



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

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

**COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS PRE Y POST  
SERVICIO PARA VACAS REPETIDORAS EN  
SISTEMAS INTENSIVOS DE PRODUCCIÓN DE  
LECHE**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**QUINTINA GUADALUPE MARTÍN DEL CAMPO  
RODRÍGUEZ**

**TUTOR**

**DR. EUGENIO VILLAGOMEZ AMEZCUA  
MANJARREZ**

**COMITÉ TUTORAL**

**DR. HÉCTOR R. VERA ÁVILA  
DR. JOEL HERNÁNDEZ CERÓN**

**CUAUTITLÁN IZCALLI**

**2009**



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**

A Josefina Rodríguez del Muro y Sergio Martín del Campo Rodríguez, mi madre y mi hermano: mi regalo de Dios, mi familia. Juntos hemos vivido momentos difíciles pero también triunfos. Gracias por hacer suyos mis proyectos, ustedes son mi mayor motivación para seguir adelante y lograr mis metas. Los amo.

A quienes ya no están físicamente conmigo

Roque Rodríguez Avilés y Josefina del Muro Márquez mis abuelitos, gracias por su amor y ejemplo, pues constituyen la herencia mas valiosa que poseo.

Sergio Martín del Campo González, mi padre... se que siempre estás a mi lado.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México a través de FES-Cuautitlán

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias y sus campos ubicados en Ajuchitlán, Qro y Distrito Federal.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Al Dr. Eugenio Villagómez y Dr. Héctor Vera de quienes he aprendido tanto además del aspecto académico, su ética y calidad humana. Para ustedes mi admiración y afecto

Al Dr. Antonio Romero Arredondo por su valiosa colaboración y sugerencias, sin dejar de mencionar que fue quien me impulsó a iniciar esta experiencia y de quien he aprendido valiosas lecciones profesionales y de vida.

A la Empresa Agropecuaria El Tepetatillo de la familia Quezada Gallardo por su gran disposición al permitir llevar a cabo la fase experimental en sus hatos principalmente al Sr. Daniel y al Ing. Oscar, así como el personal encargado del ganado en especial a Enrique Gallardo Cortés.

A Eliab, mi hermana Rosío, Gaby y Anne Marie que en todo momento me han brindado su apoyo, amistad y cariño.

## CONTENIDO

	Página
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	<b>I</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>II</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>IV</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Objetivo</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Hipótesis</b>	<b>4</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	
<b>2.1. Fisiología del eje reproductivo de la vaca</b>	<b>5</b>
2.1.1. Ciclo estral	<b>5</b>
2.1.2. Eje hipotálamo hipófisis gónadas	<b>6</b>
<b>2.2. Desarrollo folicular</b>	<b>14</b>
<b>2.3. Desarrollo del ovocito</b>	<b>19</b>
<b>2.4. Oleadas de desarrollo folicular</b>	<b>23</b>
2.4.1 Folículo ovulatorio persistente	<b>25</b>
<b>2.5. Reconocimiento de la gestación</b>	<b>27</b>
2.5.1. Desarrollo embrionario temprano	<b>28</b>
<b>2.6. Infertilidad</b>	<b>30</b>
2.6.1. Vaca repetidora	
2.6.2 Terapias hormonales propuestas	
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
<b>3.1. Generales</b>	<b>36</b>
<b>3.2. Diámetro de folículo ovulatorio</b>	<b>38</b>
<b>3.3. Concentración de progesterona</b>	<b>38</b>
<b>3.4. Fertilidad</b>	<b>39</b>
<b>3.5. Análisis estadístico</b>	<b>39</b>
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>40</b>
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>42</b>

<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>50</b>
<b>VII. LITERATURA CITADA</b>	<b>51</b>
<b>VIII. APÉNDICE</b>	<b>66</b>

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1</b> Dieta proporcionada a vacas altas productoras en la Empresa Agropecuaria “El Tepetatillo”	<b>67</b>
<b>Cuadro 2</b> Parámetros reproductivos obtenidos en la Empresa Agropecuaria “El Tepetatillo” durante el año 2008	<b>68</b>
<b>Cuadro 3</b> Diámetro de folículo ovulatorio (DFO mm) en vacas lecheras calificadas como repetidoras (no gestantes con 4 o más servicios) que recibieron tratamiento hormonal previo (PreS) o posterior (PostS) al servicio.	<b>69</b>
<b>Cuadro 4</b> Concentración de progesterona en vacas lecheras calificadas como repetidoras (no gestantes con 4 o más servicios) que recibieron tratamiento hormonal previo (PreS) o posterior al servicio (PosS)	<b>70</b>
<b>Cuadro 5</b> Porcentaje de vacas gestantes calificadas como repetidoras (no gestantes con 4 o más servicios) que recibieron tratamiento hormonal previo (PreS) o posterior (PosS) al servicio	<b>71</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Esquema del tratamiento previo al servicio (PreS) que recibieron vacas lecheras calificadas como repetidoras (no gestantes con 4 o más servicios). **72**
- Figura 2** Esquema del tratamiento posterior al servicio (PosS) que recibieron vacas lecheras calificadas como repetidoras (no gestantes con 4 o más servicios). **73**
- Figura 3** Esquema seguido en vacas lecheras calificadas como repetidoras (no gestantes con 4 o más servicios) que fungieron como grupo control. **74**



## COMPARACION DE TRATAMIENTOS PRE Y POST SERVICIO PARA INCREMENTAR LA FERTILIDAD DE VACAS REPETIDORAS EN SISTEMAS INTENSIVOS DE PRODUCCIÓN DE LECHE

### RESUMEN

Se estima que la incidencia de vacas repetidoras en sistemas de producción intensiva de leche es actualmente de 10 a 25%. El objetivo del estudio fue comparar el efecto sobre fertilidad de tratamientos previos o posteriores al servicio en vacas lecheras calificadas como repetidoras (no gestantes con 4 o más servicios). Se utilizaron 115 vacas Holstein repetidoras de diferente número de parto pertenecientes a 2 establos de producción intensiva de leche. En el tratamiento pre-servicio se dejó pasar el estro en que la vaca calificaba como repetidora (EREP) y posteriormente se controló el desarrollo folicular hacia el siguiente estro mediante la administración de 17- $\beta$  estradiol (E2) y prostaglandina F2 $\alpha$  (PG) (5 mg de E2 el d 6 post-estro + 500  $\mu$ g de cloprostenol el d 10 e IA a estro detectado; **PreS**, n=30). En el tratamiento post-servicio se IA en forma convencional en el EREP administrándose progesterona suplementaria durante  $\frac{3}{4}$  partes del diestro posterior (CIDR-B entre los días 5 a 14 post-servicio; **PosS**; n=47). Un grupo de vacas quedó como testigo inseminándose en el EREP (**C**, n=38). Se consideraron como variables de respuesta asociadas al estro con servicio a la concentración sérica de progesterona en los d 0 (estro), 4, 5 y 6 post-servicio (P4; RIA en fase sólida), el diámetro del folículo ovulatorio (DFO; ultrasonografía el d 0) y el porcentaje de fertilidad (FERT; diagnóstico de gestación a 50 d post-servicio). El análisis estadístico se hizo mediante ANDEVA en el caso de P4 (diseño de observaciones repetidas) y de DFO (diseño completamente al azar). El porcentaje de FERT se analizó mediante la prueba de Xi-Cuadrada. El DFO fue influenciado por el tratamiento (P<.01) siendo menor en las vacas **PreS** (16.01 $\pm$  1.09 mm) en comparación con las **PosS** (20.61 $\pm$  1.45 mm) y **C** (20.27 $\pm$  1.43 mm). La P4 en el día 0 fue menor (P<.05) en **PreS** (0.37 $\pm$ 0.2 ng/ml) que en **PosS** (0.42  $\pm$  0.017 ng/ml) y **C** (0.45  $\pm$  0.019 ng/ml). P4 durante el día 4 fue menor (P<.05) en los tratamientos PreS y PoS ( 0.58  $\pm$  0.051 y 0.62 $\pm$  0.040 ng/ml) que en el C (0.78 $\pm$  0.043) mientras que en los días 5 y 6 no se observaron diferencias (P>.05). No se encontraron diferencias estadísticas entre tratamientos para FERT aunque numéricamente ésta fue mayor en **PreS** (40%) que en **PosS** (34.78%) y **C** (31.57%). El tratamiento de control del desarrollo folicular pre-servicio redujo el DFO y la P4 en el día del estro sin diferencia estadística significativa sobre la fertilidad.

**Palabras Clave:** Vaca repetidora, diámetro folicular, progesterona, fertilidad.

## COMPARISSON BETWEEN PRE- AND POST SERVICE TO INCREASE FERTILITY TREATMENTS FOR REPEAT BREEDER DAIRY COWS

### ABSTRACT

It is estimated that the incidence of repeat breeder dairy cows in intensive milk systems production is nowadays of 10 to 25%. The objective of the study, was to compare the effect over the fertility of previous and following treatments to the service of dairy cows, qualified as repeat breeders (not as pregnant with 4 services or more). There were 115 repeat Holstein cows, used of different number of birth, belonging to 2 different herd of intensive production of milk. In the pre- service treatment it was allowed to pass the estrous, in which the cow qualified as repeat breeder (EREP), and after that the follicle development was controled to the following estrous through the administration of 17-B estradiol (E2) and prostaglandine F2 (PG) (5 mg of E2 of d 6 post-estrous + 500 mg of cloprostenol the d 10 e 1A to estrous detected ; PreS, n=30). In the post-service treatment it was IA in conventional shape in the EREP administering progesterone substitute during  $\frac{3}{4}$  of the right back (CIDR-B between de day 5 to 14 of post-service; PosS; n=47).

A group of cows was left as witness IA them in the EREP (C, n=38). They were considered as variable of the associated answers to the estrous with service to the serum concentration of progesterone in the d 0 (estrous), 4, 5 Y 6 post-service (P4; RIA in solid phase), the diameter of the follicle (DFO; ultrasonicgraphic of d 0) and the percentage of fertility (FERT; diagnostic of pregnancy to 50 d post-service). The statistic analysis was done by ANDEVA in the case of P4 (designed of repeat observations) and the DFO (a designed completely by chance). The percentage of fertility was analized through the Xi-squared test. The DFO was influenced by the treatment ( $P < .01$ ), being a less number in the cows PreS ( $16.01 \pm 1.09$ mm) in comparison to the PosS ( $20.61 \pm 1.45$ mm) and C ( $20.27 \pm 1.43$ mm). The P4 in the day 0 was less ( $P < .01$ ) in PreS ( $0.37 \pm 0.2$ ng/ml) than in PosS ( $0.42 \pm 0.017$ mg/ml) and C ( $0.45 \pm 0.019$ mg/ml). P4 during the days 4,5, and 6 was no different between the treatments ( $P > .05$ ). There weren't statistic differences between treatments for FERT even if number was the highest in PreS (40%) that in PosS (34.78%) y C (31.57%). The treatment of the development of the follicle pre-service was reduced the DFO and the P4 in the day of the estrous without significant statistic difference in the fertility.

**Key Words:** Repeat breeder cow, diameter follicle, progesterone, fertility.

## I. INTRODUCCIÓN

En el sistema de producción de leche intensiva se ha observado que a medida que se ha incrementado la producción, la fertilidad por servicio se ha visto afectada de manera considerable; así en nuestros días, nos enfrentamos al hecho de que esta no sobrepasa 40% (Royal *et al.*, 2000).

Aunado a lo anterior, se ha identificado un subgrupo de vacas las cuales a pesar de haber superado el periodo crítico de balance energético negativo, tener una condición corporal aceptable, no mostrar ninguna alteración apreciable de aparato reproductor y presentar ciclos estrales en forma y tiempo normal, han recibido por lo menos tres servicios sin éxito. Éstas son las vacas repetidoras, cuya incidencia ha sido descrita del 10 al 25% (Bartellett *et al.*, 1986; Stevenson *et al.*, 1990; Gustafsson y Emanuelsson, 2002) y que causan gran frustración a veterinarios y ganaderos así como pérdidas económicas a la industria lechera.

Al problema de la vaca repetidora se le han atribuido diversas causas tales como: genéticas, hormonales, retraso de ovulación, desarrollo y maduración deficiente del ovocito, función lútea inadecuada y pobre desarrollo embrionario (Bage *et al.*, 2002; Maurer *et al.*, 1985).

Hasta el momento se han propuesto diversas estrategias de tratamiento: la administración de hCG, GnRH (Archbald *et al.*, 1993; Morgan *et al.*, 1993) o bST (Kirby *et al.*, 1997b); al momento de la inseminación; hCG o GnRH 5 a 7 días posteriores al servicio (Walton *et al.*, 1990; Kendall *et al.*, 2008) o insulina previa a este (Selvaraju *et al.*, 2002), sin embargo, los resultados han sido variables.

Estudios sobre dinámica folicular y niveles hormonales en las vacas repetidoras, han evidenciado aspectos que pueden explicar por que se ve afectada la fertilidad tales como: larga duración de estro, retraso en el pico de LH, concentración suprabasal de progesterona durante el periodo peri-ovulatorio y menor número de oleadas de desarrollo folicular durante el ciclo, causando esto último, un aumento en la permanencia y tamaño del folículo preovulatorio, (Bage *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2004). Se ha demostrado que folículos con dominancia prolongada y diámetro aumentado tienen efectos negativos en la fertilidad (Fortune, 1994; Ahmad *et al.*, 1995; Revah *et al.*, 1996; Mhim *et al.*, 1994).

Por otro lado hay evidencias de que folículos desarrollados en ausencia de progesterona y bajo una mayor frecuencia pulsátil de LH, tienen una mejor capacidad esteroidogénica (Wolfeson et al., 1999; Sirois y Fortune, 1990; Savio y Fortune, 1993); además, el periodo del proestro es otro factor que tiene repercusión en la fertilidad (Peters y Pursley, 2003; Mussard et al., 2007; Bridges et al., 2009).

En base a esto influir sobre el desarrollo folicular puede ser una alternativa para combatir el problema de vaca repetidora. Para lograr tal fin es posible utilizar GnRH, o bien progesterona, sin embargo se han obtenido resultados más consistentes utilizando 17 beta estradiol en ganado de carne. Este, es capaz de lograr que decaiga una oleada folicular independientemente del estadio de desarrollo en el que se encuentre el folículo dominante (Bo et al., 1994 y 1995) lo cual sucede aproximadamente dentro de las 24 horas siguientes y iniciando una nueva oleada en un periodo de 3 a 4 días posteriores a su aplicación (Bo et al., 1994; Martínez *et al.*, 2005)

Por otro lado, las vacas repetidoras presentan un retraso en el aumento de progesterona así como una concentración menor posterior al servicio (Bage *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2004); tomando en cuenta que esta hormona es clave en el desarrollo embrionario temprano y en el establecimiento de la preñez, puesto que actúa sobre el endometrio y sus glándulas favoreciendo dichos procesos (Starbuck *et al.*, 1999) el suministro de progesterona es otro tratamiento al cual se ha recurrido para mejorar la fertilidad (Larson *et al.*, 2007; Villarroel *et al.*, 2004). En estos casos, también los resultados han sido un tanto variables en función del periodo durante el cual se ha llevado a cabo dicho suministro. Existen evidencias de una ventana crítica en la cual el aumento de progesterona es favorable para el establecimiento de la preñez (Stronge *et al.*, 2005; Starbuck *et al.*, 1999), puesto que su incremento en los días 5-8 post-servicio ha sido relacionado positivamente con la fertilidad y la secreción de interferón tau por parte del embrión (Mann y Lamming, 2001; Mann *et al.*, 2006). Antes o después de este periodo el

tratamiento no tiene efecto o incluso llega a ser perjudicial (Beltman *et al*, 2009; Mann *et al.*, 2006).

## **1.1 OBJETIVO**

Comparar el efecto de un tratamiento previo a la inseminación artificial mediante el cual se controle el desarrollo folicular asegurando que el folículo se desarrolle en ausencia de progesterona mediante la aplicación de 17 beta estradiol y prostaglandina, con el del suministro de progesterona posterior al servicio durante la ventana crítica del desarrollo embrionario, sobre la concentración sérica de progesterona, diámetro del folículo ovulatorio y fertilidad en vacas repetidoras.

## **1.2 HIPÓTESIS**

El control del desarrollo folicular mediante la aplicación de un tratamiento previo al estro utilizando 17- $\beta$  estradiol y prostaglandina F $2\alpha$ , así como el suministro de progesterona durante la ventana crítica del desarrollo embrionario, mejoran la fertilidad en el servicio de vacas repetidoras en sistemas de lechería intensiva.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### Fisiología del eje reproductivo de la vaca

#### Ciclo estral

El ciclo estral es una serie de sucesos hormonales progresivos, repetitivos y sincronizados regulados por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas que causan cambios internos, en el tejido del tracto reproductor principalmente, y externos que se manifiestan en el comportamiento (Kilen *et al.*, 1999)

Es importante tomar en consideración que la manera en que el ciclo estral se manifiesta actualmente es resultado, como tantos otros procesos, de la evolución y adaptación; además se expresa de manera más evidente que el resto y, aunque presenta una gran variación entre especies no pierde sus características de precisión y ciclicidad.

En condiciones normales el ciclo estral de la vaca tiene una duración de 17 a 25 días (Stevenson, 2007) y con base en los eventos fisiológicos de mayor importancia se ha dividido en etapas bien definidas: proestro, estro, metaestro y diestro

Durante el proestro (día 19 hasta que ocurre el estro) el incremento en la frecuencia de secreción de Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) en el hipotálamo, estimula a la adenohipófisis, la cual a su vez, secreta con un patrón de igual frecuencia a la Hormona Luteinizante (LH), ésta causará la maduración final de el folículo potencialmente ovulatorio; dicho folículo ha pasado por fases de crecimiento y selección puesto que ya había iniciado su desarrollo inducido por la Hormona Folículo Estimulante (FSH) junto con otros folículos que en ese momento han quedado ya como subordinados. El folículo dominante ya es capaz de sintetizar estradiol en grandes cantidades causando cambios que externamente se manifiestan con comportamiento de celo. Es justamente el momento cuando inicia la etapa del estro que tiene una duración de 12 a 18 (Stevenson, 2007) o hasta 30 horas (Driancurt *et al.*, 1993) el cual es llamado Día 0 del ciclo y se caracteriza por cambios en el comportamiento tales como aumento de la actividad, inquietud, monta a otras hembras, y receptividad al macho u otras hembras. El aumento en la

concentración circulante de estradiol además causa la oleada preovulatoria de LH responsable de la ovulación. En el caso de los bovinos la ovulación ocurre entre las 24 y 30 (Diancurt *et al.*, 1993) horas después, es decir ya en el periodo de metaestro, momento en que la concentración de estrógenos disminuye drásticamente. La liberación del ovocito deja el llamado cuerpo hemorrágico y las células tecales y de granulosa que formaban el folículo comienzan un cambio en su función ya que bajo la acción de LH secretan progesterona aumentando su producción de manera progresiva (niveles de concentración por encima de 1 ng/ml) y forman el cuerpo lúteo; esta etapa tiene una duración aproximada de uno a tres días.

El diestro se caracteriza porque durante este período el cuerpo lúteo alcanza su máximo grado en tamaño y secreción de progesterona (12 ng/ml) abarcando aproximadamente los días 4 a 18 del ciclo (Stevenson, 2007).

El diestro termina con la luteólisis debido a la liberación de prostaglandina F<sub>2</sub> por parte del útero, por lo que la concentración de progesterona cae, permitiendo nuevamente el aumento en la frecuencia de pulsos GnRH/LH y la repetición del ciclo

### **Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas**

Una forma de regular las funciones del organismo es a través del control hormonal, el SNC es quien lo realiza a través del hipotálamo. Bajo este esquema se maneja el concepto de ejes endocrinos debido a que hay una comunicación estrecha y bien regulada entre el hipotálamo, la hipófisis y otras glándulas y órganos de la periferia.

Se sabe que la función reproductiva se encuentra bajo este régimen ya que las gónadas dependen del estímulo de las gonadotropinas (FSH y LH), hormonas hipofisarias que a su vez son controladas por el factor liberador de gonadotropinas (GnRH), decapeptido producido por neuronas el hipotálamo; ambas secreciones se ven afectadas por mecanismos de retroalimentación por parte de las hormonas gonadales.



El sistema porta hipotálamo-hipofisiario es vertiente de la carótida interna y consta de un plexo primario que se encuentra en la eminencia media y uno secundario en la hipófisis anterior, de esta manera las neurohormonas producidas en hipotálamo son transportadas a sus células blanco que se encuentran en la adenohipófisis, que en el caso de la GnRH son los gonadotropos.

El hipotálamo es una porción del diencefalo que se encuentra debajo del tálamo formando parte del piso del tercer ventrículo y sus límites son: en la parte anterior la lámina terminalis, el quiasma óptico y la comisura anterior; en la posterior la fosa interpeduncular y el cuerpo mamar; en la parte superior el sulcus hipotalámico y el tálamo, y en la inferior el tuber cinereum. El hipotálamo está constituido por núcleos que son conglomerados de neuronas que extienden sus dendritas y axones a distancias considerables; algunos de los axones se extienden fuera de los límites del hipotálamo, llegando a la eminencia media y a la neurohipófisis.

La hipófisis se encuentra en la silla turca de la base del cráneo; tanto histológicamente como en el aspecto anatómico se distinguen dos partes: la hipófisis posterior o neurohipófisis a la cual llegan directamente axones de neuronas hipotalámicas; y la hipófisis anterior o adenohipófisis constituida por diversos tipos de células: tirotropos, corticotropos, somatotropos, lactotropos y gonadotropos; éstos últimos presentan receptores para GnRH así que sintetizan, almacenan y secretan FSH y LH.

#### Factor liberador de Gonadotropinas (GnRH)

El GnRH es un decapeptido del cual se han identificado múltiples isoformas en vertebrados (Sherwood *et al.*, 1993), aunque solo dos o tres son expresadas en mamíferos (Herbison, 2006) Y de las cuales la GnRH tipo I tiene un rol incuestionable en el control reproductivo pues controla la secreción de gonadotropinas en adenohipófisis

Las neuronas GnRH tienen una población relativamente pequeña (alrededor de 800 en ratones y 2400 en el mono Rhesus), sus cuerpos celulares se encuentran distribuidos en un patrón semejante a la letra "Y" invertida que se extiende desde

el bulbo olfatorio, núcleo medial septal, banda diagonal de Broca y área preóptica; en esta última se encuentran en mayor proporción. Algunos estudios han revelado que del 50 al 70% de las proyecciones de las neuronas GnRH son dirigidas hacia la eminencia media (Herbison, 2006). La población de estas neuronas es pues muy variada tanto en su localización así como en su citología pues se pueden encontrar neuronas bipolares, con citoplasma liso o con protuberancias, situación que según observaciones se ve afectada por la pubertad así como por la influencia de los esteroides gonadales (Herbison, 2006)

La secreción pulsátil de las neuronas de GnRH es regulada principalmente por los esteroides gonadales, más no de manera directa puesto que ellas no poseen receptores intracelulares para andrógenos, estrógenos ni progesterona, aunque se ha informado presencia de receptores no clásicos para estradiol denominados así, puesto que se encuentran en la membrana y por lo tanto pudieran estar ejerciendo una acción rápida no genómica (Lösel *et al.*, 2003 ).

Así pues, las evidencias indican que su control es por vías inter neuronales donde se involucran neurotransmisores tanto excitatorios como inhibitorios siendo los mas importantes dentro de las vías generalmente identificadas como positivas glutamato, óxido nítrico y kisspeptinas; con efectos negativos GABA, dopamina y péptidos opioides y con efectos duales neuropéptido Y, noradrenalina y serotonina (Terasawa y Fernández, 2001; Clarke y Pompolo 2005; Herbison, 2006)

Como se comentó anteriormente la diversidad de las neuronas de GnRH es notable, sin embargo se observa una gran sincronía en la liberación del neuropéptido y para explicar dicho evento se han propuesto varios modelos que la expliquen.

Uno de ellos indica que hay un subgrupo reducido de neuronas "líder" que dirigen al resto. Otro modelo sugiere que no existe un grupo en específico que dirija como tal a las demás sino que aquella que se repolarice o que alcance su estado de reposo inicia un pulso nuevamente y afecta al resto, esto es regulándose a través del mismo GnRH. Un tercer modelo sugiere el hecho de que cada pulso de las neuronas de GnRH sea dirigido exclusivamente por un grupo de neuronas ajenas a estas a través de los neurotransmisores enunciados anteriormente (Herbison, 2006).

Aunque no se ha elucidado cual de estas propuestas sea la verdadera o si las neuronas de GnRH actúan bajo el influjo de las tres se debe tomar en cuenta que la GnRH es indispensable para la reproducción ya que el funcionamiento del eje depende totalmente de su patrón de pulsatilidad.

### Gonadotropinas

Los gonadotropos se encuentran en la adenohipófisis conformando del 3 al 15 % de sus células totales (Childs, 2006) y expresan receptores para GnRH cuya cantidad puede variar dependiendo de la etapa del ciclo estral, preñez, lactancia siendo regulados por la misma GnRH; dichas células se encargan de sintetizar, almacenar y liberar las gonadotropinas las cuales ingresan al sistema circulatorio para regular la función de sus órganos blanco, las gónadas, promoviendo foliculogénesis, esteroidogénesis y función lútea (Childs, 2006)

Como se ha mencionado a través del escrito las gonadotropinas hipofisarias son dos: FSH (Hormona Folículo Estimulante) y LH (Hormona Luteinizante), glicoproteínas formadas por dos subunidades, la subunidad alfa que es común y además comparten con la tirotropina y una subunidad beta particular para cada gonadotropina que les confiere especificidad biológica (Bousfiel *et.al.*, 2006).

La FSH es encargada de estimular el desarrollo folicular influyendo en los folículos antrales; las células de la granulosa poseen receptores para esta hormona y una vez activados estimulan la aromatización de los andrógenos para producir estrógenos.

La LH por un lado lleva al folículo a su maduración final y ovulación y por otro promueve, la luteinización de las células de la granulosa y de la teca interna para la producción de progesterona. Al inicio del desarrollo folicular las células de la teca poseen receptores para esta hormona y producen andrógenos, posteriormente las células de la granulosa los manifiestan también coincidiendo este hecho con la adquisición de dominancia del folículo.

## Fisiología

Es un tanto complejo el entender como una molécula de GnRH es capaz de regular la síntesis y liberación de otras dos por parte de los gonadotropos, LH y FSH; por lo tanto una explicación para esto es que el patrón de síntesis y secreción de una u otra es influenciado tanto por la amplitud como por el patrón de frecuencias de los pulsos de GnRH, lo cual a su vez se ve afectado por la acción de los esteroides gonadales.

Una baja frecuencia de pulsos (con un intervalo aproximadamente de dos horas cada uno) es favorable para la biosíntesis y secreción de FSH, por el contrario una baja amplitud pero alta frecuencia favorecen completamente a la LH; aproximadamente el 93% de los pulsos de FSH corresponden a otro de GnRH bajo ese patrón de periodicidad. Esta discrepancia puede ser explicada por la acción directa sobre los gonadotropos por parte de activinas las cuales favorecen la liberación de FSH o caso contrario inhibinas y folistatinas que la inhiben aunque por otro lado se han encontrado evidencias de la existencia de un factor liberador específico para FSH (Padmanabhan y McNeilly 2001)

De manera contraria, la alta frecuencia de pulsos de GnRH son favorables para a síntesis y liberación de LH, además de que a diferencia de la FSH se ha establecido que exactamente un pulso de LH es precedido por otro de GnRH (Jeong y Kaiser *et al.*, 2006)

La modificación de los pulsos de GnRH es regulada por los esteroides gonadales estrógenos y progesterona.

Las acciones de de las hormonas esteroidales son a través de receptores clásicos los cuales se encuentran a nivel intracelular y se unen y activan factores de transcripción aunque también hay evidencias de que pueden actuar a través de receptores que se encuentran en membrana plasmática. Se han identificado dos tipos de receptores para estrógenos, el original denominado ahora ER alfa y uno de reciente descripción denominado ER beta (Scott C. J., 2000)

La progesterona ejerce un efecto negativo sobre la secreción de GnRH, de manera que durante la fase lútea del ciclo estral la frecuencia de pulsos se ve disminuida y por consecuencia también los de la LH, a través de péptidos opioides como

intermediarios puesto que, como ha sido señalado líneas arriba, las neuronas GnRH no poseen receptores para esteroides. Sin embargo, otro efecto importante de la progesterona sobre el hipotálamo es que parece ser una sensibilización previa para que por acción posterior de los estrógenos, por un lado se presente la oleada preovulatoria de gonadotropinas y la ovulación y por otro lado se manifieste el comportamiento de estro; lo anterior es apoyado por el hecho de que una exposición a progesterona previa al ciclo resulta en una manifestación de estro mas intensa asegurando incluso una sincronización entre el estro y la oleada preovulatoria (Goodman *et al.*, 2006). Además se ha sugerido que un incremento temporal de progesterona es necesario para el reestablecimiento del sistema reproductivo al finalizar una etapa de anestro estacional o posterior al parto.

En el caso de los estrógenos se ha observado que pueden ejercer mecanismos de acción tanto positivos como negativos.

Los bajos niveles de estradiol que son observados durante un anestro estacional o incluso antes de la pubertad ejercen una influencia negativa sobre la secreción de GnRH.

Por otro lado una vez que la hembra ha pasado la pubertad o bien ha salido de algún tipo de anestro los niveles de estrógenos que comienzan a aumentar durante el proestro y llegan a mantenerse por varias horas a cierta concentración actúan de manera positiva provocando la oleada preovulatoria de gonadotropinas y por ende la ovulación.

Parece ser que los efectos ejercidos por ambos esteroides sobre las gonadotropinas no involucran la disminución de la síntesis sino solamente en su secreción.

Los estrógenos influyen en la secreción de GnRH por varias vías:

Aunque muchos experimentos han demostrado que las neuronas de GnRH carecen de receptores para estrógenos, éstos se han realizado solo en animales adultos por lo que es posible que durante la etapa de desarrollo los estrógenos si puedan actuar de modo directo, la forma en que los estrógenos logran sus efectos es a través de neuronas intermediarias o modificando la posición de células gliales que rodean los cuerpos de las neuronas GnRH (Herbison, 1998).

Puesto que la regulación de GnRH es más importante en su secreción y su síntesis se debe tomar en cuenta que ésta se almacena en gránulos o vesículas secretoras que son transportadas hasta las terminales de los axones y se secretan por exocitosis la cual es dependiente del calcio (Herbison 2006).

Existen otras moléculas que ejercen efectos sobre la síntesis y secreción de las gonadotropinas además de los esteroides gonadales. Estas son: activina, inhibina y folistatina (Findlay *et al.*, 1992; Jeong y Kaiser, 2006)

Las inhibinas y folistatinas consisten en diferentes combinaciones de las unidades Alfa, Beta A y Beta B. Así pues la dimerización de una subunidad Alfa con la subunidad Beta A o Beta B da como resultado una inhibina A o B respectivamente. En cambio la dimerización de dos subunidades Beta da como resultado Activina A (Beta A, Beta A), Activina B (Beta B, Beta B) y Activina AB (Beta A y Beta B) (Findlay *et al.*, 1992).

Tanto activinas como inhibinas han sido encontradas en gonadotropos así como en extractos gonadales.

Numerosos estudios han demostrado que las activinas aumentan la síntesis de la FSH Beta; parece ser que tiene varios mecanismos por los cuales logra este propósito, por un lado no tiene efectos directos sobre la GnRH si no mas bien sobre los gonadotropos ya que es capaz de inducirlos incluso en células que se encuentran desensibilizadas a GnRH. Por lo tanto realza los efectos de esta última pues además parece favorecer la presencia de de los receptores para ésta; es capaz también de alterar la población de gonadotropos aumentando el número de aquéllos que secretan FSH.

En el caso de la inhibina su efecto es reducción de síntesis de FSH, esto parece ser que lo logra en parte siendo un antagonista de la activina puesto que tienen ambas afinidad por los mismos receptores los cuales son de dos tipos; aunque para la activina es difícil presentar un antagonismo como tal pues para el primer tipo de estos receptores su afinidad es considerablemente mas baja.

En cuanto a la LH parece no estar muy claro el efecto que la inhibina pueda ejercer sobre ella puesto que mientras algunos estudios reportan disminución en la concentración basal durante el proestro otros en cambio no han encontrado

alteración en los patrones de secreción que puedan ser explicados por la presencia de esta molécula (Jeong y Kaiser 2006)

La folistatina es otra molécula que tiene actividad supresora sobre la FSH y efecto aditivo a la inhibina; podría ser además una molécula clave en la diferenciación del efecto de GnRH sobre la producción de gonadotropinas puesto que una frecuencia alta de sus pulsos favorecen su expresión

### **Desarrollo folicular**

La duración de la foliculogénesis partiendo de folículo primordial hasta la ovulación es de aproximadamente 4-6 meses en bovino y ovino (Hunter, 2004). Durante cualquier estadio a lo largo del periodo todos son susceptibles a sufrir atresia.

El primer signo que indica el inicio del desarrollo folicular a partir del estado primordial es la transición morfológica de las células que se encuentran alrededor del ovocito que de ser redondas toman una apariencia cuboidal; el diámetro del ovocito también aumenta así como las capas de células de la granulosa, siendo durante esta etapa el desarrollo independiente de gonadotropinas.

El folículo en mamíferos consta pues de varias capas de células somáticas que rodean al ovocito, las cuales se van multiplicando y diferenciando a medida que avanza el desarrollo folicular y se forma el antro. Una vez llegado a esta etapa las gonadotropinas se vuelven indispensables, las células de la granulosa, comienzan a separarse y forman dos subtipos: el cúmulus que rodean y tienen un contacto mas estrecho con el ovocito y las células murales que limitan al folículo en la vaca y forman un epitelio estratificado con una lámina basal que separa a las células de la granulosa de las células tecales (Eppig, *et al.*, 1997).

Éstas diferencias nos solo son anatómicas sino también funcionales, ya que las células del cúmulus producen ácido hialurónico y se expanden en respuesta al estímulo de FSH, mientras que las células murales son mas activas

esteroidogénicamente como lo indica la presencia de altos niveles de RNAm de enzimas como citocromo P450<sub>scc</sub> y citocromo P450 aromatasa (Li, *et al.*, 2000) Así pues, las células del cúmulus juegan un papel importante en el crecimiento y desarrollo normal del ovocito mientras que las murales son importantes en la función hormonal y sostén durante la foliculogénesis.

Esta diferencia permanece aun después de la ovulación pues mientras que las murales cambian su rol endocrino al sufrir luteinización, las otras son liberadas junto con el ovocito y tienen una contribución importante en la reacción acrosomal del espermatozoide.

#### Origen del folículo ovárico

Las células germinales primordiales que se desarrollan y diferencian durante la embriogénesis derivan posteriormente en ovogonias en la hembra y espermatogonias en el macho; éstas se originan en el saco vitelino del endodermo para luego emigrar hacia el risco gonadal donde tienen actividad mitótica elevando considerablemente su número hasta antes del parto.

Si la determinación de sexo es a hembra las células germinales se diferencian a ovogonias para luego iniciar su primera división meiótica dando lugar a los denominados ovocitos primarios. Durante este periodo se expresan genes que favorecen la expresión de componentes de zona pelúcida y otros factores involucrados en la organización de células pregranulosas que tienen una forma aplanada y se localizan alrededor del ovocito el cual queda en un arresto meiótico y junto con estas células forman a los folículos primordiales.

#### Desarrollo Independiente de gonadotropinas

El desarrollo folicular temprano se refiere al crecimiento de un folículo a partir de su estadio primordial hasta la fase antral temprana; dichos eventos se llevan a cabo sin apoyo de gonadotropinas.



En bovinos estas fases se han clasificado en base a la configuración de las células de la granulosa así como por el diámetro del ovocito; Braw-Tal y Yossefi (1997) describieron la siguiente clasificación: 1 folículo primordial (una capa de células de granulosa), 1a transitorio (las células de la granulosa se vuelven cuboidales), 2 folículo primario (poseen de una a dos capas de células de granulosa cuboidales), 3 preantral pequeño (de dos a cuatro capas de células de granulosa y aparición de células de teca interna), 4 preantral grande (4 a 6 capas de células de granulosa), 5 antral temprano (más de cinco capas de células granulosas).

Existen fuertes evidencias de que estas etapas están reguladas por varios factores. Se ha observado por ejemplo, que el SCF (Stem Cell Factor) así como su receptor c-kit (tirosin-cinasa) están presentes tanto en el ovocito como en las células de la granulosa e influyen en la transición del folículo primordial a primario. (McNatty *et al.*, 1999).

Los dímeros activina e inhibina aparecen en células de la granulosa aproximadamente en folículo transitorio y primario ya que parecen estar involucrados en inhibir la expresión de receptores para FSH a la vez que promueven el desarrollo para que el folículo entre a etapa de preantral. (McNatty *et al.*, 1999).

La folistatina es otro factor del cual se tienen evidencias de que se presenta en todos los estadios del desarrollo folicular, es posible que se una a otras proteínas con el fin de evitar una maduración prematura del ovocito.

Los factores de crecimiento tales como TGF beta (Factor de Crecimiento Transformante beta) y FGF (Factor de Crecimiento de Fibroblastos) que se han caracterizado estar presentes en células tecales y de la granulosa así como en epitelio, músculo liso y rodeando vasos sanguíneos del ovario durante todos los estadios parecen estar involucrados en proliferación celular

En esta etapa independiente de gonadotropinas comienzan a aparecer mRNA para el receptor de FSH (R-FSH) en las células de la granulosa durante el estadio preantral. (McNatty, *et al.*, 1999 y Xu *et al.*, 1995) y aunque no se considere este evento regulado por gonadotropinas se ha observado *in vitro* que la suplementación con FSH favorece el crecimiento de folículos preantrales (Lucy, 2007). Las células de la teca que comienzan a hacerse presentes en el primer

estadio pequeño y en el siguiente, manifiestan mRNA para receptores de LH (Braw-Tal y Yossefi 1997, McNatty, *et al.*, 1999)

La angiogénesis es también un evento importante para el desarrollo folicular así como la atresia está relacionada con un decremento en la vascularización. Este suceso es evidente a finales del estadio pre-antral y coincide con la adquisición de células de la teca, la vasculatura se desarrolla en ambas capas de estas células aunque no penetra en la membrana basal, por lo que las células de la granulosa permanecen avasculares (Hunter, 2004). Tal parece que el principal factor que regula la angiogénesis en el folículo es el VEGF (Factor de crecimiento Endotelial Vascular) de el cual principalmente estimula la proliferación y migración de células endoteliales microvasculares así como la permeabilidad vascular. La principal fuente de VEGF son las células de granulosa por lo cual es abundante en líquido folicular así como también FGF-2 (Factor de Crecimiento del Fibroblasto; Hunter, 2004)

La IGF-I parece ser indispensable para el reclutamiento de folículo primordial así como el desarrollo de folículos preantrales e interviene en la expresión de receptores para FSH preparando al folículo para su transición a la siguiente etapa en la cual se vuelve dependiente de gonadotropinas (Monget *et al.*, 2002); lo anterior se ha demostrado en ratones knock-out los cuales no poseen ningún folículo antral e incapaces de llegar a la ovulación.

#### Desarrollo dependiente de gonadotropinas

El reclutamiento no es un fenómeno aislado ni casual, por el contrario el hecho de que este evento se manifieste en un grupo de folículos a la vez sugiere que reciben una señal para continuar su crecimiento a partir de folículos antrales, la cual parece ser la FSH puesto que el citado evento coincide con su elevación en plasma y sugiere también que es a partir de ese estadio que el folículo se convierte en dependiente de las gonadotropinas (Fortune, 1999) y cuyo diámetro es aproximadamente 3-4 mm en bovinos (Hunter, 2004) . El número de folículos reclutados es generalmente mayor al que se convertirá en ovulatorio, el cual a

través de un proceso de selección será el llamado folículo dominante y al cual el resto quedarán subordinados.

La selección del folículo dominante a partir del grupo de folículos antrales que inician el reclutamiento es un proceso dinámico regulado por la interacción de gonadotropinas y factores intraováricos (Austin 2001); éste no solo continúa con su desarrollo sino que se diferencia de manera funcional con respecto a los demás puesto que se prepara para la ovulación y una posible fertilización y desarrollo embrionario. La síntesis de estradiol es de suma importancia y requiere la cooperación de ambas gonadotropinas así como de células blanco en el folículo: teca y granulosa. Mientras que las primeras poseen receptores para LH y producen andrógenos, las de la granulosa responden a FSH y aromatizan estos para convertirlos en estrógenos; de vital importancia es tomar en cuenta que durante las fases finales del desarrollo folicular las células de la granulosa adquieren también receptores para LH, evento que por supuesto no sucede en los ya folículos subordinados. (Fortune 1999, Adams, 1999). En ese momento el bovino posee un diámetro folicular de 9-10 mm (Hunter, 2004). El folículo dominante adquiere además la capacidad de continuar su desarrollo sin el soporte de FSH puesto que el aumento en la producción de estradiol e inhibina tienen un efecto de retroalimentación negativa con respecto a esta gonadotropina disminuyendo su concentración y así se logra que los subordinados ya no puedan continuar el crecimiento puesto que les falta el aporte de FSH (inhibina, folistatina, etc.). Se ha observado además que en el fluido folicular de los subordinados se presenta mayor cantidad de IGFBP's (Proteínas de unión a Factor de Crecimiento Insulínico), las cuales secuestran a las IGF impidiendo de esta manera que continúen su desarrollo (Austin 2001). Existen evidencias además de que los dominantes poseen un gran desarrollo vascular que les proporciona un mayor suministro de gonadotropinas con respecto a los subordinados (Hunter, 2004). A partir de este momento se pueden presentar dos escenarios: si durante la fase de dominancia la concentración de progesterona es elevada el patrón de pulsos de LH será muy poco frecuente lo cual no favorecerá para que el folículo logre su maduración final ni tampoco a su ovulación, por lo que el folículo iniciará un proceso de atresia. Esto conlleva la disminución tanto de estradiol como de

inhibina lo que favorecerá a un nuevo aumento en la concentración de FSH y el inicio de una nueva oleada de desarrollo folicular. En cambio, si la dominancia coincide con la luteólisis y la disminución de progesterona se incrementará la frecuencia de pulsos de LH, lo cual aumentará la capacidad de células de granulosa de aromatizar andrógenos (Fortune, 1999) y la elevación de estrógenos causará la oleada de gonadotropinas que llevará al folículo a la ovulación.

### **Desarrollo del ovocito**

El ovocito tal vez posea a simple vista una morfología simple. Sin embargo es complejo desde el punto de vista molecular, ya que cuando completa su maduración y ha llegado a ser fertilizado posee los componentes necesarios para llevar a término la meiosis, entrar a división mitótica e iniciar el desarrollo del embrión de tal modo que éste a su vez sea competente para activar su genoma e iniciar una transcripción correcta (Zheng *et al.*, 2005).

La calidad del ovocito tiene un impacto importante en el desarrollo y sobrevivencia embrionaria en estadios tempranos. Esta calidad o capacidad competente del ovocito es adquirida durante el proceso de foliculogénesis pues es precisamente durante este periodo cuando se lleva a cabo no solo su crecimiento sino su maduración (Krisher, *et al.*, 2004), la cual no consiste únicamente en que se complete la meiosis o maduración nuclear sino además la maduración citoplasmática que consiste en la expresión de RNAm específicos según la etapa. Es decir, aunque la meiosis se pueda llegar a completar hay una gran variedad de procesos que ocurren en el citoplasma del ovocito y son requeridos para llevar a término el desarrollo tanto del él mismo como de los procesos que ocurren consecuentes a la fertilización, lo cual es independiente de la maduración nuclear; un ovocito que no ha logrado lo anterior correctamente es de pobre calidad e inhábil para completar el desarrollo posterior del embrión por lo que se presentan altas probabilidades de causar pérdida de la gestación. (Zheng *et al.*, 2005 y Krisher, *et al.*, 2004)

### Maduración citoplasmática del ovocito

La maduración citoplasmática del ovocito ocurre entre la transición de folículo primario a pre-ovulatorio y su diámetro incrementa de aproximadamente 15 a 100  $\mu$ m, es decir incrementa 300 veces su volumen (Erickson *et al.*, 1986). Como referencia podemos tomar en cuenta que en un ratón el ovocito contiene 200 veces más RNA y proteínas que una célula somática normal (Wassarman *et al.*, 1996). Al momento en que se lleva a cabo la meiosis la actividad transcripcional cesa, sin embargo, el transporte de RNAm continúa hasta los estadios finales de esta (Heikinheimo y Gibbons 1998).

Así pues durante el crecimiento del ovocito en el folículo muchos genes son expresados, algunos de sus productos tienen efecto sobre las células somáticas foliculares, otros están involucrados en el control de la meiosis, ya sea arresto o continuación, otros serán críticos después de la fertilización antes o después de que se active el genoma del cigoto lo cual variará dependiendo de la especie, de ahí la importancia de que el desarrollo se lleve a cabo de manera eficiente (Krisner *et al.* 2004).

#### Comunicación entre células de la granulosa y el ovocito

El desarrollo del ovocito no se lleva a cabo por sí solo o dependiente de las señales recibidas de él mismo, no se debe olvidar que durante el proceso este se encuentra acompañado de otras células somáticas: granulosa y teca que confieren el ambiente necesario para llevar al ovocito a un desarrollo competente. Las interacciones entre estas células coordinan el desarrollo de los folículos a través de varias vías de comunicación celular incluyendo endocrinas, autocrinas y paracrinas así como las uniones comunicantes. Esta coordinación entre el ovocito y las células somáticas foliculares asegura que éste sea realmente capaz de ser fertilizado y consecuentemente llevar a cabo la embriogénesis.

Esta comunicación es pues bilateral pues el ovocito a su vez promueve la proliferación, diferenciación y función de las células de la granulosa (Li *et al.*, 2000). De hecho la formación del folículo parece ser coordinada por el FIG 4 (Factor en la línea germinal 4) que se expresa en el ovocito; el desarrollo folicular temprano depende de miembros de la familia de factores de crecimiento como son

GDF-9 (Factor de Crecimiento Diferenciado) y la BMP-15 (Proteína Morfogénica del Hueso; Eppig, *et al.*, 2002 y Erickson, 1986). Dichos factores que se producen en el ovocito y que actúan de manera paracrina, promueven la proliferación y la esteroidogénesis en las células somáticas y de manera local regulan a su vez la expresión de otros genes en las células de la granulosa. Aunque no se han caracterizado exactamente todos aquellos factores derivados de los ovocitos muchos de sus efectos sobre las células de la granulosa pueden ser mimetizados por TGF's y GDF-9; de hecho hembras con deficiencia de éste son infértiles ya que se bloquea la foliculogénesis, además de que se ve disminuida la expresión de RNAm de activina b, folistatina y cyclooxygenasa 2 (COX-2; Li *et al.*, 2000).

Una investigación realizada por Eppig *et al.*, (2002) para cuestionar la hipótesis de que el ovocito controla el desarrollo folicular consistió en aislar los ovocitos de folículos secundarios de ratones con 12 días de edad los cuales se combinaron con células somáticas de ovarios pertenecientes a ratones neonatos y a su vez los ovocitos de los neonatos fueron agregados a las células somáticas de ratones de edad de 12 días. Después de tres días los ovocitos extraídos de los folículos secundarios se rodearon por una o dos capas de células de la granulosa, señal que indica la transición de folículo primario a secundario, nueve días después eran ya folículos antrales tempranos presentando células tecaes; en contraste el control aún nueve días después no contenían folículos avanzados a estadio secundario, presentando una fuerte evidencia de que el ovocito dirige el desarrollo de las células somáticas foliculares (Li *et al.*, 2000).

De igual manera también son importante las señales de las células del cúmulus para lograr que este sea competente al momento de la ovulación (Moor *et al.*, 2001). Se ha demostrado en cerdos que el ovocito depende de la presencia de las células foliculares para generar señales que coordinen su crecimiento y maduración; lo anterior derivó de la comparación de ovocitos madurados en un medio de células de la granulosa de raza Meishan que tiene una baja mortalidad embrionaria con otros que fueron cultivados en un medio con condiciones foliculares de Large White. De tal manera puede decirse que el crecimiento del ovocito es regulado por proteínas derivadas de las células de la granulosa y a su

vez el desarrollo de estas son reguladas por factores derivados del ovocito (Krisher, 2004).

### **Oleadas de desarrollo folicular**

La cinética del desarrollo folicular está bien caracterizada en bovinos quienes han sido el primer modelo por el cual se ha introducido el concepto de oleadas así como los mecanismos involucrados en este (Adams, 1999)

El crecimiento y regresión de los folículos ováricos son continuos bajo un patrón de emergencias durante el ciclo estral y, al paralelo de éste último cuyo periodo normal es de 18 a 24 días, se desarrollan generalmente de dos a tres oleadas (Ghinter *et al.*, 1989; Fortune 1993) aunque también se han reportado ciclos con una (Savio *et al.*, 1993) y hasta cuatro (Rhodes *et al.*, 1995; Pérez, *et al.*, 2004). En el caso de aquéllos que presentan dos oleadas foliculares, la primera emerge justamente el día de la ovulación y la siguiente en el día diez mientras que aquellos ciclos con tres emergen en los días 0, 9 y 16 (Ghinter *et al.*, 1989). Así pues, el folículo dominante de la última oleada coincide con la caída de progesterona y por lo tanto es el que llega a ovular. El intervalo de la emergencia folicular a la ovulación será más corto en aquellos ciclos que presenten tres oleadas si se compara con las de dos: 6 a 7 y 10 a 11 respectivamente, por lo tanto influye también en la duración del ciclo puesto que a mayor número de oleadas, el ciclo es mas largo (Pérez *et al.*, 2004). El mecanismo que regula los patrones de desarrollo folicular en ciclos estrales espontáneos sigue sin ser elucidado completamente aunque hay evidencias que la nutrición puede ser un factor importante que influya en esto (Lucy *et al.*, 1992; Bleach *et al.*, 2004)

El patrón de oleadas foliculares se refiere pues a una periodicidad y sincronía en el crecimiento de un grupo de folículos antrales, que en el caso de los bovinos son de 8-14 y que son detectados por ultrasonido presentando un diámetro de 3-4 mm (Ghinter *et al.*, 1989; Savio *et al.*, 1993; Fortune 1994). Durante los dos primeros días el crecimiento entre los folículos es similar, sin embargo solo uno de ellos se convierte en dominante, es decir, continuará con su desarrollo mientras que el resto (folículos subordinados) se convertirán en atrésicos. Bajo la influencia de

progesterona el dominante también tendrá un destino de atresia, sin embargo, si coincide con el periodo de luteólisis se convertirá en folículo ovulatorio y la emergencia de la siguiente oleada será hasta el día del estro.

Cada oleada folicular es precedida por un aumento en la concentración circulante de FSH (Adams 1999, Fortune 1994), a medida que los folículos crecen producen estradiol e inhibina los cuales provienen principalmente del folículo que se ha convertido en dominante y tienen un efecto de retroalimentación negativa con respecto a FSH, previniendo por un lado la emergencia de una nueva oleada y por otro que continúe el desarrollo de los subordinados.

La selección se refiere a la divergencia en el perfil de crecimiento de los folículos; el mecanismo de selección del folículo dominante está basado en la respuesta tanto a FSH como a LH.

El momento de la selección coincide con la caída en la concentración de FSH, esto conlleva el hecho de que el folículo dominante adquiere la capacidad de continuar su desarrollo sin el soporte de esta hormona. Otro aspecto de importancia es el cambio en su respuesta a LH (Adams 1999, Fortune 1994) puesto que las células de la granulosa presentan también receptores para ésta, lo cual hará posible su ovulación en contraparte con los subordinados que no adquieren ninguna de las dos características, sin embargo estos pueden adquirir dominancia si se remueve al folículo dominante o si se suministra de manera exógena FSH. El proceso de selección no está elucidado completamente, sin embargo se ha observado que las concentraciones de IFG-BP 4 Y 5 son mas bajas en el folículo dominante aproximadamente a partir del día tres después de la emergencia, esto es que la actividad de las IGF's tienen un papel importante en este aspecto y además precede al incremento de respuesta a LH por parte de las células de granulosa (Rhodes *et al.*, 1995).

El patrón de la oleada folicular presenta un primer periodo de desarrollo progresivo, posterior a este inicia una fase estática en la cual no aumenta el folículo de tamaño, sin embargo el dominante continúa su patrón de secreción causando el descenso de FSH; después de este periodo pueden suceder dos eventos: si la concentración de progesterona es alta como sucede durante el diestro, esto causará que la LH se encuentre con patrones bajos de secreción por



lo tanto el folículo dominante cesará su metabolismo e iniciará un periodo de regresión o atresia, cual permitirá un aumento de FSH y el inicio de una nueva oleada, en cambio si la etapa estática coincide con la regresión del cuerpo lúteo y el descenso de progesterona los pulsos de secreción de LH aumentarán favoreciendo la maduración final del folículo, así pues la concentración alta de estrógenos que ocasionará la oleada de gonadotropinas lo conducirán a la ovulación (Adams, 1999) .

#### Folículo ovulatorio persistente

La LH es pues como se describió líneas arriba de vital importancia en las etapas finales del diferenciación y desarrollo del folículo dominante, la secreción de esta debe ser en patrones de baja amplitud y alta frecuencia (Jeong *et al.*, 2006) y esta condición se presentará en ausencia de progesterona durante el proestro ya que dicha hormona ejerce retroalimentación negativa respecto a la LH.

Cuando se comenzaron a utilizar progestágenos como medio para sincronizar estros, se observó una disminución en la fertilidad; la concentración de progesterona bajo este esquema es mantenida a niveles intermedios entre la luteal y la basal por periodo de tiempo prolongado. Debido a lo anterior la frecuencia de pulsos de LH incrementa causando que el folículo continúe con un crecimiento lineal y la concentración de estradiol en plasma se eleve durante un periodo mas largo de lo normal; sin embargo, los pulsos de LH no son suficientes para causar ovulación. La información sugiere que una disminución en la fertilidad asociada con el uso de bajas dosis de progestágenos para sincronizar los ciclos estrales del ganado resulta de un prolongado desarrollo del folículo ovulatorio y de la exposición excesiva del ovocito y tracto reproductivo a niveles altos de estradiol. (Fortune, 1994)

Hatler, *et al.*(2008), reportaron que aún niveles bajos de progesterona obtenidos con los dispositivos conocidos como CIDR reutilizados, son capaces de causar esta situación e incluso no solo la formación de un folículo persistente sino que este comience a adquirir condiciones de quístico ya que impide la ovulación pero sin lograr una condición de atresia.

Como se discutió anteriormente, las vacas pueden presentar patrones de dos, tres hasta cuatro oleadas de desarrollo folicular durante su ciclo estral; se ha observado que aquéllas que presentan dos o menos el tamaño del folículo dominante es mayor que aquel presente en vacas con tres, además el periodo de dominancia es mas corto en este último (Pérez *et al.*, 2004,). Se piensa que menos oleadas pueden llevar a que un periodo de dominancia largo cause que el folículo adquiriera características similares a uno persistente y por lo tanto tenga efectos negativos sobre la fertilidad. Bleach, *et al.*(2004) reportaron que en ciclos estrales espontáneos el periodo comprendido entre la emergencia y la ovulación del folículo dominante tenía una correlación negativa con respecto a la tasa de concepción encontrando también que aquellas vacas con dos oleadas presentaban periodos mas largos y el diámetro del folículo era mayor.

### **Reconocimiento de la gestación**

En rumiantes la oxitocina, la progesterona y el estradiol regulan la secreción de prostaglandinas por parte del endometrio para causar la luteólisis (Goff, 2004). La oxitocina proveniente tanto de la neurohipófisis así como del cuerpo lúteo estimula la síntesis de sus propios receptores en el endometrio, -hecho del cual existen fuertes evidencias de que también es influenciado fuertemente por la acción de estrógenos- para ocasionar la secreción pulsátil de prostaglandinas. La progesterona es un elemento importante durante este proceso ya que por un lado promueve la acumulación de ácido araquidónico y ciclooxigenasa 2 (COX-2) principalmente, necesarias para la síntesis de PgF2 alfa y por otro inhibe la expresión de los receptores para oxitocina (OTR) y estrógenos, esto durante la parte media de la fase lútea; al final de dicha fase esta condición se pierde posiblemente por la disminución de receptores para progesterona y entonces se adquieren receptores para estrógenos (Spencer *et al.*, 2004) los cuales a su vez

inducen que el endometrio responda a oxitocina, y consecuentemente la prostaglandina comenzará a secretarse y iniciará la luteólisis (Goff, 2004).

En contraste, si el ovocito fue fecundado y se inicia el desarrollo embrionario, la luteólisis debe evitarse de modo que la secreción de progesterona continúe ya que de lo contrario la gestación sería imposible.

El reconocimiento de la preñez en rumiantes requiere que el conceptus (embrión/feto y membranas extraembrionarias) adquiera una morfología elongada y el trofoectodermo produce Interferón Tau (IFN tau), el cual es miembro de la familia de Interferones Tipo I que actúan en endometrio y se encuentran involucrados en el aumento de la expresión de genes (ISGs) que favorecen la diferenciación celular y la implantación (Spencer *et al.*, 2004). Esta será pues la señal que evitará el mecanismo de luteólisis, el cual resulta en el mantenimiento del cuerpo lúteo (Spencer *et al.*, 2004). El interferón Tau es sintetizado y secretado entre los días 10 a 25 con máxima producción entre los 14 a 17 (Niswender *et al.*, 2000) y parece ser que es el único factor que indica la presencia del embrión. Sin embargo no actúa estabilizando la expresión de receptores para progesterona sino mas bien actúa sobre la epitelio glandular y luminal del endometrio suprimiendo la expresión de receptores para estrógenos (ER alfa) y para oxitocina (ORT; Niswender *et al.*, 2000), por lo que puede deducirse que no evita la síntesis de PgF2alfa pues sus niveles así como de la COX-2 son iguales en hembras no preñadas como en las que sí lo están (Spencer *et al.*, 2004), por lo que mas bien evita su secreción.

### **Desarrollo embrionario temprano**

Los receptores para progesterona se encuentran presentes en el epitelio luminal y glandular así como en el estroma del endometrio durante la fase lútea temprana; una continua exposición de progesterona causa disminución de estos receptores aproximadamente los días 11 a 13 de preñez, sin embargo en miometrio y en estroma siguen presentes durante la mayor parte de la gestación (Spencer *et al.*, 2004). La regulación funcional del estroma uterino es influenciada de manera positiva por la progesterona de tal manera que expresa y/o activa moléculas

importantes para el desarrollo del embrión como son Factores de Crecimiento del Fibroblasto 10 (FGF-10), Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF) cuyos receptores se encuentran en el trofoectodermo, factores de transcripción, factor de crecimiento epidermal, proteínas ligadoras, morfogenes (Indian hedgehog), proteínas de adhesión entre otras (Spencer *et al.*, 2004).

El endometrio es secuencialmente influenciado por progesterona, estrógenos e Interferón Tau los cuales activan y mantienen la función secretora del endometrio así como los cambios en su morfología para que se lleve a cabo la implantación favoreciendo la expresión de receptores para Hormona de Crecimiento (GH) y Prolactina placentarios (Spencer *et al.*, 2004).

El epitelio glandular, también bajo la influencia de progesterona expresa UTMP (Uterine Milk Proteins) miembro de una familia e inhibidores de proteasas que comienza a aparecer aproximadamente en los días 15 a 17 y su incremento es paralelo al desarrollo fetal.

### Causas que afectan el desarrollo embrionario temprano

Varios estudios han indicado que al menos el 25% de los embriones son perdidos durante las primeras tres semanas de gestación lo cual se atribuye a múltiples causas incluyendo baja calidad del ovocito, defectos o retraso de desarrollo en el embrión, ambiente uterino inadecuado, asincronía entre el embrión y la madre (Green *et al.*, 2005).

El buen desarrollo embrionario está relacionado con periodos de estrógeno cortos ya que influye en el intervalo entre inicio de estrógeno y ovulación así como pico preovulatorio de LH, y la consecuente concentración de progesterona. Así pues la progesterona es una hormona esencial para la sobrevivencia y desarrollo adecuado del embrión, por lo tanto su secreción debe ser adecuada tanto en tiempo como en concentración. Existen muchas evidencias de esto y aunque hay variedad en las especulaciones la mayoría coincide que el inicio del aumento de progesterona debe de ser aproximadamente a partir del día 3 (Maurer 1982;

Larson *et al.*, 2007) y la concentración adecuada alcanzarse entre los días 5 a 7 de gestación (McNeill *et al.*, 2006).

Un embrión elongado produce una mayor cantidad de interferón Tau lo cual está positivamente relacionado con el aumento en la concentración de progesterona. Se ha observado que en aquellas vacas con un retraso en la ovulación se colectaron embriones menos desarrollados y el interferón Tau no fue detectado, por lo que el reconocimiento de la preñez va de acuerdo al desarrollo embrionario y la producción de Interferón Tau lo cual a su vez es dependiente de un apropiado ambiente hormonal por parte de la madre, en particular del patrón de progesterona después de la ovulación (Mann *et al.*, 2001).

El folículo persistente es otra condición que parece afectar el desarrollo embrionario; Ahmad *et al.*, (1995) reportó que los ovocitos de estos folículos presentan cúmulus expandido, cromatina condensada y algunas evidencias de vesícula germinal rota debido al incremento de pulsos LH durante un periodo de tratamiento de progesterona, suficiente para avanzar la maduración del ovocito mas no inducir la ovulación. Lo anterior podría influir en la sobrevivencia embrionaria, ya que es posible además que la meiosis se lleve a cabo de manera prematura comprometiendo el desarrollo del embrión (Austin *et al.*, 2001).

Concentraciones altas de E2 en plasma durante varios días antes del estro se han relacionado con embriones de mala calidad y por ende bajas tasas de concepción, esto se relaciona además con el hecho de que los folículos persistentes producen una mayor cantidad de estrógenos y por un tiempo más prolongado (Ahmad *et al.*, 1995).

### **Infertilidad**

La infertilidad o falla en la concepción constituye uno de los problemas que tienen mayor repercusión en la productividad de los hatos lecheros hoy en día. Desde hace ya varios años, la cantidad de leche producida por vaca ha aumentado de manera considerable hasta que en nuestros días ésta es alrededor de 10, 000 kg de leche por lactancia. Sin embargo a medida que aumenta la producción los problemas reproductivos se han acentuado; en la actualidad es muy común que

los porcentajes de fertilidad en los establos no sobrepase valores del 40% (Royal *et al.*, 2000).

Aunque la fertilidad y la producción de leche obviamente se encuentran ligados el problema no está directamente asociado con el proceso fisiológico de lactopoyesis como tal sino con los cambios metabólicos que sufre la vaca para producir una alta cantidad, debido al monto de energía, requerido el cual no es posible cubrir con el consumo, pues este a su vez se ve reducido en el periodo inmediato después del parto causando un balance energético negativo.

El término de éste periodo es aproximadamente entre los días 70-80 posteriores al parto y para este tiempo las vacas han recibido ya por lo menos su primer servicio. Aunado a este panorama de baja fertilidad en los hatos, se observa de manera común un subgrupo de vacas que pasado este periodo crítico, han recibido ya por lo menos tres inseminaciones artificiales y sin embargo, siguen sin concebir aunque aparentemente no muestren ninguna alteración en su aparato reproductor, tengan buena condición corporal y sus ciclos se presenten en tiempo y forma normal.

### **Vaca repetidora**

La vaca repetidora es aquella que ha recibido más de tres servicios sin éxito, es decir, la vaca no queda gestante, no muestra ningún tipo de anormalidad en su aparato reproductor y sus ciclos estrales se presentan de manera normal tanto en forma como en tiempo. Se ha descrito que la incidencia de este síndrome es de 10-25% (Bartellett *et al.*, 1986; Stevenson *et al.*, 1990; Gustafsson y Emanuelsson, 2002), causando pérdidas económicas y gran frustración en el ámbito de la industria lechera.

Se le han atribuido diversas causas: genéticas, hormonales, retraso en ovulación, anormalidades en los gametos, inadecuada función lútea, pobre desarrollo embrionario, deficiencias nutricionales, errores en el manejo de los hatos como pueden ser: carencias en la detección de estros, que la técnica de IA no sea llevada correctamente; enfermedades, etc.,

### Vacas Repetidoras y muerte embrionaria temprana

Se ha observado que el 90% de los ovocitos son fecundados (Humblot, 2001) por lo cual esto no constituye ningún problema para el establecimiento de la preñez. Consecuentemente lo que lleva a una vaca a convertirse en repetidora son principalmente los eventos ocurridos previo a la ovulación como posteriormente a la misma, esto es durante el desarrollo del embrión y las condiciones que presente el ambiente uterino durante este periodo, lo cual está influenciado, a su vez sin lugar a la duda por el desarrollo folicular que lo antecede.

Es claro que el desarrollo del folículo ovulatorio tiene suma importancia ya que proporcionará embriones viables y un ambiente favorable para que se lleve a cabo la gestación. En estudios realizados sobre el porcentaje de viabilidad embrionaria se estableció que al día 35 las vaquillas normales presentan dicha viabilidad en un porcentaje del 75-85 y del 69-70% en vacas normales mientras que las repetidoras presentan 21-35% (Stevenson *et al.*, 1990)

La muerte embrionaria temprana a la cual sin duda se le puede atribuir en gran medida la presentación del síndrome de vaca repetidora, es un tema sobre el cual aún quedan muchos aspectos sin elucidar. Se han encontrado evidencias de que el perfil hormonal, el desarrollo del embrión así como el del folículo ovulatorio es diferente si se comparan vacas repetidoras con aquellas que no lo son. Estas mismas discrepancias se han observado incluso en vaquillas repetidoras; por desgracia aún no se conoce la primera causa que desencadena la pérdida temprana del embrión.

En un estudio realizado con vaquillas repetidoras (Bage *et al.*, 2002) en el cual fueron comparadas con un grupo que nunca había sido inseminado se reportó que las diferencias más relevantes fueron las siguientes:

Las repetidoras presentaron un estro más prolongado, un retraso en el pico de LH y el folículo preovulatorio tuvo una vida media mayor tal vez tomando características de un dominante persistente. En cuanto a la progesterona, su concentración apareció un tanto elevada durante el estro, en cambio, el aumento que se espera posterior a la ovulación fue retrasado y sus niveles se presentaron más bajos de lo normal.

Tanto el estro prolongado como el retraso en el pico preovulatorio traerán consigo que el momento de la IA sea discorde con la ovulación, situación que por si misma ya es desfavorable; aunado a esto, habrá una asincronía del ambiente uterino con respecto al desarrollo del embrión, el cual posiblemente ya presente alteración o retraso debido a una pobre calidad del ovocito que ha sido fecundado. Existen fuertes evidencias de que un folículo dominante persistente afecta la maduración final del ovocito con severos efectos en la fertilidad (Bage *et al.*, 2002).

En un estudio realizado sobre dinámica folicular en vacas repetidoras se pudo observar que en su mayoría presentaban patrones de dos ondas de crecimiento folicular por ciclo y muy pocas presentaban tres o más (Pérez *et al.*, 2004). Aquéllas que presentaron dos, tuvieron folículos dominantes de tamaño mayor en comparación con los de tres; aunque en los primeros días no se encontraron diferencias significativas en niveles plasmáticos de progesterona entre vacas con 2 y 3 ondas, este si comenzó a mostrarse desigual a partir del día ocho del ciclo. (Pérez *et al.*, 2004)

La progesterona es una hormona clave en el desarrollo embrionario y en el establecimiento de la preñez; sin embargo su perfil de concentración debe presentarse de una manera adecuada tanto en concentración como en tiempo, es decir, altos niveles de esta durante el periodo preovulatorio así como inmediatamente después de que se lleva a cabo este evento no son favorables así como tampoco lo es que su aumento se de retrasado o que la concentración sea baja alrededor del día 5 post-ovulación (Larson *et al.*, 2007; Starbuck *et al.*, 1999). Stronge, *et al.*, (2005) relacionó la concentración de progesterona en leche con la sobrevivencia embrionaria observando que aquellas vacas con bajos o excesivamente altos niveles de progesterona principalmente a partir del día 5 sufrieron pérdida del embrión, coincidiendo con otros trabajos que presentaron situaciones similares.

Las concentraciones de 7-8 ng/ml en el día 5 han sido asociadas con máximos porcentajes de preñez, mientras que aquellas mas bajas o altas que esta se relacionan con una fertilidad reducida, en cuanto a los días 6 y 7 se han reportado una máxima sobrevivencia a concentraciones de 13.2-16.8 ng/ml. (Starbuck *et al.*, 1999)



El embrión debe tener la capacidad de producir el Interferón Tau aproximadamente durante los días 15 a 17 después de la inseminación con el fin de evitar la luteólisis y la gestación pueda ser establecida (Niswender *et al.*, 2000), por lo que debe haber una sincronía y “diálogo” estrecho entre el producto y el ambiente uterino materno para que esto se lleve a cabo. Por lo tanto, si el desarrollo del embrión es sub-óptimo, la señal no la dará en el momento adecuado ni mucho menos en la cantidad requerida, si a esto se suma el hecho de que los niveles hormonales no son favorables aumenta la probabilidad de una falla en la concepción.

Se debe tomar en cuenta además que durante el desarrollo folicular intervienen diversas de hormonas, no solo las clásicas reproductivas, que requieren ser estudiadas para intervenir en la falla de la concepción.

Tomando en consideración estudios realizado en a base a lo que se conoce de fisiología se han propuesto algunas terapias hormonales para vacas repetidoras que se discuten a continuación.

## **Terapias Hormonales Propuestas**

### **GnRH y hCG**

Como ya es sabido la GnRH es quien controla la secreción de gonadotropinas y está bien establecido su papel determinante en el desarrollo folicular, la ovulación y posteriormente en el establecimiento del cuerpo lúteo. En el caso de la hCG se sabe que es una hormona luteotrópica por excelencia. Basados en las funciones de cada una, se ha establecido su aplicación en dos ocasiones: en el momento de la inseminación, utilizándose para este caso de manera más común la GnRH y durante los 5 a 7 días posteriores a la IA, hCG.

### En el momento de la IA

Como se apuntó anteriormente las vacas repetidoras pueden presentar estros prolongados y retraso en el pico preovulatorio causando una asincronía con el momento de la inseminación artificial (Bage *et al.*, 2002); al aplicar GnRH al momento del servicio se asegura que el pico de gonadotropinas esté mas cercano a este evento evitando la situación anterior.

Además de esto es posible que contribuya a mejorar la función del cuerpo lúteo, aunque respecto a lo anterior en algunos estudios no ha observado tal beneficio (Archbald *et al.*, 1993; Morgan *et al.*, 1993). Además parece ser que influye el momento de la aplicación puesto que tanto esta como la inseminación artificial se realizan en función de la detección de estros la cual aún hoy en día es un tanto deficiente, por lo que sus efectos no son claros o significativos (Archbald *et al.*, 1993).

En un estudio realizado en el que se comparó el efecto sobre la preñez aplicando GnRH al momento de la inseminación sencilla o en la doble con un grupo que solo recibió inseminación doble y otro que fungió como control siendo inseminadas en una sola ocasión como comúnmente se hace, se tuvo como resultado que en aquellos grupos con el tratamiento hormonal aumentó el porcentaje de preñez; sin embargo, los resultados de esta terapia no son muy consistentes puesto que existen otros estudios en los cuales la reacción favorable no es significativa (Stevenson *et al.*, 1990).

#### Después de la IA

En vacas repetidoras se han evidenciado patrones de progesterona deficientes; esto no solamente se refiere a que la concentración es más baja de la normal sino que su ascenso comienza de manera tardía.

Si a este panorama se le añade que el desarrollo del embrión presenta por sí mismo un retraso y no será capaz de evitar la luteólisis a tiempo vendrá la inevitable pérdida de la gestación.

Ante este escenario se ha diseñado una terapia hormonal que mejore la calidad del cuerpo lúteo y de manera consecuente la concentración de progesterona, utilizando GnRH o hCG posterior a la IA.

Esta terapia se maneja entre los días 5 y 7, lo cual es un rango amplio y que da resultados variables e inconsistentes puesto que las condiciones uterinas durante este lapso van cambiando de manera significativa.

Este tratamiento hormonal tiene como finalidad lograr la ovulación y luteinización del folículo dominante que pertenece a la primera oleada con el fin de aumentar los niveles de progesterona (Walton *et al.*, 1990). Sin embargo, al igual que la terapia

anterior, aunque en algunos estudios se ha visto que esto favorece en gran medida para la gestación otros han presentado resultados en los cuales la diferencia no es relevante (Kendall *et al.*, 2008)

### **Progesterona**

Como se ha hecho hincapié en el papel preponderante de la progesterona en este problema nada resultaría mas sencillo que la aplicación de la misma como tal después de la IA, para esto se han utilizado principalmente dispositivos (PRID, CIDR) a partir del día 7 post- inseminación y se retira aproximadamente 15 días después con intención de cubrir la deficiencia de progesterona durante el periodo crítico de reconocimiento temprano de la preñez ya que el CIDR mantiene 1.5 ng/ml adicional a la producida por el cuerpo lúteo (Hatler *et al.*, 2008). En un estudio realizado por Villarroel *et al.*, (2004) en el cual aplicaron dispositivos en el día 5 para después retirarlo en el día 19 pudieron observar que el tratamiento tendió a mostrar un efecto negativo en vacas con mas de 3 lactancias y un efecto positivo aunque moderado en aquellas con menos lactancias, aunque si observó la disminución de abortos después del diagnóstico de gestación en aquellas que recibieron el tratamiento (4% *versus* 14%). Larson *et al.*, (2007), reportaron también que suplementación con progesterona, mejora la fertilidad. Sin embargo los reportes existentes han sido un tanto contradictorios puesto que mientras unos observan una mejora en el porcentaje de gestación, otros no han observado diferencias significativas.

### **Somatotropina Bovina (bST)**

La administración de bST es principalmente con el fin de aumentar la producción láctea sin embargo se ha observado que tiene efectos negativos sobre el comportamiento reproductivo aumentando los días abiertos y disminuyendo el porcentaje de preñez en el hato, por lo tanto la mayoría de los investigadores han concluido que es antagonista de la función reproductiva.

Debido a que su incremento va a su vez acompañado del aumento de IGF-1 el índice mitótico de las células granulosas se ve favorecido y aunque el desarrollo folicular se acelera los ovocitos serán inmaduros. Otros efectos de la somatotropina son: mayor reclutamiento de folículos al iniciar la fase de desarrollo antral, niveles de inhibina aumentados provocando que la concentración sérica de FSH sea 25% menos de lo normal, la manifestación del estro se reduce a 8 h en los animales que lo expresan y aumenta el número de animales en anestro (Kirby *et al.*, 1997).

A pesar de lo anterior existen reportes en los cuales la bST aplicada en el momento de la inseminación puede traer consigo más bien efectos favorables pues influye en la concentración de progesterona y el peso del cuerpo lúteo (Kirby *et al.*, 1997), lo cual consecuentemente favorecerá el desarrollo del embrión; además si aumenta la concentración de IGF-1, ésta a su vez tendrá un efecto positivo sobre el útero y oviducto, condiciones que coadyuvan también para lograr la gestación.

### **Insulina**

No existe mucha información acerca del papel de la insulina en vacas repetidoras, sin embargo se ha identificado que esta tiene un rol importante en el desarrollo folicular, ya sea por si misma o a través de su acción favorecedora sobre la IGF's, las cuales se han identificado plenamente por estar involucradas en este proceso. Los niveles aumentados de insulina posiblemente eleven el número de folículos que respondan adecuadamente a las gonadotropinas y favorecen su desarrollo óptimo de ésta manera, serán capaces de producir progesterona en forma adecuada cuando se luteinizen.

En un experimento realizado por Selvaraju *et al.*, (2002) aplicaron insulina los días 8, 9 y 10 del ciclo, provocando luego la luteólisis el día 12 para observar si se había favorecido el porcentaje de gestación en vacas repetidoras a través de su influencia en crecimiento folicular, calidad de ovocito y desarrollo embrionario adecuado, ya sea por si misma o a través de otras hormonas. Sin embargo no encontraron diferencias significativas con respecto al grupo control aunque el nivel

de progesterona se vio aumentada después del día ocho en aquéllas que recibieron el tratamiento deduciendo que tal vez tenga un efecto esteroideogénico positivo.

A excepción del uso de insulina, el resto de los tratamientos se llevan a cabo ya sea al momento de la inseminación artificial o posterior a ésta con el fin de corregir una condición que posiblemente esté influida por procesos que sucedieron mucho antes en particular durante el desarrollo folicular.

Es posible que tratamientos anteriores a la inseminación se conviertan en un punto importante para futuros estudios pues se comenzaría a atacar un problema desde el punto de el posible origen.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Generales

El estudio se llevó a cabo en dos hatos con sistema intensivo de producción lechera “El Judío” y “El Tepetatillo” los cuales forman parte de la Empresa Agropecuaria El Tepetatillo. Los hatos se conforman por un total de 1150 vacas, Tepetatillo 370 y Judío 780, todas de raza Holstein. Estos se encuentran ubicados en el Municipio de Lagos de Moreno, Jalisco cuyo clima es semiseco, con una temperatura media anual de 17.4°C y una precipitación pluvial media de 526 mm (450 a 500 mm). El periodo de lluvias corresponde al verano y en el resto de las estaciones se llegan a registrar precipitaciones aisladas de baja intensidad. El régimen térmico más cálido se registra en mayo con temperaturas entre los 22 y los 23°C, siendo el mes más frío enero con temperaturas de 13 a 14°C; los periodos de heladas van de 10 a 80 días al año, con mayor incidencia durante el periodo que corresponde a los meses de noviembre a febrero.

En ambos hatos la frecuencia de ordeño es dos veces al día con intervalo de 12 horas y el promedio de producción de 27 litros/vaca/día durante el periodo de estudio que correspondió al año 2008.

La alimentación que reciben está de acuerdo con los requerimientos nutricionales de la NRC para vacas altas productoras (Cuadro1)

Los métodos utilizados para la detección de estros son: podómetros, detector Bovine Beacon, marcaje con crayón y observación directa. El tiempo de inseminación se lleva a cabo conforme a la regla AM/PM y antes de realizarla se corrobora el estro mediante la palpación rectal por parte del técnico encargado.

En el Cuadro 2 se observan los promedios de los parámetros reproductivos registrados durante el 2008.

De manera diaria tanto por la mañana como por la tarde se identificaron las vacas que se reportaban con elevada actividad o presentaron signos de estro y cumplían con las siguientes características para calificarlas como repetidoras:

- Al menos tres servicios consecutivos sin resultado favorable.
- El estro se manifestaba de manera normal en forma y tiempo, esto último se corroboró con las fechas de inseminación anteriores.
- Aparentemente sanas
- Aparato reproductor sin anomalías apreciables a la palpación
- Condición corporal entre 3 y 3.5, según la escala 1-5 (Phillips, 2001).

Una vez calificadas como vacas repetidoras se asignaron de manera aleatoria a uno de los siguientes tratamientos:

Tratamiento pre-servicio (PreS; n=30): Las vacas de este grupo no recibieron inseminación artificial (IA) el día del estro (Día 0). Posteriormente se controló el desarrollo folicular hacia el siguiente estro mediante la administración el día 6 de 5 mg de  $17\beta$ -estradiol (N° de Catálogo 250155-5G, SIGMA-ALDRICH) por vía intramuscular con el fin de lograr la terminación de la onda folicular en desarrollo y el inicio de otra a un tiempo conocido, el cual es de aproximadamente cuatro días más tarde (Bo et al.1994). El día 10 se aplicó por vía intramuscular 500  $\mu$ g de Cloprostenol (Boviprost®, Laboratorio Lapisa) para causar luteólisis y se esperó la aparición del estro para realizar la IA (Figura 1).

Tratamiento post-servicio (PostS; n=47). Las vacas se inseminaron artificialmente en forma convencional el día del estro (Día 0) y se les administró progesterona suplementaria durante  $\frac{3}{4}$  partes del diestro posterior para lo cual el día 5 se les insertó un CIDR (Dispositivo intravaginal de liberación controlada de droga; Pfizer con 1.9 g de progesterona) mismo que se retiró el día 14 del ciclo (Figura 2).

Tratamiento Control (C; n=38). Aquellas asignadas a este grupo, al igual que el anterior recibieron también Inseminación Artificial en forma convencional el día del estro (Día 0; Figura 3).

En total se les asignó tratamiento a 115 vacas con número de servicios promedio de 5.5, 2.98 lactancias y 206.77 Días en Leche (DEL).

### 3.2 Diámetro de folículo ovulatorio

Se realizó ultrasonografía vía rectal para determinar el diámetro del folículo ovulatorio durante el día de la inseminación artificial a 35 vacas (15 por tratamiento) mediante un equipo Aloka® con transductor de 7.5 Mhz. Las imágenes fueron capturadas e impresas en papel fotográfico de 110 mm Sony® tipo IV (UPP-110HA) por un equipo Sony® modelo UP-870MD, para posteriormente realizar la medición del diámetro del folículo ovulatorio (DFO).

### 3.3 Concentración de progesterona

Las muestras de sangre para determinar progesterona y estradiol se colectaron el día de la IA y los días 4, 5 y 6 post-IA, por punción en la vena caudal de todas las vacas que formaron parte del estudio. Las muestras se obtuvieron con tubos Vacutainer con anticoagulante (143 USP Unidades de Heparina Sódica) centrifugadas a 3000 gravedades por 15 minutos. El plasma fue transferido a viales de 2 ml y congelados a -20° C hasta su proceso para la cuantificación de progesterona (P<sub>4</sub>). Para ello se usó un estuche comercial de RIA en fase sólida (Diagnostic Systems Laboratories, Inc). La sensibilidad mínima de los ensayos fue de 0.032 ng/ml y los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron de 6 % y 8.7 %, respectivamente.



### 3.4 Fertilidad

El diagnóstico de gestación se llevó a cabo por palpación rectal a partir del día 50 posterior a la inseminación; si antes de este periodo alguna vaca retornaba al estro y se inseminaba nuevamente el resultado se dio como negativo a gestación.

### 3.5 Análisis estadístico

Se consideraron como variables de respuesta asociadas al estro con servicio a la concentración sérica de progesterona en los d 0 (estro), 4, 5 y 6 post-servicio, el diámetro del folículo ovulatorio (ultrasonografía el día del servicio) y el porcentaje de fertilidad (diagnóstico de gestación a 50 días post-servicio).

Para la concentración sérica de P4 se realizó un análisis de varianza con observaciones repetidas en la vaca (Littel et al., 1998) y para el diámetro del folículo ovulatorio un diseño completamente al azar. El porcentaje de fertilidad se analizó mediante la prueba de la Xi-Cuadrada.

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Diámetro de folículo ovulatorio

El diámetro del folículo ovulatorio fue afectado por el tratamiento ( $P < 0.01$ ) siendo menor en el grupo de vacas en las cuales se aplicó el tratamiento previo al servicio ( $16.01 \pm 1.09a$  mm), en comparación a las del tratamiento posterior a la inseminación ( $20.61 \pm 1.45b$  mm) y a las del grupo control ( $20.27 \pm 1.43b$  mm); estas dos últimas fueron estadísticamente similares (Cuadro 3).

Asimismo, se observó que el intervalo entre la aplicación de estradiol a la presentación del celo fue de  $8.9 \pm 2.05$  días y de  $4.9 \pm 1.99$  días con respecto a la aplicación de la prostaglandina.

### 4.2 Concentración de progesterona en plasma

También se observó un efecto del tratamiento sobre la concentración plasmática de progesterona el día del servicio ( $P < 0.05$ ; Cuadro 4), con una menor concentración en las vacas del grupo que recibió el tratamiento previo al servicio ( $0.37 \pm 0.22$  ng/ml), en comparación a las del grupo control ( $0.45 \pm 0.019$  ng/ml) y las del tratamiento posterior a la inseminación con un valor intermedio ( $0.42 \pm 0.017$  ng/ml).

En este mismo cuadro se puede observar que durante el día cuatro la concentración sérica de progesterona fue menor ( $P = 0.04$ ) en los grupos de tratamientos previo y posterior al servicio ( $0.58 \pm 0.05$  y  $0.62 \pm 0.04$  ng/ml, respectivamente), en comparación a la concentración observada en las vacas del grupo control ( $0.78 \pm 0.04$  ng/ml).

La concentración de progesterona no fue afectada ( $P > 0.5$ ) por el tratamiento durante los días cinco y seis (Cuadro 4).

### 4.3 Fertilidad

No se observó un efecto estadístico del tratamiento sobre la fertilidad ( $P > 0.5$ ). El grupo que recibió el tratamiento previo al servicio presentó una fertilidad del 40% mientras que las del tratamiento posterior a la inseminación y el grupo testigo 34.78% y 31.57% respectivamente (Cuadro 5).

## V. DISCUSION

Al problema de la vaca repetidora se le han atribuido diversas causas, in embargo, existen estudios sobre dinámica folicular y niveles hormonales que podrían explicar de qué manera se ve afectada la fertilidad. Así pues, se han descrito aspectos asociados a el problema tales como larga duración de estro, retraso en el pico de LH, retraso en el aumento de progesterona posterior al estro y concentración suprabasal de esta hormona durante el periodo peri-ovulatorio. También se ha observado en vacas repetidoras una mayor vida y tamaño del folículo preovulatorio, siendo afectados estos últimos a su vez por el número y la duración de las oleadas de desarrollo folicular (Bage *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2004).

Por lo anterior el presente estudio se diseñó para comparar la fertilidad entre un tratamiento que permitiera ejercer un control sobre el desarrollo de la oleada folicular previa al servicio, con un tratamiento posterior al mismo mediante el suministro exógeno de progesterona en sincronía con el desarrollo temprano del embrión. En el caso del primero se buscó que la oleada de desarrollo folicular inducida por la administración del 17 beta estradiol se diera en ausencia de progesterona lo cual se logra al aplicar prostaglandina cuatro días después del tratamiento (Bo *et al.*, 1995; Martínez *et al.*, 2005). De tal forma el desarrollo folicular se daría en condiciones de un patrón de secreción de LH que podría influenciar la velocidad de desarrollo, el grado de actividad estrogénica y el tamaño ovulatorio del folículo.

En el presente estudio el diámetro del folículo ovulatorio fue menor en las vacas del grupo que recibió el tratamiento con 17 beta estradiol previo al servicio en comparación con las del tratamiento posterior a la inseminación y a las del grupo control las cuales fueron estadísticamente similares. En otros estudios se ha observado que el tratamiento con 17 beta estradiol es capaz de lograr que decaiga una oleada folicular independientemente del estadio de desarrollo en el que se encuentre el folículo dominante (Bo *et al.*, 1994 y 1995), lo cual ocurre aproximadamente dentro de las 24 horas siguientes (García *et al.*, 2001). Se ha observado además que los niveles de estradiol se elevan 12 horas después de la aplicación y causan una disminución en la concentración sérica de FSH (Bo *et al.*, 1994; Martínez *et al.*, 2005). En cuanto a los niveles de LH, también son

modificados, inicialmente puede causar un pico en su concentración y posterior a esto un decremento notable (Martínez *et al.*, 2005) por lo que aquellos folículos dependientes tanto de FSH como LH en el momento de la administración de estradiol se ven afectados y su desarrollo es suprimido (Bo *et al.*, 2000). El inicio de una nueva oleada es dependiente de un nuevo aumento de FSH; existen reportes variados acerca de la ocurrencia de este evento el cual oscila entre 3 y 4 días posteriores a la aplicación del estradiol (Bo *et al.*, 1994); por lo que el inicio de una nueva oleada en desarrollo es en ese mismo intervalo de tiempo aproximadamente (Bo *et al.*, 1995 a, Martínez *et al.*, 2005), situación que como se comentó anteriormente sugirió los momentos de aplicación del estradiol y la prostaglandina.

Se sabe que existen ciertas condiciones durante los ciclo estrales espontáneos que influyen sobre el diámetro del folículo ovulatorio tales como el periodo comprendido entre su emergencia y ovulación, días de dominancia y el número de oleadas durante el ciclo, situaciones que a su vez están asociadas a el porcentaje de concepción (Bleach *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2004; Celik *et al.*, 2005). Así pues se ha observado que a mayor diámetro del folículo ovulatorio el porcentaje de gestación disminuye (Vasconcelos *et al.*, 1999). Asimismo se ha observado que al sincronizar estros con progestágenos los folículos presentan una dominancia prolongada llegando a convertirse en persistentes (Sirois y Fortune, 1990; Revah *et al.*, 1996; Stock y Fortune, 1993; Savio y Fortune, 1993).

Bajo condiciones de progesterona a un nivel sub-luteal, los pulsos de LH no se encuentran totalmente inhibidos, sin embargo tampoco presentan un patrón de secreción adecuado para lograr el desarrollo final del folículo. Por lo tanto, dichas hormonas en tales condiciones son quienes llevan al folículo a expresar una dominancia prolongada (Stock y Fortune, 1993).

Folículos en tal situación presentan entre otras cosas un diámetro aumentado: 17.2 mm o más. (Ahmad *et al.*, 1995; Revah *et al.*, 1996).

Existen fuertes evidencias que la dominancia prolongada de un folículo tiene efectos negativos sobre la fertilidad por diversos factores: la exposición excesiva tanto del ovocito como del tracto reproductor a niveles altos de estradiol (Fortune, 1994), una maduración prematura del folículo pues presentan un cúmulus

expandido, ovocito con cromatina altamente condensada y demás evidencias que pueden indicar un posible reinicio de la meiosis. Este hecho es atribuido en parte a que los estrógenos inactivan a las moléculas inhibitoras de este proceso, y un folículo en tales condiciones se ve expuesto por largo tiempo a esta hormona (Ahmad *et al.*, 1995; Revah *et al.*, 1996; Mhim *et al.*, 1994) la cual también ejerce efectos sobre el oviducto afectando el transporte de gametos o bien del embrión.

El número de oleadas durante un ciclo estral espontáneo influye en el periodo de dominancia, intervalo de emergencia a estro y diámetro folicular. Estos factores aumentan a menor número de oleadas y se ven reflejadas en un decremento de la fertilidad (Bleach *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2004; Townson *et al.*, 2002).

Aunque no se sabe con exactitud que mecanismo determine la cantidad de oleadas de desarrollo folicular por ciclo estral, si se ha observado que las vacas repetidoras presentan en mayor porcentaje dos oleadas por ciclo (Pérez *et al.*, 2004). De igual manera se ha observado esta condición en vacas altas productoras (Bleach *et al.*, 2004).

Debido a lo anterior y con el afán de garantizar una mayor fertilidad, diversos estudios han tenido como objetivo la disminución del diámetro del folículo ovulatorio mediante el control del desarrollo de oleadas, inducidas ya sea por aspiración o con tratamientos hormonales, como es el caso del presente. No obstante, los resultados no han sido del todo adecuados puesto que en algunos experimentos se han obtenido folículos de 14 mm o menos, lo cual trae como consecuencia una formación de cuerpos lúteos de menor tamaño, concentración subnormal de estradiol durante el proestro y el estro, además de retraso en el aumento de progesterona posterior a la ovulación (Busch *et al.*, 2008; Ahmad *et al.*, 1995; Vasconcelos *et al.*, 2001; Perry *et al.*, 2007).

El diámetro del folículo ovulatorio obtenido en el grupo de vacas con el tratamiento pre-servicio de estradiol fue de  $16.01 \pm 1.09$  mm, tamaño que en otros estudios ha sido encontrado como favorable para la fertilidad (Lopes *et al.*, 2007; Vasconcelos *et al.*, 1999). Sin embargo, otros autores consideran a valores entre 11 y 15 mm como óptimos (Perry *et al.*, 2006). De igual manera, sólo aquellos folículos con diámetros menores a 11 mm han sido asociados con una baja fertilidad (Vasconcelos *et al.*, 2001; Perry *et al.*, 2005; Busch *et al.*, 2008).

En el grupo de vacas tratadas con estradiol previo al servicio se obtuvo un promedio de  $4.9 \pm 1.99$  días de intervalo entre la aplicación de la prostaglandina y la presentación del celo. Se sabe que la caída de progesterona cuando se inicia la luteólisis por efecto de prostaglandina exógena se presenta aproximadamente a las 24 horas después de su aplicación (Jackson *et al.*, 1979; Waldmann *et al.*, 2006), así pues, al administrar 17 beta estradiol y prostaglandina en el presente estudio, se indujo un desarrollo de folículo en ausencia de progesterona. Existen evidencias de que el ambiente hormonal influye en la calidad del folículo. Así por ejemplo, se ha observado en distintos estudios que una baja concentración de progesterona confiere una mayor capacidad esteroidogénica al folículo dominante, puesto que su desarrollo se lleva a cabo bajo una mayor frecuencia pulsátil de LH (Wolfeson *et al.*, 1999; Sirois y Fortune, 1990; Savio y Fortune, 1993). Lo anterior estimula la producción de androstenediona por las células tecaes (Fortune, 1994; Magoffin y Wietsman, 1994; Kinder *et al.*, 1996), presentándose además un aumento del RNAm de enzimas asociadas a la producción de androstenediona en estas células y de estradiol en el fluido folicular, sin afectar la actividad aromatasas de las células de la granulosa (Tian *et al.*, 1995). Por otra parte, Wolfenson *et al.*, (1999) observaron una mejor capacidad de síntesis de progesterona por parte de un cuerpo lúteo desarrollado *in vitro*, cuando éste se derivó de la ovulación de un folículo de la primera oleada desarrollado en ausencia de progesterona comparado con uno derivado de la ovulación de un folículo de la segunda oleada.

Además de los aspectos ya mencionados, la duración del proestro es importante en el comportamiento reproductivo de las vacas, ya que se ha observado que proestros de corta duración afectan negativamente el porcentaje de preñez (Peters y Pursley, 2003; Mussard *et al.*, 2007). Así mismo, proestros largos implican fases lúteas de duración normal, aumento en la concentración de progesterona posterior a la ovulación, mayor concentración de estradiol durante el desarrollo del folículo y mayor porcentaje de gestación comparándolo con proestros cortos (Bridges *et al.*, 2009).

En cuanto a la concentración de progesterona, se observó que durante el día del estro ésta fue significativamente menor en las vacas tratadas antes del servicio en comparación a la observada en las vacas repetidoras del grupo testigo.

En estudios realizados con vacas y vaquillas lecheras, se ha observado que las repetidoras presentan valores superiores de progesterona durante el estro en comparación a las hembras más fértiles (Bage, 2003; Waldmann *et al.*, 2001). Además se ha demostrado una marcada relación entre la fertilidad y la concentración de progesterona y mayor probabilidad de que hembras con incrementos de progesterona al servicio retornen nuevamente al estro (Waldmann *et al.*, 2001).

Una concentración suprabasal de progesterona se presenta generalmente cuando la vida media de folículo preovulatorio es prolongada, situación observada de manera frecuente en repetidoras (Bage, 2002).

Experimentalmente, inducir concentraciones suprabasales de progesterona durante el estro en vaquillas normales, da lugar a desórdenes reproductivos tales como efectos negativos en el comportamiento de estro, retraso en la ovulación y alteraciones en la concentración de hormonas y la dinámica folicular (Duchens *et al.*, 1994). Esto confirma, que aunque durante el estro los niveles de progesterona son bajos, un aumento por encima de la concentración promedio durante esta etapa del ciclo estral afecta de manera negativa al sistema reproductivo. En condiciones naturales, el origen de la excesiva cantidad de progesterona durante el estro es aún desconocido, sin embargo, se ha relacionado con una dominancia prolongada del folículo. En estas condiciones, se ha observado alta concentración de progesterona intrafolicular y se ha sugerido que una luteinización prematura en folículos con dominancia prolongada podría ser un factor involucrado en el decremento de la fertilidad en ovocitos provenientes de dichos folículos (Bigelow *et al.*, 1998). Además hay información que indica que esta condición presenta un microambiente alterado capaz de inducir una meiosis prematura del ovocito (Revah *et al.*, 1996).



La concentración de progesterona el día 4 fue mayor en el grupo control que en el resto de los tratamientos además estuvo por debajo de 1 ng/ml, lo cual indica que el cuerpo lúteo se encontraba en un estadio de desarrollo temprano.

Hay discrepancias en la literatura en cuanto a establecer el día del ciclo estral en el cual el aumento de progesterona es favorable para el desarrollo embrionario. Se ha propuesto que ese incremento es importante entre los días cuatro a ocho (Villarroel *et al.*, 2004; McNeill *et al.*, 2006; Kendall *et al.*, 2008 ), sin embargo, otros autores han encontrado una asociación negativa entre la concentración de progesterona al día cuatro y la fertilidad la cual se vuelve positiva a partir del día cinco (Stronge *et al.*, 2005). Por otra parte, en otro estudio con vacas repetidoras que presentaron dos o tres oleadas durante el ciclo, la diferencia en el aumento de progesterona entre las repetidoras y las que no lo eran se manifestó a partir del día ocho posterior al servicio (Pérez *et al.*, 2004).

No se logró aumentar considerablemente la concentración de progesterona en el tratamiento posterior a la inseminación, puesto que no hubo diferencias durante el día 6 entre tratamientos, esto en discrepancia con Villarroel *et al.*, (2004); Larson *et al.*, (2007) puesto que reportan un aumento de progesterona 12 horas después de insertar el CIDR.

Se ha encontrado variación en el aumento de la concentración sérica de progesterona posterior a la inserción del CIDR puesto que al parecer esto se asocia a la capacidad para metabolizar la progesterona. Otro factor que influye es la exposición previa a progesterona y la presencia o ausencia de un cuerpo lúteo al momento de la inserción, esto es manifiesto en animales ovariectomizados puesto que presentan un aumento mayor que en vacas intactas.

En otro estudio con un esquema de trabajo parecido (Villarroel *et al.*, 2004) se observaron mejoras en fertilidad, particularmente en animales jóvenes, así como la disminución de abortos después del diagnóstico de gestación (4% versus 14%). De la misma manera, Larson *et al.*, (2007), reportaron resultados similares con dicho tratamiento, mejorando la fertilidad principalmente en vacas de primera y segunda lactancia.

Por lo tanto, es claro que la fertilidad se ve afectada también por una baja concentración de progesterona proveniente de un cuerpo lúteo temprano, situación

que suele presentarse en vacas repetidora (Bage *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2004; Villarroel *et al.*, 2004 ). La progesterona es indispensable para el apoyo de la gestación y su deficiencia en tiempo y forma afecta el ambiente uterino y el desarrollo del embrión, limitando su capacidad de señalizar en el momento adecuado para el reconocimiento temprano de la preñez (Mann y Lamming, 2006). Alteraciones en la concentración de la progesterona sanguínea han sido atribuidas a eventos que se presentan durante el desarrollo folicular, asociados a un periodo de larga dominancia folicular derivando en un cuerpo lúteo que no produce progesterona en un perfil adecuado, además de la ovulación de un ovocito de baja calidad.

Así pues, la concentración de progesterona debe ser adecuada principalmente durante los primeros días de desarrollo embrionario, por lo que la suplementación debe realizarse durante este periodo crítico. En la mayoría de los esquemas propuestos para tratamientos de suplementación de progesterona, se inician su aplicación entre los días 5-9 del ciclo estral considerando a esta ventana como la más adecuada debido a la correlación positiva con la sobrevivencia embrionaria (Beltman *et al.*, 2009; Mann y Lamming, 2006). Además, en vacas normales se ha observado que logran éxito en la gestación cuando durante este periodo se eleva la concentración de progesterona, aparentemente asociado a que el desarrollo embrionario se encuentra en la transición de mórula a blastocito en ese momento (Mann y Lamming, 2001).

En base a lo anterior, en nuestro estudio se decidió que la permanencia del CIDR fuera del día 5 al 14. Es posible que los resultados contradictorios encontrados en la literatura en cuanto al efecto sobre la fertilidad del suplemento de progesterona, estén relacionados con diferencias en el momento del ciclo estral en que se inicia la suplementación de la hormona y en su duración. En ese sentido se ha observado que la suplementación prolongada o iniciada en forma muy temprana (inmediatamente después de la inseminación), pueden ser perjudiciales para la fertilidad. Así por ejemplo, cuando el tratamiento se inicia en el día 3.5 no presenta un efecto positivo sobre la fertilidad (Beltman *et al.*, 2009). De igual manera, una suplementación tardía, como puede ser en los días 12 a 16 no favorece el

desarrollo del embrión ni se relaciona con la secreción de interferon Tau (Mann y Lamming, 2001; Mann y Lamming, 2006).

Otro aspecto a considerar, es que la administración de progesterona exógena durante el día cinco influye en los niveles de estradiol, causando una disminución en su secreción proveniente de los folículos de la primera oleada. La posibilidad de que las mejoras en la fertilidad se deban en parte a la reducción de la secreción de estradiol no puede ser descartada, puesto que esta hormona afecta el transporte del embrión por el oviducto. En este sentido, hay que considerar que el 80% de los embriones aún se encuentran en el oviducto el día cinco del ciclo estral y el cambio en el cociente estrógeno:progesterona puede favorecer su paso hacia el útero (Green *et al.*, 2005). Además, puede considerarse otra razón por la cual la suplementación tardía de progesterona no mejora la fertilidad, puesto que no influye en la secreción de estradiol y en el transporte embrionario hacia el útero (Starbuck *et al.*, 2009).

## **VI. CONCLUSIONES**

El esquema de control del desarrollo folicular para el tratamiento pre-servicio permitió obtener folículos de un diámetro dentro del rango que ha sido relacionado con mayor fertilidad y concentraciones de progesterona durante el estro menores a los presentados en vacas repetidoras, sin embargo, esto no repercutió en diferencias estadísticamente significativas en fertilidad.

En el tratamiento pos-servicio no se logró el paradigma experimental dado que las concentraciones de progesterona en los días 5 y 6 fueron similares a los otros tratamientos

En base a los resultados obtenidos se sugiere continuar la línea de investigación asociada a tratamientos pre-servicio para vacas repetidoras.

## VII. LITERATURA CITADA

- Adams, G.P., 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54:17-32.
- Ahmad N, Schrick N, Butcher R, Inskeep K 1995. Effect of Persistent Follicles on Early Embryonic Losses in Beef Cows. *Biology of Reproduction* 52, 1129-1135
- Archbald L.F., Sumrall D.P., Tran T., Klapstein E., Risco IC. and Chavattel P. 1993. Comparison of pregnancy rates of repeat-breeder dairy cows given gonadotropin releasing hormone at or prior to the time of insemination *Theriogenology* 39:1081-1091.
- Archbald L.F., Sumrall D.P., Tran T., Klapstein E., Risco C. and Chavattel P. 1993. Comparison of pregnancy rates of repeat-breeder dairy cows given gonadotropin releasing hormone at or prior to the time of insemination *Theriogenology* 39:1081-1091.
- Austin E. J., Mihm M., Evans A. C. O., Ireland J. L. H., Ireland J. J. and Roche J. F. 2002. Effects of oestradiol and progesterone on secretion of gonadotrophins and health of first wave follicles during the oestrous cycle of beef heifers. *Reproduction* 124, 531–541
- Austin E.J., Mihm M., Evans A.C.O., Knight P.G., Ireland J.L.H., Ireland J.J., and J.F. Roche. 2001. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. *Biology of Reproduction* 64, 839–848
- Bage R. 2003. Conception rates after AI in swedish red and white dairy heifers: relationship with progesterone concentrations at AI *Reprod Dom Anim* 38, 199–203

- Bage, R. Gustafsson, H. Larsson, B. Forsber., Rodríguez Martínez H. 2002 Repeat breeding in dairy heifers: follicular dynamics and estrous cycle characteristics in relation to sexual hormone patterns. *Theriogenology*, 57 (2257-2269)
- Bartlett, P.C., Kirk, J.H., Mather, E.C., 1986. Repeated insemination in Michigan Holstein-Friesian cattle: incidence, descriptive epidemiology, and estimated economic impact. *Theriogenology* 26, 309–332
- Beltman M.E., Lonergan P., Diskin M.G., Roche J.F., Crowe M.A. 2009. Effect of progesterone supplementation in the first week post conception on embryo survival in beef heifers. *Theriogenology* 71 1173–1179
- Bigelow K.L. and Fortune J.E. 1998. Characteristics of prolonged dominant versus control follicles: follicle cell numbers, steroidogenic capabilities, and messenger ribonucleic acid for steroidogenic enzymes. *Biology of Reproduction* 58, 1241-1249
- Bleach C L, Glencross R. G and Knight P. G. 2004. Association between ovarian follicle development and pregnancy rates in dairy cows undergoing spontaneous oestrous cycles. *Reproduction* 127 621–629.
- Bo G.A., Adams, G.P., Caccia M., Martinez M., Pierson, R.A., Mapletoft R.J. 1995a. Ovarian follicular wave emergente after tratment with progestogen and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science* 39 193-204
- Bo G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A., Tribulo H. E., Caccia M., Mapletoft R.J. 1994. Follicular wave dynamics after estradiol-17 beta treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology* 41:1555-1569.

- Bo G.A., Bergfelt D.R., Brogliatti G.M., Pierson R.A., Adams G.P., Mapletoft R.J. 2000. Local versus systemic effects of exogenous estradiol-17 beta on ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen implants. *Animal Reproduction Science* 59 141–157
- Bo, G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A., Mapletoft, R.J. 1995b. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 43, 31–40b
- Bousfield G. R., Jia L, Ward D. N. 2006. Gonadotropins: Chemistry and Biosynthesis. Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. Third Edition.
- Bridges, G.A., Mussard, M.L., Burke, C.R., Day, M.L. 2008. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. *Animal Reproduction Science*
- Busch D. C., Atkins A., Bader J. F., Schafer D. J., Patterson D. j., Geary T. W. and Smith M. F. 2008. Effect of ovulatory follicle size and expression of estrus on progesterone secretion in beef cows. *J Anim Sci.*86:553-563
- Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Mol Reprod Dev* 2002;62:489-495.
- Celik, H. A., I. Aydm, S. Sendag, and D. A. Dinc. (2005). Number of follicular waves and their effect on pregnancy rate in the cow. *Reprod. Domest. Anim.* 40:87–92.
- Cerri R. L. A., Santos J. E. P., Juchem S. O., Galva K. N., and Chebel R. C. 2004. Timed Artificial Insemination with Estradiol Cypionate or Insemination at Estrus in High-Producing Dairy Cows *J. Dairy Sci.* 87:3704–3715.

- Childs G. V., Gonadotropes and Lactotropes. 2006. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Third Edition.
- Clarke, I.J., Pompolo, S., 2005. Synthesis and secretion of GnRH. Anim. Reprod. Sci. 88:29-55.
- Driancourt M.A., Royère D., Hédon B., Levasseur MC., Oestrous and menstrual cycles Cap. 29. Reproduction in Mammals and Man. Thibault MC Levasseur, Hunter RHF. Elipses, Paris 1993.
- Driancourt, M.A., 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farms animals. Implications for manipulation of reproduction. Theriogenology. 55:1211-1239.
- Duchens M. Forsberg M., Edqvist L.E., Gustafsson H. and Rodriguez-Martinez H. 1994. Effect of induced suprabasal progesterone levels around estrus on plasma concentrations of progesterone, Estradiol-17 beta and LH in heifers. Theriogenology 42: 1159-1169.
- Duchens M., Forsberg M., Gustafsson H., Edqvist L. E., Rodríguez-Martínez H. 1995. Reproductive oestrous asynchrony by suprabasal plasma progesterone levels. Animal Reproduction Science 39 171-182
- Duchens M., Maciel M., Gustafsson H., Forsberg M., Rodriguez-Martinez H., Edqvist LE. 1995. Influence of perioestrous suprabasal progesterone levels on cycle length, oestrous behaviour and ovulation in heifers. Animal Reproduction Science 37: 95-108
- Eppig J. J., Wigglesworth Karen, and Pendola Frank L. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. 2890–2894 PNAS March 5, 2002 vol. 99 no. 5



- Eppig JJ, Chesnel F, Hirao Y, O'Brien MJ, Pendola FL, Watanabe S, Wigglesworth K. 1997. Oocyte control of granulosa cell development: how and why. *Hum Reprod*; 12 (suppl 11):127–132.
- Erickson, G.F. 1986. An analysis of follicle development and ovum maturation. *Semin. Reprod. Endocrinol.*, **4**, 233–254.
- Findlay J.K., Robertson D.M., Clarke I.J., Klein R., Doughton B.W., Xiao S, Russell D.L. and Shukovski L. 1992. Hormonal regulation of reproduction – general concepts. *Animal Reproduction Science*, 28. 319-328.
- Fortune J. E. Ovarian Follicular Growth and Development in Mammals. 1994. *Biology of Reproduction* 50, 225-232
- Garcia A., Salaheddine M. 2001. Effect of oestrous synchronization with estradiol 17 beta and progesterone on follicular wave dynamics in dairy heifers. *Reprod Dom Anim* 36, 301-307.
- Ginther O.J., Kastelic J.P. And Knopf L. 1989. Composition and Characteristics of Follicular Waves during the Bovine Estrous Cycle. *Animal Reproduction Science*, 20 187-200 187
- Goff, A K. .2004. Steroid Hormone modulation of prostaglandin secretion in the ruminant endometrium during the estrous cycle. *Biology of Reproduction* 71, 11-16
- Goodman R. L., Inskeep E. K, 2006. Neuroendocrine Control of the ovarian cycle of the sheep. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Third Edition.

- Green M.P, Hunter M.G., Mann G.E. 2005 Relationships between maternal hormone secretion and embryo development on day 5 of pregnancy in dairy cows. *Animal Reproduction Science* 88 179–189.
- Gustafsson H, Emanuelsson U, 2002: Characterisation of the repeat breeding syndrome in Swedish dairy cattle. *Acta Vet Scand* 43, 115–125.
- Hatler T.B., Hayes S.H., Ray D.L., Reames P.S., Silvia W.J. 2008. Effect of subluteal concentrations of progesterone on luteinizing hormone and ovulation in lactating dairy cows. *The Veterinary Journal* 177 360–368
- Heikinheimo O, Gibbons W. E. 1998. The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine *Molecular Human Reproduction* vol.4 no.8 pp. 745–756,
- Herbison A E. 1998. Multimodal Influence of Estrogen upon Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons *Endocrine Reviews* 19(3): 302–330.
- Herbison A. E. 2006. Physiology of the Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Network. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Third Edition.
- Humblot P. 2001. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. *Theriogenology*; 56: 1417-1433.
- Hunter M. G., Robinson R. S., Mann G. E., Webb R. 2004. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Animal Reproduction Science* 82-83 461-477.

- Jeong K H, Kaiser U B. 2006. Gonadotropin- Releasing Hormone regulation of gonadotropin biosynthesis and secretion. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Third Edition.
- Kendall N.R., Flint A.P.F., Mann G.E. 2008. Incidence and treatment of inadequate postovulatory progesterone concentrations in repeat breeder cows. The Veterinary Journal. Article in press.
- Kilen S. M., Swartz N.B. 1999. Estrous Cycle. Encyclopedia of Reproduction Volume 2. Academic Press..
- Kinder JE, Kojima FN, Bergfeld EG, Wehrman ME and Fike KE. 1996. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. Journal of Animal Science 74, 1424-1440.
- Kirby J C, Wilson JS Matthew CL. 1997. Follicular Function in Lactating Dairy cows treated with sustained-release bovine somatotropin. Dairy Science 80: 276-285
- Kirby J C, Wilson JS Matthew CL. 1997. Response of Dairy Cows Treated with Bovine Somatotropin to a Luteolytic dose of Prostaglandin F<sub>2</sub>α. Dairy Science 80: 286-294
- Kriegsfeld Lance J., Mei Dan Feng , Bentley George E. , Ubuka Takayoshi , Mason Alex O. , Inoue Kazuhiko, Ukena Kazuyoshi , Tsutsui Kazuyoshi, and Rae Silver. 2006. Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. PNAS. February 14, vol. 103 no. 7 2410–2415.
- Krisher R. L. 2004. The effect of oocyte quality on development. Animal Science. 82 (E. Suppl.):E14–E23.

- Larson S. F., Butler W.R. , Bruce C. W. 2007. Pregnancy rates in lactating dairy cattle following supplementation of progesterone after artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 102. 172–179
- Li R., Norman R. J., Armstrong D. T. and Gilchrist R. B. 2000. Oocyte-Secreted Factor(s) Determine Functional Differences Between Bovine Mural Granulosa Cells and Cumulus Cells. *Biology of Reproduction* 63, 839–845
- Lopes A.S., Butler S.T., Gilbert R.O., Butler W.R. 2007. Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. *Animal Reproduction Science* 99 34–43
- Lösel M.R., Falkenstein E., Feuring M., Schultz A., Tillmann C., Aseroth R. K., Wehling M. 2003. Nongenomic Steroid Action: Controversies, questions and Answers. *Physiol. Rev.* Vol 83. July 2003.
- Lucy M. C. 2007. The bovine dominant ovarian follicle. *J Anim Sci.*85:E89-E99.
- Magoffin DA and Wietsman SR. 1994. Insulin-like growth factor-I regulation of luteinizing hormone (LH) receptor messenger ribonucleic acid expression and LH-stimulated signal transduction in rat ovarian theca interstitial cells. *Biology of Reproduction* 51, 766-775.
- Mann G. E. and Lamming G. E. 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 121, 175–180

- Mann G.E., Fray M.D., Lamming G.E. 2006. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-tau production in the cow *The Veterinary Journal* 171; 500–503.
- Martínez M.F., Kastelic J.P, Bo G.A., Caccia M., Mapletoft R.J. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle *Reproduction Science* 86 (2005) 37–52
- Maurer R. R., Echternkamp S. E. Hormonal asynchrony and embryonic development. *Theriogenology* January 1982 Vol. 17 No. 1
- Maurer, R.R., Echternkamp, S.E., 1985. Repeat breeder females in beef cattle: influences and causes. *J. Anim. Sci.* 61, 624–636.
- Mc. Natty K.P., Heath D. A., Lundy T., Fidler A.E., Quirke L., O’Connell A., Smith P., Groome N., Tisdall D. J. 1999 Control of early ovarian follicular development. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 54 3-16.
- McNeill RE, Diskin MG, Sreenan JM, Morris DG. 2006. Associations between milk progesterone concentration on different days and with embryo survival during the early luteal phase in dairy cows. *Theriogenology* 65 1435–1441.
- Miyoshi S, Pate JL, Palmquist DL. 2001. Effects of propylene glycol drenching on energy balance, plasma glucose, plasma insulin, ovarian function and conception in dairy cows. *Anim Reprod Sci*;68:29-43.
- Monget P, Stéphane F, Mulsant P, Lecerf F, Elsen J M, Mazerbourg S, Pisselet C, Monniaux D. 2002. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology* 23, 139-154

- Moor, R., and Y. Dai. 2001. Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *Reproduction* 58:91–104.
- Morgan W. F., Lean I. J. 1993. Gonadotrophin-releasing hormone treatment in cattle a meta-analysis of the effects on conception at the time of insemination. *Aust. Vet J.* 1993; 70:205-209.
- Mussard M. L., Burke C. R., Behlke E. J., Gasser C. L., and Day M. L. 2007. Influence of premature induction of a luteinizing hormone surge with gonadotropin-releasing hormone on ovulation, luteal function, and fertility in cattle. *J Anim Sci* 85:937-943
- Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. 2000. Mechanism of controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews* Vol 80, No 1.
- Padmanabham V, McNeilly A.S. 2001. Is there an FSH-releasing factor?. *Reproduction* 121, 21-30.
- Pérez M. C.C., Rodríguez A.I., España E. F., Dorado M. J., Hidalgo P. M., Corral P. S., Sanz P. J. 2004. Dinámica folicular ovárica en vacas repetidoras: Estudio ecográfico y perfil de progesterona. *Archivos de zootecnia* vol. 53, núm. 201. Pág 35-46
- Perry G. A., Smith M. F, Lucy M. C., Green J. A. , Parks T. E. , MacNeil M. D., Roberts A. J., and Geary T. W. 2005. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *PNAS* vol. 102 no. 14
- Perry G. A., Smith M. F, Roberts A. J., MacNeil M. D. and Geary T. W. 2007. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers . *J Anim Sci.*85:684-689.

- Peters M.W., Pursley J.R. 2003. Timing of final GnRH of the Ovsynch protocol affects ovulatory follicle size, subsequent luteal function, and fertility in dairy cows *Theriogenology* 60 1197–1204.
- Peterson AJ, Henderson HC. 1990. Plasma progesterone concentrations in ovariectomized dairy cows treated with a CIDR-B breeding device [abstract]. *J Reprod Fertil*;(43):315.
- Phillips C.J.C. 2001. *Cattle growth and Rearing Systems. Principles of cattle production.* CABI Publishing.
- Revah I. and Butler W. R. 1996. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* 106, 39-47.
- Rhodes FM, Peterson AJ, Jolly PD, McMillan WH, Donnison M, Ledgad, A Parton G and Hall DR. 1995. Bovine ovarian follicle and oocyte characteristics after emergence of the first follicular wave. *Theriogenology*
- Roche, J. F., Austin, E. J., Ryan M., O'Rourke M., Mihm M., Diskin M. G. 1999. Regulation of follicle waves to maximize fertility in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 54, 61-71.
- Royal MD, Darwash AO, Flint APF. 2000. Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. *Anim Sci*; 70: 487-501.
- Savio J. D., Thatcher W. W., Badinga L., de la Sota R. L. and Wolfenson D. 1993. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 97, 197-203.

- Savio JD, Thatcher WW, Badinga L, De-la Sota RL and Wolfenson D 1993. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 97, 197-203.
- Scott C.J, Tilbrook A.J., Rawson J.A., Clarke I.J. 2000. Gonadal steroid receptors in the regulation of GnRH secretion in farm animals *Animal Reproduction Science* 60–61; 313–326
- Selvaraju S., Agarwal S.K., Karche S. D, F 2002. Fertility responses and hormonal profiles in repeat breeding cows treated with insulin. *Animal Reproduction Science* 73; 141-149
- Sherwood N M, Lovejoy D.A., Coe R. 1993 Origin of mammalian gonadotropin-releasing hormones. *Endocrine Reviews* 14 (2): 241-254
- Sianangama P. C., Rajamahendran R. 1992. Effect of human chorionic gonadotropin administered at specific times following breeding on milk progesterone and pregnancy in cows. *Theriogenology* 38: 85-96.
- Sirois J and Fortune JE. 1990. Lengthening the bovine oestrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance *Endocrinology* 127 916-925
- Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW. 2004. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: Insights from domestic animals. *Biology of reproduction* 71, 2-10
- Spicer LJ, Alpizar E, Echternkamp SE. 1993. Effects of insulin, insulin-like growth factor I and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth factor I in vitro. *J Anim Sci*;71:1232-1241.



- Starbuck GR, Darwash AO, Lamming GE. 1999. The importance of progesterone during early pregnancy in the dairy cow. *Cattle Practice*, 7:397–9.
- Starbuck GR, Mann GE. 2009. Differential effects of exogenous progesterone administration at different stages of the luteal phase on endogenous oestradiol concentration in cows. *Reprod Domest Anim*. Jan 8
- Stevenson JS., Call E. P., Scoby R K., 1990. Double Insemination and Gonadotropin –Releasing Hormone Treatment of Repeat-Breeding Dairy Cattle. *Dairy Science* 73: 1766-1772
- Stevenson, J.S. 2007. Clinical reproductive physiology of the cow. Chapter 35 In: Youngquist, R.S. Threlfall W.R. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. W.B. Saunders Elsevier. Co. Philadelphia, USA. Second Edition 258-270 pp..
- Stock E. And. Fortune J. E. 1993. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology* Vol. 132, No. 3
- Stronge A. J. H., Sreenan J. M., Diskin M. G. 2005. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology* 64 1212-1224.
- Sutton M.L., Gilchrist R.B. and Thompson J.G.. 2003. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reproduction Update*, Vol.9, No.1 pp. 35-48,
- Tian XC, Berndtson AK and Fortune JE. 1995. Differentiation of bovine preovulatory follicles during the follicular phase is associated with increases in messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 side

chain cleavage 3 $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase and p450 17 $\alpha$  hydroxylase but not P450 aromatase. *Endocrinology* 136, 5102-5110.

Townson D. H., Tsang P. C., Butler W. R., Frajblat M., Griel L. C., Johnson C. J., Milvae R. A., Niksic G. M. and Pate J. L. 2002. Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows *J Anim Sci.* 80:1053-1058.

Utt MD, Jousan FD, Beal WE. 2003 The effects of varying the interval from follicular wave emergence to progestin withdrawal on follicular dynamics and the synchrony of estrus in beef cattle. *J Anim Sci*; (81):1562-1567.

Van Cleeff J, Lucy MC, Wilcox CJ, Thatcher WW. Plasma and milk progesterone and plasma LH in ovariectomized lactating cows with new or used controlled internal drug release devices. *Anim Reprod Sci* 1992;(27):91-106.

Vasconcelos J.L.M, Sartori R., Oliveira H.N., Guenther and Wiltbank M.C. 2001. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 56:307-314.

Vasconcelos, J.L.M., Silcox R.W., Rosa G.J.M., Pursley J.R. and Wiltbanksa MC. 1999. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 52:1067-1078.

Villarroel A., Martino A, Durant R H., Deletang F, Sischo W. M. 2004. Effect of post-insemination supplementation with PRID on pregnancy in repeat breeder Holstein cows. *Theriogenology* 61;1513-1520.

Waldmann A., Reksen O., Landsverk K., Kommisrud E., Dahl E., Refsdal A.O., Ropstad E. 2001. Progesterone concentrations in milk fat at first

insemination—effects on non-return and repeat-breeding. *Animal Reproduction Science* 65; 33–41

Waldmann A, Kurykin J, Jaakma U, Kaart T, Aidnik M, Jalakas M, Majas L, Padrik P. 2006. The effects of ovarian function on estrus synchronization with PGF in dairy cows. *Theriogenology* 66; 1364–1374

Walton J. S., Holbert G. W. Robinson N. A., Leslie K. E. 1990. Effects of progesterone and human chorionic gonadotropin administration five days post insemination on plasma and milk concentrations of progesterone and pregnancy rates of normal and repeat breeder dairy cows. *Can J Vet Res.* 54:305-308

Wassarman, P.M.. In Adashi, E.Y., Rock, J.A. and Rosenwaks, Z. 1996. Oogenesis surgery and technology. *Reproductive Endocrinology* pp. 341–357.

Wolfenson D., Sonego H., Shaham-Albalancy A., Shpirer Y., Meidan R. 1999. Comparison of the steroidogenic capacity of bovine follicular and luteal cells, and corpora lutea originating from dominant follicles of the first or second follicular wave. *Journal of Reproduction and Fertility* 117, 241-247.

Xu, Z., H. A. Garverick, G. W. Smith, M. F. Smith, S. A. Hamilton, and R. S. Youngquist. 1995. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol. Reprod.* 53:951–957.

Zheng B, Patel B, McMenamin Malgorzata, Moran E, Paprocki A. M, Maki Kihara, R. Dee Schramm, and Keith E. Latham. 2005. Effects of Follicle Size and Oocyte Maturation Conditions on Maternal Messenger RNA Regulation and Gene Expression in Rhesus Monkey Oocytes and Embryos. *Biology of Reproduction* 72, 890–897.

## VIII. APÉNDICE

**Cuadro 1.** Dieta proporcionada a vacas altas productoras en la Empresa Agropecuaria “El Tepetatillo”

<b>Ingrediente</b>	<b>Cantidad kg/vaca/día</b>
Ensilaje de maíz	10 Kg
Ensilaje de alfalfa	7 Kg
Ensilaje de triticali	3 Kg
Heno del alfalfa	.90 Kg
Concentrado marca comercial	11.2 Kg
Booster Judío	2.6 Kg
Semilla de algodón	1 Kg
<b>TOTAL</b>	<b>35.7 Kg</b>

**Cuadro 2** Parámetros reproductivos obtenidos en la Empresa Agropecuaria “El Tepetatillo” durante el año 2008

Intervalo entre partos	13.79
Días abiertos	120
Desechos	23.44 %
Dosis por concepción	3.14
Gestantes	46.82 %
Inseminadas	26.96 %
Abiertas	26.23 %
Vacas problema*	13.94%
Detección de estros	56.24 %
Fertilidad	31.9 %
Fertilidad a	
1 <sup>er</sup> Servicio	33.45%
2 <sup>o</sup> Servicio	40.21%
3 <sup>er</sup> Servicio	30.09%
Días a	
1 <sup>er</sup> Servicio	64.74
2 <sup>o</sup> Servicio	104.28
3 <sup>er</sup> Servicio	136.88

\* Vacas con más de 150 días en leche sin quedar gestantes

**Cuadro 3** Diámetro de folículo ovulatorio (DFO mm) en vacas lecheras calificadas como repetidoras (no gestantes con 4 o más servicios) que recibieron tratamiento hormonal previo (PreS) o posterior (PostS) al servicio.

TRATAMIENTO	DFO (mm)
<b>PreS<sup>1</sup></b>	<b>16.01± 1.09 a</b>
PosS <sup>2</sup>	20.61± 1.45 b
C <sup>3</sup>	20.27± 1.43 b

<sup>1</sup>. Se dejó pasar el estro en que la vaca calificaba como repetidora y posteriormente se controló el desarrollo folicular hacia el siguiente estro mediante la administración de 17-β estradiol (E2) y prostaglandina F2α (PG) (5 mg de E2 el d 6 post-estro + 500 µg de cloprostenol el d 10 e IA a estro detectado).

<sup>2</sup>. Se inseminó en forma convencional durante el estro en que la vaca calificaba como repetidora administrándose progesterona suplementaria durante ¾ partes del diestro posterior (CIDR-B entre los días 5 a 14 post-servicio).

<sup>3</sup>. Grupo de vacas testigo inseminadas en forma convencional.

a, b. Diferente literal dentro de la columna significa diferencias estadísticas (P<0.01)

**Cuadro 4.** Concentración de progesterona en vacas lecheras calificadas como repetidoras (no gestantes con 4 o más servicios) que recibieron tratamiento hormonal previo (PreS) o posterior (PostS) al servicio.

CONCENTRACIÓN DE PROGESTERONA (ng/ml)				
Tratamiento	Día del servicio	Día 4	Día 5	Día 6
PreS <sup>1</sup> n=30	0.37±0.22 a	0.58 ± 0.051 a	0.86 ± 0.096	0.97±0.16
PostS <sup>2</sup> N=46	0.42 ± 0.017ab	0.62± 0.040 a	0.84± 0.076	1.41±0.12
Control <sup>3</sup> N=38	0.45 ± 0.019b	0.78± 0.043 b	0.78±0.083	1.02±0.14
P	=0.0460	= 0.0357	= 0.6251	= 0.6743

<sup>1</sup>. Se dejó pasar el estro en que la vaca calificaba como repetidora y posteriormente se controló el desarrollo folicular hacia el siguiente estro mediante la administración de 17-β estradiol (E2) y prostaglandina F2α (PG) (5 mg de E2 el d 6 post-estro + 500 µg de cloprostenol el d 10 e IA a estro detectado

<sup>2</sup>. Se inseminó en forma convencional durante el estro cuando que la vaca calificaba como repetidora administrándose progesterona suplementaria durante ¾ partes del diestro posterior (CIDR-B entre los días 5 a 14 post-servicio

<sup>3</sup>. Grupo de vacas testigo inseminadas en forma convencional cuando que la vaca calificaba como repetidora.

<b>Cuadro 5</b> Porcentaje de vacas gestantes calificadas como repetidoras (no gestantes con 4 o más servicios) que recibieron tratamiento hormonal previo (PreS) o posterior (PosS) al servicio		
Tratamiento	Vacas gestantes	
	Número	(%)
Tratamiento previo al servicio (PreS) <sup>1</sup>	12/30	40.00
Tratamiento posterior al servicio (PosS) <sup>2</sup>	16/46	34.78
Tratamiento Control (C) <sup>3</sup>	12/38	31.57

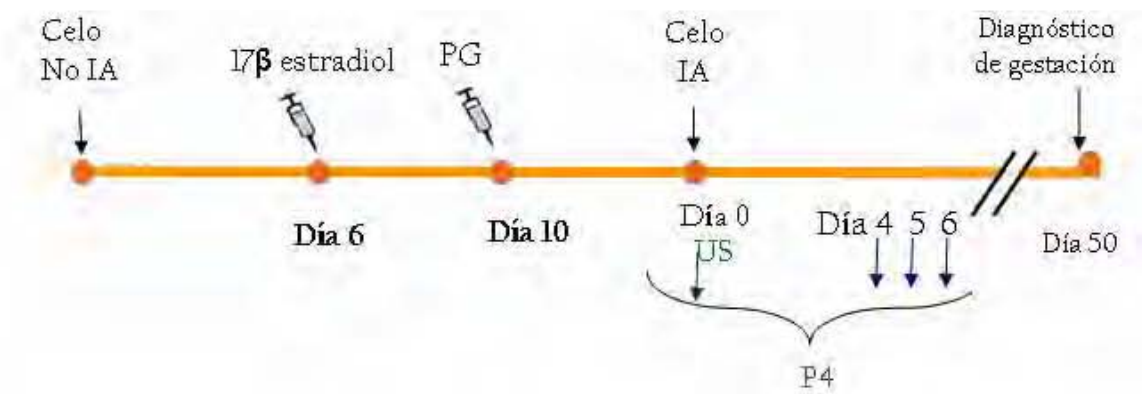
<sup>1</sup>. Se dejó pasar el estro en que la vaca calificaba como repetidora y posteriormente se controló el desarrollo folicular hacia el siguiente estro mediante la administración de 17-β estradiol (E2) y prostaglandina F2α (PG) (5 mg de E2 el d 6 post-estro + 500 µg de cloprostenol el d 10 e IA a estro detectado

<sup>2</sup>. Se inseminó en forma convencional durante el estro cuando que la vaca calificaba como repetidora administrándose progesterona suplementaria durante <sup>3</sup>/<sub>4</sub> partes del diestro posterior (CIDR-B entre los días 5 a 14 post-servicio

<sup>3</sup>. Grupo de vacas testigo inseminadas en forma convencional cuando que la vaca calificaba como repetidora.



**Figura 1** Esquema del tratamiento previo al servicio (PreS) que recibieron vacas lecheras calificadas como repetidoras (no gestantes con 4 o más servicios).



**Figura 2** Esquema del tratamiento posterior al servicio (PosS) que recibieron vacas lecheras calificadas como repetidoras (no gestantes con 4 o más servicios).



**Figura 3** Esquema seguido en vacas lecheras calificadas como repetidoras (no gestantes con 4 o más servicios) que fungieron como grupo control.

