



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ESTROGÉNICA EN  
FOLÍCULOS DOMINANTES DE HEMBRAS *Bos indicus*  
CON ESTRO SINCRONIZADO**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**DANIEL DÍAZ ESPINOSA DE LOS MONTEROS**

**TUTOR  
CARLOS S. GALINA HIDALGO**

**COMITÉ TUTORAL  
TATIANA FIORDELISIO COLL  
CARLOS G. GUTIÉRREZ AGUILAR**

**MÉXICO, D.F.**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## DEDICATORIA

*Santiago: sonrisas, sueños e ingenuidad*

*Arlette: diversión y ternura*

*Citlali: anhelos, dedicación y comprensión*

*(una vida no será suficiente para disfrutarlos)*

*A mis padres y a mi abuela Sara (q.e.p.d.)*

## **PRESENTACIÓN**

La primera parte del trabajo se realizó en las instalaciones del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIGT) que pertenece a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

La parte final de la investigación se desarrollo en el Departamento de Reproducción de la FMVZ y en el Departamento de Biofísica del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la UNAM.

Los resultados del presente estudio forman parte de la línea de investigación 3 “Tecnología para incrementar la eficiencia reproductiva” que se deriva del Macroproyecto 7 “Productividad Sostenible de los Hatos de Cría en Pastoreo” perteneciente a la Unidad de Apoyo a la Investigación en Facultades y Escuelas (UAIFE) de la UNAM.

## **AGRADECIMIENTOS**

Se agradece el apoyo económico del Fomento a la Graduación otorgado por la Coordinación de Estudios de Posgrado de la UNAM.

Se reconoce el apoyo económico para la impresión de la tesis otorgado por el Honorable Comité Académico del Programa de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal.

Se agradece ampliamente la participación del comité tutorial: Dra. Tatiana Fiordeliso Coll y el Dr. Carlos G. Gutiérrez Aguilar, los cuales contribuyeron en gran medida al trabajo, tanto en su forma experimental como en el escrito.

Se agradece la participación de los integrantes del jurado de examen que revisaron y emitieron acertados comentarios sobre el escrito: Dra. Ivette Rubio Gutiérrez, Dr. Salvador Romo García, Dra. Gabriela González-Mariscal, Dr. Agustín Orihuela Trujillo y Dr. Gerardo Perera Marín

Se reconoce el extraordinario apoyo técnico realizado por el M. en C. Marco Antonio Alarcón Zapata durante la primera etapa de la investigación (sincronización de los animales, ovariectomías y ultrasonidos).

Se reconocen todas las facilidades brindadas por el Dr. Manuel D. Corro Morales. (Director Técnico del CEIEGT durante la realización del proyecto) para el cumplimiento de la primera etapa de la investigación (préstamo de potreros, animales, alojamiento y comidas), además de la excelente ayuda profesional brindada durante las ovariectomías (bloqueos epidurales).

Se agradece infinitamente todo el apoyo profesional de la Dra. Ivette Rubio Gutiérrez durante la primera etapa del proyecto (ultrasonidos, logística de los experimentos, apoyo económico), pero sobre todo por la profunda dedicación mostrada en su área de conocimiento y el gran respeto que demuestra hacia los animales.

Se reconoce la excelente asistencia profesional de la M. en C. Ana Delia Rodríguez Cortez durante la medición de las hormonas esteroides mediante la técnica de ELISA.

Se agradece el efectivo y oportuno servicio profesional de la Dra. Clara Murcia Mejía durante la determinación de los niveles hormonales mediante la técnica de RIA.

A todos mis amigos y compañeros: se agradecen los ratos de ocio y buenos momentos. Especialmente a caballeros como Flavio Bautista González y Antonio Fitz Aranda, sin olvidar la delicadeza de damas como Aurora Xolalpa Aroche.

## RESUMEN

El objetivo del estudio consistió en determinar si la sincronización secuencial de hembras *Bos indicus* induce la expresión del estro sin un folículo dominante estrogénicamente activo. Para ello, 3 grupos ( $n = 6$ ) de hembras multíparas y con actividad cíclica fueron sincronizadas con 24 h de diferencia mediante un dispositivo intravaginal CIDR que permaneció *in situ* durante 9 días. Al retiro del CIDR se aplicó una dosis luteolítica de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (25 mg/animal) y 24 h después las hembras se observaron durante 96 h para determinar el inicio del estro. También se obtuvieron cada 4 h, entre las 8:00 y las 20:00 horas, muestras de sangre para determinar el perfil de progesterona por medio de RIA y se midió el crecimiento folicular mediante ultrasonografía transrectal. Las hembras se ovariectomizaron después de 6 h de iniciado el estro. A partir de los folículos obtenidos se cuantificó la concentración intrafolicular de esteroides por medio de ELISA y se determinó la expresión de las enzimas esteroidogénicas (P450scc y P450arom) mediante la técnica de inmunofluorescencia. A partir de los horarios de ovariectomía, las hembras se distribuyeron en los siguientes grupos: 24 ( $n = 5$ ), 48 ( $n = 6$ ) y 72 h post-CIDR ( $n = 4$ ). De las 18 hembras, únicamente 10 expresaron estro. De las hembras no detectadas, 5 se incluyeron dentro de los grupos debido a que participaron en grupos sexualmente activos e interrumpieron su conducta de monta como resultado de la ovariectomía de sus compañeras, mientras que las 3 restantes fueron retiradas del experimento debido a lesiones. La concentración de progesterona sérica fue similar entre los grupos al inicio del estro y al momento de la cirugía. Todas las hembras presentaron un folículo dominante  $>10$  mm de diámetro, que inició con un tamaño similar entre los grupos y finalizó con un diámetro mayor para el grupo de 72 h post-CIDR ( $p < 0.05$ ). Asimismo, el crecimiento total fue mayor para el grupo de 72 h post-CIDR ( $p < 0.001$ ), al igual que el porcentaje de crecimiento con respecto al tamaño inicial ( $p < 0.05$ ). Finalmente, las hembras de 72 h post-CIDR presentaron la concentración más alta de estradiol ( $p < 0.01$ ). Mientras que testosterona y progesterona fueron similares en los 3 grupos. Las hembras de 72 h post-CIDR presentaron la mayor expresión de P450scc en las células de la granulosa y de la teca interna ( $p < 0.05$ ), al igual que en las células de la granulosa para P450arom ( $p < 0.01$ ). En conclusión, todas las hembras detectadas y no detectadas en estro presentan un folículo dominante  $>10$  mm de diámetro, capaz de ovular y que es estrogénicamente activo, debido a que produce cantidades elevadas de estradiol y expresa las proteínas de las enzimas esteroidogénicas. El tratamiento de sincronización produce una respuesta variada, a pesar de que todas las hembras presentan niveles de progesterona sérica que indican actividad ovárica. Por consiguiente, otros factores además de la presencia de un folículo dominante y la producción de hormonas esteroides determinan la expresión del estro en las hembras *B. indicus* sincronizadas.

*Palabras clave:* *Bos indicus*, sincronización del estro, folículo dominante, esteroidogénesis, estradiol, células de la granulosa, teca interna, P450scc y P450arom

## ABSTRACT

To determine if estrous synchronization induces sexual behavior without the presence of an estrogenically active dominant follicle (>10 mm diameter), 3 groups ( $n = 6$ ) of adult and sexually active *Bos indicus* cattle were used in a sequential synchronization scheme. All groups were treated with exogenous progesterone via an intravaginal controlled internal drug-release device (CIDR) during 9 days. At the moment of implant withdrawal, a 25 mg/animal injection of PGF<sub>2</sub> $\alpha$  was applied to promote CL regression. At 24 h of CIDR removal, the cows were observed continually for 96 hours in order to detect estrous onset. In the same period, blood samples were taken every 4 h from 8:00 am to 20:00 pm by coccygeal venipuncture to determine concentrations of progesterone using RIA, and follicular development was monitored by transrectal ultrasonography. Six hours after estrous detection, cattle were ovariectomized and the dominant follicle dissected from the ovary. Follicular fluid was aspirated from the follicle and analyzed by ELISA to determine steroid hormones concentrations. Additionally, steroidogenic enzymes P450scc and P450arom expression was assessed by immunofluorescence. Females were assigned to one of three groups, according to surgery schedule: 24 ( $n = 5$ ), 48 ( $n = 6$ ) and 72 h post-CIDR ( $n = 4$ ). Ten out of 18 cows expressed estrous with significant differences in estrous onset between groups ( $p < 0.001$ ). Five out of 8 non-detected cows were ovariectomized and included in one group since these females formed sexually active groups but had an interruption of their activity by the ovariectomy of their mounting partners. The rest of non-detected cows were excluded from the experiment due to lesions. Serum progesterone concentrations were similar between groups, both at the estrous onset and ovariectomy. All the females in the groups showed a >10 mm diameter dominant follicle, which initialized its growth with similar size among groups, but ended up with a larger diameter in the females ovariectomized at 72 h post-CIDR ( $p < 0.05$ ). Also, total growth and growth percentage were larger for 72 h post-CIDR group ( $p < 0.05$ ). Finally, females in the 72 h post-CIDR group exhibited greater intrafollicular estradiol concentration ( $p < 0.01$ ). Meanwhile, both testosterone and progesterone were similar between the three groups. Protein expression for P450scc was greater in females of 72 h post-CIDR group in granulosa cells and theca interna ( $p < 0.05$ ), as well as levels of expression for P450arom in granulosa cells ( $p < 0.01$ ). In summary, all the animals (both detected in estrous and non-detected) exhibited at the moment of sexual behavior a >10 mm diameter dominant follicle, which was estrogenically active, since it produces high estradiol concentrations and expressed proteins for steroidogenic enzymes. In addition, synchronization treatment produced a wide response among the animals, even when blood progesterone levels showed ovarian cyclic activity. Therefore, other factors besides the presence of a dominant follicle and its steroid hormone production are needed to induce estrous expression in synchronized *B. indicus* cattle.

*Keywords:* *Bos indicus*, estrous synchronization, dominant follicle, steroidogenesis, estradiol, granulosa cells, theca interna, P450scc and P450arom.

## CONTENIDO

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. HIPÓTESIS.....</b>	<b>3</b>
<b>III. OBJETIVOS .....</b>	<b>3</b>
<b>IV. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
<b>A. Factores que Afectan a los Programas Reproductivos.....</b>	<b>4</b>
<b>B. Ciclicidad Reproductiva .....</b>	<b>5</b>
1. <i>Sincronización del estro.....</i>	<i>6</i>
2. <i>Detección del estro: efecto de la conducta sexual y factores sociales.....</i>	<i>9</i>
<b>C. Crecimiento Folicular .....</b>	<b>12</b>
1. <i>Características del crecimiento folicular en ganado de clima tropical.....</i>	<i>13</i>
<b>D. Esteroidogénesis.....</b>	<b>15</b>
1. <i>Análisis de la actividad esteroidogénica de los folículos como herramienta de estudio... </i>	<i>16</i>
<b>V. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
<b>A. Obtención de Muestras Biológicas y Dinámica Folicular .....</b>	<b>20</b>
1. <i>Localización .....</i>	<i>20</i>
2. <i>Animales.....</i>	<i>20</i>
3. <i>Sincronización y Detección del Estro .....</i>	<i>21</i>
4. <i>Grupos de Hembras Ovariectomizadas .....</i>	<i>22</i>
5. <i>Desarrollo Folicular: Características del Folículo Dominante.....</i>	<i>24</i>
6. <i>Perfil de P4 en Suero.....</i>	<i>25</i>
7. <i>Ovariectomía, Disección de los Folículos y Recolección del Líquido Folicular .....</i>	<i>25</i>
<b>B. Análisis de la Actividad Esteroidogénica de los Folículos Dominantes</b>	<b>28</b>
1. <i>Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas para Hormonas Esteroides .....</i>	<i>28</i>
2. <i>Inmunofluorescencia.....</i>	<i>29</i>
a) <i>Sistema de adquisición de imágenes digitales de fluorescencia .....</i>	<i>31</i>
b) <i>Análisis de imágenes de fluorescencia.....</i>	<i>32</i>
<b>C. Análisis de Datos.....</b>	<b>34</b>

<b>VI. RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
<b>A. Primera Parte .....</b>	<b>35</b>
1. <i>Grupos de Hembras Ovariectomizadas y Perfil de P4 en Suero.....</i>	<i>35</i>
<b>B. Segunda Parte .....</b>	<b>38</b>
1. <i>Características del Folículo Dominante: Dinámica de Crecimiento.....</i>	<i>38</i>
<b>C. Tercera Parte .....</b>	<b>45</b>
1. <i>Capacidad Esteroidogénica del Folículo Dominante.....</i>	<i>45</i>
a) <i>Producción de Hormonas Esteroides en Líquido Folicular.....</i>	<i>45</i>
b) <i>Expresión de P450scc en Pared Folicular .....</i>	<i>47</i>
c) <i>Expresión de P450arom en Células de la Granulosa.....</i>	<i>48</i>
<b>VII. DISCUSIÓN .....</b>	<b>53</b>
<b>A. Factores que Afectan la Expresión del Estro en Bos indicus .....</b>	<b>53</b>
<b>B. Las Hembras Sincronizadas Presentan Patrones Característicos de Crecimiento Folicular .....</b>	<b>59</b>
<b>C. Actividad Esteroidogénica Folicular .....</b>	<b>62</b>
1. <i>Producción de Hormonas Esteroides.....</i>	<i>62</i>
2. <i>Expresión de Enzimas Esteroidogénicas.....</i>	<i>66</i>
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>70</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>72</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama de la síntesis de los principales progestágenos, andrógenos y estrógenos.....	17
<b>Figura 2.</b> Protocolo experimental para inducir la sincronización del estro y su expresión en secuencia.....	23
<b>Figura 3.</b> Formación de los grupos de hembras ovariectomizadas.....	27
<b>Figura 4.</b> Inicio del estro y cirugía de las hembras dentro de los grupos de ovariectomía.....	36
<b>Figura 5.</b> Perfil de P <sub>4</sub> en suero de las hembras ovariectomizadas.....	37
<b>Figura 6.</b> Población de folículos presentes al momento de la ovariectomía.....	40
<b>Figura 7.</b> Patrón de crecimiento del folículo dominante.....	41
<b>Figura 8.</b> Diámetro inicial y final del folículo dominante.....	42
<b>Figura 9.</b> Características de crecimiento del folículo dominante.....	43
<b>Figura 10.</b> Análisis de regresión lineal para el crecimiento del folículo dominante con respecto al tiempo.....	44
<b>Figura 11.</b> Concentración de hormonas esteroides en muestras de líquido folicular.....	46
<b>Figura 12.</b> Localización de la expresión de P450scc por inmunofluorescencia en folículos dominantes.....	49
<b>Figura 13.</b> Curvas de distribución de la intensidad de fluorescencia para P450scc y P450arom en células de la pared folicular.....	50
<b>Figura 14.</b> Fluorescencia relativa para P450scc y P450arom en células de la pared folicular.....	51
<b>Figura 15.</b> Localización de la expresión de P450arom por inmunofluorescencia en reconstrucciones de folículos dominantes.....	52

## I. INTRODUCCIÓN

El uso de las tecnologías reproductivas representa una alternativa para lograr una mayor producción de benefactores de origen bovino. Sin embargo, múltiples factores, entre los que destaca una baja eficiencia reproductiva, han limitado la producción del ganado bovino dentro de las zonas con clima tropical (Román 1981). En este tipo de regiones climáticas, caracterizadas por índices pluviométricos elevados y temperaturas altas, la mayoría de los animales producidos pertenecen a la especie *Bos indicus* debido a que presentan una gran adaptabilidad a las condiciones climáticas del trópico (Baruselli et al. 2004). Asimismo, se reconocen diferencias importantes entre esta especie y *Bos taurus*, particularmente en lo referente al tamaño máximo del folículo dominante y del cuerpo lúteo, la duración del estro, entre otros (Bo et al. 2003).

En lo correspondiente al trópico mexicano, las dos principales herramientas reproductivas son la inseminación artificial y en menor grado la transferencia de embriones. No obstante, su aplicación se ha enfrentado a diversas dificultades, de las cuales una inadecuada detección del estro representa el principal problema (Galina y Orihuela 2007). Por consiguiente, el uso de diferentes métodos de sincronización del estro ha surgido como una alternativa para mejorar las tasas de detección (Odde 1990). A pesar de lo anterior existe variabilidad en la respuesta al programa de sincronización y se requiere una cantidad considerable de tiempo para realizar la detección precisa del estro (Bo et al. 2003).

En consecuencia, el incremento en los porcentajes de expresión del estro obtenido mediante la aplicación de tratamientos sincronizadores no ha logrado aumentar concomitantemente la fertilidad de los animales tratados. Por ejemplo, la sincronización secuencial del estro en *B. indicus* provoca que algunas hembras sin la presencia de folículos dominantes >10 mm de diámetro capaces de ovular, expresen estro en conjunto con hembras que sí muestran un folículo dominante al momento de la conducta sexual (Medrano et al. 1996; Cortes et al. 1999; Maquivar et al. 2002). Además, también se ha demostrado que otras hembras *B. indicus* sincronizadas son incapaces de expresar estro y ovular, esto a pesar de que presentan un folículo preovulatorio (Isidro et al. 2005; Verduzco et al. 2006; Acevedo et al. 2007;

Maquivar et al. 2007). En ambos casos la fertilidad de estas hembras se compromete. Para responder a estas situaciones se ha sugerido que en el primer caso las vacas muestran una conducta de imitación (Orihuela et al. 1983; Gutierrez et al. 1993), incrementando con ello la expresión del estro sin que necesariamente aumente la tasa de ovulación y en el segundo caso, que el desarrollo folicular no se acompaña de una adecuada producción de estrógenos (Maquivar et al. 2002; Maquivar et al. 2007), los cuales desempeñan un papel fundamental en la regulación de los eventos endocrinos y conductuales asociados al ciclo estral de las hembras.

Por tal razón, el objetivo general del estudio consiste en determinar si la sincronización secuencial de hembras *B. indicus* induce la expresión del estro en hembras con folículos dominantes estrogénicamente activos.

## II. HIPÓTESIS

La sincronización en secuencia de las hembras *Bos indicus* induce la expresión del estro sin la presencia de un folículo dominante (>10 mm de diámetro) estrogénicamente activo.

## III. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo consistió en determinar si las hembras *B. indicus* con estro sincronizado presentan un folículo dominante esteroideogénicamente activo al momento de la expresión del estro. Para cumplir con tal meta se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar la dinámica folicular de las hembras *B. indicus* sincronizadas, con el propósito de realizar un seguimiento del crecimiento del folículo dominante.
2. Analizar, por medio de una prueba de ELISA, el contenido folicular de las hormonas esteroideas (E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> y T<sub>4</sub>) de los folículos dominantes.
3. Determinar por medio de inmunofluorescencia la expresión de las proteínas de P450<sub>scc</sub> y P450<sub>arom</sub> en células de la granulosa y de la teca interna obtenidas de los folículos dominantes, para evaluar los patrones de expresión de las enzimas esteroideogénicas.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### A. Factores que Afectan a los Programas Reproductivos

En la actualidad la inseminación artificial (IA) representa una de las principales tecnologías reproductivas que se aplican en los bovinos. Parte de su éxito se debe a que reduce la transmisión de enfermedades, además de que permite la selección genética y un incremento en la salud, longevidad y producción de las vacas (Dransfield et al. 1998). Por tales motivos, esta tecnología es una de las mejores vías para la rápida dispersión de genes de alto valor productivo y económico dentro de los sistemas de producción, incrementando con ello la calidad genética de los hatos alrededor del mundo. Lo anterior debido a que la técnica es un método simple, exitoso y económico para fijar genes seleccionados dentro de las poblaciones productivas, en comparación a la transferencia de embriones (TE) ó la monta natural (Vishwanath 2003).

Por su parte, la TE representa una herramienta fundamental para eliminar el límite en el progreso genético que impone la baja tasa reproductiva de las hembras y los largos intervalos generacionales (Seidel 1981). Esta reducción en el tiempo generacional es quizá la principal ventaja sobre la IA, ya que así se logra aumentar el potencial genético de los animales seleccionados en períodos de tiempo considerablemente inferiores. Por tal razón, en el trópico de México se ha impulsado la implementación de programas de TE. Sin embargo, los resultados han sido muy diversos, especialmente cuando se compara la información generada con los resultados obtenidos en hembras *B. taurus* mantenidas en climas templados (Kafi y McGowan 1997).

A pesar de las notables ventajas que supone el uso de la IA y la TE sobre el potencial genético y productivo dentro de los hatos del trópico mexicano, la implementación de dichas técnicas se encuentra afectada por las múltiples variables que inciden sobre su desempeño. Uno de los principales factores que influyen de forma negativa es la falta de información que existe sobre la biología reproductiva de *B. indicus*. Por lo tanto, resulta necesario mejorar y ampliar el conocimiento existente sobre el comportamiento reproductivo de este tipo de ganado.

Cunningham (1989) señala que de las tecnologías reproductivas, la correspondiente al área de embriones representa el mejor prospecto para desarrollarse en los países pobres. Por tal razón, para obtener éxito con la TE primero se deben eliminar los problemas operativos que han afectado la implementación de la IA, ya que de otra manera el uso generalizado será imposible, al menos en el corto plazo. Lo anterior es importante, ya que de acuerdo a las tendencias actuales en la ganadería de carne y leche dentro del trópico, se ha incrementado la demanda por las tecnologías reproductivas. Por tal motivo, este sector de la población ha obligado a los gobiernos locales a desarrollar proyectos para mejorar la calidad del ganado, introduciendo para ello razas especializadas, tanto en la producción de carne como en la de leche, por medio de la IA y la TE (Kristjason et al. 2002).

Dentro del trópico mexicano el uso de la IA y la TE ha sido frenado por dificultades técnicas, entre las que destacan: el programa de sincronización del estro, la inadecuada detección de los signos de estro, el empleo de semen de mala calidad, la variación en la respuesta a la superovulación y la pobre obtención de embriones con la calidad suficiente para ser trasplantados. En los siguientes párrafos se presentan de forma general algunos de los principales factores que afectan el desarrollo e implementación de las tecnologías reproductivas en el trópico.

## B. Ciclicidad Reproductiva

Para iniciar es necesario definir de forma general la actividad reproductiva que inicia cuando se alcanza la pubertad. En las hembras bovinas esto implica el inicio de una actividad cíclica en la cual ocurren ovulaciones de forma regular (Moran et al. 1989). Los eventos reproductivos que comienzan durante la fase del estro (también denominado celo o calor) y que finalizan con el subsecuente estro reciben el nombre de *ciclo estral*. La duración del ciclo estral bovino tiene una duración promedio de 21 días (intervalo de 17-24 días) y se produce de forma continua a lo largo del año, por lo que se clasifica a las hembras bovinas como poliéstricas continuas (Senger 2005).

El ciclo estral se divide en dos fases que se denominan de acuerdo a la estructura dominante presente en el ovario: 1) **fase folicular**, caracterizada por la presencia de un folículo dominante en crecimiento que secreta cantidades abundantes de estradiol ( $E_2$ ) y 2) **fase lútea**, que comprende hasta 80% de la duración total del ciclo y que presenta a un cuerpo lúteo (**CL**) que secreta progesterona ( $P_4$ ).

El ciclo estral se divide en las siguientes etapas: a) **proestro**, inicia con la lisis del CL y la consecuente disminución en los niveles de  $P_4$  ocasionados por la prostaglandina  $F2\alpha$  ( $PGF2\alpha$ ) secretada por el útero. Esta etapa de transición endocrina dura de dos a cinco días y parte de la producción de  $P_4$  hacia una elevada síntesis de estrógenos, principalmente  $E_2$ . Las gonadotropinas hormona folículo estimulante (FSH, por sus siglas en inglés) y la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés) son las causantes de dicha transición; b) **estro**, es la etapa de receptividad sexual, por tal motivo es fácilmente reconocible, ya que se presentan signos visuales característicos. La receptividad sexual ocurre de forma gradual, ya que al inicio la hembra únicamente muestra conducta sexual secundaria (mostrar interés, seguir, apoyo en grupa, oler, etc.), mientras que al final de la etapa la hembra permite las montas e intentos de monta por otras hembras y por el macho. Esta disposición para ser montada se denomina como “celo franco”; c) **metaestro**, inicia con la ovulación y la posterior formación del CL, durante este proceso se luteinizan las células que componen la pared folicular; células de la granulosa y células de la teca interna; y d) **diestro**, es la etapa de mayor funcionalidad del CL y la de mayor duración dentro del ciclo estral (10 a 14 días). La función de la  $P_4$  que produce el CL consiste en preparar a la hembra bovina para la gestación.

#### 1. *Sincronización del estro*

El principal objetivo de los sistemas de producción bovino es elevar los parámetros productivos y reproductivos del hato con la finalidad de incrementar las ganancias económicas y hacer redituable la actividad. Para cumplir lo anterior se deben implementar estrategias de manejo para reducir la variabilidad en los períodos de concepción y partos, principalmente cuando los animales se mantienen en

pastoreo (Cordoba y Fricke 2002). Por tal razón, la sincronización del ciclo estral bovino representa una alternativa para optimizar el desempeño reproductivo de este tipo de hatos, ya que facilita el uso de animales con mayor potencial genético, mediante la IA (Odde 1990c).

La sincronización del estro se logra mediante el control e inducción del ciclo estral. Su principal objetivo es lograr que la mayoría de hembras dentro de un grupo presente estro en un momento determinado, para inseminarlas después de la detección del estro ó eliminando este último paso y realizando la IA a tiempo fijo (Odde 1990b). Algunos de los beneficios de la sincronización de grupos grandes de hembras incluyen: a) la facilitación de la IA, ya que se reduce el período en que se realiza; b) un incremento del número de hembras que resultan gestantes en cada empadre; c) concentración de hembras en estro en un corto período, lo cual vuelve más precisa la detección del comportamiento sexual; d) reducción de los períodos de detección del estro y e) facilitación de la aplicación de las tecnologías reproductivas.

Para el control del ciclo estral en los bovinos se cuenta básicamente con métodos que funcionan de la siguiente manera: 1) provocando una regresión prematura del CL, con lo cual se acorta la duración del ciclo. Para ello se utilizan agentes luteolíticos como la  $PGF2\alpha$  o sus análogos sintéticos (Odde 1990a), 2) alargando la fase lútea con una simulación de la etapa de diestro a través de la aplicación exógena de progestágenos sintéticos o naturales (Macmillan y Peterson 1993b) y finalmente 3) sincronizando el desarrollo de la onda folicular mediante la aplicación de GnRH +  $PGF2\alpha$  (Bo et al. 2002b).

A pesar de los múltiples métodos existentes en la actualidad, la variabilidad en la respuesta de los animales hacia el tratamiento hormonal es uno de los problemas más frustrantes asociados a la sincronización del estro (Bo et al. 2002a). En este sentido, la precisión en la sincronización del estro no depende únicamente del tratamiento empleado sino de la variación en la duración del proestro y del estado de desarrollo del folículo dominante al momento del inicio de la sincronización (Kastelic y Ginther 1991). Consecuentemente, el retraso en la expresión del estro se debe al alargamiento del período requerido para que finalice

la maduración folicular. Por ejemplo, algunas revisiones de literatura confirman la existencia de variabilidad en los porcentajes de detección del estro (40 al 70%) cuando se utiliza PGF2 $\alpha$  como método de sincronización (Bo et al. 2003d; Porras y Galina 1991; Galina y Arthur 1990). En el caso particular de las prostaglandinas se sabe que la expresión del estro no depende únicamente de la respuesta del CL al tratamiento, ya que se ha publicado que del total de hembras que presentan regresión del CL, únicamente el 60% son detectadas en estro (Moreno et al. 1986). Este dato implica que se pierde hasta un 40% de los estros. Sin embargo, es necesario preguntar si la ausencia de actividad sexual se asocia a una deficiencia en la detección del estro, como comúnmente se sugiere que ocurre cuando se sincroniza con PGF2 $\alpha$  (Watts y Fuquay 1985) ó si las causas son fisiológicas.

Por otro lado, la creciente disponibilidad comercial de los dispositivos intravaginales de liberación controlada de P<sub>4</sub> (comúnmente denominado **CIDR** por sus siglas en inglés) ha incrementado su utilización como método de sincronización. El dispositivo de silicón se encuentra impregnado con 1.9 g de P<sub>4</sub> micronizada de origen natural que se libera de forma gradual y lenta hacia la circulación sanguínea del animal, ejerciendo con ello una fuerte inhibición del estro y de la ovulación (Rathbone et al. 2002). Así, con el retiro del dispositivo y la concomitante disminución en la concentración de P<sub>4</sub> en suero, se promueve la sincronización del estro en las hembras (Macmillan y Peterson 1993a). Sin embargo, el uso del CIDR como método de sincronización se ha enfrentado al mismo problema que otros tratamientos; produce una excelente sincronización, pero con una reducida fertilidad. De igual forma, los protocolos de sincronización que utilizan progestágenos con una combinación de estrógenos y PGF2 $\alpha$  han seguido la misma suerte (Xu y Burton 1999; Odde 1990d).

Una de la principales razones que se han propuesto para responder por la baja fertilidad observada se relaciona con el desarrollo de **foliculos dominantes con crecimiento prolongado** (Mihm et al. 1994; Stock y Fortune 1993; Sirois y Fortune 1990). Estos foliculos se originan debido a que los métodos de sincronización inducen concentraciones sub-luteales de P<sub>4</sub> que provocan un

crecimiento persistente, inhibiendo con ello el surgimiento de nuevas ondas foliculares y consecuente desarrollo de un ovocito viejo, el cual al ser fertilizados produce un embrión de pobre calidad (Revah y Butler 1996; Smith y Stevenson 1995). Para evitar lo anterior es recomendable mantener concentraciones plasmáticas elevadas de P<sub>4</sub>, por lo menos iguales a la fase lútea, durante el tratamiento. En conjunto estos resultados sugieren que para lograr un programa de sincronización exitoso se deben de sincronizar el desarrollo folicular, la expresión del estro y la ovulación (Xu y Burton 2000). Lo anterior para asegurar que todas las hembras tengan un folículo en crecimiento con capacidad de ovular un ovocito viable después del tratamiento.

## 2. *Detección del estro: efecto de la conducta sexual y factores sociales*

Es bien sabido que la detección del estro es uno de los principales factores que afecta la implementación exitosa de la IA y la TE en ganado bovino mantenido en el trópico (Galina y Orihuela 2007b). De igual forma en las producciones lecheras de Norteamérica se estiman cuantiosas pérdidas anuales, únicamente ocasionadas por la falla en la detección del estro, evento que ha influenciado negativamente el impacto económico y productivo que provee la IA (Senger 1994). Por lo tanto, los esfuerzos encaminados a incrementar la eficiencia y precisión de la detección del estro serán bien recibidos por parte de los productores.

Parte de la baja fertilidad que se registra en los hatos lecheros se debe a una deficiente detección del estro (Reimers et al. 1985), actividad que depende en gran medida de las prácticas de manejo, de las cuales una correcta identificación de los signos de estro es la principal. Por su parte, el comportamiento de monta representa la conducta sexual más confiable para determinar que una hembra se encuentra en estro, además de que se utiliza como referencia para determinar el tiempo óptimo para realizar la IA y así obtener altos porcentajes de gestación (Nebel et al. 2000; Walker et al. 1996; Baker y Seidel, Jr. 1985). Sin embargo, en ganado lechero únicamente se logra detectar por este criterio a menos del 50% del total de hembras en estro (Van Eerdenburg et al. 2002a; Lyimo et al. 2000a; van Vliet y Van Eerdenburg 1996).

Con respecto a *B. indicus*, dos recientes revisiones de literatura discuten los esfuerzos realizados hasta la fecha para conocer, por una parte los factores que afectan y limitan la detección del estro (Galina y Orihuela 2007a), y por otra parte los avances en el estudio de la dinámica folicular y su manipulación para lograr programas reproductivos exitosos (Bo et al. 2003c). Los primeros autores concluyen que las características sociales y conductuales de *B. indicus* influyen en la respuesta a los tratamientos de sincronización, mientras que los últimos autores sugieren que para disminuir los problemas en la detección del estro es necesario implementar técnicas que controlen el desarrollo folicular para aplicar IA a tiempo fijo y eliminar con ello la necesidad de la detección del celo.

Es cierto que a pesar del esfuerzo realizado todavía se desconocen en su mayoría las causas precisas que originan las diferencias reproductivas y conductuales entre *B. indicus* y *B. taurus*. Diferencias que de acuerdo a Bo et al. (2003b) residen en: 1) un menor período de expresión del estro; 2) un menor tiempo para alcanzar el pico preovulatorio de LH; 3) mayor dificultad para detectar estro, debido principalmente a estructuras sociales complejas, conducta agresiva, menor disponibilidad para ser montadas y expresión de señales de estro durante la noche; 4) un menor tamaño del folículo dominante y del CL; 5) amplia respuesta a los programas de sincronización.

Un rasgo característico de los programas de sincronización utilizados en ganado *B. indicus* es el elevado porcentaje de animales que llegan a presentar estro después del tratamiento, seguido de bajas tasas de fertilidad. La existencia de trabajos que utilizan diversos métodos de sincronización, en donde obtienen hasta 90% de sincronización pero únicamente del 30 al 60% de animales gestantes (Rekwot et al. 1999; Tegegne et al. 1989), respaldan esta idea. Por tal motivo, desde hace algún tiempo nuestro grupo de trabajo ha realizado una serie de estudios con la intención de responder la pregunta de ¿porqué la elevada respuesta a la sincronización del estro en hembras *B. indicus* no se refleja en buenos índices de fertilidad? El modelo que hemos utilizado es la sincronización secuencial de las hembras para así programar la expresión del estro en forma escalonada (Medrano et

al. 1996). Mediante este método de sincronización es posible por un lado, disminuir el riesgo de que las hembras sincronizadas presenten la conducta de imitación previamente descrita en esta especie (Gutierrez et al. 1993; Orihuela et al. 1983b) y por el otro, determinar y diferenciar las características conductuales, hormonales y del crecimiento folicular que ocurren entre las hembras que expresan conducta sexual cuando se encuentran en celo franco y aquellas que únicamente imitan el comportamiento.

Los resultados obtenidos hasta la fecha han aportado evidencia en varios sentidos. Ya que por ejemplo se ha determinado que cuando se sincronizan hembras en pequeños números, estas tienden a expresar estros agrupados (Fetter et al. 2006; Cortes et al. 1999) e independientemente de la presencia de un folículo dominante capaz de ovular (Verduzco et al. 2006; Maquivar et al. 2002b). También se ha determinado la existencia de hembras que presentan conducta sexual con folículos dominantes que no ovulan (Acevedo et al. 2007; Maquivar et al. 2007c). En todos los casos descritos la fertilidad se afecta de forma directa, por tal motivo es necesario investigar los cambios endocrinos que ocurren en los folículos que determinan la conducta sexual de estas hembras.

Con respecto a las hembras *B. indicus* se ha demostrado que presentan una baja tendencia para permitir ser montadas en períodos cortos de tiempo (Orihuela et al. 1983a) y por miembros de otras razas (Galina et al. 1982). Además, generalmente estas hembras se crían en condiciones de pastoreo, razón por la cual los animales se encuentran dispersos y con pocas probabilidades para interactuar con otras hembras, factores que dificultan la frecuente observación de los animales y su precisa determinación del estro (Hardin et al. 1980). Por otra parte, los rasgos de comportamiento (Solano et al. 2005; Solano et al. 2000) y de estructura social (Solano et al. 2004; Gutierrez et al. 1993), característicos de este tipo de ganado dificultan aún más la tarea. Por ejemplo, se ha encontrado que las hembras de mayor jerarquía social dentro de un grupo realizan más de la mitad de las montas durante el período de receptividad sexual (Orihuela et al. 1988), además de que estas mismas hembras presentan menos disposición para ser montadas (Castellanos et al. 1997).

La composición y tamaño del grupo es otro factor importante que influencia la respuesta al tratamiento de sincronización, ya que el número de hembras que se encuentran en estro al mismo tiempo afectan la frecuencia de las montas y a su vez la duración del estro (Galina et al. 1996). En los animales sincronizados la formación de los grupos sexualmente activos (**GSA**), caracterizados por la participación de hembras con conducta de monta, resulta un evento común (Williamson et al. 1972). Además, es bien sabido que la actividad sexual se incrementa conforme aumenta el número de hembras en estro (Hurnik et al. 1975), posiblemente como un efecto de la facilitación social y la estimulación sexual.

### **C.** Crecimiento Folicular

La **foliculogénesis** se define como el proceso por el cual se forman los folículos de Graff o preovulatorios a partir de un conjunto de folículos primordiales (Spicer y Echterkamp 1986). Dicho proceso se inicia durante la vida fetal del animal en la cual se produce la reserva total de folículos primordiales (Erickson 1966), algunos de los cuales llegarán a transformarse en folículos preovulatorios, mientras que el resto (>99%) sufrirán atresia (Ireland 1987).

Desde el punto de vista hormonal, el proceso del desarrollo folicular comprende dos etapas (Driancourt 1991): *a) etapa basal*, que se realiza en ausencia de gonadotropinas y comienza con el desarrollo de los folículos primordiales poco después del nacimiento hasta convertirse en folículos primarios (Fortune 2003). Durante esta etapa reinicia la proliferación de las células de la granulosa, las cuales cambian de forma aplanada a cuboidal (Braw-Tal y Yossefi 1997) y *b) etapa tónica*, en donde la continuidad del crecimiento de los folículos es dependiente del aporte de gonadotropinas, especialmente FSH (Fortune et al. 1991). Durante esta etapa sucede una serie de eventos que dan origen al folículo que posteriormente ovulará.

Las etapas que tienen lugar durante la foliculogénesis fueron definidas por Hodgen (1982a) e incluyen: 1) **reclutamiento**, es el crecimiento de una onda folicular, compuesta de tres a seis folículos de entre 4 y 5 mm de diámetro (Fortune et al. 2001b), cuyo estímulo principal es un aumento en la FSH circulante (Fortune 1994); 2) **selección**, proceso por el cual uno de los folículos de la oleada folicular

evita la atresia y continúa con su desarrollo hasta volverse competente para llegar a ovular (Hodgen 1982b) y 3) **dominancia**, etapa en la que el folículo seleccionado continúa su crecimiento y diferenciación, mientras que los folículos subordinados sufren regresión (Fortune et al. 2001a).

El proceso de crecimiento y regresión de los folículos antrales que conduce al desarrollo de un folículo preovulatorio se conoce como **dinámica folicular** (Lucy et al. 1992). Diversos grupos de investigación determinaron, por medio de ultrasonografía transrectal, que en el ciclo estral de la vaca se pueden presentar de una a cuatro ondas de crecimiento folicular (Sirois y Fortune 1988; Savio et al. 1988a). De forma característica, los folículos dominantes que se desarrollan durante la fase lútea sufren regresión, mientras que el folículo dominante que crece durante la última oleada folicular, la cual coincide con la regresión del CL, ovulará (Ginther et al. 1989b). En hembras adultas con dos o tres ondas foliculares, la primera de ellas generalmente inicia 2 días después del estro. En las hembras con tres oleadas, la segunda y tercera oleada se detecta alrededor del día 9 y 16, respectivamente. Mientras que en aquellas con dos oleadas la segunda onda inicia alrededor del día 12 (Knopf et al. 1989; Ginther et al. 1989a). Así, los ciclos estrales son más largos en hembras con tres oleadas que las de dos (Savio et al. 1990; Savio et al. 1988b).

#### 1. *Características del crecimiento folicular en ganado de clima tropical*

Hasta la fecha se han realizado diversos estudios para determinar las características de la dinámica folicular en *B. indicus* (Figueiredo et al. 1997; Zeitoun et al. 1996; Rhodes et al. 1995; Bo et al. 1993). En general los estudios coinciden en que el patrón de crecimiento folicular es similar al observado en *B. taurus*, aunque con la existencia de diferencias en el tamaño del CL y del folículo dominante (Bo et al. 2003a). Diferencias que resultan importantes tanto en la dificultad técnica para palpar dichas estructuras, así como en su producción de hormonas. Además en *B. indicus* también se registra una mayor incidencia de intervalos interovulatorios de cuatro ondas foliculares (Bo et al. 2003e) y una mayor proporción de poblaciones de folículos de <5 mm de diámetro (Segerson et al. 1984).

A partir del modelo de sincronización secuencial en hembras *B. indicus* hemos encontrado resultados interesantes con respecto a la relación que guardan el desarrollo folicular, la expresión de conducta sexual y la ovulación. Por ejemplo, Maquivar et al. (2002a) determinan que en algunas hembras examinadas mediante ultrasonografía no existe una correlación entre la expresión de la conducta sexual y el diámetro del folículo de mayor tamaño presente al momento del estro. Observación que concuerda con los resultados de Verduzco et al. (2006) que demuestran que algunas hembras ovulan sin presentar conducta sexual. Mientras que otras aún con la presencia de un folículo >10 mm fallan en la expresión del estro y en la ovulación (Maquivar et al. 2007b).

En un estudio reciente Maquivar et al. (2007a) presentan la existencia de una gran variabilidad en los patrones de crecimiento folicular entre hembras que ovulan y aquellas incapaces de ovular. Resultados similares se encontraron entre la duración del estro y la hora de ovulación (Forster et al. 2007). Tendencias que también han sido documentadas en ganado lechero por Van Eerdenburg et al. (2002b), los cuales no detectan una correlación directa entre el tamaño folicular, el momento de ovulación y el comportamiento sexual. Desafortunadamente los estudios anteriores no determinan las características endocrinas de las hembras o los folículos para poder respaldar los resultados de Lyimo et al. (2000b) que encuentran una estrecha relación entre la conducta sexual y el pico de la concentración de E<sub>2</sub> al momento de la expresión del estro. Por tal razón, para tener una visión más detallada de la relación entre la respuesta a un programa de sincronización y el desarrollo folicular es necesaria una herramienta de estudio que nos permita precisar los cambios endocrinos que ocurren en los folículos en crecimiento, los cuales posiblemente ocasionan la conducta sexual de la mayoría de las hembras sincronizadas. Así, la determinación de la actividad esteroideogénica que se realiza en los folículos dominantes de las hembras nos puede ofrecer una alternativa viable para el estudio de los eventos fisiológicos que determinan los eventos reproductivos en las hembras *B. indicus* sincronizadas.

#### D. Esteroidogénesis

Las hormonas esteroides se sintetizan principalmente en las gónadas, la placenta y en la glándula adrenal. Lugares donde cumplen diversas funciones fisiológicas entre las que se incluyen el mantenimiento de los tejidos reproductivos y la coordinación de los eventos reproductivos (Browne et al. 2006b). Dentro del ovario bovino los folículos antrales, que se encuentran anatómicamente y funcionalmente compartimentalizados, responden a la estimulación gonadotrópica con la respectiva síntesis de productos esteroidales. En este sentido los folículos dominantes se caracterizan por su actividad esteroidogénica, la cual produce elevadas cantidades de hormonas esteroides, principalmente E<sub>2</sub> (Fortune et al. 2001c). Dentro de los folículos la esteroidogénesis se realiza en las células de la granulosa y de la teca interna que componen la pared folicular y es llevada a cabo por la actividad enzimática de diferentes proteínas pertenecientes al citocromo P450 (Miller 1988).

Los citocromos P450 (CYP ó P450) son enzimas esenciales para el metabolismo del colesterol y las hormonas esteroides, actividad que se realiza en la membrana interna de la mitocondria de los órganos esteroidogénicos (Omura 2006a). P450 constituye una superfamilia de más de 5500 enzimas distribuidas a través del reino animal y que se han agrupado en familias y subfamilias con base en la identidad de su secuencia de aminoácidos (Pikuleva 2006). Esta división ha originado las familias que incluyen a los grupos: CYP1A, CYP2A, CYP4A14, CYP11A, CYP17A1, CYP19 y CYP27A, entre otros (Miller 1988).

Las enzimas P450 desempeñan un papel fundamental en la biosíntesis de las hormonas esteroides a partir del colesterol. El primer paso, que es además tasa-limitante dentro de la secuencia de esteroidogénesis, es la división de la cadena lateral del colesterol catalizada por la enzima CYP11A (*P450<sub>scc</sub>*) que produce pregnenolona (*P<sub>5</sub>*) y que continúa con la actividad de otras enzimas P450 microsomiales del retículo endoplasmático (familias 17A y 19A), además de las deshidrogenasas (*3β-Hidroxiesteroide Deshidrogenasa* y *17β-HSD*) (Omura 2006b). La actividad de P450<sub>scc</sub> en la mitocondria depende a su vez del aporte de colesterol desde el citoplasma hacia la membrana interna de la mitocondria, función

regulada por la proteína **StAR** (steroidogenic acute regulatory protein) que facilita la transferencia de colesterol hacia P450<sub>scc</sub>, estimulando con ello la producción de P<sub>5</sub> (Christenson y Strauss 2000). Por otra parte, CYP17A1 (**P450c17**) es importante en la conversión de P<sub>5</sub> y P<sub>4</sub> a los andrógenos dihidroepiandrosterona (**DHEA**) y androstenediona (**A<sub>4</sub>**). En dicho proceso la enzima cataliza ambas reacciones; la 17- $\alpha$ -hidroxilación, así como la reacción 17,20-liasas, mientras que la actividad de 3 $\beta$ -Hidroesteroide Deshidrogenasa es crucial para la transformación de P<sub>5</sub> en P<sub>4</sub> y en conjunto con 17 $\beta$ -HSD, para la producción de los andrógenos A<sub>4</sub>, androstenediol (**A<sub>5</sub>**) y testosterona (**T<sub>4</sub>**). Los andrógenos así producidos presentan actividad biológica, pero también sirven como sustratos para la síntesis de los estrógenos E<sub>2</sub> y estrona (**E<sub>1</sub>**) por parte de CYP19 (**P450arom**) (Corbin et al. 1999). En la Figura 1 se presenta de forma esquemática el proceso general de esteroidogénesis.

1. *Análisis de la actividad esteroidogénica de los folículos como herramienta de estudio*

A partir de la vasta cantidad de estudios realizados por el grupo de la Dra. J. Fortune de la Universidad de Cornell de los Estados Unidos de América (EUA), se ha documentado con gran detalle la regulación y características de la esteroidogénesis de los folículos preovulatorios bovinos. De forma general sus estudios han comprobado que las funciones endocrinas necesarias para la síntesis de E<sub>2</sub>, que requiere una producción de andrógenos y su posterior aromatización a estrógenos, se localizan en el tejido esteroidogénico del folículo dominante. Así tenemos a las células de la teca interna aportando andrógenos para su aromatización a E<sub>2</sub> en las células de la granulosa (Fortune y Quirk 1988), ya que éstas últimas son incapaces de sintetizar andrógenos debido a que este proceso ocurre casi de forma exclusiva en la teca interna (Erickson et al. 1985). A pesar de esta limitante, Fortune (1986a) demostró que las células de la granulosa favorecen la producción de andrógenos en la teca interna al proveer precursores progestágenos. En este sentido ahora sabemos que en el bovino la producción de andrógenos se realiza por la vía  $\Delta^5$  a partir de P<sub>5</sub> hasta A<sub>4</sub>, a diferencia de los folículos preovulatorios de la rata que utilizan P<sub>4</sub> como principal precursor para la producción de andrógenos, además de que utilizan la vía  $\Delta^4$  (Fortune 1986b).

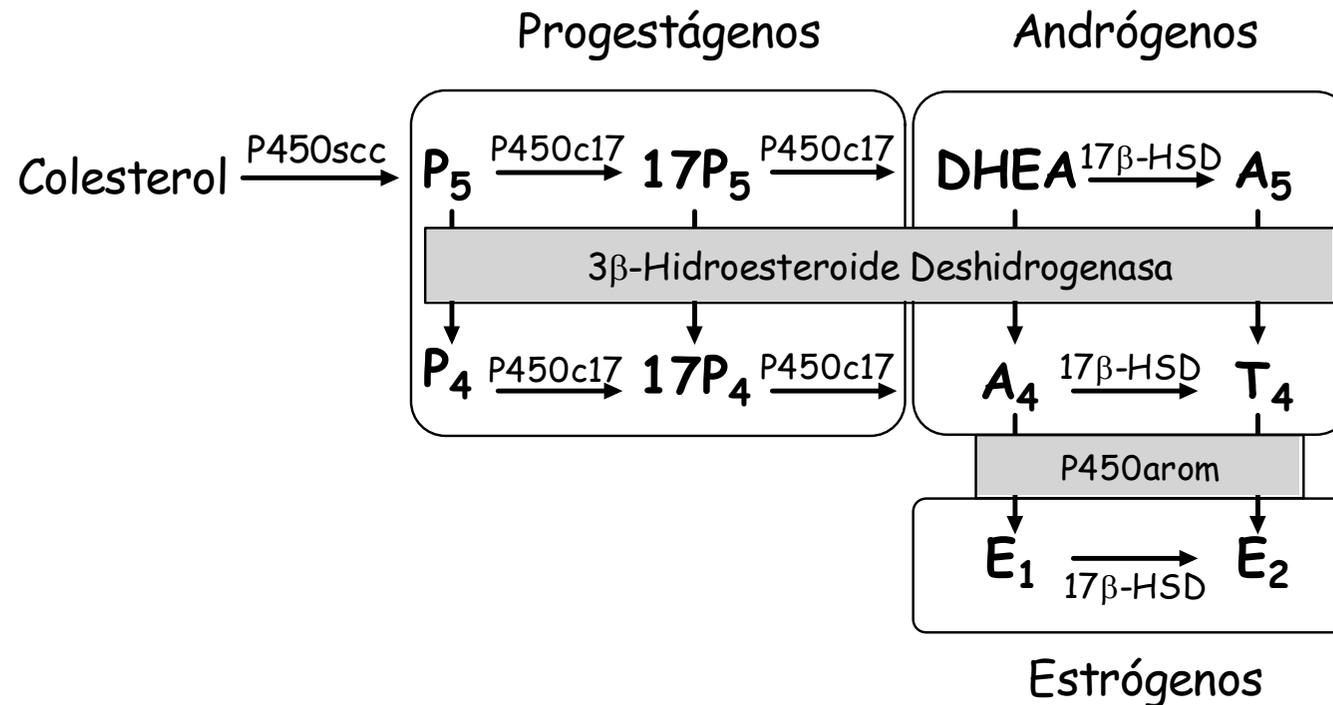


Figura 1. **Diagrama de la síntesis de los principales progestágenos, andrógenos y estrógenos.**

Abreviaturas usadas para 1) hormonas esteroides:  $P_5$ , pregnenolona;  $17P_5$ , 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona;  $DHEA$ , dehidropiandrosterona;  $A_5$ , androstenediol;  $P_4$ , progesterona;  $17P_4$ , 17 $\alpha$ -hidroxiprogestero;  $A_4$ , androstenediona;  $T_4$ , testosterona;  $E_1$ , estrona;  $E_2$ , estradiol, 2) enzimas P450:  $P450scc$ , citocromo P450 side chain cleavage;  $P450c17$ , citocromo P450 17 $\alpha$  hidroxilasa/17,20 liasa;  $17\beta\text{-HSD}$ , 17 $\beta$  hidroxioesteroide deshidrogenasa;  $P450arom$ , citocromo P450 aromatasa (Modificado de Browne et al. 2006).

Desde hace varias décadas se han realizado diferentes esfuerzos para determinar la capacidad esteroidogénica de los folículos bovinos, ya sea mediante la medición de los esteroides en suero (Ireland et al. 1979b; Kanchev et al. 1976) o con la síntesis *in vitro* de cultivos aislados de teca interna y células de la granulosa (Fortune 1986c; Fortune y Hansel 1979). Al mismo tiempo se utilizó también líquido folicular proveniente de animales de rastro para conocer la concentración intrafolicular de esteroides y la relación que guarda esta con el desarrollo de los folículos (Ireland et al. 1979a; England et al. 1973). Henderson et al. (1982b) determinan en muestras de rastro que conforme aumenta el tamaño del folículo se incrementa la concentración folicular de E<sub>2</sub>, a diferencia de A<sub>4</sub> y T<sub>4</sub> que muestran un comportamiento inverso. Sin embargo, sus resultados carecen de una interpretación fisiológica debido a que los autores desconocían la historia reproductiva y la etapa del ciclo estral de las hembras al momento del sacrificio (Henderson et al. 1982a). Por tal razón, la cuantificación precisa de los esteroides foliculares durante etapas fisiológicas conocidas puede proveer de información importante sobre la capacidad sintética de las células de la granulosa y de la teca interna en varias etapas de diferenciación. A este respecto Fortune y Hansel (1985) mostraron desde hace algunos años que los cambios en el proceso esteroidogénico de los folículos preovulatorios son reflejados de forma clara en el fluido folicular. De hecho Ireland y Roche (1983) resaltan la importancia de la actividad esteroidogénica folicular al definir a los folículos como estrogénicamente activos ó inactivos con base en la cantidad de E<sub>2</sub> en líquido folicular, ya que los folículos estrogénicamente activos tienen una mayor concentración de E<sub>2</sub> que de P<sub>4</sub> y andrógenos, mientras que los inactivos tienen una mayor concentración de P<sub>4</sub> ó andrógenos que de E<sub>2</sub>.

Otro acercamiento experimental para evaluar la actividad esteroidogénica de los folículos bovinos está representada por las técnicas de biología molecular (RT-PCR) e inmunológicas (hibridación *in situ*, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia) que se utilizan para determinar los patrones de expresión del mRNA y de las proteínas de las enzimas esteroidogénicas P450, respectivamente. Por ejemplo mediante el uso de hibridación *in situ*, se han caracterizado los cambios

que ocurren durante los procesos de reclutamiento, selección y dominancia de los folículos en *B. taurus* (Bao y Garverick 1998). En conjunto los resultados del grupo de la Universidad de Missouri nos muestran que durante el desarrollo de una onda folicular la expresión del mRNA para P450arom se incrementa en los folículos reclutados, mientras que los folículos dominantes tienen mayores niveles de mRNA para los receptores de las gonadotropinas y de las enzimas P450 involucradas en la síntesis de andrógenos y progestágenos (P450scc, P450c17, 3 $\beta$ -Hidroesteroide Deshidrogenasa y StAR).

La relevancia de este tipo de estudios queda claramente expuesta por autores como Omura (2006c) que señala a la expresión tejido-específica de las enzimas P450 como el principal determinante del tipo y la cantidad de hormonas esteroides que se producen dentro de un órgano o tejido esteroideogénico. Por tal razón, el estudio de los patrones de expresión de dichas enzimas representa una herramienta útil que puede proveer información importante sobre el potencial esteroideogénico (Browne et al. 2006a). En consecuencia, resulta evidente que la determinación de la actividad esteroideogénica, en conjunto con la valoración precisa del crecimiento folicular de las hembras *B. indicus* sincronizadas, plantea un acercamiento integral que nos puede proporcionar información relevante acerca de la relación existente entre la actividad sexual de estos animales y la capacidad esteroideogénica de los folículos que conducen dicha actividad

## V. MATERIAL Y MÉTODOS

### A. Obtención de Muestras Biológicas y Dinámica Folicular

#### 1. *Localización*

Los experimentos para la obtención de las muestras biológicas (ovarios con folículos) se realizaron dentro de las instalaciones del módulo de producción de vaquillas, perteneciente al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El CEIEGT se encuentra situado en Martínez de la Torre, Ver., México, ubicado a 20°4' latitud Norte y 97°3' longitud Oeste. La altura sobre el nivel del mar es de 151 m. El clima está clasificado como Af (m) w'' (e) caliente y húmedo, con lluvias todo el año, sin estación seca definida. La precipitación pluvial media anual es de 1991 mm y la temperatura promedio anual es de 23.7°C, con un intervalo entre 14 y 35°C (García 1988).

El análisis y procesamiento de las muestras se realizó en el Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM, así como en el Departamento de Biofísica del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la misma institución.

#### 2. *Animales*

Se utilizaron 18 hembras adultas *B. indicus* (raza Brahman), multíparas sin cría al pie y sexualmente activas al inicio del tratamiento. Las hembras se dividieron de forma aleatoria en tres grupos ( $n = 6$ ) para la expresión del estro en secuencia. Mediante la división de los animales se trató de evitar la aparición de conducta de imitación (Orihuela et al. 1983), además de que se facilitó la identificación de cada grupo sexualmente activo (GSA) formado. Las hembras se mantuvieron en un mismo lote bajo condiciones de pastoreo, y con la intención de facilitar su manejo, se les proporcionó una suplementación alimenticia con un concentrado comercial que contenía 14% de proteína cruda. La condición corporal de las vacas se mantuvo entre 3 y 4, de acuerdo a la escala modificada por Edmonson et al. (1989), en donde 1 es emaciada y 5 obesa.

### 3. *Sincronización y Detección del Estro*

Los animales se sincronizaron mediante la aplicación de un dispositivo intravaginal CIDR que contenía 1.9 g de P<sub>4</sub> natural (Pfizer, Mexico), sin la adición de estrógenos. El dispositivo se mantuvo *in situ* por un período de 9 días. Al retiro del implante se administraron 5 ml/animal (25 mg) por vía intramuscular (i.m.) de PGF<sub>2α</sub> (Lutalyse, Pharmacia & Upjohn Inc., Kalamazoo Mich., EUA) para lizar el cuerpo lúteo y así favorecer el crecimiento de los folículos en desarrollo y estimular la actividad sexual (Porras y Galina 1991). Para que los animales sincronizados presentaran estro en secuencia (Medrano et al. 1996), la inserción del CIDR se realizó con 24 horas de diferencia entre los grupos, de acuerdo al protocolo esquematizado en la Figura 2.

Veinticuatro horas después del retiro del CIDR, las hembras se observaron continuamente durante 96 horas. Las actividades sexuales fueron registradas de acuerdo al método propuesto por Orihuela et al. (1983) dentro del intervalo esperado para la expresión del estro de las 24 a las 72 horas posteriores al retiro del CIDR (Verduzco et al. 2006).

Orihuela (2000) señala que por causas de manejo y naturales, como la estructura social del hato, algunas de las hembras sometidas a tratamientos de sincronización pueden retardar o inhibir la expresión del estro. Por tal razón, clasificamos a las hembras con base en los siguientes criterios: 1) **hembras detectadas**, definidas como las vacas que montaron y se dejaron montar por otras hembras. Para estos animales el inicio del estro se definió cuando la hembra aceptó tres o más montas en un período máximo de dos horas, y 2) **hembras no detectadas**, que incluyó a hembras con folículos dominantes y próximas al inicio del estro, a juzgar por la expresión de conducta sexual (mostrar interés, seguir, lamer, apoyo en grupa, olfatear, etc.) y algunos intentos de monta. Sin embargo, la interrupción continua en la estructura del GSA que incluía a dichas hembras, provocó que éstas no manifestaran un celo franco.

Las hembras detectadas fueron ovariectomizadas de 6 a 12 horas después del inicio del estro para evitar la ovulación del folículo dominante (Bo et al. 2003),

mientras que las hembras no detectadas continuaron en observación y se sometieron a cirugía únicamente cuando se consideró que se alteró la estructura social del hato y que habían perdido a su principal compañera de monta (Castellanos et al. 1997). La ovariectomía de estas hembras se realizó en el mismo intervalo propuesto, utilizando como referencia la hora del último registro de actividad sexual.

#### 4. *Grupos de Hembras Ovariectomizadas*

Con la intención de formar grupos de hembras ovariectomizadas a diferentes momentos durante el intervalo esperado de expresión de conducta sexual, que va de 24 a 72 horas posteriores al retiro del implante, decidimos dividir el intervalo esperado. De esta forma es posible estratificar la respuesta de los animales durante el período de observación, ya que experimentos previos realizados por Alonso et al. (2009) indican que las hembras sincronizadas expresan conducta sexual a diferentes tiempos, desde las 25 hasta las 90 horas posteriores al retiro del implante. Con base en este antecedente dividimos en tres períodos el intervalo, considerando un lapso de  $\pm 12$  horas con respecto al inicio (24 horas), la parte intermedia (48 horas) y el final (72 horas). Así, los grupos formados se denominaron de la siguiente manera: 1) **24 h post-CIDR**, que va de 12 a 36 horas; 2) **48 h post-CIDR**, que va de 36 a 60 horas; y 3) **72 h post-CIDR**, que va de 60 a 84 horas posteriores al retiro del CIDR.

Para la formación de los grupos de hembras ovariectomizadas únicamente se utilizó como criterio de inclusión la hora de ovariectomía, en consecuencia cada grupo se compone por hembras detectadas y no detectadas en estro provenientes de los distintos grupos sincronizados. En la Figura 3 se presentan de forma esquemática el protocolo de sincronización y la composición final de los grupos de hembras ovariectomizadas. Cabe mencionar que el análisis de todos los datos experimentales que obtuvimos se realizó a partir de los tres grupos formados, a los cuales nos referiremos a lo largo del texto.

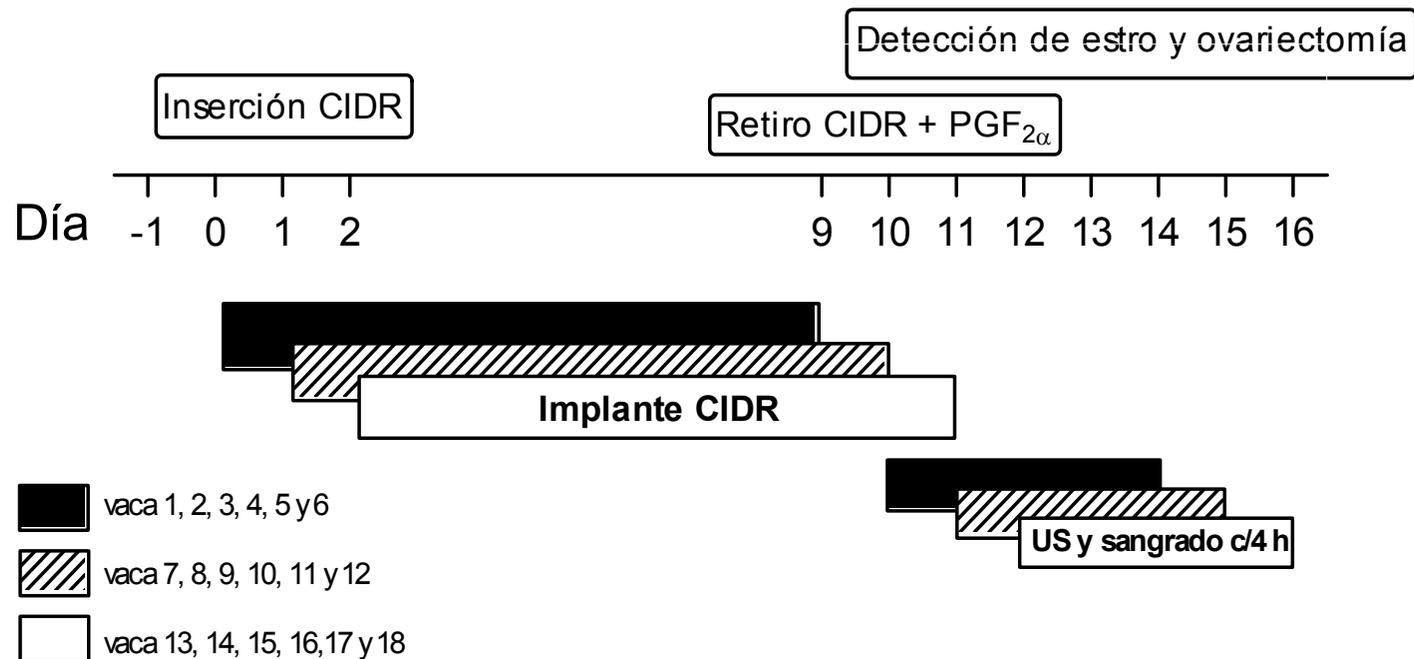


Figura 1. **Protocolo experimental para inducir la sincronización del estro y su expresión en secuencia.**

El día -1 las hembras *B. indicus* se dividieron en tres grupos ( $n = 6$ ). Los grupos se sincronizaron mediante CIDR con un día de diferencia entre ellos, para así expresar estro en secuencia. Al retiro del implante se aplicaron 5 ml/animal i.m. de PGF<sub>2α</sub>. La detección del estro comenzó 24 horas después del retiro del implante. Las hembras se observaron de manera continua durante 96 horas hasta determinar el inicio del estro para las hembras detectadas ó hasta el último registro de actividad sexual para las hembras no detectadas. En ambos casos la ovariectomía se realizó de 6 a 12 horas después de cada evento. En conjunto con la detección del estro, se realizaron ultrasonidos (US) y sangrados de la vena coccígea cada 4 horas de las 8:00 a las 20:00 horas, para no intervenir con la conducta sexual que ocurre principalmente durante la noche y la madrugada.

##### 5. *Desarrollo Folicular: Características del Folículo Dominante*

Para evaluar el crecimiento folicular se realizaron estudios de ultrasonografía, los cuales iniciaron 24 horas después del retiro del CIDR (Figura 2). Los folículos medidos se dividieron en tres categorías de acuerdo a su diámetro folicular: 1) <5 mm de diámetro, 2) de 5 a 10 mm de diámetro y 3) >10 mm de diámetro. Los folículos pertenecientes a la última categoría se consideraron dominantes cuando presentaron las siguientes características: 1) **crecimiento dominante** con respecto a los demás folículos presentes (Fortune et al. 2001), 2) **tamaño >10 mm** (Bo et al. 2003) y <25 mm de diámetro, para no ser considerado como quiste (Kesler y Garverick 1982) y 3) **no entrar en regresión** antes de la detección del estro (Fortune 1994). En éste último punto se consideró a un folículo en regresión cuando en tres ultrasonidos consecutivos se registró como tendencia una disminución del tamaño máximo del diámetro folicular.

Utilizando la metodología propuesta por Sirois y Fortune (1988) se determinó y registró el crecimiento de los folículos dominantes. Para lo anterior, se utilizó un equipo de ultrasonido (ALOKA SSD-210DXII, Aloka, Tokio, Japón) con transductor intrarectal de 7.5 MHz. Todas las observaciones fueron registradas y dibujadas sobre mapas de los ovarios de cada animal. Las ultrasonografías se realizaron cada 4 horas entre las 8:00 y las 20:00 horas, dejando libre de manejo el intervalo de 21:00 a 7:00 horas (Figura 2); período con la expresión de conducta sexual de mayor intensidad en vacas *B. indicus* (Galina y Arthur 1990).

A partir de la información de los estudios de ultrasonografía se definieron las siguientes variables:

1) **Días de crecimiento del folículo dominante**; que comprendió a los días que permaneció el folículo dominante en el ovario; desde el retiro del CIDR hasta la ovariectomía.

2) **Diámetro inicial**; tamaño con el que inicio el crecimiento del folículo dominante al momento del retiro del CIDR.

3) **Diámetro final**; tamaño máximo del folículo dominante registrado antes de la ovariectomía.

4) ***Crecimiento total***; obtenido de la diferencia del diámetro final menos el diámetro inicial.

5) ***Tasa de crecimiento diario***; obtenido a partir del cociente del crecimiento total entre los días de crecimiento del folículo dominante.

6) ***Porcentaje de crecimiento del folículo dominante***; que se definió como el cociente del crecimiento total entre el diámetro inicial multiplicado por 100.

#### 6. *Perfil de P<sub>4</sub> en Suero*

Simultáneamente a los estudios de ultrasonografía se obtuvieron muestras de sangre por venopunción de la vena coccígea de cada animal. Las muestras se almacenaron en tubos Vacutainer (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) y se colocaron en hielo hasta ser centrifugadas (2500 rpm durante 15 minutos) con el fin de obtener el suero. El suero se almacenó a -4°C para su posterior determinación de P<sub>4</sub>, a través del radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés) en fase sólida. Para ello se utilizó la metodología descrita por Pulido et al. (1991) y se emplearon estuches comerciales (Coat-A-Count, Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA, USA). Todas las muestras se analizaron en un sólo experimento con lo que se obtuvo un coeficiente de variación intraensayo de 3.6% y una sensibilidad del ensayo de 0.1 ng/ml.

#### 7. *Ovariectomía, Disección de los Folículos y Recolección del Líquido Folicular*

La ***ovariectomía*** se realizó por vía transvaginal y consistió en: 1) evacuación de materia fecal remanente en el tracto digestivo; 2) bloqueo epidural con xilocaína al 5% a nivel de la región sacra-coccígea y 3) desinfección de la región perianal y vulvar con Iodo y d) Palpación de las estructuras reproductivas.

Transcurridos los pasos anteriores se realizó el procedimiento quirúrgico, con duración de entre 45 y 60 minutos por animal, que se describe a continuación: 1) localización transvaginal del fornix (sacos ciegos de la vagina) a nivel del saco dorsal. En este punto se realizó una perforación con un bisturí de hoja oculta, dicha perforación se amplió con ayuda de los dedos, 2) dentro de la cavidad se localizó el cuello del útero, siguiendo su longitud hasta los cuernos uterinos y después hasta los

ovarios. Estos últimos fueron retraídos hacia la perforación vaginal para posteriormente ser extirpados. Previamente, cada ovario se envolvió en una gasa impregnada con 10 ml de xilocaína al 5% para producir un efecto de anestesia local, 3) se introdujo un ovariótomo por vía vaginal para cortar y obtener los ovarios, 4) al finalizar la cirugía se aplicó a cada animal 25 ml i.m. de un antibiótico de amplio espectro: penicilina G Benzatínica ( $3 \times 10^6$  U.I.), penicilina G Procaínica ( $1.5 \times 10^5$  U.I.), penicilina G Potásica ( $1.5 \times 10^5$  U.I.) y estreptomina base (2,500 mg) (Intervet, México) y finalmente 5) se realizó un seguimiento post-operatorio que consistió en la observación continua de los animales para evaluar el estado general de las hembras.

Una vez extirpados los ovarios se colocaron en solución salina fría al 0.9% y se transportaron al laboratorio (dentro de 10-15 minutos post-cirugía) en donde se identificó y disectó al folículo dominante. Posteriormente, los folículos se congelaron con vapores de  $N_2$  líquido. Las criosecciones obtenidas se almacenaron a  $-80^\circ C$  para su posterior procesamiento y análisis. De forma previa al congelamiento de los folículos dominantes, se extrajeron y congelaron a  $-4^\circ C$  muestras de 50-300  $\mu l$  de líquido folicular con ayuda de una jeringa de 1ml con aguja calibre 25.

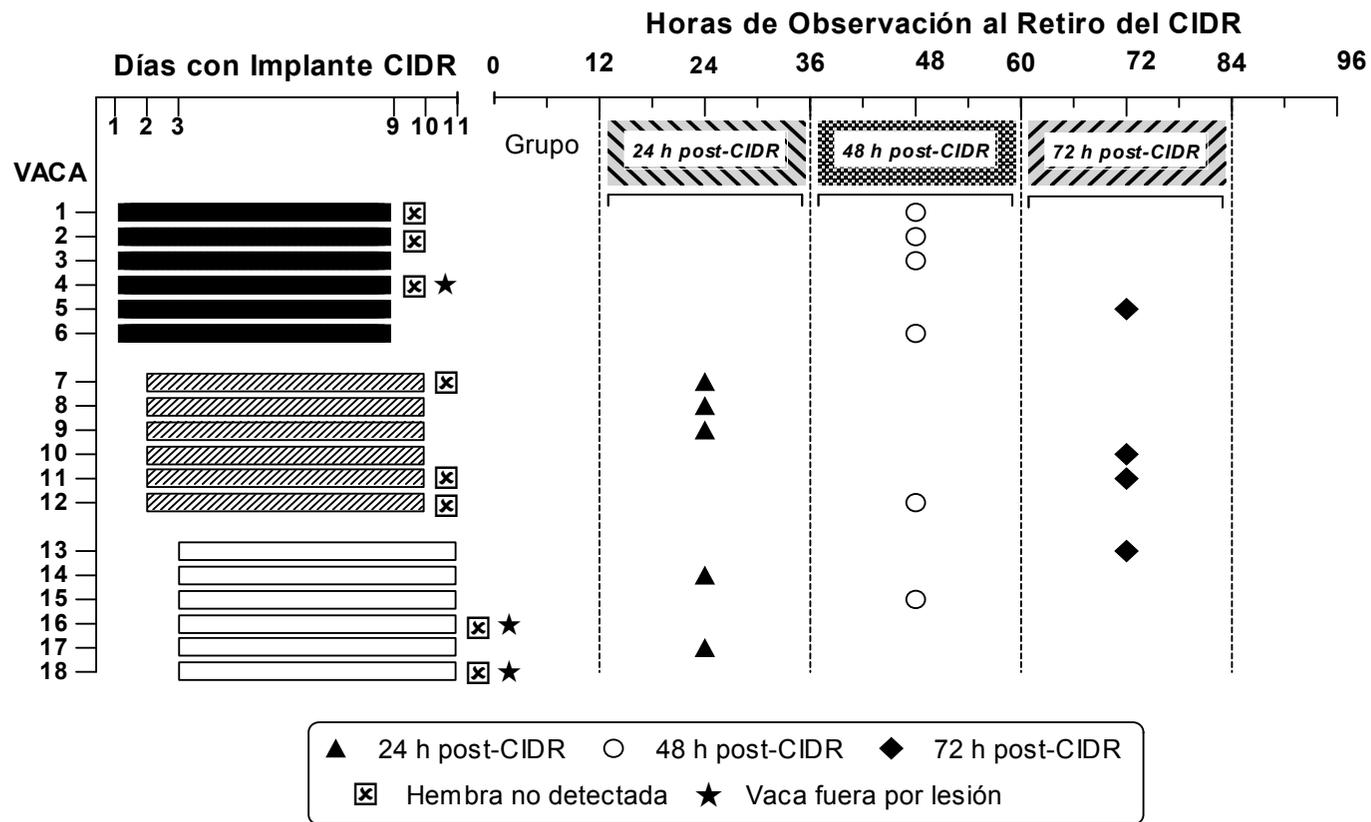


Figura 2. **Formación de los grupos de hembras ovariectomizadas.**

Se presenta el protocolo de sincronización y la distribución de las hembras ovariectomizadas dentro de los grupos. La formación de los grupos: 24 h post-CIDR (intervalo de 12 a 36 horas), 48 h post-CIDR (intervalo de 36 a 60 horas) y 72 h post-CIDR (intervalo de 60 a 72 horas) se realizó con base en el horario de ovariectomía de cada hembra sincronizada. Se muestra la composición final de los grupos. Tres de las hembras no detectadas fueron retiradas del experimento debido a lesiones que impidieron su continuación en el experimento.

B. Análisis de la Actividad Esteroidogénica de los Folículos Dominantes

1. *Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas para Hormonas Esteroides*

A partir de las muestras de líquido folicular almacenadas se determinó el perfil de E<sub>2</sub>, T<sub>4</sub> y P<sub>4</sub> mediante la técnica de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) de tipo competitivo. Para ello se utilizó el método descrito por Munro y Stabenfeldt (1984). Las muestras se descongelaron en hielo y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos para remover remanentes celulares y obtener el sobrenadante para la evaluación hormonal.

El procedimiento se describe en los siguientes pasos: 1) **Unión del anticuerpo primario a la placa**, se utilizaron las siguientes concentraciones de anticuerpo primario: anti-E<sub>2</sub> (rabbit polyclonal R4972, 1/8000), anti-T<sub>4</sub> (rabbit polyclonal R-156/7, 1/35000) y anti-P<sub>4</sub> (rabbit polyclonal R4859, 1/35000) diluidas en una solución de amortiguador de carbonatos con la siguiente composición: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.2 M, NaHCO<sub>3</sub> 0.2 M, NaN<sub>3</sub> 3 mM y dH<sub>2</sub>O, pH 9.6 ajustado con NaOH. De la solución anterior se adicionaron 50 µl a las microplacas MaxiSorp de poliestireno de 96 pozos (Nunc, Rochester, NY, EUA). Los pozos que no se utilizaron funcionaron para determinar la unión no específica del conjugado, ya que únicamente se cubrieron con una solución amortiguadora de fosfatos salinos (PBS, por sus siglas en inglés), la cual tenía la siguiente composición: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 M, NaCl 0.15 M, BSA 0.1% (p/v) y dH<sub>2</sub>O, pH 7.0 ajustado con NaOH. Cada placa utilizada se cubrió con plástico delgado y se incubó a 4°C por toda la noche. Durante el tiempo de incubación se prepararon los estándares necesarios para la construcción de la curva estándar además de los controles de calidad alto y bajo, incluidos como referencia en cada ensayo, 2) **Adición de la muestra y el conjugado**, transcurrido el tiempo de incubación del anticuerpo primario, se lavó la placa en cuatro ocasiones con una solución compuesta de: NaCl 1.5 M, Tween 20 (BioRad, Hercules, CA, EUA) 0.5% (v/v) y dH<sub>2</sub>O. Adicionalmente se prepararon las muestras a las siguientes concentraciones: E<sub>2</sub> (1/300), T<sub>4</sub> (1/10 y 1/50) y P<sub>4</sub> (1/300) y por otra parte el conjugado HRP: E<sub>2</sub> (1/20000), T<sub>4</sub> (1/40000) y P<sub>4</sub> (1/50000), diluidos todos ellos en PBS. En cada pozo

se agregaron 50 µl de la muestra preparada (excepto en 3 pozos a los que se les agregó la misma cantidad de amortiguador de fosfatos y que se utilizaron como blancos para determinar la unión máxima) y después 50 µl del conjugado preparado, para un total de 100 µl finales en cada pozo. Posteriormente, las placas se incubaron durante 2 horas a 30°C para después repetir el proceso de lavado y finalizar con la incubación de las placas con el sustrato específico de la enzima, 3) **Reacción enzimática**, la parte final de los ensayos inició con la adición de 100 µl/pozo de la solución sustrato 2-2'azino-bis ácido 3-etilbenzo-tiazol-6-sulfónico (ABTS). La placa con el sustrato se incubó nuevamente durante 1 hora a 30°C para después detener la reacción, de ser necesario, con 100 µl/pozo de una solución de HF 0.15 M y EDTA 1 M. Inmediatamente, se realizó la lectura de la placa en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm. Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa Assay Zap 3.1 (Biosoft, Cambridge, Reino Unido).

Todos los anticuerpos y conjugados fueron donados amablemente por la Dra. C. Munro de la Universidad de Davis, EUA.

Las siguientes son las reacciones cruzadas de los anticuerpos primarios utilizados: anti-E<sub>2</sub>, 100% 17β-estradiol, 3.3% estrona y <1% con otros esteroides; anti-P<sub>4</sub>, 21% 11α-hidroxiprogesterona y 29% 5α-pregнено-3,20-diona y <0.05% con otros esteroides y finalmente anti-T<sub>4</sub>, 100% testosterona, 57.4% 5α-dihidrotestosterona, 0.27% androstenediona y <0.1% con otras esteroides.

Para E<sub>2</sub>, T<sub>4</sub> y P<sub>4</sub> se obtuvieron los siguientes coeficientes de variación intraensayo: 7.1, 8.1 y 4.8%, respectivamente. Por otra parte, la sensibilidad del ensayo para E<sub>2</sub>, T<sub>4</sub> y P<sub>4</sub> fue de 7.48, 2.38 y 0.36 ng/ml, respectivamente.

## 2. *Inmunofluorescencia*

Para evaluar la expresión por inmunofluorescencia de las proteínas P450<sub>scc</sub> y P450<sub>arom</sub> en las células de la granulosa y de la teca interna, se utilizó una modificación del método descrito por Fiordeliso y Hernandez-Cruz (2002). A partir de las criosecciones de tejido ovárico conservado se realizaron cortes seriales de 20 µm de espesor con ayuda de un criostato a -20°C (Cambridge Instruments GmbH, Heidelberg, Alemania). Los cortes se montaron en portaobjetos especiales

para la adhesión de tejido criopreservado (Erie Scientific Company, Portsmouth, NH, EUA) y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

La inmunofluorescencia consistió en los siguientes pasos: 1) ***delineado del contorno de los cortes de tejido***, utilizando para ello un plumón hidrofóbico (Dako, Carpinteria, CA, EUA), para mantener las soluciones sobre el tejido; 2) ***bloqueo de los sitios de unión inespecíficos y permeabilización de las membranas***, durante 30 minutos a temperatura ambiente con 150  $\mu\text{l}$ /portaobjetos de una solución con la siguiente composición: BSA 2% (p/v) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) y Triton X 100 0.2% (v/v) (Fluka, Sigma-Aldrich) diluidos en PBS 0.1 M; 3) ***unión del anticuerpo primario***, después de la permeabilización y el bloqueo, se retiró la solución y se incubaron las muestras con 150  $\mu\text{l}$ /portaobjetos de alguno de los siguientes anticuerpos primarios policlonales: anti-P450scc (rabbit primary antibody to Cytochrome P450 Side Chain Cleavage, Abcam, Cambridge, Reino Unido, 1/100) ó anti-P450arom (rabbit primary antibody to Aromatase, Chemicon, Millipore, Temecula, CA, EUA, 1/100), diluidos en la misma solución de bloqueo y permeabilización. Este procedimiento se realizó en una caja húmeda a  $4^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche; 4) ***lavado del anticuerpo primario***, consistió en tres lavados a temperatura ambiente durante 5 minutos con PBS para eliminar todos los restos del anticuerpo primario y preparar la muestra para usar el anticuerpo secundario; 5) ***unión del anticuerpo secundario***, a cada laminilla se le agregaron 150  $\mu\text{l}$  del anticuerpo secundario durante un período de 2 horas. Cada anticuerpo secundario (anti-IgG) de conejo se encontraba conjugado con algunos de los siguientes fluorocromos: Alexa fluor 488, Alexa fluor 555 ó Alexa fluor 647 (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). El anticuerpo secundario se diluyó en la solución de bloqueo y permeabilización a una concentración de 1:100; 6) ***lavado del anticuerpo secundario y tinción de núcleos***, después del tiempo de incubación del anticuerpo secundario, se lavó nuevamente la laminilla. Para la contratinción específica de los núcleos, las laminillas se incubaron durante 5 minutos con 150  $\mu\text{l}$ /portaobjetos de 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) (Sigma-Aldrich) diluido en PBS 0.1 M; finalmente 7) ***montaje de las laminillas***,

una vez retirado el DAPI se realizó la preparación final de las laminillas con medio de montaje para fluorescencia (Dako) compuesto de  $\text{NaN}_3$  15 mM.

Los controles negativos para P450scc y P450arom se obtuvieron incubando las muestras únicamente en presencia del anticuerpo primario ó secundario y continuando con el proceso normal para la inmunofluorescencia. Para P450arom se utilizó, además, otro control negativo para confirmar la especificidad del anticuerpo primario. El procedimiento consistió en la pre-absorción del anticuerpo primario con un volumen similar de su péptido específico (aromatase peptide, ab51924; Abcam), durante 30 minutos en un agitador orbital a temperatura ambiente, seguido de los pasos descritos para las demás inmunofluorescencias. En las laminillas control solamente se esperó obtener la fluorescencia basal (denominada autofluorescencia).

a) Sistema de adquisición de imágenes digitales de fluorescencia

Para obtener las imágenes de fluorescencia digital se utilizó un microscopio invertido y automatizado (Leica DMI6000 B, Leica Microsystems, Cambridge, Reino Unido) acoplado a una fuente de iluminación externa (Leica EL6000) para lograr la excitación de los fluorocromos. La fuente de luz consistió en una lámpara de aditivos metálicos y dos apagadores a control remoto con tiempo de respuesta de 6 milisegundos, para evitar el blanqueamiento de las muestras. Todos los componentes motorizados del microscopio, además de la iluminación interna del mismo se controlaron mediante una interfase análoga (Leica CTR6500).

El microscopio se equipó con los filtros apropiados para la detección de la emisión fluorescente de los fluorocromos utilizados (Alexa Fluor 488, excitación a 495 nm y emisión a 519 nm / L5, con filtro de excitación a 545/40 nm, espejo dicroico a 505 nm y filtro barrera a 527/30 nm; Alexa Fluor 555, excitación a 555 nm y emisión a 565 nm / Y3, con filtro de excitación a 545/40 nm, espejo dicroico a 565 nm y filtro barrera a 610/75 nm; y Alexa Fluor 647, excitación a 650 nm y emisión a 668 nm / Y5, con filtro de excitación a 620/60 nm, espejo dicroico a 660 nm y filtro barrera a 700/75 nm). Para DAPI se utilizó el filtro A, con filtro de excitación a 360/40 nm, espejo dicroico a 400 nm y filtro barrera a 40/40 nm.

Para la ubicación inicial de las áreas de interés dentro de la muestra completa se utilizó un objetivo de 20X de inmersión en aceite (Leica HCX PL APO CS 20X AN 0.7) y después, para la adquisición de imágenes (tomas aisladas o reconstrucciones), se utilizaron objetivos de 40X ó 63X, ambos de inmersión en aceite (Leica HCX PL APO AN 1.25/1.52 40X y HCX PL APO 63X AN 1.4/1.52).

Por otra parte, las imágenes fueron adquiridas con una cámara digital CCD monocromática de 8-12 bits especial para fluorescencia (Leica DFC350 FX de 1.4 Megapíxeles de resolución), enfriada y de alta sensibilidad en el espectro infrarrojo y visible, además de alta linealidad y exposición ajustable desde 5 milisegundos (ms) hasta 10 minutos. Para determinar el intervalo de exposición adecuado para cada lote de laminillas, se utilizaron los valores máximos y mínimos de la intensidad de fluorescencia registrados en áreas con señal de fluorescencia saturada (alta expresión de proteína) y en experimentos control con fluorescencia no específica (nula expresión de proteína), respectivamente. En todos los casos el intervalo de exposición se ubicó entre 25 y 150 ms. Cada lote de laminillas pertenecientes al mismo experimento se analizaron el mismo día para eliminar posibles diferencias en la fluorescencia registrada.

Tanto el microscopio como la cámara digital se controlaron mediante una interfase digital (Leica AF6000), con la cual se adquirieron imágenes en multicanal y se manejó el programa LAS AF (Leica Application Suite: Advanced Fluorescence), además del ajuste de los parámetros internos de la cámara como el tiempo de exposición, la ganancia y la resolución en bits, entre otros.

Por otra parte, las imágenes fueron adquiridas por medio del programa AF, incluido en del paquete LAS. Las imágenes obtenidas se almacenaron en formato LIF (Leica Image File) a una resolución de 8 bits dentro del disco duro de la computadora que controla el microscopio y la cámara digital.

#### b) Análisis de imágenes de fluorescencia

Para cuantificar la expresión de las proteínas P450<sub>scc</sub> y P450<sub>arom</sub> se utilizó una modificación del método descrito por Xu et al. (1995) para hibridación *in situ*. El análisis semicuantitativo de fluorescencia digital se realizó a partir de las

**reconstrucciones** (composición de varias imágenes individuales) de los folículos dominantes. Para ello se utilizó el sistema de análisis de imágenes del programa Image J 1.39 del NIH, EUA.

El procedimiento consistió en los siguientes pasos: 1) **reconstrucción de los folículos dominantes**, cada folículo dominante se dividió en cuatro campos de 90° a partir de los cuales se fotografiaron secciones individuales hasta completar cada campo, y con ello el área total del folículo dominante; 2) **determinación del área de células de la granulosa y de la teca interna**, dentro de cada folículo se localizó y delimitó el área que ocuparon las células de la pared folicular. Se midieron las áreas seleccionadas y se determinó el número total de píxeles por cada tipo celular; 3) **medición de la fluorescencia de fondo**, en cada campo analizado se marcaron áreas libres de tejido para obtener el valor promedio de la fluorescencia de fondo, la cual se restó de las intensidades de fluorescencia medidas para los marcadores fluorescentes de P450sc y P450arom. Así se obtuvo el valor promedio de la fluorescencia corregida que se denominada fluorescencia específica; 4) **cuantificación de la fluorescencia específica**, para medir la fluorescencia específica se fijó un umbral en escala de grises (60 a 255 píxeles, debido a que el marcaje es continuo y con intensidades variables) a partir de la cual se determinó el número total de píxeles ocupados por la reacción inmune dentro del tejido marcado; 5) **cuantificación de la fluorescencia relativa**, que se obtuvo como el cociente del valor de fluorescencia específica entre el área total de cada tipo celular dentro de un folículo dominante. Mediante este procedimiento se elimina el efecto del tamaño entre los folículos y se obtiene un índice de la expresión de las proteínas P450sc y P450arom. La fluorescencia específica y la fluorescencia relativa se expresa en unidades arbitrarias de fluorescencia (uaf).

Este mismo procedimiento, excepto la cuantificación de la fluorescencia relativa, se utilizó para analizar las imágenes provenientes de los experimentos control.

### C. Análisis de Datos

El análisis inició con la transformación de los datos a  $\text{Log}_{10}$  ó arcoseno en el caso de porcentajes, de acuerdo a los resultados de las pruebas de distribución normal y de homogeneidad de varianzas. Después, se realizaron análisis de varianza de una vía para comparar los promedios de la hora de inicio del estro y de la concentración de  $\text{P}_4$  en muestras de suero en los grupos. Se utilizó la prueba  $t$  de Student de una cola para comparar promedios de dos conjuntos de datos. También se realizó un análisis de regresión lineal para evaluar la existencia de la relación entre el crecimiento folicular y el tiempo de observación. Todos los análisis anteriores se realizaron con el paquete estadístico JMP 7.02 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

Por otra parte, la comparación de los niveles de hormonas esteroides en líquido folicular, las características generales de crecimiento del folículo dominante, así como el análisis de la expresión de las enzimas esteroideogénicas se realizó utilizando el procedimiento del Modelo General Lineal (GLM) incluido en el paquete estadístico SAS 9.0. En todos los modelos se incluyeron los efectos principales de los grupos con las variables correspondientes y de resultar significativos, también se incluyeron los efectos de las interacciones (análisis de covarianza). Para el caso particular del análisis de la concentración de hormonas esteroides en líquido folicular se incluyó el diámetro folicular como covariable de la concentración de cada hormona.

En todas las pruebas, en caso de existir diferencias significativas entre las medias estudiadas se aplicó la prueba de Tukey-Kramer. Se consideró la existencia de diferencias significativas si  $p < 0.05$ . Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  error estándar de la media (EE). Todas las gráficas presentadas se realizaron con el programa Prism 5.01 (Graph Pad Software Inc, San Diego, CA, EUA).

## VI. RESULTADOS

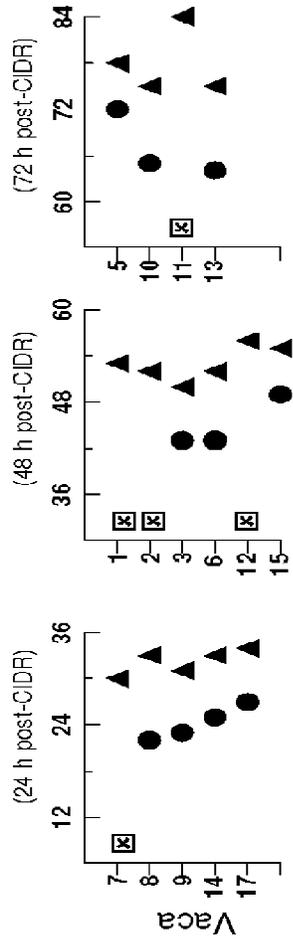
### A. Primera Parte

#### 1. *Grupos de Hembras Ovariectomizadas y Perfil de P<sub>4</sub> en Suero*

La respuesta de expresión del estro fue del 55.5% (10/18). De las hembras no detectadas, se ovariectomizó a cinco y las tres restantes se retiraron del experimento debido a lesiones que impidieron su participación (vacas 4, 16 y 18). El inicio del estro en las hembras detectadas se ubicó dentro de las 22 a 72 horas post-CIDR, con un promedio de  $45.4 \pm 5.9$  horas para todo el grupo. La distribución del inicio del estro y de las ovariectomías dentro del período de observación se presenta en la Figura 4. El análisis de la figura nos indica que las hembras detectadas y las no detectadas se distribuyeron dentro de los intervalos que definieron a los grupos de hembras ovariectomizadas. En las hembras detectadas se presentaron diferencias significativas en el inicio del estro ( $p < 0.001$ ).

Los perfiles de P<sub>4</sub> sérica obtenidos durante el período de observación continua se presentan en la Figura 5. Entre los grupos de hembras ovariectomizadas a las 24 (panel A) y 72 h post-CIDR (panel C) se detectaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el segundo muestreo, que corresponde a 0 horas post-CIDR. En contraste, en las hembras ovariectomizadas a las 48 h post-CIDR (panel B) los valores promedio de P<sub>4</sub> sérica fueron similares a los grupos anteriores ( $p > 0.05$ ) durante todo el período de observación. Cabe mencionar que en los grupos de hembras ovariectomizadas, a partir del tercer muestreo los valores promedio de la hormona esteroide se encuentran por debajo de 1.0 ng/ml. Dichos valores se mantienen significativamente ( $p < 0.01$ ), tanto al inicio del estro como al momento de la cirugía, por debajo del nivel propuesto para declarar que un animal presentó estro o que por lo menos no se encontró en la etapa de diestro de acuerdo al criterio de [P<sub>4</sub> sérica] <1.0 ng/ml. Además, al inicio del estro y al momento de la cirugía los valores de P<sub>4</sub> sérica resultaron similares en las hembras detectadas ( $p = 0.36$  y  $p = 0.29$ , respectivamente).

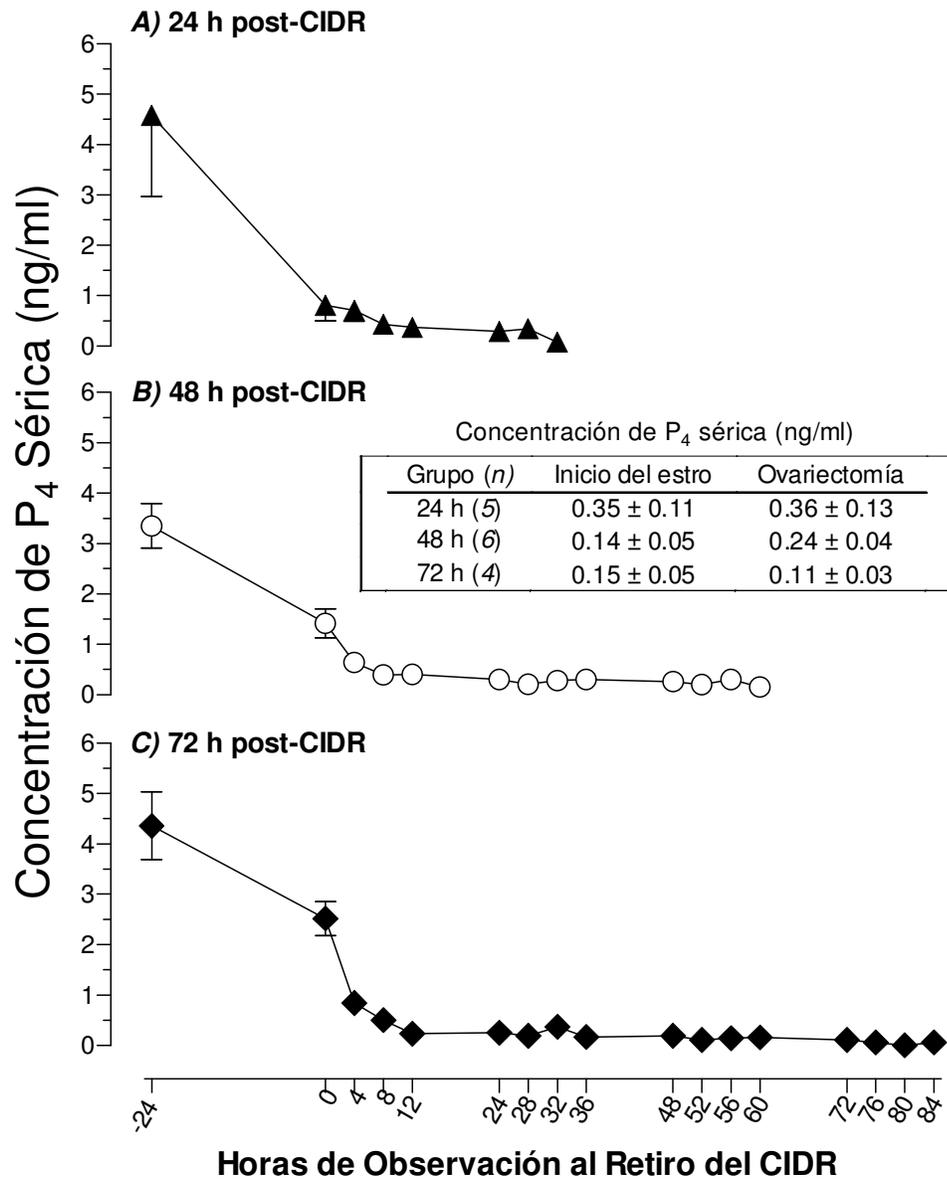
### Horas de Observación al Retiro del CIDR



● Inicio del estro ▲ Ovariectomía ☒ Hembra no detectada

Grupo (n)			
24 h post-CIDR	48 h post-CIDR	72 h post-CIDR	
Inicio del estro	24.2 ± 1.1 (4) A	45.2 ± 2.0 (3) B	67.0 ± 2.5 (3) C
Ovariectomía	32.2 ± 0.7 (5)	53.1 ± 0.8 (6)	78.5 ± 2.5 (4)

Figura 4. Inicio del estro y cirugía de las hembras dentro de los grupos de ovariectomía. Promedio ± EE del horario de inicio del estro para las hembras detectadas y de ovariectomía de todas las hembras incluidas en cada grupo. En paréntesis se presenta el número de integrantes por grupo. Literales diferentes entre columnas indican diferencias significativas ( $p < 0.001$ ). El horario de cirugía no se analizó debido a que no representa un factor biológico.



**Figura 5. Perfil de P<sub>4</sub> en suero de las hembras ovariectomizadas.**

Promedio  $\pm$  EE de la concentración de P<sub>4</sub> sérica obtenida en cada muestreo. Retiro del CIDR a -24 horas e inicio de observación continua a 0 horas. A partir del eje de las ordenadas se ha trazado una línea punteada para hacer evidente que la concentración de P<sub>4</sub> es  $<1$  ng/ml. El inserto muestra los valores promedio  $\pm$  EE obtenidos al momento del inicio del estro para las hembras detectadas y de la ovariectomía para cada grupo. Los valores de la concentración de P<sub>4</sub> resultaron similares entre los grupos ( $p > 0.05$ ).

## B. Segunda Parte

### 1. *Características del Folículo Dominante: Dinámica de Crecimiento*

El número promedio de folículos <5 mm de diámetro fue similar entre los grupos de hembras ovariectomizadas ( $p = 0.46$ ), al igual que los folículos de entre 5 y 10 mm de diámetro ( $p = 0.12$ ). En contraste, la categoría de folículos >10 mm de diámetro fue diferente para las hembras ovariectomizadas a las 24 y 48 h post-CIDR ( $p < 0.04$ ), mientras que las hembras del grupo de 72 h post-CIDR presentaron valores similares a los grupos anteriores ( $p > 0.05$ , Figura 6A). Esta información confirmó la existencia de por lo menos un folículo >10 mm de diámetro al momento de la ovariectomía, el cual se consideró como dominante. Para diferenciar de forma cuantitativa el crecimiento del folículo dominante con respecto a los folículos subordinados, se midió el diámetro del primer y segundo folículo subordinado presentes en el ovario (Figura 6B). En ambos casos, las hembras ovariectomizadas a las 24 h post-CIDR presentaron los diámetros más grandes para ambos tipos foliculares ( $p < 0.05$  y  $< 0.01$ , respectivamente).

Para ejemplificar el crecimiento de los folículos dominantes registrados en las hembras ovariectomizadas, en la Figura 7 se presentan los patrones representativos del incremento del diámetro folicular durante el período de observación continua de los grupos de 24 (panel A), 48 (panel B) y 72 h post-CIDR (panel C). El crecimiento del folículo dominante inició con un diámetro similar para los tres grupos de hembras ( $p = 0.09$ ). No obstante, las hembras ovariectomizadas a las 72 h post-CIDR iniciaron el período de observación continua con folículos numéricamente mayores ( $12.6 \pm 2.0$  mm), a diferencia de los grupos restantes ( $9.1 \pm 0.8$  y  $8.1 \pm 0.8$  mm, para 24 y 48 h post-CIDR, respectivamente). En contraste, el diámetro final resultó diferente entre las hembras de 48 y 72 h post-CIDR ( $p < 0.05$ ) y similar entre estos grupos y las hembras ovariectomizadas a las 24 h post-CIDR ( $p = 0.31$ ). La información anterior se presenta resumida en la Figura 8A. Asimismo, en las hembras del grupo de 72 h post-CIDR se obtuvo el promedio más alto del porcentaje de crecimiento del folículo dominante, esto con respecto a los grupos de 24 ( $p < 0.001$ ) y 48 h post-CIDR ( $p < 0.05$ , Figura 8B). En contraste, los porcentajes

de 24 y 48 h post-CIDR resultaron similares entre sí ( $p > 0.05$ ). En este sentido, el inserto de la figura ejemplifica el cambio del valor promedio del diámetro inicial y final correspondiente a cada grupo experimental.

Los resultados de la investigación muestran además que el crecimiento total de los folículos dominantes es significativamente diferente ( $p < 0.0001$ ) al comparar los grupos 24 y 48 h post-CIDR ( $3.5 \pm 0.3$  y de  $4.9 \pm 0.7$  mm, respectivamente) en contra de 72 h post-CIDR ( $9.2 \pm 0.3$  mm). A pesar de la evidente diferencia entre el crecimiento total de los grupos, la tasa de crecimiento diario de los folículos dominantes fue similar entre los tres grupos evaluados ( $p = 0.13$ ). El resumen de la información anterior se muestra en la Figura 9A. En el inserto de la misma figura se resumen los valores promedio de los días que perduró el crecimiento del folículo dominante, los cuales presentaron diferencias altamente significativas ( $p < 0.0001$ ) entre los grupos.

Para determinar la existencia de una relación entre el crecimiento total del folículo dominante y la tasa de crecimiento diario se realizó un análisis de regresión lineal entre las variables. Los resultados del análisis muestran un coeficiente de determinación  $R^2 = 0.66$  ( $p < 0.05$ , Figura 9B). El mismo tipo de análisis se utilizó para el crecimiento total y los días de crecimiento del folículo dominante y se encontró un coeficiente de determinación  $R^2 = 0.56$  ( $p < 0.05$ , Figura 9C).

De igual forma, mediante análisis de regresión se determinó la relación funcional entre el crecimiento del folículo dominante y el tiempo transcurrido durante el período de observación continua. Los valores de  $R^2$  obtenidos indican una estrecha relación entre ambas variables para las hembras ovariectomizadas a las 48 y 72 h post-CIDR (0.9 y 0.74, respectivamente). En contraste, las hembras de 24 h post-CIDR no presentaron una relación evidente, ya que el valor del coeficiente de determinación  $R^2$  fue demasiado bajo (0.17) y la pendiente del modelo no fue diferente de cero ( $p > 0.05$ ). Los ajustes de los datos experimentales se presentan en la Figura 10.

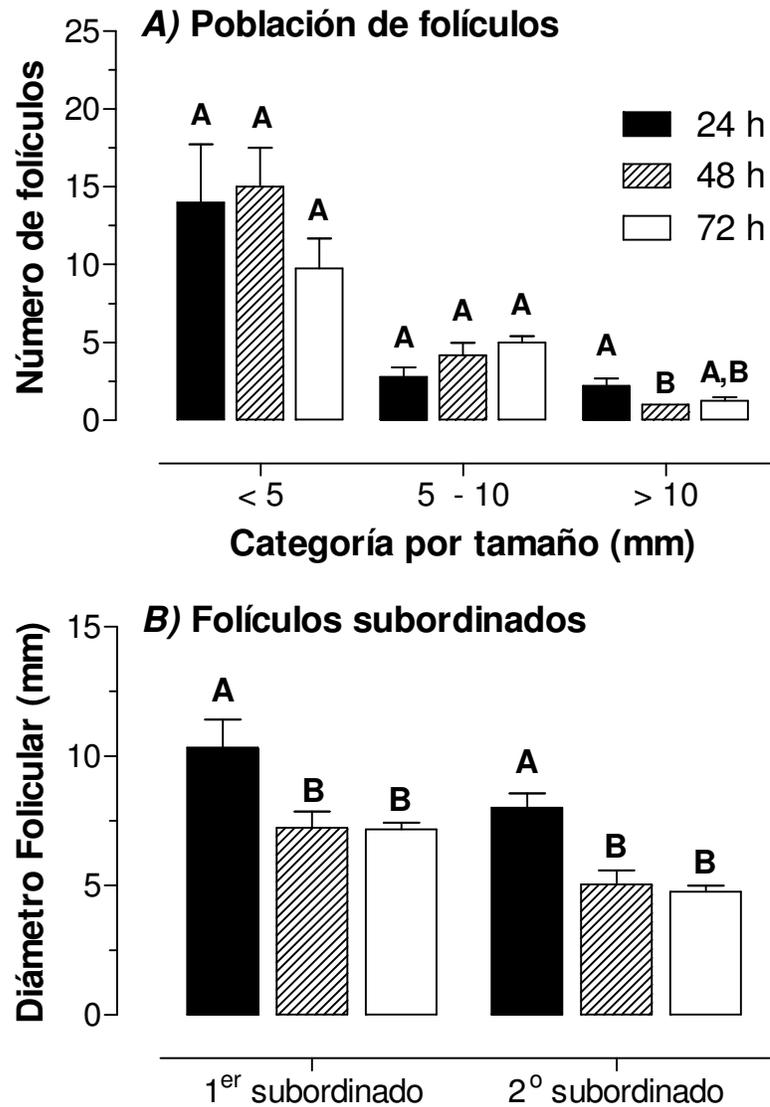


Figura 6. **Población de folículos presentes al momento de la ovariectomía.** Promedio  $\pm$  EE del número de folículos registrados por cada categoría (<5, 5 - 10 y >10 mm de diámetro) al momento de la ovariectomía (**A**) y diámetro folicular del 1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> folículo subordinado registrado mediante ultrasonografía (**B**). Las barras que no comparten literal dentro de una categoría son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

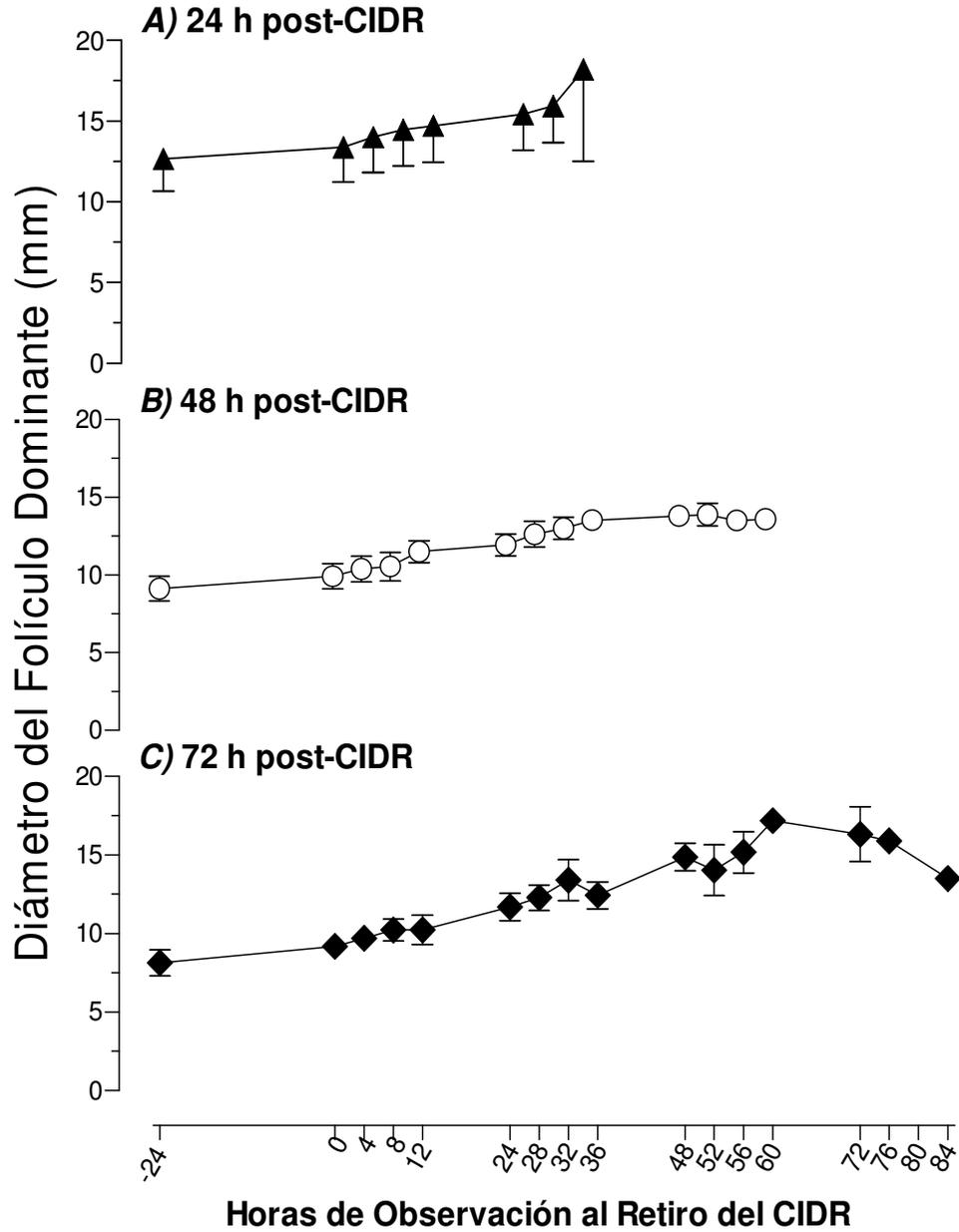


Figura 7. Patrón de crecimiento del folículo dominante.

Promedio  $\pm$  EE del crecimiento del folículo dominante y del perfil de P<sub>4</sub> sérica de las hembras de 24 (A), 48 (B) y 72 h post-CIDR (C). El retiro del CIDR corresponde a -24 horas.

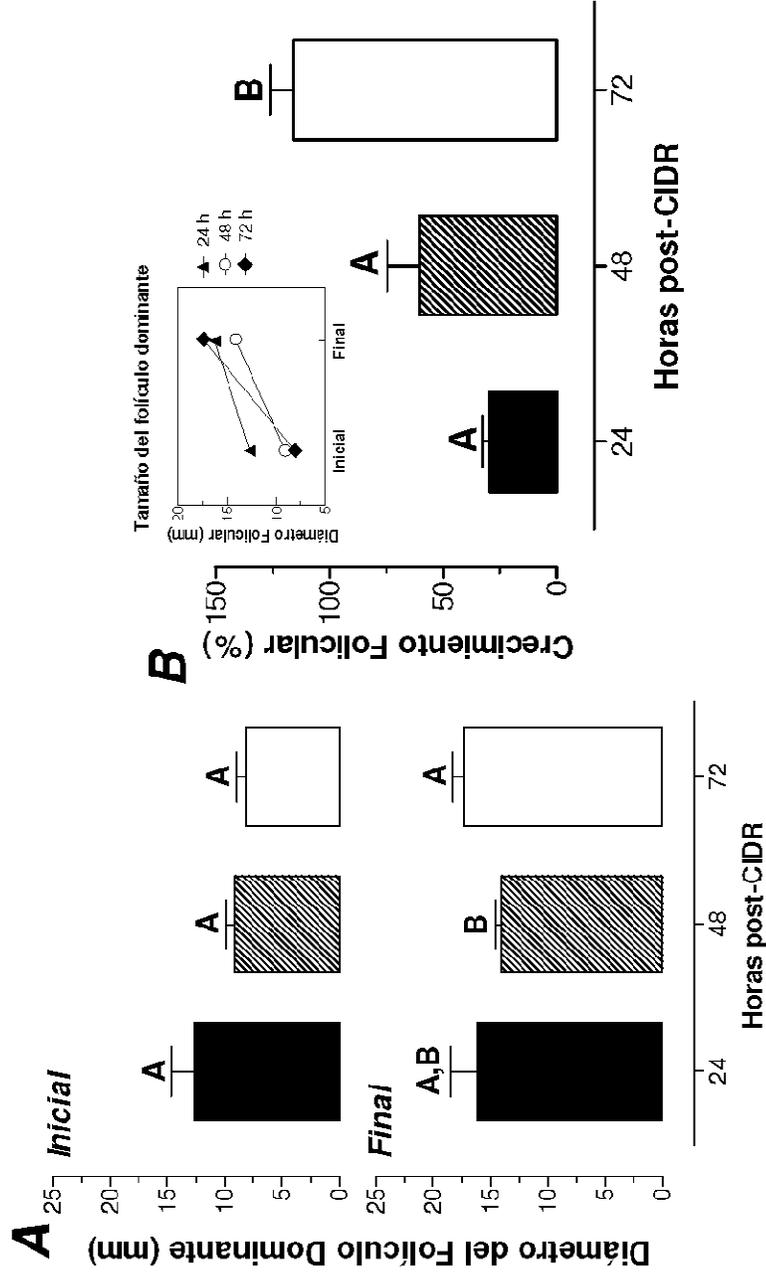


Figura 8. **Diámetro inicial y final del folículo dominante.** Promedio  $\pm$  EE del diámetro inicial (panel superior) y final (panel inferior) del folículo dominante de las hembras ovariectomizadas (**A**) y del porcentaje de crecimiento de los folículos dominantes detectados (**B**). El inserto del panel B muestra el cambio del tamaño del folículo dominante. Las barras que no compartan literal dentro de cada panel son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

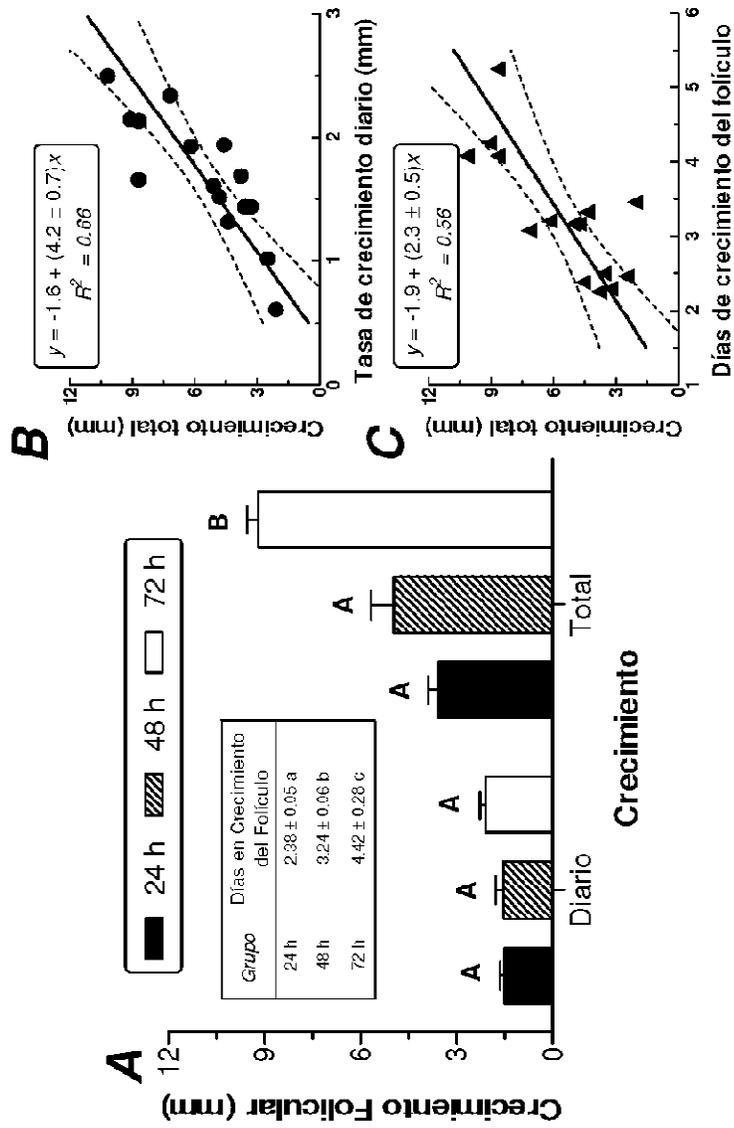


Figura 9. Características de crecimiento del folículo dominante. Promedio + EE, del crecimiento diario y total del folículo dominante (A) y análisis de regresión lineal para el crecimiento total con respecto a la tasa de crecimiento diario (B) y a los días de crecimiento del folículo dominante (C). En B y C, se incluyeron todos los datos experimentales y se muestran los coeficientes de determinación. Barras que no comparten la misma literal difieren significativamente al nivel de  $p < 0.001$ .

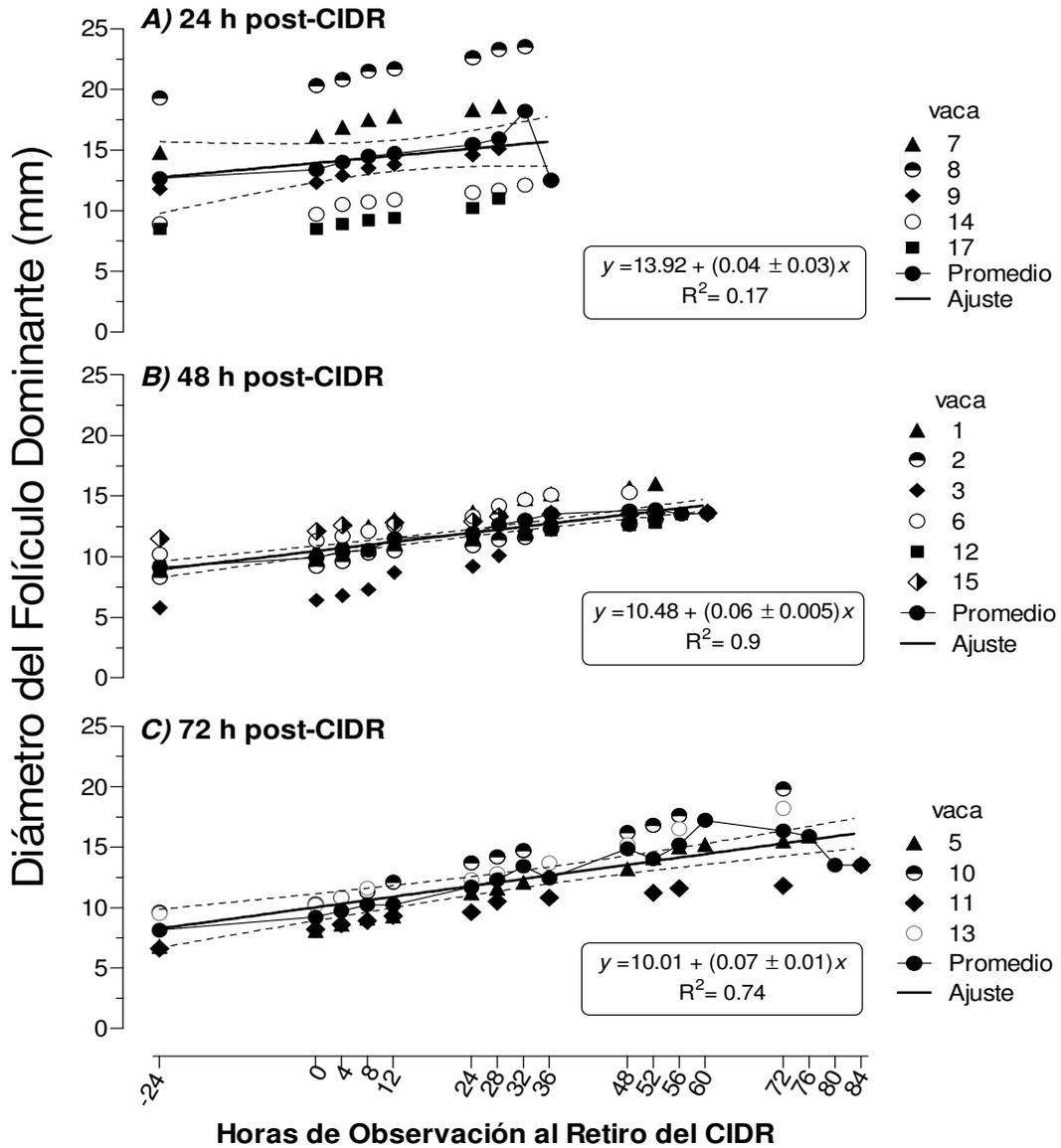


Figura 10. Análisis de regresión lineal para el crecimiento del folículo dominante con respecto al tiempo.

Los puntos experimentales representan la dispersión del crecimiento del folículo dominante de cada hembra con respecto al tiempo para los grupos de 24 (A), 48 (B) y 72 h post-CIDR (C). Se ajustaron los datos sobre el promedio de las observaciones de cada grupo experimental y los parámetros obtenidos se presentan en el inserto.

### C. Tercera Parte

#### 1. Capacidad Esteroidogénica del Folículo Dominante

##### a) Producción de Hormonas Esteroides en Líquido Folicular

Al momento de la cirugía, la concentración de E<sub>2</sub> de las hembras de 72 h post-CIDR fue significativamente más alta en comparación a 24 y 48 h post-CIDR (2 y ~3 veces, respectivamente;  $p < 0.01$ ). Mientras que los grupos restantes presentaron valores similares de la hormona ( $p > 0.05$ , Figura 11A). El análisis de covarianza indicó que la covariable diámetro folicular presentó un efecto altamente significativo ( $p < 0.005$ ). Así, la covariable explica en gran medida la variación total observada en los niveles de E<sub>2</sub> de los grupos. El coeficiente de regresión de la variable E<sub>2</sub> dada la covariable diámetro folicular nos indica que la concentración de E<sub>2</sub> se modificará en 1.79 unidades por cada unidad de cambio en el diámetro folicular.

La concentración de T<sub>4</sub> folicular no presentó diferencias a través de los grupos ( $p = 0.88$ , Figura 11B). En todos los casos la concentración del andrógeno fue significativamente menor a la del estrógeno ( $p < 0.001$ ) y únicamente para 48 h post-CIDR cuando se le comparó contra P<sub>4</sub> ( $p < 0.05$ ). La concentración de P<sub>4</sub> también fue similar entre los grupos ( $p = 0.18$ ), con valores numéricamente mayores para 48 h post-CIDR con respecto a los grupos restantes (Figura 11C).

Además se realizó un análisis de correlación entre los valores promedio de la concentración de las hormonas esteroides y el diámetro folicular, y se utilizó para ello el total de los datos de los tres grupos. Los resultados mostraron que únicamente E<sub>2</sub> y el diámetro folicular presentaron un coeficiente de correlación de Pearson significativo ( $r = 0.76$ ;  $p < 0.002$ ). En cambio, T<sub>4</sub> y P<sub>4</sub> presentaron coeficientes de correlación no significativos (-0.02,  $p = 0.94$  y 0.27,  $p = 0.31$ , respectivamente).

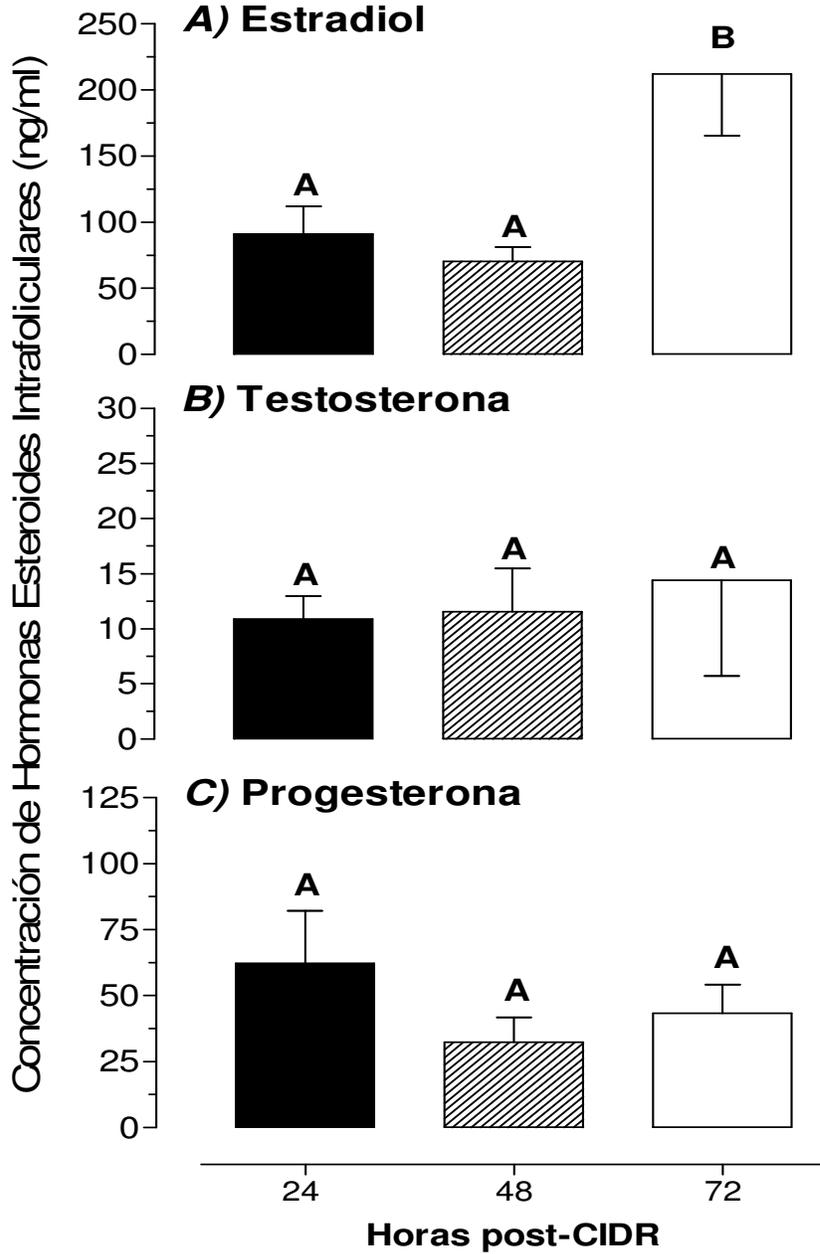


Figura 11. **Concentración de hormonas esteroides en muestras de líquido folicular.**

Las barras graficadas representan el promedio  $\pm$  EEM de la concentración (ng/ml) de  $E_2$  (**A**),  $T_4$  (**B**) y  $P_4$  (**C**) en muestras de líquido folicular extraídas del folículo dominante de los grupos de hembras ovariectomizadas. Dentro de cada panel las barras con diferentes literales son significativamente diferentes ( $p < 0.01$ ).

b) Expresión de P450scc en Pared Folicular

Con la intención de realizar un análisis semi-cuantitativo de la expresión de las enzimas esteroideogénicas P450scc y P450arom en tejido folicular, se utilizaron las imágenes de IF digital de los cortes de ovarios criopreservados.

Una reconstrucción representativa de la inmunofluorescencia analizada para P450scc se presenta en la Figura 12. En la imagen se detecta un marcaje continuo y con diferentes intensidades del tejido inmunoteñido para la enzima. La zona celular que presentó reacción inmune corresponde al citoplasma de los dos tipos celulares que conforman la pared folicular: células de la granulosa y teca interna.

La distribución de la intensidad de fluorescencia con respecto al área inmunoteñida contra P450scc en las células de la granulosa (Figura 13A) y teca interna (Figura 13B) nos indica que los picos de fluorescencia y la forma de las curvas resultaron característicos para cada grupo. En ambos tipos celulares el área inmunoteñida de las hembras de 72 h post-CIDR es mayor al compararse con los grupos restantes. Sin embargo, a pesar de la mayor cantidad de tejido que presenta inmunotinción, la intensidad de fluorescencia es inferior para 72 h post-CIDR que para los otros grupos. Así, las curvas de 24 y 48 h post-CIDR muestran que en éstas se presenta una mayor intensidad de fluorescencia en una menor área inmunoteñida. Tendencia que se aprecia en las curvas de distribución normalizadas con respecto al área inmunoteñida (insertos Figura 13A y B). Por su parte los controles negativos presentaron un pico discreto de fluorescencia, con poca variabilidad (Figura 13A y B).

Los promedios de la fluorescencia relativa de P450 para las células de la granulosa y de la teca interna se presentan en la Figura 14A y B, respectivamente. Para las células de la granulosa, las hembras ovariectomizadas a las 72 h post-CIDR presentaron valores de fluorescencia relativa más altos con respecto al grupo de 24 h post-CIDR ( $p < 0.05$ ) y similares al de 48 h post-CIDR ( $p = 0.30$ ). Mientras que los grupos de hembras de 24 y 48 h post-CIDR fueron similares ( $p = 0.25$ ). Con respecto a teca interna, se encontró que las hembras del grupo de 72 h post-CIDR tuvieron valores mayores con que el de 24 h post-CIDR ( $p < 0.05$ ), pero similares al

de 48 h post-CIDR ( $p = 0.33$ ). A su vez, estos dos últimos grupos resultaron similares entre sí ( $p = 0.23$ ).

c) Expresión de P450arom en Células de la Granulosa

La detección de la proteína P450arom se localizó exclusivamente en las células de la granulosa (Figura 15). La distribución de la intensidad de fluorescencia en los grupos presenta valores menores para el Grupo 72 horas, pero con un área inmunoteñida  $\sim 3$  veces mayor, con respecto a los grupos restantes (Figura 13C). El inserto de la figura muestra las curvas normalizadas que resaltan las diferencias entre los picos de fluorescencia.

Los valores de fluorescencia relativa para P450arom en las células de la granulosa se resumen en la Figura 14C. Se encontraron diferencias significativas entre las hembras ovariectomizadas a las 48 y a las 72 h post-CIDR ( $p < 0.01$ ). En contraste, se presentaron valores muy similares entre el grupo de 24 y 48 h post-CIDR ( $p = 0.73$ ) y una similitud ligera entre los valores de 24 y 72 h post-CIDR ( $p = 0.06$ ).

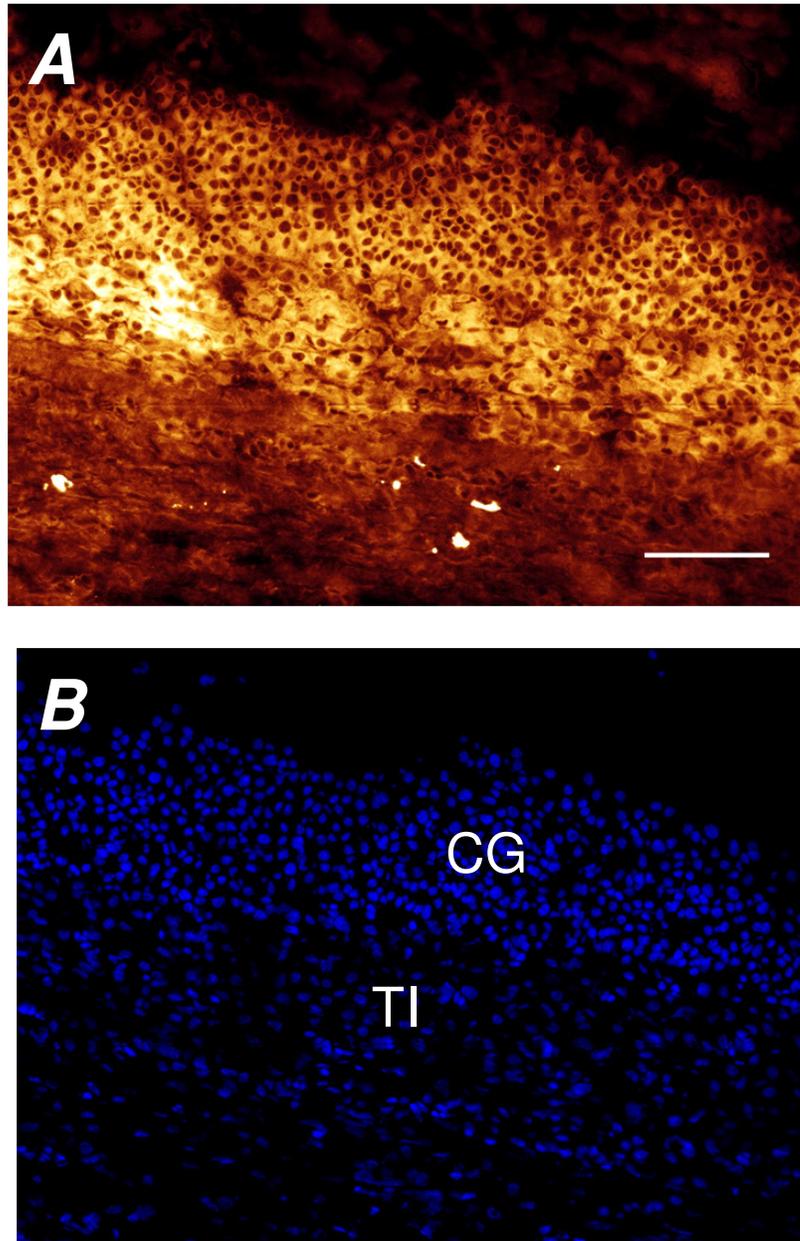


Figura 12. **Localización de la expresión de P450scc por inmunofluorescencia en folículos dominantes.**

La reconstrucción muestra la inmunotinción de P450scc en las células de la granulosa (CG) y en teca interna (TI) en criosecciones de un folículo dominante de 13 mm (**A**) y el mismo campo con núcleos contrateñidos con DAPI (**B**). Ampliación del objetivo, 20x. La barra representa 100  $\mu$ m.

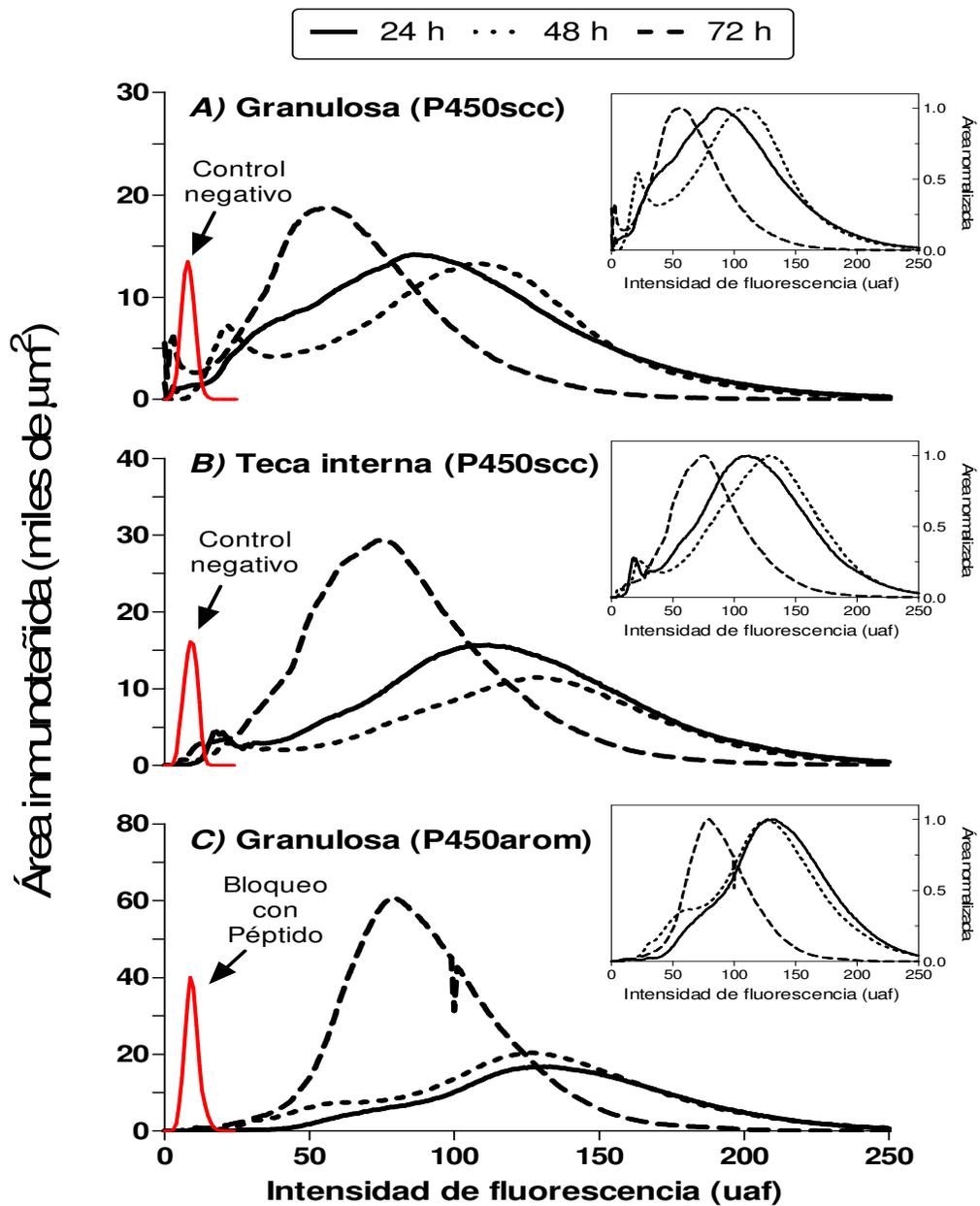


Figura 13. Curvas de distribución de la intensidad de fluorescencia para P450scc y P450arom en células de la pared folicular.

Distribución promedio de la intensidad de fluorescencia para la identificación de la expresión de P450scc en células de la granulosa (A) y teca interna (B) y para P450arom (C). Con la intención de mostrar las diferencias encontradas entre los grupos de cada tipo celular, en los insertos de cada panel se muestran las curvas de distribución normalizadas con respecto al área inmunoteñida.

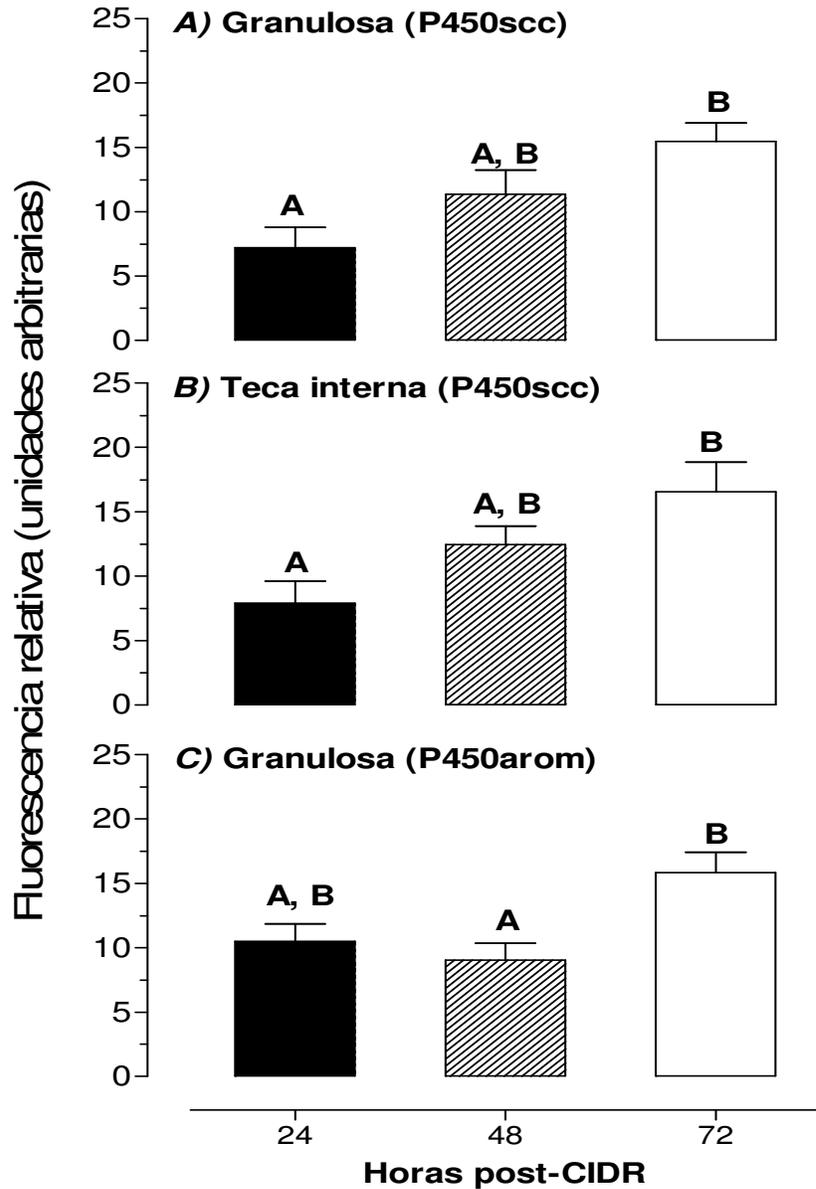
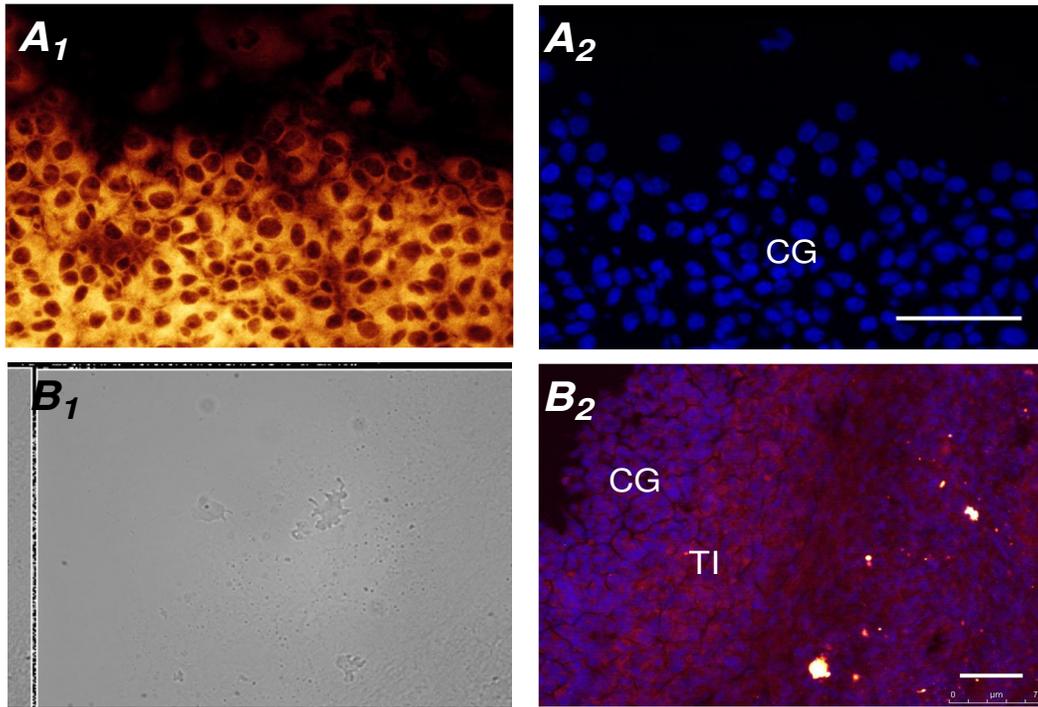


Figura 14. Fluorescencia relativa para P450scc y P450arom en células de la pared folicular.

Promedios  $\pm$  EE de la fluorescencia relativa que se utilizó como índice de expresión de las proteínas de P450scc en las células de la granulosa (**A**) y de la teca interna (**B**) y P450arom (**C**). Literales diferentes entre columnas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



**Figura 15. Localización de la expresión de P450arom por inmunofluorescencia en reconstrucciones de folículos dominantes.**

Inmunotinción de P450arom en células de la granulosa de un folículo dominante de 15 mm (**A<sub>1</sub>**), el mismo campo con núcleos contrateñidos con DAPI (**A<sub>2</sub>**). Inmunotinción de folículos utilizados como controles negativos con pre-absorción del anticuerpo primario, imagen en contraste de fases (**B<sub>1</sub>**) e imagen del mismo campo con nula inmunoreactividad y núcleos contrateñidos (**B<sub>2</sub>**). La barra representa 25 y 50  $\mu\text{m}$  para A y B, respectivamente. Ampliación del objetivo, 63 y 40x para A y B, respectivamente.

## VII. DISCUSIÓN

### A. Factores que Afectan la Expresión del Estro en *Bos indicus*

El intervalo observado de inicio del estro en las hembras detectadas coincide con el esperado de 24 a 72 horas propuesto por Verduzco et al. (2006). El período en que se registró actividad sexual sugiere que los animales sincronizados de forma secuencial mediante CIDR presentan una amplia variabilidad en la respuesta al esquema de sincronización. Nuestras observaciones coinciden con estudios recientes realizados por nuestro grupo de trabajo que detectan variaciones en el inicio del estro después de utilizar un método de sincronización similar al nuestro (Díaz et al. 2002; Fetter et al. 2006; Forster et al. 2007; Acevedo et al. 2007). En el mismo contexto, Alonso et al. (2009) encontraron la existencia de variabilidad en el inicio del estro en un grupo de 114 hembras *B. indicus* sincronizadas y divididas en dos grupos para IA a tiempo fijo a las 48 y 72 horas después del tratamiento. Los autores encuentran que las hembras con mayor intensidad del estro (determinado por el número de montas realizadas) inician su actividad sexual primero, la cual además dura por más tiempo con respecto a las hembras de baja intensidad y menor duración del estro. De acuerdo a los autores, la jerarquía e intensidad del estro determinan parcialmente la hora de inicio del estro después de un programa de sincronización. Es posible que estos factores, que no fueron estudiados en nuestra investigación, expliquen parte de variabilidad que observamos. Por ejemplo, las hembras detectadas a las 24 h post-CIDR pudieron presentar estros de mayor intensidad, ya que existía un mayor número de hembras disponibles para la monta y en consecuencia iniciar antes su actividad sexual, tal y como se observó. Asimismo, la reducción gradual de las parejas de monta por efecto de la ovariectomía pudo haber ocasionado la expresión de estros de menor intensidad en las hembras de los grupos de 48 y 72 h post-CIDR, ocasionando como resultado un retraso en la expresión de conducta sexual.

Cabe resaltar que el inicio del estro detectado para las hembras ovariectomizadas a las 48 h post-CIDR ( $45 \pm 2.0$  h) se ajusta bien a la referencia de 48 horas comúnmente publicada en este tipo de ganado (Galina y Arthur 1990) y

que se utiliza para los programas de IA a tiempo fijo (Bo et al. 2003). No obstante, las hembras detectadas de los grupos 24 y 72 h post-CIDR presentaron una respuesta que puede disminuir la eficiencia reproductiva si se utilizan protocolos de IA a tiempo fijo. Ya que en dichas hembras la expresión del estro puede ocurrir de manera temprana o tardía con respecto al momento de la inseminación, provocando que la misma se realice cuando la ovulación en las hembras lleva ya demasiadas horas ó sin que necesariamente las hembras hayan ovulado. Resultados previos obtenidos por Alonso et al. (2009) coinciden con esta idea, ya que en su estudio las hembras inseminadas a las 48 horas dentro de un programa de IA a tiempo fijo presentan mayor probabilidad de quedar gestantes que aquellas que se inseminan a las 72 horas, lo anterior cuando se utiliza CIDR como método de sincronización del estro.

Nuestros resultados señalan que la sincronización con CIDR produce una respuesta heterogénea debido a que algunas hembras aparentemente aceleran la expresión de la conducta sexual (grupo 24 h post-CIDR), mientras que otras al parecer retardan la aparición de los signos de estro (grupo 72 h pos-CIDR). Esto último cuando se comparan ambos grupos con las hembras de 48 h post-CIDR. En este contexto, Diaz et al. (2002) demuestran que las novillonas *B. indicus* sincronizadas mediante CIDR adelantan la expresión del estro ~10 horas con respecto a las hembras que recibieron, además, una dosis de estrógenos (CIDR + BE). Asimismo, los autores encuentran que del 70% de hembras que expresan estro, únicamente ovula un 41%. Por tal motivo, se necesitan más estudios para determinar si las hembras que presentan estro a diferentes momentos durante el período de observación son capaces de ovular y si presentan las condiciones fisiológicas para ello.

En nuestro estudio se presentaron hembras no detectadas en estro (8/18). Resultado que no es sorprendente, ya que tenemos evidencia previa que demuestra que en ganado *B. indicus* se logra detectar únicamente entre el 55 y el 65% de las hembras en estro (Orihuela et al. 1983; Landivar et al. 1985). Por tal motivo, para explicar la falla en la detección del estro primero tenemos que analizar las posibles causas que

provocaron la ausencia de actividad sexual. Por un lado, se presentó la lesión de tres hembras durante el desarrollo del experimento, evento que aparentemente impidió que estas hembras exhibieran conducta sexual. A este respecto, Walker et al. (2008) señala que los estresantes crónicos, como la laminitis, pueden afectar la intensidad del estro a pesar de que la incidencia de estro no se modifica. No obstante, dos de las hembras presentaron una claudicación severa de una de las extremidades, factor que a nuestro parecer impidió que las hembras presentaran disposición a montar o ser montadas, y en general a mostrar cualquier actividad sexual. La hembra restante presentó un prolapso que posiblemente evitó la expresión de signos conductuales del estro. Por otro lado, las cinco hembras restantes sí exhibieron una o varias de las conductas sexuales características del estro. Sin embargo, en estas hembras no fue posible determinar con precisión el inicio del estro. Algunas de las posibles causas se discuten a continuación.

Algunas de las hembras no detectadas en celo franco formaron un GSA con vacas que se ovariectomizaron antes que ellas. Evento que probablemente alteró la estructura del grupo después de que se estableció, ya que las hembras *B. indicus* tienen una marcada tendencia para interactuar con las mismas parejas de monta a través de los diferentes ciclos estrales, debido a que tienen estructuras sociales bien consolidadas (Castellanos et al. 1997). Además, las características de nuestro estudio implicaron un manejo intensivo de los animales y por consiguiente una continúa interrupción de cada GSA formado, alterando con ello los patrones de actividad sexual y la aparición de signos claros de estro en los animales no detectados.

Por otra parte, es bien sabido que la composición y número de integrantes del grupo afectan la expresión e intensidad del estro en animales sincronizados (Galina et al. 1996). A este respecto trabajos realizados en *B. taurus* (Hurnik et al. 1975; Castellanos et al. 1997) y en *B. indicus* (Cortes et al. 1999) concluyen que el número de montas por hora se incrementa cuando dos o más vacas se encuentran sexualmente receptivas al mismo tiempo. Además, los resultados de Lamothe et al. (1995) sugieren que la probabilidad de que una hembra sola muestre actividad sexual es muy baja (~10%). Por consiguiente, sería difícil obtener actividad dentro de un

GSA que ha reducido su número de integrantes por causa de la ovariectomía en las hembras detectadas. Especialmente, cuando en nuestro experimento el único criterio para determinar el inicio del estro se basó en el número de montas recibidas. Por tales motivos, y tomando en cuenta trabajos previos que demuestran la baja tendencia de las hembras *B. indicus* para permitir ser montadas en períodos cortos de tiempo (Galina et al. 1982; Orihuela et al. 1983), es posible sugerir que los experimentos en los que se altera la composición del hato y la formación de GSA, se reconsidere sí el comportamiento de monta permanece como el indicador ideal para determinar el inicio del estro o sí las señales de estro secundarias pueden representar una alternativa dentro de los procesos de observación para la detección del estro (Van Eerdenburg et al. 2002). En este sentido el uso de un sistema de cuantificación de la conducta sexual, basado en una escala de puntuación de cada uno de los signos conocidos de estro, se puede considerar como una solución para la determinación del estro en hembras que modifican su conducta sexual a causa de diversos factores de manejo (Van Eerdenburg et al. 1996).

La jerarquía social del grupo de animales sincronizados representa otro factor importante para la expresión y detección del estro. En un estudio realizado por Orihuela et al. (1988) encuentran que ~60% de las montas que recibe una hembra en celo provienen de vacas con mayor jerarquía dentro del hato, las cuales necesitan más tiempo para ser detectadas en celo (Landaeta-Hernandez et al. 2002) debido a que presentan menor disposición a ser montadas (Castellanos et al. 1997), complicando aún más la detección del estro de animales con las jerarquías más altas. Desafortunadamente por la naturaleza del experimento no fue posible determinar en el presente estudio la situación precisa de la estructura social del hato. Sin embargo, este componente se considera importante para el estudio de los factores que afectan el desempeño reproductivo del ganado *B. indicus* (Orihuela 2000).

De forma característica, todas las hembras del experimento (detectadas y no detectadas en estro) presentaron al momento de la cirugía un folículo dominante (>10 mm de diámetro). Este resultado concuerda con datos que indican que la mayoría de las hembras que expresan celo franco presentan folículos  $\geq 10$  mm

capaces de ovular (Acevedo et al. 2007; Maquivar et al. 2007). Con respecto a las vacas que no fueron detectadas, se han detectado hembras con folículos dominantes que ovulan sin presentar estro (Verduzco et al. 2006) y otras que, aún con la presencia de un folículo dominante, son incapaces de expresar estro y ovular (Maquivar et al. 2007). En el mismo contexto, los datos de ultrasonografía de los grupos muestran la existencia de un desarrollo folicular y la presencia de un folículo dominante, información que contrasta con publicaciones previas en donde detectan la existencia de vacas que exhiben conducta sexual aún con el implante de P<sub>4</sub> todavía colocado y con folículos de entre 4 y 9 mm de diámetro incapaces de ovular (Cortes et al. 1999; Maquivar et al. 2002; Isidro et al. 2005). En consecuencia, nuestros resultados apoyan la idea de que la expresión de la conducta sexual y la ovulación no se pueden predecir en términos exclusivos del diámetro del folículo dominante (Dimmick et al. 1991; Ruiz-Cortes y Olivera-Angel 1999). Por tal motivo, se requieren más investigaciones para determinar las posibles causas que ocasionan que las hembras con crecimiento folicular y desarrollo de un folículo dominante no muestren conducta sexual. Por ejemplo, en ganado *B. indicus* se ha sugerido que probablemente los folículos dominantes de las hembras que carecen de expresión del estro no son estrogénicamente activos, capaces de producir pulsos de LH y con ello la ovulación.

Además de la presencia del folículo dominante se detectaron concentraciones de P<sub>4</sub> <1 ng/ml, información que confirma que las hembras probablemente se encontraban en estro. Sin embargo, los resultados obtenidos por Cavestany y Galina (2001a) indican que en un programa de IA en ganado lechero basado en la detección de señales visuales del estro, hasta el 11% de inseminaciones se realizan en el momento erróneo, cuando las concentraciones de P<sub>4</sub> en leche se encuentran en niveles correspondientes a la fase lútea. Además, el uso de los patrones de P<sub>4</sub> en leche para comprobar la expresión del estro en grupos de hembras ciclando, muestra en general una eficiencia cercana al 47% (Cavestany y Galina 2001b), lo cual indica que algunas hembras no presentan conducta sexual a pesar de presentar actividad ovárica. Más aún, hasta el 52% de las ovulaciones que se determinan de

acuerdo a la concentración de P<sub>4</sub> en leche nunca son observadas en términos de la expresión del estro (Cavestany y Galina 2001b). Por tal razón, la deficiencia en la detección del estro en las hembras del nuestro estudio coincide con datos previos que señalan que algunas hembras son incapaces de mostrar estro a pesar de tener perfiles de P<sub>4</sub> indicativos de actividad cíclica (Orihuela et al. 1983; Castellanos et al. 1997). De hecho, Vaca et al. (1985) encuentran que el 20% de los animales de su estudio no presentan celo durante 53 días de observación, a pesar de tener perfiles de P<sub>4</sub> correspondientes a animales que se encontraban ciclando.

En el mismo contexto cabe mencionar que la súbita disminución de la concentración periférica de P<sub>4</sub> registrada con la lisis del cuerpo lúteo no es suficiente para aumentar la expresión del estro en vacas *B. indicus* (Moreno et al. 1986). Esto a pesar de que la reducción de los niveles de P<sub>4</sub> incrementa la concentración de E<sub>2</sub> y con ello aumenta la frecuencia en los pulsos de LH, ocasionando el desarrollo de los folículos y la concomitante expresión del estro. De esta forma, una deficiencia en el acoplamiento entre la disminución de P<sub>4</sub> y el incremento en las concentraciones de E<sub>2</sub> y LH por parte de los folículos dominantes en crecimiento pudieran ocasionar la ausencia de expresión de estro y la serie de procesos subsecuentes. Resulta pues necesario determinar si en un programa de sincronización con CIDR, la disminución de P<sub>4</sub> ocasionada por el retiro del implante provee las condiciones endocrinas apropiadas para inducir la ovulación.

En conjunto nuestros resultados y aquellos publicados previamente en otros estudios resaltan la variabilidad en la respuesta a estro que se obtiene en las hembras sincronizadas mediante CIDR. Sin duda, estas observaciones refuerzan la idea de que la detección del estro permanece como uno de los principales factores que afectan la aplicación de la IA, y en general la implementación de programas de reproducción asistida en el trópico (Galina y Orihuela 2007). Resulta, por tal razón, necesario estudiar a detalle que tipo de factores (internos y externos) regulan la respuesta a los programas de sincronización, con la intención de ofrecer alternativas para controlar dicha variabilidad y así incrementar los parámetros reproductivos de las hembras *B. indicus* en el trópico mexicano. De esta manera, podemos señalar que

la expresión del estro es un proceso multifactorial y complejo que no se puede explicar ni predecir en términos de una sola variable.

#### B. Las Hembras Sincronizadas Presentan Patrones Característicos de Crecimiento Folicular

El diámetro final del folículo dominante presentó un intervalo de 11 a 23.5 mm, que es similar al propuesto por diferentes autores (Figueiredo et al. 1997; Bo et al. 2003; Saumande y Humblot 2005). Por otro lado, el promedio de la tasa de crecimiento diario de los folículos se situó entre 1.5 a 2.1 mm/día, valores que concuerdan en general con estudios realizados en *B. indicus* con vacas ovulando (Maquivar et al. 2007) y novillonas (Rhodes et al. 1994; Rhodes et al. 1995a). Sin embargo, nuestros resultados son superiores a las tasas de crecimiento registradas en vacas que no ovulan (Maquivar et al. 2007), vacas amamantando (Ruiz-Cortes y Olivera-Angel 1999) y en novillonas inducidas al anestro (Rhodes et al. 1996). Con respecto a *B. taurus*, Sirois and Fortune (1988) encuentran resultados similares a nuestros hallazgos. En contraste Savio et al. (1988) encontraron tasas de crecimiento diario en novillonas con dos y tres ondas foliculares de 2.95 y 3.61 mm/día, respectivamente, que son superiores a las aquí presentadas. En este contexto, varios estudios señalan que conforme aumenta el número de ondas foliculares se incrementa la tasa de crecimiento del folículo preovulatorio debido a que concomitantemente disminuye el número de días que perdura el folículo dominante antes de su ovulación (Sirois y Fortune 1988; Rhodes et al. 1994; Rhodes et al. 1995a). No obstante, observamos una tendencia contraria ya que la tasa de crecimiento diario aumentó conforme se incrementó el número de días que pasó cada folículo dentro del ovario.

Probablemente, las diferencias observadas en el patrón de crecimiento de las hembras ovariectomizadas se asocian al hecho de que éstas iniciaron el período de crecimiento con folículos de diferentes tamaños, reflejando la variabilidad existente entre las hembras sincronizadas. Por ejemplo las hembras de 72 h post-CIDR presentar el mayor crecimiento total con respecto a los demás grupos (2.5 y 1.8 veces mayor para los grupos de 24 y 48 h post-CIDR, respectivamente). La anterior

observación se explica en términos de la tasa de crecimiento diario y de los días de crecimiento del folículo dominante, ya que las hembras de este grupo presentaron la tasa de crecimiento más alta y un mayor número de días durante los cuales creció el folículo dominante. Awasthi et al. (2007) encuentran un comportamiento similar en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*). Su estudio demuestra que las hembras que inician la sincronización con folículos significativamente más pequeños, tienen una tasa de crecimiento diario mayor y requieren más días de crecimiento para llegar a la ovulación, presentado por lo tanto un mayor crecimiento total. Esto sin que existan diferencias entre el diámetro de los folículos preovulatorios de estas hembras y las que inician con folículos de mayor tamaño, tal como ocurrió en nuestro experimento.

Por otra parte, se ha demostrado que el retraso en la expresión del estro y la ovulación en algunos integrantes de un grupo sincronizado de bovinos (Kastelic et al. 1990; Kastelic y Ginther 1991) o búfalos (Brito et al. 2002; Awasthi et al. 2007), ocurre debido a que dichos animales ovulan a partir del segundo folículo más grande (proveniente de la segunda onda folicular), el cual inicia con un tamaño menor y tiene una mayor tasa de crecimiento diario. A diferencia de las hembras que ovulan a partir del folículo dominante de la primera onda folicular, que tiene como características un tamaño inicial mayor y una menor tasa de crecimiento diario. Un escenario similar puede explicar la aparente aceleración y retraso en la respuesta de las hembras ovariectomizadas a las 24 y 72 h post-CIDR, respectivamente. Sin embargo, todas las hembras sincronizadas continuaron con el crecimiento del folículo más grande que se registró al inicio del período de observación. Además, debido a que no se presentaron diferencias significativas entre los valores de la tasa de crecimiento no podemos saber si los folículos dominantes de los grupos provenían de hembras en la primera, segunda o tercera onda folicular. Los cuales, de acuerdo a Fortune et al. (2001) pueden ovular si presentan las condiciones apropiadas para ello durante su etapa de dominancia, sin importar la onda folicular en la cual se desarrollaron.

Por otra parte, en las hembras ovariectomizadas a las 48 y 72, pero no en las de 24 h post-CIDR se detectó una relación funcional entre el crecimiento del folículo y el tiempo. Estas observaciones coinciden con los resultados de Maquivar et al. (2007). Sus datos muestran una amplia variabilidad y coeficientes de determinación que van de 0.02 a 0.9, de los cuales únicamente un grupo de hembras que no ovularon presentaron una relación estrecha entre crecimiento y tiempo ( $R^2 = 0.9$ ). La variación en los coeficientes de determinación de los grupos sugiere la existencia de diferencias importantes en los patrones de crecimiento de los folículos dominantes de las hembras sincronizadas. Para ejemplificar lo anterior tenemos a las hembras de 24 h post-CIDR que presentaron en promedio un diámetro inicial numéricamente mayor a los grupos restantes y un menor porcentaje de crecimiento folicular, razón por la cual se observó una baja relación entre el crecimiento y el tiempo de observación. Datos contrastantes con los del grupo de 72 h post-CIDR, en el cual las hembras iniciaron su etapa de crecimiento con los folículos numéricamente más pequeños. Es probable que este comportamiento explique porque las hembras ovariectomizadas a las 24 h post-CIDR aparentemente aceleraron su expresión del estro con respecto a las demás hembras; iniciaron el período de observación con folículos de mayor tamaño, los cuales alcanzaron su diámetro final en menor tiempo y estaban probablemente más próximos a la ovulación. Asimismo, las hembras de 72 h post-CIDR aparentemente retardaron su expresión del estro, ya que al iniciar el crecimiento con los folículos más pequeños requirieron de un mayor número de días para llegar al diámetro preovulatorio.

En conclusión, la presencia de un folículo dominante es una condición necesaria, pero no suficiente, para la expresión del estro. Por tal razón, el patrón de crecimiento de los folículos dominantes representa una mejor herramienta para la predicción del momento de la ovulación para los programas de IA en hembras *B. indicus*, ya que sí se logra estratificar a las hembras de acuerdo a su tamaño inicial del folículo al momento de la sincronización se puede proceder a la inseminación tomando en cuenta el tamaño inicial del folículo, la tasa de crecimiento y una aproximación de los días necesarios para alcanzar el diámetro preovulatorio. Sin

embargo, el escenario anterior parece poco útil para grupos grandes de hembras sincronizadas. Por tal razón, el control farmacológico de la onda folicular representa una mejor alternativa, aunque a un elevado costo económico, para asegurar que todas las hembras inicien el tratamiento con folículos de tamaño similar.

### C. Actividad Esteroidogénica Folicular

#### 1. Producción de Hormonas Esteroides

No se detectó ningún patrón en la concentración folicular de las hormonas esteroides en los grupos de hembras ovariectomizadas. La concentración de  $T_4$  se ubicó entre 10 y 15 ng/ml, valores ligeramente superiores a los determinados previamente en *B. taurus* después del inicio del estro, pero  $\sim 30$  veces inferiores con respecto a los valores que se registran durante el proestro (Fortune y Hansel 1985). A este respecto, los resultados de Voss y Fortune (1993b) indican que la  $A_4$  también cambia de concentraciones altas ( $>80$  ng/ml) durante el proestro, hasta niveles  $<10$  ng/ml durante el estro. Los autores asocian esta disminución a la pérdida de expresión del mRNA de la enzima P450c17 en TI conforme el folículo se acerca al estro, después del pico de LH. Tomando en cuenta la idea anterior, es probable que la menor expresión del mRNA de la enzima se asocie también con los bajos niveles de  $T_4$  que presentamos, ya que esta enzima produce los principales precursores para la síntesis de andrógenos. Originando con ello una menor producción de andrógenos aromatizables y consecuentemente una baja síntesis de  $E_2$ .

Por su parte, la concentración folicular de  $P_4$  presentó niveles de entre 32 y 63 ng/ml, consistentes a los encontrados en hembras ovariectomizadas después del pico de LH (Fortune y Hansel 1985) y en folículos dominantes obtenidos en la fase de crecimiento de la primera (Xu et al. 1995; Manikkam et al. 2001; Bridges y Fortune 2003) y segunda onda folicular (Bigelow y Fortune 1998; Manikkam et al. 2001). Los datos de Voss y Fortune (1993b) demuestran que los niveles de  $P_4$  folicular se incrementan a partir del inicio de la fase folicular y hasta después del pico de LH que precede a la ovulación. Sin embargo, nosotros obtuvimos valores similares de  $P_4$  para todas las hembras ovariectomizadas. Por tal razón sería difícil

decidir en términos de la concentración de ésta hormona, cual grupo de animales se encontraba más cercano a la ovulación.

En lo correspondiente a E<sub>2</sub>, los grupos 24 y 48 h post-CIDR mostraron concentraciones relativamente bajas son similares a las encontradas por Xu et al. (1995) en el folículo dominante del día 6 de la primera onda folicular, momento en que alcanza su diámetro máximo. En contraste, para el grupo 72 h post-CIDR se detectó una concentración de 212 ± 46.7 ng/ml que es similar a la encontrada por Fortune y Hansel (1985) en hembras ovariectomizadas después del inicio del estro a las 15 horas (176.7 ± 80.8 ng/ml), pero no a las 24 horas (89.5 ± 16.7 ng/ml). De igual forma, nuestros datos coinciden con las concentraciones de E<sub>2</sub> publicadas para los folículos dominantes que crecen durante la fase luteal, pero resultan muy inferiores (~7 veces) cuando se comparan con las concentraciones de los folículos dominantes obtenidos durante los primeros dos días de la fase folicular, correspondientes a la etapa de proestro (Voss y Fortune 1993b; Bigelow y Fortune 1998; Bridges y Fortune 2003). Durante esta fase del ciclo la concentración de P<sub>4</sub> sérica aún se encuentra en disminución y todavía no ocurre el pico de LH, razón por la cual los folículos dominantes producen cantidades de E<sub>2</sub> de hasta 1 µg/ml de (Fortune y Hansel 1985).

La diferencia observada en los valores de E<sub>2</sub> se explica en parte por el tamaño del folículo de los grupos, a juzgar por los resultados del análisis de covarianza y por el análisis de correlación (r = 0.76). Esta observación coincide con los hallazgos de Henderson et al. (1987) obtenidos en cultivos de células de la granulosa de bovino provenientes de folículos de diferentes tamaños. Sin embargo, nuestros resultados difieren de trabajos previos que no detectan una relación entre el tamaño del folículo y la producción de E<sub>2</sub> *in vitro* (Staigmiller et al. 1982) y en líquido folicular (Ireland et al. 1979). Probablemente la variación observada que no se explica por nuestro modelo de correlación se asocie a los cambios en la producción de E<sub>2</sub> con respecto a los diferentes momentos en que pudo haber ocurrido el pico preovulatorio de LH, ya que estudios *in vitro* (Staigmiller et al. 1982) e *in vivo* (Fortune y Hansel 1985; Voss y Fortune 1993b) sugieren que los niveles de la

hormona disminuyen dramáticamente en las horas posteriores al pico de LH. Por otra parte, estudios realizados en líquido folicular de ovino (Webb y England 1982), bovino (Fortune y Hansel 1985; Bigelow y Fortune 1998) y porcino (Ainsworth et al. 1980) sugieren que en los folículos preovulatorios, la concentración de E<sub>2</sub> disminuye conforme la ovulación se aproxima, mientras que la concentración de P<sub>4</sub> se incrementa de forma concomitante. Lo anterior como probable resultado de un mayor número de horas posteriores al pico de LH, evento que disminuye la producción de E<sub>2</sub> (Hansen et al. 1988), eliminando con ello el bloqueo que este ejerce sobre la producción de P<sub>4</sub> (Fortune y Hansel 1985). Sin embargo, aunque se registraron niveles inferiores de E<sub>2</sub> en los grupos de 24 y 48 h post-CIDR no se apreció un verdadero aumento en la concentración de P<sub>4</sub>, ya que los valores resultaron similares para todas las hembras. Posiblemente, el efecto negativo que ejerce E<sub>2</sub> sobre la producción de P<sub>4</sub> todavía no se eliminaba por completo.

En un trabajo reciente Bridges et al. (2010) relacionan la concentración de E<sub>2</sub> y la duración del proestro con la fertilidad de las hembras *B. taurus*. Los autores demuestran que las hembras con períodos reducidos de proestro tienen una menor probabilidad de quedar preñadas con IA a tiempo fijo a comparación de las hembras con proestros más largos. Debido probablemente a que en las primeras se reduce la concentración de E<sub>2</sub>, además de que se presentan períodos luteales más cortos y con niveles de P<sub>4</sub> inferiores en el siguiente ciclo estral (Bridges et al. 2010). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que posiblemente las hembras *B. indicus* sincronizadas que presenten un comportamiento similar a las integrantes del grupo 24 h post-CIDR, comprometan su fertilidad. Ya que al parecer tuvieron un período más corto de proestro, a juzgar por la hora de inicio del estro ( $24.2 \pm 1.1$  horas) y por el patrón de P<sub>4</sub> sérica (<1 ng/ml al inicio del período de observación). Sin embargo, se requieren más estudios para determinar si efectivamente disminuye la fertilidad en las hembras sincronizadas mediante CIDR y que presentan estro con diferente duración del proestro.

Finalmente, las observaciones realizadas por McGuire et al. (1990) hace ya dos décadas, ponen de manifiesto el papel de los estrógenos en la expresión del

estro. Sus estudios indican que incluso las hembras ovariectomizadas son capaces de expresar estro al ser sometidas a un tratamiento de sincronización que incluye la aplicación externa de benzoato de estradiol (BE). Los autores proponen que sí la expresión del estro ocurre únicamente como una respuesta al tratamiento de sincronización, entonces la actividad sexual no se debe considerar como una señal de actividad ovárica, ya que posiblemente los animales tratados resultan sensibilizados a fuentes extraováricas de estrógenos. En este contexto, trabajos previos que estudian el efecto de la adición de valerato de estradiol (VE) (Solano et al. 2000) y BE (Díaz et al. 2002; Fetter et al. 2006) sobre la respuesta del estro en hembras *B. indicus*, indican que se obtienen porcentajes más altos de detección cuando se utilizan los estrógenos, sin que aumente de forma concomitante el porcentaje de ovulación. En nuestro estudio no se incluyó la aplicación exógena de ningún estrógeno para no afectar la respuesta que induce el protocolo de sincronización. Aún así, la respuesta de estro obtenida es similar a la encontrada por Solano et al. (2000) en las hembras que incluyeron la administración de VE. Sin embargo, resultó inferior a la respuesta que encuentran Fetter et al. (2006) y Díaz et al. (2002) cuando utilizan BE. Estos resultados sugieren que al parecer en las hembras *B. indicus* se presenta variabilidad en la respuesta frente a la aplicación exógena de factores que inducen una mayor expresión del estro. Además, la producción interna de estrógenos que ocurre dentro del folículo dominante no es suficiente para inducir la ovulación de la mayoría de las hembras que presentan estro, ya que entre el 44 y 64% de las hembras que son inyectadas con BE, son incapaces de ovular a pesar de presentar conducta sexual (Díaz et al. 2002; Fetter et al. 2006).

Consideramos como prioridad el realizar estudios para determinar los patrones foliculares de la concentración de hormonas esteroides en hembras *B. indicus*. Debido a que se ha sugerido que el menor tamaño del cuerpo lúteo que se registra en este tipo de ganado (Irvin et al. 1978), sea la causa probable que origina los niveles inferiores de  $P_4$ , característicos del ganado cebú (Irvin et al. 1978). Un escenario similar puede afectar la producción de hormonas esteroides en los

folículos preovulatorios, los cuales son de menor tamaño que los de *B. taurus* (Bo et al. 2003). Por tal razón, el conocimiento preciso de las modificaciones en la actividad esteroideogénica de los folículos en diferentes etapas durante el ciclo estral (reclutamiento, selección y dominancia) nos ayudará a entender en *B. indicus* una parte esencial de las características de estas estructuras, tal y como se ha descrito para el caso de *B. taurus* (Badinga et al. 1992; Fortune 1994; Bodensteiner et al. 1996; Ginther et al. 1997; Manikkam et al. 2001).

## 2. *Expresión de Enzimas Esteroidogénicas*

En todos los grupos la expresión de la enzima P450<sub>scc</sub> se ubicó en los dos tipos celulares que conforman la pared folicular; células de la granulosa y de la teca interna, lo cual coincide con la localización de la proteína mediante IF en estudios previos realizados en *B. taurus* (Rodgers et al. 1986; Irving-Rodgers et al. 2003). Nuestros resultados indican que el tejido folicular presenta una reacción inmune continua, aunque de diferentes intensidades, la cual presenta una localización citoplasmática. A este respecto Rodgers et al. (1986) proponen que la intensidad de la tinción depende de la forma del tipo celular, lo cual genera una señal de intensidades diferentes, además de que la localización de la reacción inmune se explica por la expresión mitocondrial de las proteínas. Adicionalmente, diferentes estudios han determinado la expresión del mRNA de P450<sub>scc</sub> mediante la técnica de hibridación *in situ* (Xu et al. 1995; Bao et al. 1997b; Manikkam et al. 2001), la cual coincide con la expresión de la proteína. Un hallazgo interesante de los estudios realizados, es que la expresión, tanto de la proteína como del mRNA, de la enzima en TI comienza desde los folículos antrales que presentan el tejido bien diferenciado. En contraste en las células de la granulosa no se encuentran niveles detectables de mRNA en folículos <4 mm de diámetro, lo cual sugiere que la adquisición de la capacidad esteroideogénica en estas células ocurre hasta que los folículos son seleccionados. Este evento al parecer es dependiente del incremento de FSH que precede al reclutamiento de la cohorte de folículos que tiene lugar al inicio de cada onda folicular (Adams et al. 1992), ya que se ha determinado que

dicha hormona es el principal factor que estimula la producción de P450scc en las células de la granulosa (Funkenstein et al. 1983).

El análisis semicuantitativo de la expresión de P450scc indicó que en ambos tipos celulares de la pared folicular se incrementa significativamente la expresión de la proteína en las hembras ovariectomizadas a las 72 h post-CIDR con respecto a los dos primeros grupos. Voss y Fortune (1993a) encontraron que los niveles de mRNA para P450scc en las células de la granulosa, pero no en la teca interna, disminuyen conforme avanza el estado de desarrollo folicular. Estos resultados son interesantes ya que de forma contraria, se esperaría un aumento en los niveles de mRNA de la enzima debido a que el destino del folículo preovulatorio es convertirse en un CL con alta producción de P<sub>4</sub>. De hecho, la producción de P<sub>4</sub> presenta un comportamiento inverso, ya que la concentración del progestágeno aumenta mientras el mRNA de la enzima disminuye significativamente (Voss y Fortune 1993a). Sin embargo, éste patrón es transiente ya que los niveles de P450scc se elevan drásticamente durante el desarrollo del CL (Rodgers et al. 1987). Probablemente, a pesar de que el mRNA de P450scc disminuye a niveles apenas detectables después del pico de LH, la actividad enzimática permanece de forma estable. Esta idea respalda nuestros hallazgos, ya que detectamos la expresión de la proteína y su actividad esteroideogénica, en los folículos de hembras ovariectomizadas después del pico de LH. De igual forma, Rodgers et al. (1995) encuentran que al final de la fase lútea, la aplicación de PGF<sub>2</sub>α, que característicamente reduce los niveles del mRNA de P450scc, no provoca el mismo efecto sobre la expresión de la proteína.

Con respecto a P450arom, nuestros resultados muestran que en todos los folículos dominantes la expresión de la proteína se localizó exclusivamente en las células de la granulosa. La presente información coincide con resultados previos que localizan el mRNA que codifica para la enzima en el mismo tipo celular dentro del folículo (Xu et al. 1995; Bao et al. 1997a; Manikkam et al. 2001). Además, se ha determinado que la expresión del mRNA de P450arom se asocia con el estado de desarrollo del folículo, específicamente con el tamaño, ya que la expresión de la

enzima, y por consiguiente la capacidad de aromatizar andrógenos, ocurre durante la etapa de reclutamiento y tiende a incrementarse durante la etapa de dominancia de los folículos (Xu et al. 1995; Bao et al. 1997b). Sin embargo, los niveles de mRNA para P450arom disminuyen dramáticamente después del pico de LH, una vez que inicia el estro. Además de que concomitantemente ocurre una evidente disminución en la actividad esteroidogénica folicular, ya que el contenido de E<sub>2</sub> folicular disminuye conforme se avanza desde el proestro hasta después de que ocurre el pico de LH (Voss y Fortune 1993b).

Por otra parte, nuestros resultados indican que las hembras del grupo 72 h post-CIDR expresan una mayor cantidad de la enzima P450arom. De acuerdo al análisis de covarianza, las diferencias observadas en la producción de E<sub>2</sub> dentro de los grupos se asocian en parte al efecto que tiene el nivel de expresión de la proteína dentro de las células de la granulosa. Adicionalmente, no encontramos una relación funcional entre el aumento de la producción de E<sub>2</sub> con el tejido esteroidogénico, ya que los grupos de hembras presentaron áreas de tejido celular similares. Estos resultados contrastan con datos que demuestran que los folículos dominantes con crecimiento prolongado producen concentraciones elevadas de E<sub>2</sub> como consecuencia de un incremento considerable del tejido esteroidogénico (Bigelow y Fortune 1998). En conjunto, nuestros datos sugieren que en respuesta a un programa de sincronización con CIDR, las hembras *B. indicus* presentan folículos dominantes capaces de producir E<sub>2</sub> a través de la expresión funcional de las proteínas de P450arom; es decir son estrogénicamente activos. Sin embargo, a pesar de que se encontró actividad esteroidogénica en todos los folículos dominantes, algunas hembras no presentaron estro. Por tal razón, es necesario realizar investigaciones orientadas a determinar si los patrones de expresión de P450arom en las células de la granulosa y la concomitante producción de E<sub>2</sub> que ocurre en estas hembras es suficiente para inducir la expresión del estro y posteriormente la ovulación.

Además de los aspectos discutidos, estudios *in vitro* han demostrado que en las células de la granulosa la producción de E<sub>2</sub> se puede afectar por el diámetro y

estado de salud del folículo dominante (Henderson et al. 1987). Pero además, por factores extrínsecos como la aplicación de estrógenos (inductores de atresia) (Burke et al. 2007) y la nutrición. A este respecto, los experimentos realizados *in vitro* por Armstrong et al. (2002) demuestran que la capacidad secretora de las células de la granulosa, obtenidas a partir de folículos pequeños, se incrementa cuando las hembras son alimentadas con dietas de mejor calidad nutricional que las de mantenimiento. Estos resultados indican que es posible inducir, en el corto plazo, cambios en el potencial esteroidogénico de los folículos pequeños que pueden afectar el patrón de la dinámica folicular. Zachut et al. (2008) sugieren que la inclusión de ácidos grasos no saturados en la dieta de hembras *B. taurus* incrementa el diámetro y la producción de hormonas esteroides en los folículos preovulatorios, lo cual se puede considerar como consecuencia benéfica para la función ovárica, y en general para el proceso reproductivo. Por tal razón, es posible que las hembras *B. indicus* del experimento sufrieran modificaciones en el patrón de desarrollo folicular y en la capacidad esteroidogénica de sus folículos, afectando con ello la producción de las hormonas. Debido a que la pobre calidad nutricional de los forrajes puede producir un efecto negativo en el patrón de crecimiento y la capacidad esteroidogénica de los folículos preovulatorios. Sin embargo, se requieren más estudios para determinar de forma específica el efecto que produce la dieta en las hembras *B. indicus* sincronizadas sobre sus patrones de actividad folicular; crecimiento y producción de hormonas.

## VIII. CONCLUSIONES

La sincronización secuencial de las hembras *B. indicus* mediante CIDR produce una respuesta heterogénea, ya que se encontraron diferencias en el inicio del estro para las hembras detectadas de cada grupo. Además, los niveles de P<sub>4</sub> sérica encontrados al inicio del estro, para las hembras detectadas, y al momento de la ovariectomía fueron siempre <1 ng/ml. Sin embargo, a pesar de que información es indicativa de actividad cíclica, algunas de las hembras no fueron detectadas en estro.

Por otra parte, la evaluación del crecimiento folicular demostró que en todas las hembras sincronizadas se presentó un folículo dominante >10 mm de diámetro. No obstante, el patrón de crecimiento del folículo dominante fue distinto entre los grupos de hembras ovariectomizadas. De esa forma, las hembras que inician con folículos dominantes de menor tamaño requieren más días de crecimiento, presentan un mayor porcentaje de crecimiento y tienen una relación estrecha entre el crecimiento folicular y el tiempo de evaluación. Además, los resultados demuestran que al parecer el tamaño inicial del folículo dominante determina el momento en que las hembras presentan actividad sexual.

Finalmente, todos los folículos dominantes evaluados presentaron actividad esteroideogénica, aunque con diferencias entre los grupos. Como era de esperarse, los folículos dominantes producen más E<sub>2</sub> que T<sub>4</sub> y P<sub>4</sub>. También se detectó la expresión de las enzimas esteroideogénicas P450scc en las células de la granulosa y de la teca interna y de P450arom en las células de la granulosa. Los valores de fluorescencia relativa son indicativos de patrones de expresión diferencial entre los tres grupos de hembras ovariectomizadas.

En consecuencia, los hallazgos de la presente investigación no soportan la hipótesis planteada, ya que en todas las hembras sincronizadas y ovariectomizadas se presentó un folículo dominante >10 mm de diámetro el cual es, además, estrogénicamente activo. No obstante, algunas de las hembras no fueron detectadas en estro, a pesar de tener las condiciones necesarias para ello; presencia de un folículo dominante >10 mm de diámetro, niveles de P<sub>4</sub> sérica <1 ng/ml, producción

intrafolicular de E<sub>2</sub> y la expresión de las enzimas esteroidogénicas P450scc y P450arom. Por lo tanto, otros factores además de los descritos previamente posiblemente determinan la expresión del estro en las hembras *B. indicus* sincronizadas con CIDR.

Nuestros resultados aportaron evidencia experimental sobre la capacidad esteroidogénica de los folículos dominantes de *B. indicus*, concretamente en lo referente a la producción intrafolicular de las hormonas esteroides y en la expresión de las proteínas de las enzimas esteroidogénicas en células del tejido folicular. La generación de este tipo de información, hasta ahora desconocida y limitada al ganado *B. taurus*, es necesaria para incrementar el conocimiento global de la biología reproductiva de *B. indicus*.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

1. **Acevedo, N, CS Galina, A Pulido, y A Orihuela.** (2007). Dynamics in sexually active groups of Zebu cattle (*Bos indicus*) comparing two procedures for estrus induction. *J Vet Behav: Clin Appl Res.* 2: 5-9.
2. **Adams, GP, RL Matteri, JP Kastelic, JC Ko, y OJ Ginther.** (1992). Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil.* 94: 177-188.
3. **Ainsworth, L, BK Tsang, BR Downey, GJ Marcus, y DT Armstrong.** (1980). Interrelationships between follicular fluid steroid levels, gonadotropic stimuli, and oocyte maturation during preovulatory development of porcine follicles. *Biol Reprod.* 23: 621-627.
4. **Alonso, L, CS Galina, M Maquivar, JJ Romero, I Molina, y P Carvajal.** (2009). Evaluación de la fertilidad de hembras *Bos indicus*, de acuerdo a la intensidad de celo, manejadas en un programa de inseminación artificial a tiempo fijo en condiciones de trópico. *Revista Científica, FCV-LUZ.* 19: 639-644.
5. **Armstrong, DG, JG Gong, JO Gardner, G Baxter, CO Hogg, y R Webb.** (2002). Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. *Reproduction.* 123: 371-378.
6. **Awasthi, MK, FS Kavani, GM Siddiquee, NP Sarvaiya, y HJ Derashri.** (2007). Is slow follicular growth the cause of silent estrus in water buffaloes? *Anim Reprod Sci.* 99: 258-268.
7. **Badinga, L, MA Driancourt, JD Savio, D Wolfenson, M Drost, RL de la Sota, y WW Thatcher.** (1992). Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. *Biol Reprod.* 47: 871-883.
8. **Baker, AEM y GE Seidel, Jr.** (1985). Why do cows mount other cows? *Appl Anim Behav Sci.* 13: 237-241.
9. **Bao, B y HA Garverick.** (1998). Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J Ani Sci.* 76: 1903-1921.
10. **Bao, B, HA Garverick, GW Smith, MF Smith, BE Salfen, y RS Youngquist.** (1997a). 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. *Biol Reprod.* 56: 1158-1168.
11. **Bao, B, HA Garverick, GW Smith, MF Smith, BE Salfen, y RS Youngquist.** (1997b). Expression of messenger ribonucleic acid (mRNA) encoding 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase delta4,delta5 isomerase (3beta-HSD) during recruitment and selection of bovine ovarian follicles: identification of dominant follicles by expression of 3beta-HSD mRNA within the granulosa cell layer. *Biol Reprod.* 56: 1466-1473.
12. **Baruselli, PS, EL Reis, MO Marques, LF Nasser, y GA Bo.** (2004). The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci.* 82-83: 479-486.
13. **Bigelow, KL y JE Fortune.** (1998). Characteristics of prolonged dominant versus control follicles: follicle cell numbers, steroidogenic capabilities, and messenger ribonucleic acid for steroidogenic enzymes. *Biol Reprod.* 58: 1241-1249.

14. **Bo, GA, GP Adams, LF Nasser, RA Pierson, y RJ Mapletoft.** (1993). Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. *Theriogenology*. 40: 225-239.
15. **Bo, GA, PS Baruselli, y MF Martinez.** (2003). Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci*. 78: 307-326.
16. **Bo, GA, PS Baruselli, D Moreno, L Cutaia, M Caccia, R Tribulo, H Tribulo, y RJ Mapletoft.** (2002). The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*. 57: 53-72.
17. **Bodensteiner, KJ, MC Wiltbank, DR Bergfelt, y OJ Ginther.** (1996). Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. *Theriogenology*. 45: 499-512.
18. **Braw-Tal, R y S Yossefi.** (1997). Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil*. 109: 165-171.
19. **Bridges, GA, ML Mussard, CR Burke, y ML Day.** (2010). Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. *Anim Reprod Sci*. 117: 208-215.
20. **Bridges, PJ y JE Fortune.** (2003). Characteristics of developing prolonged dominant follicles in cattle. *Domest Anim Endocrinol*. 25: 199-214.
21. **Brito, LFC, R Satrapa, EP Marson, y JP Kastelic.** (2002). Efficacy of PGF2[alpha] to synchronize estrus in water buffalo cows (*Bubalus bubalis*) is dependent upon plasma progesterone concentration, corpus luteum size and ovarian follicular status before treatment. *Anim Reprod Sci*. 73: 23-35.
22. **Browne, P, AJ Conley, T Spraker, RR Ream, y BL Lasley.** (2006). Sex steroid concentrations and localization of steroidogenic enzyme expression in free-ranging female northern fur seals (*Callorhinus ursinus*). *Gen Comp Endocrinol*. 147: 175-183.
23. **Burke, CR, H Cardenas, ML Mussard, CL Gasser, y ML Day.** (2007). Steroidogenic changes and steady state amount of messenger RNA encoding steroidogenic enzymes, gonadotropin receptors and cell-death signalling in the dominant ovarian follicle during estradiol-induced atresia in cattle. *Anim Reprod Sci*. 99: 244-257.
24. **Castellanos, F, CS Galina, JA Orihuela, R Navarro-Fierro, y R Mondragón.** (1997). Estrous expression in dairy cows and heifers (*Bos taurus*) following repeated PGF2[alpha] injection and choice of selecting a mounting partner. *Appl Anim Behav Sci*. 51: 29-37.
25. **Cavestany, D y CS Galina.** (2001a). Evaluation of an artificial insemination programme in a seasonal breeding dairy system through milk progesterone. *Reprod Domest Anim*. 36: 79-84.
26. **Cavestany, D y CS Galina.** (2001b). Factors affecting the reproductive efficiency of artificial insemination programmes in a seasonal breeding pasture-based dairy system with the aid of milk progesterone. *Reprod Domest Anim*. 36: 85-89.
27. **Christenson, LK y JFI Strauss.** (2000). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and the intramitochondrial translocation of cholesterol. *Biochim Biophys Acta*. 1529: 175-187.
28. **Corbin, CJ, JM Trant, KW Walters, y AJ Conley.** (1999). Changes in testosterone metabolism associated with the evolution of placental and gonadal isozymes of porcine aromatase cytochrome P450. *Endocrinology*. 140: 5202-5210.

29. **Cordoba, MC y PM Fricke.** (2002). Initiation of the breeding season in a grazing-based dairy by synchronization of ovulation. *J Dairy Sci.* 85: 1752-1763.
30. **Cortes, R, A Orihuela, y CS Galina.** (1999). Effect of sexual partners on the oestrous behaviour response in zebu cattle (*Bos indicus*) following synchronisation with a progestagen (Synchro-Mate B). *Asian-Aus J Anim Sci.* 12: 515-519.
31. **Cunningham, EP.** (1989). The genetic improvement of cattle in developing countries. *Theriogenology.* 31: 17-28.
32. **Diaz, GS, CS Galina, H Basurto, y GP Ochoa.** (2002). Efecto de la progesterona natural con o sin la adición de benzoato de estradiol sobre la presentación de celo, ovulación y gestación en animales tipo *Bos indicus* en el trópico mexicano. *Arch Med Vet.* 34: 235-244.
33. **Dimmick, MA, T Gimenez, y JC Spitzer.** (1991). Ovarian endocrine activity and development of ovarian follicles during the postpartum interval in beef cows. *Anim Reprod Sci.* 24: 173-183.
34. **Dransfield, MB, RL Nebel, RE Pearson, y LD Warnick.** (1998). Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. *J Dairy Sci.* 81: 1874-1882.
35. **Driancourt, MA.** (1991). Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology.* 35: 55-79.
36. **Edmonson, AJ, IJ Lean, CO Weaver, T Farver, y G Webster.** (1989). A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J Dairy Sci.* 72: 68-78.
37. **England, BG, HJ Karavolas, ER Hauser, y LE Casida.** (1973). Ovarian follicular estrogens in Angus heifers. *J Anim Sci.* 37: 1176-1179.
38. **Erickson, BH.** (1966). Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci.* 25: 800-805.
39. **Erickson, GF, DA Magoffin, CA Dyer, y C Hofeditz.** (1985). The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocr Rev.* 6: 371-399.
40. **Fetter, PH, CS Galina, A Pulido, A Orihuela, y M Maquivar.** (2006). A note on estrous response in cows induced with or without the application of estrogens, and their effect in nontreated herd mates. *J Vet.Behav.: Clin.Appli.Res.* 1: 75-79.
41. **Figueiredo, RA, CM Barros, OL Pinheiro, y JM Soler.** (1997). Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology.* 47: 1489-1505.
42. **Fiordeliso, T y A Hernandez-Cruz.** (2002). Oestrogen regulates neurofilament expression in a subset of anterior pituitary cells of the adult female rat. *J Neuroendocrinol.* 14: 411-424.
43. **Forster, K, CS Galina, M Maquivar, LG Van der, R Arnoni, y A Verduzco.** (2007). Assessment of the Intensity of Behavioural Traits and Ovulation between Synchronized and Non-synchronized Cows. *Reprod Domest Anim.* 42: 566-570.
44. **Fortune, JE.** (1986). Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. *Biol Reprod.* 35: 292-299.
45. **Fortune, JE.** (1994). Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod.* 50: 225-232.
46. **Fortune, JE.** (2003). The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci.* 78: 135-163.

47. **Fortune, JE y W Hansel.** (1979). The effects of 17 beta-estradiol on progesterone secretion by bovine theca and granulosa cells. *Endocrinology*. 104: 1834-1838.
48. **Fortune, JE y W Hansel.** (1985). Concentrations of steroids and gonadotropins in follicular fluid from normal heifers and heifers primed for superovulation. *Biol Reprod*. 32: 1069-1079.
49. **Fortune, JE y SM Quirk.** (1988). Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. *J Anim Sci*. 66: 1-8.
50. **Fortune, JE, GM Rivera, AC Evans, y AM Turzillo.** (2001). Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod*. 65: 648-654.
51. **Fortune, JE, J Sirois, AM Turzillo, y M Lavoie.** (1991). Follicle selection in domestic ruminants. *J Reprod Fertil Suppl*. 43: 187-198.
52. **Funkenstein, B, MR Waterman, BS Masters, y ER Simpson.** (1983). Evidence for the presence of cholesterol side chain cleavage cytochrome P-450 and adrenodoxin in fresh granulosa cells. Effects of follicle-stimulating hormone and cyclic AMP on cholesterol side chain cleavage cytochrome P-450 synthesis and activity. *J Biol Chem*. 258: 10187-10191.
53. **Galina, CS y GH Arthur.** (1990). Review of cattle production in the tropics. Part 4. Oestrus cycles. *Animal Breeding Abstracts*. 58: 697-707.
54. **Galina, CS, A Calderon, y M McCloskey.** (1982). Detection of signs of estrus in the charolais cow and its Brahman cross under continuous observation. *Theriogenology*. 17: 485-498.
55. **Galina, CS y A Orihuela.** (2007). The detection of estrus in cattle raised under tropical conditions: what we know and what we need to know. *Horm Behav*. 52: 32-38.
56. **Galina, CS, A Orihuela, y I Rubio.** (1996). Behavioural trends affecting oestrus detection in Zebu cattle. *Ani Reprod Sci*. 42: 465-470.
57. **Garcia, E.** (1988). Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía. UNAM, México, D.F. 4a edición: 210-246.
58. **Ginther, OJ, L Knopf, y JP Kastelic.** (1989). Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J. Reprod Fertil*. 87: 223-230.
59. **Ginther, OJ, K Kot, LJ Kulick, y MC Wiltbank.** (1997). Sampling follicular fluid without altering follicular status in cattle: oestradiol concentrations early in a follicular wave. *J Reprod Fertil*. 109: 181-186.
60. **Gutierrez, CG, CS Galina, y I Rubio.** (1993). The influence of the social structure of a zebu herd on the manifestation of signs of oestrus. *World Rev Ani Pro*. 28: 57-70.
61. **Hansen, TR, RD Randel, y TH Welsh, Jr.** (1988). Granulosa cell steroidogenesis and follicular fluid steroid concentrations after the onset of oestrus in cows. *J Reprod Fertil*. 84: 409-416.
62. **Hardin, DR, AC Warnick, y MJ Fields.** (1980). Artificial insemination of subtropical commercial beef cattle following synchronization with cloprostenol (ICI 80996): II estrous response. *Theriogenology*. 14: 259-268.
63. **Henderson, KM, KP McNatty, P Smith, M Gibb, LE O'Keeffe, S Lun, DA Heath, y MD Prisk.** (1987). Influence of follicular health on the steroidogenic and morphological characteristics of bovine granulosa cells in vitro. *J Reprod Fertil*. 79: 185-193.

64. **Henderson, KM, AS McNeilly, y IA Swanston.** (1982). Gonadotrophin and steroid concentrations in bovine follicular fluid and their relationship to follicle size. *J Reprod Fertil.* 65: 467-473.
65. **Hodgen, GD.** (1982). The dominant ovarian follicle. *Fertil.Steril.* 38: 281-300.
66. **Hurnik, JF, GJ King, y HA Robertson.** (1975). Estrous and related behaviour in postpartum Holstein cows. *Appl Anim Ethol.* 2: 55-65.
67. **Ireland, JJ.** (1987). Control of follicular growth and development. *J Reprod Fertil Suppl.* 34: 39-54.
68. **Ireland, JJ, PB Coulson, y RL Murphree.** (1979). Follicular development during four stages of the estrous cycle of beef cattle. *J Anim Sci.* 49: 1261-1269.
69. **Ireland, JJ y JF Roche.** (1983). Growth and differentiation of large antral follicles after spontaneous luteolysis in heifers: changes in concentration of hormones in follicular fluid and specific binding of gonadotropins to follicles. *J Anim Sci.* 57: 157-167.
70. **Irvin, HJ, RD Randel, WE Haensly, y J Sorensen.** (1978). Reproductive studies of Brahman cattle III. Comparison of weight, progesterone content, histological characteristics, and 3[beta]-hydroxysteroid dehydrogenase activity in corpora lutea of Brahman, Hereford, and Brahman  $\times$  Hereford heifers. *Theriogenology.* 10: 417-427.
71. **Irving-Rodgers, HF, M Krupa, y RJ Rodgers.** (2003). Cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression and the concentrations of steroid hormones in the follicular fluids of different phenotypes of healthy and atretic bovine ovarian follicles. *Biol Reprod.* 69: 2022-2028.
72. **Isidro, R, A Orihuela, CS Galina, L Martinez, M Maquivar, y J Solano.** (2005). Zebu cows concomitantly in estrus may hasten sexual behaviour in hermats but not ovulation. *J Appl Anim Res.* 28: 117-120.
73. **Kafi, M y MR McGowan.** (1997). Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Anim Reprod Sci.* 48: 137-157.
74. **Kanchev, LN, H Dobson, WR Ward, y RJ Fitzpatrick.** (1976). Concentration of steroids in bovine peripheral plasma during the oestrous cycle and the effect of betamethasone treatment. *J Reprod Fertil.* 48: 341-345.
75. **Kastelic, JP y OJ Ginther.** (1991). Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis. *Anim Reprod Sci.* 26: 13-24.
76. **Kastelic, JP, L Knopf, y OJ Ginther.** (1990). Effect of day of prostaglandin F2[alpha] treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. *Anim Reprod Sci.* 23: 169-180.
77. **Kesler, DJ y HA Garverick.** (1982). Ovarian cysts in dairy cattle: a review. *J Ani Sci.* 55: 1147-1159.
78. **Knopf, L, JP Kastelic, E Schallenberger, y OJ Ginther.** (1989). Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Dom Anim Endocrinol.* 6: 111-119.
79. **Kristjason, P, F Place, S Franzel, y PK Thornton.** (2002). Assessing research impact on poverty: the importance of farmer's perspectives. *Agricultural Systems.* 72: 73-92.
80. **Lamothe, C, F Montiel, G Fredrikson, y CS Galina.** (1995). Reproductive performance of zebu cattle in Mexico. Influence of season and social interaction on timing of expressed oestrus. *Trop Agric (Trinidad).* 72: 319-323.

81. **Landaeta-Hernandez, AJ, JV Yelich, JW Lemaster, MJ Fields, T Tran, CC Chase, Jr., DO Rae, y PJ Chenoweth.** (2002). Environmental, genetic and social factors affecting the expression of estrus in beef cows. *Theriogenology*. 57: 1357-1370.
82. **Landivar, C, CS Galina, A Duchateau, y R Navarro-Fierro.** (1985). Fertility trial in Zebu cattle after a natural or controlled estrus with prostaglandin F2 Alpha, comparing natural mating with artificial insemination. *Theriogenology*. 23: 421-429.
83. **Lucy, MC, JD Savio, L Badinga, RL de la Sota, y WW Thatcher.** (1992). Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci*. 70: 3615-3626.
84. **Lyimo, ZC, M Nielen, W Ouweltjes, TA Kruip, y FJ Van Eerdenburg.** (2000). Relationship among estradiol, cortisol and intensity of estrous behavior in dairy cattle. *Theriogenology*. 53: 1783-1795.
85. **Macmillan, KL y AJ Peterson.** (1993). A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for oestrous synchronisation, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anoestrus. *Anim Reprod Sci*. 33: 1-25.
86. **Manikkam, M, MD Calder, BE Salfen, RS Youngquist, DH Keisler, y HA Garverick.** (2001). Concentrations of steroids and expression of messenger RNA for steroidogenic enzymes and gonadotropin receptors in bovine ovarian follicles of first and second waves and changes in second wave follicles after pulsatile LH infusion. *Anim Reprod Sci*. 67: 189-203.
87. **Maquivar, M, CS Galina, y A Orihuela.** (2002). Cows treated with Synchronate B may cluster their sexual behaviour independent of follicular growth at the time of oestrus. *Physiol Behav*. 76: 199-203.
88. **Maquivar, M, A Verduzco, CS Galina, A Pulido, S Rojas, K Forster, LG Vander, y R Arnoni.** (2007). Relationship among follicular growth, oestrus, time of ovulation, endogenous estradiol 17beta and luteinizing hormone in *Bos indicus* cows after a synchronization program. *Reprod Domest. Anim*. 42: 571-576.
89. **McGuire, WJ, RL Larson, y GH Kiracofe.** (1990). Syncro-Mate B® induces oestrus in ovariectomized cows and heifers. *Theriogenology*. 34: 33-37.
90. **Medrano, EA, O Hernandez, C Lamothe, y CS Galina.** (1996). Evidence of asynchrony in the onset of signs of oestrus in zebu cattle treated with a progestogen ear implant. *Res Vet Sci*. 60: 51-54.
91. **Mihm, M, A Baguisi, MP Boland, y JF Roche.** (1994). Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. *J Reprod Fertil*. 102: 123-130.
92. **Miller, WL.** (1988). Molecular biology of steroids hormone synthesis. *Endocr Rev*. 9: 295-318.
93. **Moran, C, JF Quirke, y JF Roche.** (1989). Puberty in heifers: A Review. *Anim Reprod Sci*. 18: 167-182.
94. **Moreno, IY, CS Galina, FJ Escobar, B Ramirez, y R Navarro-Fierro.** (1986). Evaluation of the lytic response of prostaglandin F2 alpha in Zebu cattle based on serum progesterone. *Theriogenology*. 25: 413-421.
95. **Munro, C y G Stabenfeldt.** (1984). Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J Endocrinol*. 101: 41-49.
96. **Nebel, RL, MG Dransfield, SM Jobst, y JH Bame.** (2000). Automated electronic systems for the detection of oestrus and timing of AI in cattle. *Anim Reprod Sci*. 60-61: 713-723.

97. **Odde, KG.** (1990). A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. *J Anim Sci.* 68: 817-830.
98. **Omura, T.** (2006). Mitochondrial P450s. *Chem Biol Interact.* 163: 86-93.
99. **Orihuela, A.** (2000). Some factors affecting the behavioural manifestation of oestrus in cattle: a review. *Appl Anim Behav Sci.* 70: 1-16.
100. **Orihuela, A, CS Galina, y A Duchateau.** (1988). Behavioural patterns of Zebu bulls towards cows previously synchronized with prostaglandin F2 $\alpha$ . *Appl Anim Behav Sci.* 21: 267-276.
101. **Orihuela, A, CS Galina, J Escobar, y E Riquelme.** (1983). Estrous behavior following prostaglandin F2[alpha] injection in Zebu cattle under continuous observation. *Theriogenology.* 19: 795-809.
102. **Pikuleva, IA.** (2006). Cytochrome P450s and cholesterol homeostasis. *Pharmacol Ther.* 112: 761-773.
103. **Porras, AA y CS Galina.** (1991). Utilización de prostaglandina F2 $\alpha$  y sus análogos para la manipulación del ciclo estral bovino. *Vet Mex.* 22: 401-405.
104. **Pulido, A, L Zarco, CS Galina, C Murcia, G Flores, y E Posadas.** (1991). Progesterone metabolism during storage of blood samples from Gyr cattle: Effects of anticoagulant, time and temperature of incubation. *Theriogenology.* 35: 965-975.
105. **Rathbone, MJ, CR Bunt, CR Ogle, S Burggraaf, KL Macmillan, CR Burke, y KL Pickering.** (2002). Reengineering of a commercially available bovine intravaginal insert (CIDR insert) containing progesterone. *J Control Release.* 85: 105-115.
106. **Reimers, TJ, RD Smith, y SK Inewman.** (1985). Management Factors Affecting Reproductive Performance of Dairy Cows in the Northeastern United States. *J Dairy Sci.* 68: 963-972.
107. **Rekwot, PI, EO Oyedipe, E Mukasa-Mugerwa, VO Sekoni, OP Akinpelumi, y AA Anyam.** (1999). Fertility in zebu cattle (*Bos indicus*) after prostaglandin administration and artificial insemination. *Vet J.* 158: 53-58.
108. **Revah, I y WR Butler.** (1996). Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J Reprod Fertil.* 106: 39-47.
109. **Rhodes, FM, G De'ath, y KW Entwistle.** (1995a). Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. *Anim Reprod Sci.* 38: 265-277.
110. **Rhodes, FM, KW Entwistle, y JE Kinder.** (1996). Changes in ovarian function and gonadotropin secretion preceding the onset of nutritionally induced anestrus in *Bos indicus* heifers. *Biol Reprod.* 55: 1437-1443.
111. **Rhodes, FM, LA Fitzpatrick, G De'ath, y KW Entwistle.** (1994). The effects of follicle wave numbers per oestrous cycle on the ovulatory follicle in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology.* 41: 284-
112. **Rhodes, FM, LA Fitzpatrick, KW Entwistle, y G De'ath.** (1995b). Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrus. *J Reprod Fertil.* 104: 41-49.
113. **Rodgers, RJ, HF Rodgers, PF Hall, MR Waterman, y ER Simpson.** (1986). Immunolocalization of cholesterol side-chain-cleavage cytochrome P-450 and 17 alpha-hydroxylase cytochrome P-450 in bovine ovarian follicles. *J Reprod Fertil.* 78: 627-638.
114. **Rodgers, RJ, CA Vella, FM Young, XC Tian, y JE Fortune.** (1995). Concentrations of cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme and

- 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase during prostaglandin F2 alpha-induced luteal regression in cattle. *Reprod Fertil Dev.* 7: 1213-1216.
115. **Rodgers, RJ, MR Waterman, y ER Simpson.** (1987). Levels of messenger ribonucleic acid encoding cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450, 17 alpha-hydroxylase cytochrome P-450, adrenodoxin, and low density lipoprotein receptor in bovine follicles and corpora lutea throughout the ovarian cycle. *Mol Endocrinol.* 1: 274-279.
  116. **Román, PH.** (1981). Potencial de producción de los bovinos en el trópico de México. *Cie Vet.* 3: 394-431.
  117. **Ruiz-Cortes, ZT y M Olivera-Angel.** (1999). Ovarian follicular dynamics in suckled zebu (*Bos indicus*) cows monitored by real time ultrasonography. *Anim Reprod Sci.* 54: 211-220.
  118. **Saumande, J y P Humblot.** (2005). The variability in the interval between estrus and ovulation in cattle and its determinants. *Anim Reprod Sci.* 85: 171-182.
  119. **Savio, JD, MP Boland, y JF Roche.** (1990). Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in post-partum dairy cows. *J Reprod Fertil.* 88: 581-591.
  120. **Savio, JD, L Keenan, MP Boland, y JF Roche.** (1988). Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil.* 83: 663-671.
  121. **Segerson, EC, TR Hansen, DW Libby, RD Randel, y WR Getz.** (1984). Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. *J Anim Sci.* 59: 1026-1046.
  122. **Seidel, GE.** (1981). Superovulation and embryo transfer in cattle. *Science.* 211: 351-358.
  123. **Senger, PL.** (1994). The estrus detection problem: new concepts, technologies, and possibilities. *J Dairy Sci.* 77: 2745-2753.
  124. **Senger, PL.** (2005). Pathways to pregnancy and parturition. *Current Conceptions, Inc.* Pullman, Washington, USA. 2nd edition: 144-188.
  125. **Sirois, J y JE Fortune.** (1988). Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod.* 39: 308-317.
  126. **Sirois, J y JE Fortune.** (1990). Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology.* 127: 916-925.
  127. **Smith, MW y JS Stevenson.** (1995). Fate of the dominant follicle, embryonal survival, and pregnancy rates in dairy cattle treated with prostaglandin F2 alpha and progestins in the absence or presence of a functional corpus luteum. *J Anim Sci.* 73: 3743-3751.
  128. **Solano, J, F Galindo, A Orihuela, y CS Galina.** (2004). The effect of social rank on the physiological response during repeated stressful handling in Zebu cattle (*Bos indicus*). *Physiol Behav.* 82: 679-683.
  129. **Solano, J, A Orihuela, CS Galina, y F Montiel.** (2000). Sexual behavior of Zebu cattle (*Bos indicus*) following estrous induction by Syncro-Mate B, with or without estrogen injection. *Physiol Behav.* 71: 503-508.
  130. **Solano, J, A Orihuela, CS Galina, F Montiel, y F Galindo.** (2005). Relationships between social behaviour and mounting activity of Zebu cattle (*Bos indicus*). *Appl Anim Behav Sci.* 94: 197-203.
  131. **Spicer, LJ y SE Echterkamp.** (1986). Ovarian follicular growth, function and turnover in cattle: a review. *J. Anim Sci.* 62: 428-451.

132. **Staigmiller, RB, BG England, R Webb, RE Short, y RA Bellows.** (1982). Estrogen secretion and gonadotropin binding by individual bovine follicles during estrus. *J Anim Sci.* 55: 1473-1482.
133. **Stock, AE y JE Fortune.** (1993). Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology.* 132: 1108-1114.
134. **Tegegne, A, AC Warnick, E Mukasa-Mugerwa, y H Ketema.** (1989). Fertility of *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* crossbreed cattle after estrus synchronization. *Theriogenology.* 31: 361-370.
135. **Vaca, LA, CS Galina, S Fernandez-Baca, FJ Escobar, y B Ramirez.** (1985). Oestrous cycles, oestrus and ovulation of the zebu in the Mexican tropics. *Vet Rec.* 117: 434-437.
136. **Van Eerdenburg, FJ, D Karthaus, MA Taverne, I Merics, y O Szenci.** (2002). The relationship between estrous behavioral score and time of ovulation in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 85: 1150-1156.
137. **Van Eerdenburg, FJ, HS Loeffler, y JH van Vliet.** (1996). Detection of oestrus in dairy cows: a new approach to an old problem. *Vet Q.* 18: 52-54.
138. **van Vliet, JH y FJCM Van Eerdenburg.** (1996). Sexual activities and oestrus detection in lactating Holstein cows. *Appl Anim Behav Sci.* 50: 57-69.
139. **Verduzco, A, I Rubio, CS Galina, y M Maquivar.** (2006). Average responses to estrus and timing of ovulation in *Bos indicus* synchronized alternatively with a synthetic progestagen. *J Anim Vet Adv.* 5: 924-929.
140. **Vishwanath, R.** (2003). Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology.* 59: 571-584.
141. **Voss, AK y JE Fortune.** (1993a). Levels of messenger ribonucleic acid for cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in bovine preovulatory follicles decrease after the luteinizing hormone surge. *Endocrinology.* 132: 888-894.
142. **Voss, AK y JE Fortune.** (1993b). 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: 2239-2245.
143. **Walker, SL, RF Smith, DN Jones, JE Routly, y H Dobson.** (2008). Chronic stress, hormone profiles and estrus intensity in dairy cattle. *Horm Behav.* 53: 493-501.
144. **Walker, WL, RL Nebel, y ML McGilliard.** (1996). Time of ovulation relative to mounting activity in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 79: 1555-1561.
145. **Watts, TL y JW Fuquay.** (1985). Response and fertility of dairy heifers following injection with prostaglandin F(2alpha) during early, middle or late diestrus. *Theriogenology.* 23: 655-661.
146. **Webb, R y BG England.** (1982). Relationship between LH receptor concentrations in thecal and granulosa cells and in-vivo and in-vitro steroid secretion by ovine follicles during the preovulatory period. *J Reprod Fertil.* 66: 169-180.
147. **Williamson, NB, RS Morris, DC Blood, CM Cannon, y PJ Wright.** (1972). A study of oestrous behaviour and oestrus detection methods in a large commercial dairy herd. II. Oestrous signs and behaviour patterns. *Vet Rec.* 91: 58-62.

148. **Xu, Z, HA Garverick, GW Smith, MF Smith, SA Hamilton, y RS Youngquist.** (1995). 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: 981-989.
149. **Xu, ZZ y LJ Burton.** (1999). Reproductive performance of dairy heifers after estrus synchronization and fixed-time artificial insemination. *J Dairy Sci*. 82: 910-917.
150. **Xu, ZZ y LJ Burton.** (2000). Estrus synchronization of lactating dairy cows with GnRH, progesterone, and prostaglandin F2 alpha. *J Dairy Sci*. 83: 471-476.
151. **Zachut, M, A Arieli, H Lehrer, N Argov, y U Moallem.** (2008). Dietary unsaturated fatty acids influence preovulatory follicle characteristics in dairy cows. *Reproduction*. 135: 683-692.
152. **Zeitoun, MM, HF Rodriguez, y RD Randel.** (1996). Effect of season on ovarian follicular dynamics in Brahman cows. *Theriogenology*. 45: 1577-1581.