13 o 14 postinseminación en vacas gestantes y no gestantes.

Grupo	Progesterona ng/ml	Estradiol pg/ml	Diámetro del folículo mayor (mm)
Gestante	5.89 ± 0.30^a	3.71 ± 0.45^a	13.03 ± 0.52^a
No Gestante	5.85 ± 0.31^a	3.84 ± 0.46^a	14.37 ± 0.54^b

Diferente literal en la misma columna indica diferencia estadística ($P < 0.05$).

Los datos se presentan como media \pm error estándar.

En el (Cuadro 4) se muestran los valores de la concentración plasmática de P_4 , E_2 y diámetro del folículo mayor, las cuales no fueron diferentes ($P > 0.05$) entre vacas de 1 a 5 partos. Así mismo, estos valores tampoco tuvieron diferencia ($P > 0.05$) en las vacas de 1 a 5 servicios (Cuadro 5).

Cuadro 4. Concentraciones plasmáticas de P₄, E₂ y diámetro del folículo mayor entre los días 12, 13 o 14 postinseminación en vacas de uno a cinco partos.

Grupo	Progesterona ng/ml	Estradiol pg/ml	Diámetro del folículo mayor (mm)
1 ^{er} Parto	6.26±0.26 ^a	3.30±0.32 ^a	11.22±0.53 ^a
2 ^o Parto	5.85±0.24 ^a	3.10±0.39 ^a	11.90±0.76 ^a
3 ^{er} Parto	5.80±0.46 ^a	3.00±0.57 ^a	12.21±1.20 ^a
4 ^o Parto	5.76±0.35 ^a	3.04±0.75 ^a	12.81±1.02 ^a
5 ^o Parto	5.44±0.47 ^a	4.32±1.04 ^a	12.26±0.84 ^a

Diferente literal en la misma columna indica diferencia estadística (P<0.05).

Los datos se presentan como media ±error estándar.

Cuadro 5. Concentraciones plasmáticas de P₄, E₂ y diámetro del folículo mayor entre los días 12, 13 o 14 postinseminación en vacas de uno a cinco servicios.

Grupo	Progesterona ng/ml	Estradiol pg/ml	Diámetro del folículo mayor mm)
1 ^{er} Servicio	5.59±0.42 ^a	4.07±0.63 ^a	13.24±0.73 ^a
2 ^o Servicio	5.74±0.35 ^a	3.66±0.52 ^a	14.33±0.60 ^a
3 ^{er} Servicio	6.41±0.43 ^a	3.36±0.64 ^a	15.11±0.74 ^a
4 ^o Servicio	5.55±0.53 ^a	2.75±0.79 ^a	13.09±0.91 ^a
5 ^o Servicio	6.05±0.69 ^a	5.04±1.02 ^a	12.77±1.19 ^a

Diferente literal en la misma columna indica diferencia estadística (P<0.05).

Los datos se presentan como media ±error estándar.

En lo referente a los días en que se hizo el ultrasonido día 12, 13 y 14 postinseminación no hubo diferencia estadística (P>0.05) con respecto a las concentraciones plasmáticas de P₄, E₂ y diámetro del folículo mayor (Cuadro 6).

Cuadro 6. Concentraciones plasmáticas de P₄, E₂ y diámetro del folículo mayor durante los días en que se realizó la ultrasonografía

Grupo	Progesterona ng/ml	Estradiol pg/ml	Diámetro del folículo mayor (mm)
Día 12	6.13±0.33 ^a	3.10±0.49 ^a	14.03±0.57 ^a
Día 13	5.92±0.35 ^a	3.94±0.53 ^a	14.05±0.61 ^a
Día 14	5.56±0.42 ^a	4.29±0.62 ^a	13.04±0.72 ^a

Diferente literal en la misma columna indica diferencia estadística (P<0.05).

Los datos se presentan como media ±error estándar.

Cabe señalar que no se encontró efecto de las dobles interacciones en las variables independientes; resultado de la I.A. (gestante, no gestante), el número de parto, el número de servicio y el día postservicio en que se realizó la ultrasonografía ni de la covariable que en este trabajo fueron los días en leche que se uso para controlarla como fuente de variación.

Por lo que se refiere a los coeficientes de correlación en la prueba de Pearson entre el diámetro del folículo mayor y las concentraciones plásmaticas de P_4 y E_2 para las vacas gestantes y las no gestantes se observa que no hay correlación entre estas dos variables ($P>0.05$) (Cuadro 7 y 8).

Cuadro 7. Coeficientes de correlación y niveles de (P) en la prueba de Pearson entre el diámetro del folículo mayor y las concentraciones plasmáticas de P_4 , E_2 en vacas gestantes.

	Diámetro del folículo mayor	Concentración plasmática de P_4 ng/ml	Concentración plasmática de E_2 pg/ml
Diámetro del folículo mayor.	1.00000 0.0	-0.031 0.673	-0.014 0.850

Cuadro 8. Coeficientes de correlación y niveles de (P) en la prueba de Pearson entre el diámetro del folículo mayor y las concentraciones plasmáticas de P_4 , E_2 en vacas no gestantes.

	Diámetro del folículo mayor	Concentración plasmática de P_4 ng/ml	Concentración plasmática de E_2 pg/ml
Diámetro del folículo mayor	1.00000 0.0	-0.064 0.437	-0.069 0.397

Por lo que se refiere a los coeficientes de correlación entre el diámetro del folículo mayor y las concentraciones plásmaticas de P_4 y E_2 tanto para vacas gestantes y no gestantes en la prueba de Spearman se observa que no hay correlación entre ellas ($P>0.05$) (Cuadro 9 y10).

Cuadro 9. Coeficientes de correlación y niveles de (P) en la prueba de Spearman entre el diámetro del folículo mayor y las concentraciones plasmáticas de P₄, E₂ en vacas gestantes

	Diámetro del folículo mayor	Concentración plasmática de P ₄ ng/ml	Concentración plasmática de E ₂ pg/ml
Diámetro del folículo mayor	1.00000 0.0	-0.032 0.695	-0.105 0.198

Cuadro 10. Coeficientes de correlación y niveles de (P) en la prueba de Spearman entre el diámetro del folículo mayor y las concentraciones plasmáticas de P₄, E₂ en vacas no gestantes

	Diámetro del folículo mayor	Concentración plasmática de P ₄ ng/ml	Concentración plasmática de E ₂ pg/ml
Diámetro del folículo mayor	1.00000 0.0	0.033 0.661	0.007 0.921

CAPITULO V

DISCUSION

El porcentaje de concepción fue mayor en las vacas que tuvieron folículos <15 mm de diámetro (49.7%;105/211) que en las vacas con folículos \geq 15 mm (37.1%;46/124). Además las vacas gestantes tuvieron menor diámetro folicular (13.03 ± 0.52 mm) que las vacas no gestantes (14.37 ± 0.54 mm) ($P < 0.05$). Estos resultados permiten sugerir una asociación entre el diámetro del folículo mayor con el porcentaje de concepción y son parecidos a los obtenidos por Rangel *et al.* (1997) en un estudio preliminar en el cual observó que las vacas que en el día 11 o 12 postservicio tuvieron folículos menores de 10 mm de diámetro, presentaron mayor porcentaje de concepción que aquellas que tuvieron folículos mayores de 10 mm.

Existe evidencia de una asociación entre la dinámica folicular en el ciclo postservicio y la fertilidad. Ahmad *et al.* (1997) observaron que las vacas con dos ondas foliculares tuvieron menor fertilidad que las vacas con tres ondas. Además, la modificación de la dinámica folicular mediante la luteinización de los folículos en los días 11 a 13 con GnRH o hCG ha incrementado el porcentaje de concepción (Lajili *et al.*, 1991; Macmillan *et al.*, 1986; Macmillan y Thatcher, 1991). Dichos resultados coinciden con lo observado en el presente estudio, en el cual se encontraron evidencias de una asociación entre las características foliculares y el porcentaje de concepción.

Por otra parte también se sabe que la gestación temprana suprime el desarrollo folicular y disminuye la capacidad estrogénica de los folículos, procesos que forman parte del mecanismo antiluteolítico promovido por el embrión. Sin embargo, estos cambios se han observado solamente después del día 17 postinseminación (Driancourt *et al.*, 1991; Pierson y Ginther, 1987; Thatcher *et al.*, 1991). Por lo cual el hecho de que en la presente investigación las vacas no

gestantes presentaran folículos en promedio mayores que las gestantes durante los días 12, 13 o 14 probablemente no sería un efecto de la ausencia de la gestación, sino que más bien estos folículos podrían estar influenciando negativamente la concepción.

El mecanismo por el cual la dinámica folicular postservicio pudiera afectar la fertilidad no se conoce del todo pero puede especularse una asociación con la duración de la fase lútea ya que en el estudio previamente citado realizado por (Ahmad *et al.*, 1997) fue evidente que las vacas con dos ondas foliculares en el ciclo postservicio fueron menos fértiles que las vacas con tres ondas y se conoce que en las vacas con dos ondas la regresión lútea ocurre en el día 16.5 mientras que en las vacas con tres sucede en el día 19. Este efecto sobre la fertilidad se da probablemente por que las vacas con dos ondas foliculares tienen concentraciones sanguíneas más altas de E₂ al momento del reconocimiento materno de la gestación (día 14-17 postservicio) (Ahmad *et al.*, 1997; Ginther *et al.*, 1989a).

Además, Salfen *et al.* (1999) observaron que la presencia de un folículo dominante puede ser un factor importante en el control del mecanismo luteolítico ya que al administrar E₂ tres veces al día durante cuatro días comenzando un día después de que terminó el crecimiento del folículo dominante de la segunda onda folicular (día 15 del ciclo estral) en vacas que tenían tres ondas de desarrollo folicular provocó lúteolisis temprana, cinco días antes que los animales testigo; en otro experimento al inyectar líquido folicular bovino tres veces al día durante cuatro días empezando el día 13 del ciclo estral, en vacas con dos ondas foliculares, provocó que el crecimiento folicular se suprimiera y la lúteolisis se retrasara cuatro días más en comparación de los animales testigos.

Se ha observado por otro lado que las vacas tratadas con GnRH o hCG en los días 11, 12 o 13 tienen un alargamiento del ciclo estral asociado con un incremento en el porcentaje de concepción, causado por la luteinización y/o atresia del folículo dominante (Macmillan *et al.*, 1986; Macmillan y Thatcher, 1991). La luteinización del folículo se da al alterar la integridad funcional de células de la

teca y granulosa disminuyendo su capacidad de producir E_2 (Macmillan y Thatcher, 1991) dando oportunidad para que el embrión produzca a tiempo $IFN\tau$ y se logre el reconocimiento materno de la gestación.

Por lo anterior existe evidencia que el desarrollo folicular y por consiguiente la cantidad de E_2 secretada por este, participan en la determinación de la duración de la fase lútea, por lo que la modificación de los folículos de acuerdo a su tamaño en esta fase del diestro pueden provocar cambios hormonales que favorezcan la sobrevivencia embrionaria (Ahmad *et al.*, 1997; Macmillan *et al.*, 1986; Macmillan y Thatcher, 1991; Salfen *et al.*, 1999)

La cantidad de progesterona secretada por el cuerpo lúteo determina la sensibilidad del mecanismo de secreción de la $PGF2\alpha$, de tal forma que el mecanismo es más sensible a menores niveles de progesterona (Lamming y Mann, 1993; Lamming y Mann, 1995). Ya que la P_4 influye en el control del mecanismo lúteolítico, inhibiendo el desarrollo de receptores a E_2 y a oxitocina en el endometrio que son necesarios para la liberación de $PGF2\alpha$ (Salfen *et al.*, 1999). Esta inhibición dura 12 días del diestro en un ciclo estral, inmediatamente después hay "down regulation" en los receptores de P_4 , finalizando así este bloqueo, permitiendo entonces un rápido incremento en los receptores endometriales para oxitocina iniciándose así los mecanismos que provocan la lúteolisis (Robinson *et al.*, 1989; Lamming y Mann, 1995 y Pritchard *et al.*, 1994).

Debido a que las vacas lecheras pueden presentar una función lútea subnormal (menor cantidad de P_4 secretada por el CL) determinada por el estado metabólico que impone la lactación (Villa-Godoy *et al.*, 1988), el establecimiento y mantenimiento de la gestación se encontraría doblemente en desventaja. Por un lado se ha observado que al haber menos progesterona el desarrollo del embrión es más lento y tendría menor capacidad para producir interferón- τ (Garret *et al.*, 1988; Kerbler *et al.*, 1997) y por otra parte, los mecanismos que inician la secreción pulsátil de $PGF2\alpha$ serían más sensibles (Lamming y Mann, 1993; Lamming y Mann, 1995). Bajo estas circunstancias es posible que la presencia de folículos grandes y en consecuencia de una actividad estrogénica elevada, estaría

haciendo aun más sensible el inicio de la secreción de PGF2 α (Pritchard *et al.*, 1994).

En el presente trabajo las concentraciones de progesterona y estradiol no se asociaron con el porcentaje de concepción. No obstante que las vacas gestantes tuvieron menor diámetro folicular no ocurrió lo mismo con las concentraciones de estradiol, ya que fueron similares a la de las vacas no gestantes. Estos resultados son diferentes a los encontrados por (Pritchard *et al.*, 1994) quienes observaron que las vacas que tuvieron concentraciones bajas de estradiol en el diestro tardío presentaron un porcentaje de concepción mayor que las vacas con concentraciones elevadas y también son diferentes a lo observado por Mann *et al.* (1995) quienes encontraron que las vacas tratadas con GnRH en el día 12 postinseminación que resultaron gestantes tuvieron menores concentraciones de estradiol que las vacas que no concibieron,

Considerando que las concentraciones circulantes de estradiol provienen en su mayor proporción del folículo más desarrollado (Fortune, 1994) eran de esperarse menores concentraciones de estradiol en las vacas con menor diámetro folicular. Sin embargo, esto no se observó en este estudio ya que no se encontró correlación entre el diámetro folicular y las concentraciones de progesterona y estradiol. Esta situación pudo deberse al esquema de muestreo empleado en la presente investigación pues se ha observado la dificultad de detectar pequeños cambios en los niveles periféricos de estradiol con una sola muestra al día (Moser *et al.*, 1989; Salfen *et al.*, 1999). Otra posible razón es que los niveles de E₂ en sangre periférica pueden no mostrar en su totalidad la producción de esta hormona a partir de los folículos ováricos (Ahmad *et al.*, 1997; Driancourt *et al.*, 1991; Villa-Godoy *et al.*, 1985).

En los estudios realizados cuando se eliminan hormonalmente los folículos grandes en diferentes condiciones utilizando GnRH y hCG en los días 11, 12 o 13 se observa una amplia variabilidad en los resultados de fertilidad, ya que en algunos estudios se ha incrementado el porcentaje de concepción (Humblot y Thibier, 1981; Lajili *et al.*, 1991; Macmillan *et al.*, 1986; Drew y Peters, 1991),

mientras que en otros no ha sido significativo este efecto (Eduvie y Seguin, 1982; Jubb *et al.*, 1990). Esta situación probablemente depende de las particularidades (nutrición, producción de leche, condición corporal y medicina preventiva) de los hatos estudiados y también de las características de la población folicular de las vacas al momento del tratamiento, la cual sería muy variable entre ellas (vacas con dos, tres ó mas ondas foliculares). (Ginther *et al.*, 1989a; Ginther *et al.*, 1989b; Mann *et al.*, 1995).

Aunque las vacas utilizadas en el presente trabajo provenían de establos muy parecidos en manejo, no fue posible lograr una homogeneidad en el número de parto, número de servicio o días en leche. Así mismo, por aspectos prácticos de manejo tampoco se pudieron realizar las ultrasonografías ováricas en el mismo día del ciclo estral en todas las vacas. Por ello estos factores de variación se consideraron en el análisis estadístico como variables independientes o covariables según el caso, sin que como se observa en los cuadros cuatro a seis estas variables influenciaran las respuestas analizadas.

Los resultados del presente trabajo indican que existe una asociación entre el tamaño folicular durante la segunda mitad del diestro y el porcentaje de concepción, sin embargo no permiten establecer el sentido de esa relación (v.g ¿el tamaño folicular influye en la gestación o la gestación determina el tamaño folicular?); por lo que será importante continuar explorando la posible influencia de la dinamica folicular sobre el establecimiento de la gestación.

CAPITULO VI

LITERATURA CITADA

Ahmad N, Townsen EC, Dailey RA, Inskip, EK. Relationships of hormonal patterns and fertility to occurrence of two or three waves of ovarian follicles, before and after breeding, in beef cows and heifers. *Anim Reprod Sci* 1997;49:13-28.

Albihn A, Gustafsson H, Hurst M, Rodriguez-Martinez. Embryonic ability to prolong the interoestrous interval in virgin and repeat breeder heifers. *Anim Reprod Sci* 1991;26:193-210.

Ayalon, N. A review of embryonic mortality in cattle. *J Reprod Fert* 1978;54:483-493.

Bandinga L, Collier RJ, Thatcher WW, Wilcox CJ. Effects of climatic and management factors on conception rate of dairy cattle in subtropical climate. *J Dairy Sci* 1985; 68:78-85.

Bane A. Microbiology of the genital tract; etiology of genital infections. *Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. USA* 1980;2:473-481.

Bazer FW, Ott T.L, Spencer T.E. Pregnancy recognition in ruminants, pigs and horses: signal from the thophoblast. *Theriogenology* 1994;41:79-94.

Bowen BA. Viral agents and embryo loss. *Proc. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem., 4, XIII USA* 1984;16-21.

Braden TD, Gamboni F, Niswender G.D. Effects of prostaglandin F_{2α} induced luteolysis on the populations of cells in the ovine corpus luteum. *Biol Reprod* 1988;39:245-253.

Chandler PT, Brown CA, Johnston RP, Macleod GK, Moss BR, Rakes AH, Satter LD. Protein and methionine hydroxy analog for lacting cows. *J Dairy Sci* 1976; 1897-1909.

Diskin MG, Sreenan JM. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *J Reprod Fertil* 1980;59:463-473.

Drew SB, Peters AR. The effects of treatment with a gonadotrophin releasing hormone analogue on fertility of dairy cows. *Anim Prod* 1991;52 612.

Driancourt MA, Thatcher WW, Terqui M, Adrieu, D. Dynamic of ovarian follicular development in cattle during the estrous cycle, early pregnancy and in response to PMSG. *Dom Anim Endo* 1991;8:209-221.

Eduvie LO, Seguin BE. Corpus luteum function and pregnancy rate in lactating dairy cows given human chorionic gonadotropin at midiestrus. *Theriogenology* 1982;17: 415-423.

Elrod CC, and Butler WR. Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *J Anim Sci* 1993;71:694-701.

Farin CE, Moeller CL, Sawyer, HR, Gamboni R, Niswender, GD. Morphometric analysis of cells types in the ovine corpus luteum throughout the estrus cycle. *Biol Reprod* 1986;35:1299-1308.

Ferguson JD, Blanchard TL, Galligan DT, Hoshall DC, and Chalupa W. Infertility in dairy cattle fed a high percentage of protein degradable in the rumen. *J Am Vet Med Assoc* 1988;192:659-662.

Flint EL, McCann TJ, Jones DSC. Luteal oxytocin: Characteristics and control of synchronous episodes of oxytocin and PGF₂ α secretion at luteolysis in ruminants. *Dom Anim Endocr* 1990;7:111-124.

Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 1994;50:225-232.

Gaines JD. Investigating the role of infectious diseases and toxins in the subfertile dairy herd. *Vet Med* 1989;84:1195-1199.

García E. Modificación del sistema de clasificación climático de Köppen. 4a ed. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1987

Garrett JE, Geisert RD, Zavy MT, Morgan GL. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in the bovine. *J Reprod Fertil* 1988;84:437-446.

Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fertil* 1989a;87:223-230.

Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP. Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biol Reprod.* 1989b: 41:247-254.

Griffin JFT, Hartigan PJ, and Nunn WR. Non-specific uterine infection and bovine infertility. II Infection patterns and endometritis before and after service. *Theriogenology* 1974;1:107-113.

Gustafsson, H. Characteristics of embryos from repeat-breeder and virgin heifers. *Theriogenology* 1985; 23: 487-498.

Hartigan PJ. The role of non-specific uterine infection in the infertility of clinically normal repeat breeder cows. *Vet Sci Comm* 1978;1:307-321.

Helmer SD, Hansen PJ, Thatcher WW, Johnson JW, Bazer FL. Intrauterine infusion of highly enriched bovine trophoblast protein-1 complex exerts an antiluteolytic effect to extend hábeas luteum lifespan in cyclic cattle. *J Reprod Fertil* 1989;87:89-101.

Hernández-Cerón J. Ciclo estral en la hembra bovina. En: Hernández-Cerón, J, editor. *Mejoramiento Animal. Reproducción. Bovinos*. México, D.F: Universidad Nacional Autónoma de México, 1999.

Hernández-Cerón J, Zarco QLA. Función del cuerpo lúteo y muerte embrionaria en rumiantes. En: Moreno, CR, editor. *Ciencia Veterinaria*. México, D.F: Universidad Nacional Autónoma de México, 1998:1-18.

Hernandez-Ledezma JJ, Sikes JD, Murphy CN, Watson A.J, Schultz G.A, Roberts RM. Expresion of bovine trophoblast interferon in conceptuses derived by *in vitro* techniques. *Biol Reprod* 1992;47:374-380.

Humblot P, Thibier M. Effect of gonadotropin releasing hormone (GnRH) treatment during the midluteal phase in repeat breeder cows. *Theriogenology* 1981;16:375-379.

Jubb TF, Abhayarantne D, Malmo J, Anderson GA. Failure of an intramuscular injection of an analogue of gonadotrophin-releasing hormone 11 to 13 days after insemination to increase pregnancy rates in dairy cattle. *Aust Vet J* 1990;67:369-361.

Karsch FJ, Moenter SM, Caratay A. The neuroendocrine signal for ovulation. *Anim Reprod Sci* 1992;28:329-341.

Kastelic JP. Noninfectious embryonic loss in cattle. *Food Animal Practice* 1994;89:584:589.

Kerbler TL, Buhr MM, Jordan LT, Leslie KE, Walton JS. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology* 1997;47:703-714.

King, WA. Embryo-mediated pregnancy failure in cattle. *Can Vet J* 1991;32:99-103.

Knickerbocker JJ, Wiltbank MC, Niswender G:D. Mechanisms of luteolysis in domestic livestock. *Dom Anim Endocrinol* 1988;5:91-107.

Lajili H, Humblot P, Thibier M. Effect of PGF2 alpha treatment on conception rates of dairy cows treated with a GnRH agonist 12 to 14 days after artificial insemination. *Theriogenology* 1991;36:335-347.

Lamming GE, Darwash AO, Back H.L. Corpus luteum function in dairy cows and embryo mortality. *J Reprod Fertil* 1989, Suppl 37:245-252.

Lamming GE, Mann GE. Progesterone concentration affects the development of the luteolytic mechanism in the cow. *J Reprod Fertil* 1993;Abstr Ser 11:8

Lamming GE, Mann GE. A dual role for progesterone in the control of cyclicity in ruminants. *J Reprod Fertil* 1995;Suppl.49:561-566.

Linares T. Embryonic development in repeat breeder and virgin heifers seven days after insemination. *Anim Reprod Sci* 1982;4:189-198.

Lucy MC, Thatcher WW, Collier RJ, Simmen FA, Ko Y, Savio JD, Bandinga L. Effects of somatotropin on the conceptus, uterus, and ovary during maternal recognition of pregnancy in cattle. *Dom Anim Endocrinol* 1995;12:73-82.

Lucy MC, Savio JD, Bandinga L, De La Sota LR, Thatcher WW. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci*1992;70:15-36.

Macmillan KL, Taufa VK, Day AM. Effects of an agonist of gonadotrophin releasing hormone (Buserelin) in cattle. III. Pregnancy rates after a post-insemination injection during metaestrus or dioestrus. *Anim Reprod Sci* 1986;11:1-10.

Macmillan KL, Thatcher WW. Effects of an agonist of gonadotrophin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol Reprod* 1991;45:883-889.

Mann GE, Lamming GE, Fray MD. Plasma oestradiol and progesterone during early pregnancy in the cow and the effects of treatment with buserelin. *Anim Reprod Sci* 1995;37:121-131.

Manspeaker JE, Robl MG, Edwards GH.: Mineral nutrition and early embryonic mortality in the Bovine Animal. *The Bovine Practitioner*. 1989;24:154-156.

McClure TJ. An experimental study of the causes of a nutritional and lactational stress infertility of pasture-fed cows, associated with loss of body weight at about the time of mating. *Res Vet Sci.* 1970;11:247-254.

McCracken JA, Shramm W, Okulicz WC. Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF₂ α from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. *Anim Reprod Sci.* 1984;7:31-35.

Meyer MD, Drost M, Schmitt EJP, Badinga L, Hansen PJ, Thatcher WW. Recombinant bovine interferon τ extends corpus luteum lifespan, reduces uterine secretion of prostaglandin F₂ α and causes dose-dependent effects on body temperature and plasma progesterone in cattle. *J Anim Sci* 1994;72 (Suppl.1) 281 (Abstract).

Moser MT, Garverick HA, Smith MF, Youngquist R. Effect of bovine follicular fluid and follicle-stimulating hormone on follicular growth in unilaterally ovariectomized prepubertal heifers. *J Dairy Sci* 1989;72:2170-2178.

Niswender GD, Juengel JL, McGuire WJ, Belfiore CJ, Wiltbank MC. Luteal function: The Estrous cycle and early pregnancy. *Biol Reprod* 1994;50:239-247.

Peters , RA. Herd management for reproductive efficiency. *Anim Reprod Sci* 1996; 42:455-464.

Pierson RA, Ginther OJ. Intraovarian effect of the corpus luteum on ovarian follicles during early pregnancy in heifers. *Anim Reprod Sci* 1987;15:53-60.

Plante C, Thatcher WW, Hansen PJ. Alteration of estrous cycle length, ovarian function and oxytocin induced release of prostaglandin F₂ α by intrauterine and intramuscular administration of recombinant bovine interferon- α to cow. *J Reprod Fertil*1991;93:375-384.

Pritchard JY, Schrick FN, Inskeep EK. Relationship of pregnancy rate to peripheral concentrations of progesterone and estradiol in beef cows. *Theriogenology* 1994;42: 247-259.

Pulido A, Zarco L, Galina CS, Murcia C, Flores G, Posadas E. Progesterone metabolismo during storage of blood samples from Gyr cattle. Effects of anticoagulate, time and temperature of incubation. *Theriogenology* 1991;35:965-975.

Rangel SR, Alcántara RA, Crisanto RE, Apodaca SC, Ayala OJ. Fertilidad de vacas Holstein que presentaron un folículo grande durante la fase lútea media.

Memorias del XXI Congreso Nacional de Buiatría. Colima, Col. 365-367
Asociación de Medicos Veterinarios Especialistas en Bovinos. México 1997.

Robinson NA, Leslie KE, Walton J.S. Effect of treatment with progesterone on pregnant rate and plasma concentration of progesterone in Holstein cows. *J Dairy Sci* 1989; 72:202-207

Salfen BE, Cresswell JR, Xu ZZ, Bao B, Garverick HA. Effects of the presence of a dominant follicle and exogenous oestradiol on the duration of the luteal phase of the bovine estrous cycle *J Reprod Fertil* 1999;115:15-21.

SAS. Institute. SAS/STAT guide for personal computers, version 6.03. SAS. Institute Inc. Cary North Carolina. USA.1991.

Schramm W, Bovaird LC, Glew ME, Schramm G, McCracken JA. Corpus luteum regression induced by ultra-low pulses of PGF 2α . *Prostaglandins* 1983; 26:347-364

Singh R, Singha SPS, Setia. Oestrogens and progesterone status during pregnancy and parturition in bovines:a review. *Indian Vet Med J* 1992;16:87-93.

Sirois J, Fortune JE. Ovarian follicular dynamics during the estrus cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod* 1988; 39:308-317.

Stock AE, Fortune JE. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology* 1993;132:1108-1114.

Thatcher WW, Bazer FW, Sharp DC, Roberts RM. Interrelationships between uterus and conceptus to maintain corpus luteum function in early pregnancy: sheep, cattle, pigs and horses. *J Anim Sci* 1986;62 Suppl.2:25-46.

Thatcher WW, Driancourt MA, Terqui M, Bandinga L. Dynamics of ovarian follicular development in cattle following hysterectomy and during early pregnancy. *Dom Anim Endocrinol* 1991; 8:223-234.

Thatcher WW, Macmillan KL, Hansen PJ, Drost M. Concepts for regulation of corpus luteum function by conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology* 1989;31:149-164.

Thatcher WW, Staples CR, Danet-Desnoyers G, Oldick B, Schmitt, EP. Embryo health and mortality in sheep and cattle. *J Anim Sci* 1994;72 Suppl. 3:16-30.

Thatcher WW, Meyer MD, Danet-Desnoyers G. Maternal recognition of pregnancy. *J Reprod Fert* 1995;49:15-28.

Turzillo AM, Fortune JE. Supresión of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers. *J Reprod Fertil* 1990;89:643-653.

Ulberg LC, Sheenan LA.: Early development of mammalian embryos in elevated ambient temperatures. *J. Reprod. Fertil* 1973;19:155-161.

Villa-Godoy A, Hughes TL, Emery RS, Chapin LT, Fogwell RL. Association between energy balance and luteal function in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 1988;71: 1063-1072.

Villa-Godoy A, Ireland JJ, Wortman JA, Ames NK, Hughes TH, Fogwell RL. Effect of ovarian follicles on luteal regression in heifers. *J Anim Sci* 1985;60:519-527.

Wiltbank MC, Gallagher KP, Christensen AK, Brabec RK, Keyes PL. Physiological and Immunocytochemical evidence for a new concept of blood flow regulation in the corpus luteum. *Biol Reprod.* 1990;42:139-149.

Wiltbank MC, Niswender, GD. Functional aspects of differentiation and degeneration of the steroidogenic cells of the corpus luteum in domestic ruminants. *Anim Reprod Scie* 1992;28:103-110.

Zavy MT. Embryonic Mortality in cattle. In: Zavy MT and Geisert RD editor. *Embryonic mortality in domestic species.* USA: CRC Press 1994; 99-140.

Zusman I, Ornoy, A. Embryonic resistance to chemical and physical factors: manifestation, mechanism, role in reproduction and adaption to ecology. *Biol Rev* 1990;65:1-19.