

01674

18



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

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

MANIPULACION DEL RECAMBIO FOLICULAR EN VACAS
SINCRONIZADAS CON UN IMPLANTE DE NORGESTOMET
EN AUSENCIA DE UN CUERPO LUTEO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTADA POR

MVZ. JOSE RAMON PAEZ MANRIQUE

TUTOR PRINCIPAL: DR. CARLOS GUTIERREZ AGUILAR

COMITE TUTORAL

DR. EVERARDO GONZALEZ PADILLA
DR. GERMAN MENDOZA MARTINEZ



MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DECLARACIÓN

El autor da consentimiento a la división de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que esta tesis este disponible para cualquier tipo de intercambio bibliotecario.

MVZ José Ramón Páez Manrique

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIAS

A mis padres María Eugenia Manrique de Páez y José Manuel Páez Corral, por todo el cariño y apoyo que me han dado durante toda mi vida

A mis hermanos Manolo, Susana y a mi primo Juan Ramón por ser los mejores hermanos, gracias por estimularme y apoyarme en todos los momentos de mi vida

A mis tíos Lupita, Susana, Tomas, Roberto y Juan Ramón, por darme todo su cariño y estar siempre pendientes de mi

A mi abuela Eva María, a mi tía Leticia y a mi prima Mariana por apoyarme en todo momento

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A mi comité tutorial:

Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar

Dr. Everardo González Padilla

Dr. German Mendoza Martínez

Por el apoyo y dedicación que me dieron durante la elaboración de mi trabajo

Al jefe del departamento de reproducción, Joel Hernández Cerón por su amistad y por brindarme todas las facilidades para la elaboración de mi trabajo.

A mi asesor Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar por guiarme en el conocimiento y brindarme su amistad.

Un especial agradecimiento a la Dra. Adriana Shaharrea por la asesoría, ayuda y hospitalidad que me brindo durante la realización de mi trabajo.

A mis amigos del departamento de Reproducción: Arantzazu, Ingrid, Lucy, Lucrecia, Luis, Horacio y Nicolás, por su amistad y estímulo en la elaboración del presente trabajo.

Un especial agradecimiento a mis amigos Ana y Jaime, por haberme apoyado durante la parte práctica de mi trabajo experimental

A mis amigos de Martínez de la Torre, María Luisa, Ericka, Xochitil, Oscar y Angel por brindarme su amistad

A mis amigos del laboratorio de radioinmunoanálisis de la FMVZ UNAM, Susana, Clara y Gerardo por su ayuda en la determinación de mis muestras.

A la Dra. María Teresa Sánchez Torres y Dr. Francisco J. Padilla Ramírez por sus observaciones al presente documento

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

| INDICE | Pagina |
|--|---------------|
| RESUMEN | I |
| ABSTRACT | III |
| LISTA DE CUADROS Y FIGURAS | V |
| CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN. | 1 |
| CAPITULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA: | 6 |
| 2 1 Fisiología del posparto. | 6 |
| 2 2 Dinámica folicular | 12 |
| 2 3 Sincronización de estros. | 20 |
| 2 4 Utilización de líquido folicular para alterar la dinámica folicular | 30 |
| 2 5 Persistencia folicular | 31 |
| 2 6 Métodos para la eliminación del folículo dominante persistente. | 33 |
| 2 7 Gonadotropina coriónica equina (eCG). | 36 |
| CAPITULO 3. HIPOTESIS Y OBJETIVO. | 39 |
| CAPITULO 4. EFECTO DEL EXTRACTO OVÁRICO, LÍQUIDO FOLICULAR Y ESTEROIDES EN EL RECAMBIO DEL FOLÍCULO DOMINANTE PERSISTENTE EN VACAS HOLSTEIN SINCRONIZADAS CON UN IMPLANTE DE NORGESTOMET EN AUSENCIA DE CUERPO LÚTEO | 40 |
| CAPITULO 5. EXPERIMENTO 2 EFECTO DEL NORGESTOMET EN EL RECAMBIO DEL FOLÍCULO DOMINANTE Y FERTILIDAD EN VACAS F1 (CEBÚ-HOLSTEIN) SINCRONIZADAS CON IMPLANTES DE NORGESTOMET CON O SIN ECG Y EN AUSENCIA DE UN CUERPO LÚTEO | 66 |
| CAPITULO 6. CONCLUSIONES. | 86 |
| CAPITULO 7. REFERENCIAS | 87 |

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

RESUMEN GENERAL

MVZ J. Ramón Páez Manrique: **MANIPULACIÓN DEL RECAMBIO FOLICULAR EN VACAS SINCRONIZADAS CON UN IMPLANTE DE NORGESTOMET EN AUSENCIA DE UN CUERPO LÚTEO.**

Con el objetivo de evaluar el efecto de esteroides ó proteínas ováricas (contenidas en el líquido folicular equino y extracto ovárico) en el recambio del folículo dominante se realizaron dos experimentos. El folículo dominante persistente (**FDP**) fue inducido por medio de un implante de norgestomet (**iNg**) y la inyección simultanea de prostaglandina (**PG**) (día 0). Después de la comprobación del desarrollo de un **FDP** se aplicaron diversos tratamientos y el recambio folicular (**RF**) fue determinado por ultrasonografía de los ovarios (**Uso**). **Experimento 1.** La aplicación de 20 ml de líquido folicular equino (**LFE**) intramuscular por dos días provocó **RF** en 3 de 4 vacas ($P < 0.05$). El LFE aplicado en forma intravenosa ocasionó choque anafiláctico en 2 de 3 vacas y en estos no provocó **RF**. El norgestomet (1.8 mg) indujo el **RF** en 3 de 4 vacas. El benzoato de estradiol (**BE**) (1 mg) ocasionó la ovulación del FDP en 3 de 4 vacas y el posterior desarrollo de un nuevo folículo. La aplicación de extracto ovárico (**EO**) hidrosoluble (10 ml) por 5 días suprimió el desarrollo folicular > 8 mm. Igualmente, 20 ml de **EO** por dos días provocó recambio del **FDP** en 2 de 4 vacas ($P > 0.05$). En las vacas testigo ($n=16$) no se presentó **RF**. **Experimento 2.** Se utilizaron 55 vacas Holstein/Cebú. El grupo NORG ($n=28$) recibió 1.8 mg de norgestomet el día 5 y el grupo Testigo ($n=27$) no recibió tratamiento. El día 9 se retiró el implante, se realizó destete temporal por 72 h y las vacas fueron divididas dentro de sus tratamientos para recibir ($n=23$) o no ($n=27$) 500 UI de eCG. Las vacas fueron inseminadas 12 h después del estro. El efecto del norgestomet y la etapa de desarrollo folicular (crecimiento ó meseta) sobre el **RF** fue analizada por X^2 . El efecto del recambio folicular sobre el tiempo de presentación de estro e índice de concepción se analizó por T de Student. El efecto de la eCG en el tamaño del folículo ovulatorio y tiempo de presentación del estro se analizó por T de Student. En el grupo NORG el 40% (10/25) de las vacas presentaron **RF** contra el 16% (4/25) del grupo

Testigo ($P < 0.05$) La eCG no tuvo efecto sobre el índice de crecimiento (eCG, 1.73 ± 0.2 vs No eCG 1.63 ± 0.2 mm/día), tamaño del folículo ovulatorio (eCG, 17.05 ± 0.8 vs No eCG 16.44 ± 0.4 mm) y tiempo de presentación del estro (eCG, 36.47 ± 4.4 vs No eCG, 39.37 ± 3.1 h) ($P > 0.05$). No se encontró efecto del **RF** sobre el tiempo de presentación del estro ni sobre la fertilidad ($P > 0.05$). La etapa de desarrollo folicular (meseta o crecimiento) al momento del tratamiento con norgestomet influyó en la respuesta al tratamiento, el 66.6% (6/9) de las vacas que se encontraban en etapa de meseta presentaron recambio folicular contra el 25% (4/16) de las que se encontraban en etapa de crecimiento ($P = 0.046$). Se concluye que el norgestomet y el benzoato de estradiol estimulan el **RF** en vacas con un FDP

Palabras clave: Folículo dominante persistente, recambio folicular, extracto ovárico, líquido folicular equino, benzoato de estradiol y norgestomet.

ABSTRACT

MVZ. José Ramón Páez Manrique. **CHANGE FOLLICULAR MANIPULATION IN COWS SYNCHRONIZES WITH NORGESTOMET IMPLANT IN ABSENCE OF CORPUS LUTEUM.**

The objective of this study was to evaluate the effect of steroids, equine follicular fluid and ovarian extract on the persistence and turnover of the dominant follicle. Persistent dominant follicle (**PDF**) were induced by placing a norgestomet implant (iNg) at the time of prostaglandin injection (**PG**) (day 0). After **PDF** formation various treatments were applied and follicular turnover (**FT**) determined by ovarian ultrasonography (**US**). In **experiment 1**, 20 ml im of equine follicular fluid stimulated **FT** in three of four cattle ($P < 0.05$). Intravenous injection of **EFF** caused an anaphylactic shock in two of three cattle. Estradiol benzoate (**EB**) (1mg) stimulated the ovulation to the **PDF** in three of four cattle and a new follicle was recruited. The treatment with ovarian extract (**OE**) (10 ml) for five days suppressed follicular development beyond 8 mm. Similarly, 20 ml the **OE** by two days induced **PDF** turnover in two of four cattle ($P > 0.05$). In contrast, follicle turnover was not observed in the control group (0/16). In **experiment 2**, fifty-five Holstein/Cebu lactating nursing cattle were used in two groups. **NORG** group (n=28) received 1.8 mg im of norgestomet on day 5 whilst the control group remained untreated (n=27). The implant was withdrawn on day 9 and the calf was temporally removed from its dam for 72 h. Further cattle were divided either to receive (n=23) or not (n=27) 500 UI of eCG at the time of implant withdrawal. Insemination was carried out 12 h after standing estrus. The effect norgestomet and of the stage of follicular development (growth or plateau) on **FT** were analyzed by X^2 . The effect of **FT** on the conception rate and on the interval from implant withdrawal to estrous behavior were analyzed by T-test. The effect of eCG on ovulatory follicle growth and interval from implant withdrawal to estrous behavior was analyzed by T test. Cattle in the **NORG** group presented **FT** in 10/25 vs 4/16 in the control group ($P > 0.05$). There was no effect of eCG on growth rate (eCG, 1.73 ± 0.2 vs control 1.63 ± 0.2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

mm/day) ovulatory follicle diameter (eCG, 17.05 ± 0.8 vs. control 16.44 ± 0.04 mm) and interval from implant withdrawal to estrous behavior (eCG 36.47 ± 4.4 vs control 39.37 ± 3.1 h) ($P > 0.05$). Follicular turnover did not affect the interval from implant withdrawal to estrous behavior or fertility ($P > 0.05$). The stage of follicular development (growth or plateau) affected the response of the follicle to the norgestomet treatment. While 66.6% (6/9) of cattle with follicles on the plateau stage showed FT, it cattle with growing follicles occurred in only 25% (4/16). In conclusion, norgestomet and estradiol benzoate stimulate FT in cattle with a PDF

Keywords: Persistent dominant follicle, follicle turnover, ovarian extract, equine follicular fluid, estradiol benzoate and norgestomet

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

FIGURAS

- Figura 1.** Niveles de progesterona en sangre después de la aplicación de prostaglandina $PGF_{2\alpha}$ en vacas ciclando. 25
- Figura 2.** Diseño experimental utilizado para probar el efecto de el extracto ovárico sobre el crecimiento folicular en vacas sincronizadas con un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo (Estudio 1 Primera parte) 45
- Figura 3.** Diseño experimental para probar el efecto del extracto ovárico sobre la persistencia del folículo dominante en vacas sincronizadas con un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo (Estudio 1 Segunda parte). 46
- Figura 4.** Diseño experimental utilizado para probar el efecto de 20 ml de líquido folicular equino intramuscular en la persistencia del folículo dominante en vacas sincronizadas con implantes de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo (Estudio 2. Primera parte). 48
- Figura 5.** Diseño experimental utilizado para probar el efecto de 20 ml de líquido folicular equino intravenoso sobre la persistencia del folículo dominante en vacas sincronizadas con implantes de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo (Estudio 2. Segunda parte)..... 49
- Figura 6.** Diseño experimental utilizado para probar el efecto del benzoato de estradiol y norgestomet sobre la persistencia de folículo dominante en vacas sincronizadas con implantes de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo (Estudio 3)..... 50
- Figura 7.** Diámetro de los folículos ováricos durante (4-8) y después (9-18) del tratamiento con extracto ovárico en las vacas sincronizadas con un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo..... 52
- Figura 8.** A) Vacas en las que la aplicación del extracto ovárico no provocó recambio folicular. Nótese que el FDP se encontraba creciendo. B) Vacas en las

que la aplicación del extracto ovárico provocó el recambio folicular. Nótese que el FDP no se encontraba creciendo. C) Vacas en el grupo Testigo en donde no se presentó recambio folicular. Las vacas estaban sincronizadas con un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo53

Figura 9. Diámetro del folículo dominante persistente y subordinado ($X \pm EE$). A) Vacas que se les aplicó LFE y no presentaron recambio del FDP. B) Vacas que se les aplicó LFE y presentaron recambio del FDP. C) Vacas del grupo Testigo en las cuales no se presentó recambio del FDP. Las vacas se sincronizaron con un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo. 55

Figura 10. Diámetro del folículo dominante persistente y subordinado ($X \pm EE$) de vacas sincronizadas con un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo. A) Vacas tratadas con LFE iv, las cuales no presentaron recambio del FDP. B) Vacas en el grupo Testigo, las cuales no fueron tratadas y no presentaron recambio del FDP. 56

Figura 11. Diámetro del folículo dominante persistente y subordinado ($X \pm EE$) de vacas sincronizadas con un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo. A) Vaca tratada con 1.8 mg de norgestomet que no presentó recambio del FDP. B) Vacas que presentaron recambio del FDP después de la aplicación de 1.8 mg de norgestomet. C) Vacas tratadas con 1 mg de benzoato de estradiol. D) Vacas en el grupo Testigo.57

Figura 12. Concentraciones de progesterona en 16 vacas tratadas con un implante de norgestomet y 15 mg de luprostiol en el día 0 y hasta el día 1073

Figura 13. Diámetro del folículo dominante persistente y subordinado ($X \pm EE$) en vacas sincronizadas con un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo. A) Vacas que recibieron 1.8 mg de norgestomet el día 5 y no presentaron recambio folicular. B) Vacas que recibieron 1.8 mg de norgestomet el día 5 y presentaron recambio folicular.75

Figura 14. Diámetro del folículo dominante persistente y subordinado en vacas sincronizadas con un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo. A) Las vacas cuyo folículo estaba en etapa de meseta al momento de la aplicación de 1.8 mg de norgestomet y presentaron recambio folicular. Por el contrario, las vacas cuyo folículo estaba en etapa de crecimiento y tuvieron recambio folicular después del tratamiento con 1.8 mg de norgestomet (B).

..... 78

CUADROS

Cuadro 1. Porcentaje de vacas que presentaron recambio folicular después de la aplicación de extracto ovárico, líquido folicular equino, norgestomet y benzoato de estradiol..... 58

Cuadro 2. Porcentaje de vacas que presentaron recambio folicular, estrógeno y porcentaje de fertilidad en vacas tratadas o no con 1.8 mg de norgestomet im en el día 5 de un programa de sincronización con un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo74

Cuadro 3. Índice de crecimiento del folículo dominante (IC) de la aplicación de eCG a la presentación de estrógeno, diámetro del folículo ovulatorio (DFO) el día de la presentación de estrógeno y tiempo de presentación de estrógeno (TPE) en vacas que presentaron estrógeno después de la sincronización con un implante de norgestomet y fueron tratadas o no con 500 UI de eCG.....76

Cuadro 4. Tiempo y dispersión de la presentación de estrógeno en vacas que después de la aplicación de norgestomet presentaron o no recambio del folículo dominante.....77

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

Durante el ciclo estral en vacas, se presentan de dos a tres oleadas de desarrollo folicular (Sirois y Fortune, 1988). Cada oleada folicular comprende el reclutamiento, selección, dominancia, recambio folicular y atresia. El recambio folicular del folículo dominante se da en un ambiente de baja frecuencia en la liberación de pulsos de LH, producidas por altas concentraciones de progesterona que son típicas a la mitad del ciclo estral (Kinder *et al.*, 1996). La sincronización de estros en ausencia de un cuerpo lúteo (CL) resulta en concentraciones subluteales de progesterona (1-2 ng/ml) (Mitchell *et al.*, 1995), que permiten el incremento en la frecuencia de pulsos de LH que sostiene el crecimiento anormal del folículo dominante (FD), prolongando su dominancia (Sirois y Fortune, 1990). A este FD se le llama folículo dominante persistente (FDP) y secreta mayores cantidades de 17β estradiol que las que secreta un FD en una fase lútea media (Sánchez *et al.*, 1993). La sincronización en ausencia de un CL y presencia de un FDP, resulta en una fertilidad reducida en comparación con la sincronización en presencia de un cuerpo lúteo en donde no se desarrolla un FDP 41.5 vs 56.8 %, (Mitchell *et al.*, 1995), 37.1 vs 64.8 %, (Savio *et al.*, 1993). Se han encontrado varias causas para la baja fertilidad después de la ovulación de un folículo dominante persistente. Mihm *et al.* (1994) encontraron que los oocitos ovulados de un folículo dominante persistente sufren un retorno prematuro a la meiosis y que la baja fertilidad podría ser debida a una asincronía en la maduración nuclear y citoplasmática del oocito. Igualmente, Revah y Butler (1996) encontraron que los oocitos obtenidos de folículos dominantes persistentes tienen una mayor cantidad de células columnares expandidas a comparación de oocitos ovulados de folículos normales. Binelli *et al.* (1999) atribuyen la baja fertilidad de los folículos dominantes persistentes a que estos secretan una gran cantidad de 17β estradiol que alteran el ambiente oviductual y Borchert *et al.* (1999) encontraron que el estradiol secretado por el folículo dominante persistente produce alteraciones en el oocito y expansión de células columnares del mismo.

Se han desarrollado varios modelos para la eliminación de un FDP integrados a la sincronización de estros y así mejorar la fertilidad. Una de las alternativas es provocar la ovulación del FDP con la aplicación de hCG (De Renis *et al.*, 1999) o GnRH (Roche *et al.*, 1999). Niasari-Naslaji *et al.* (1996) aplicaron 500 UI de hCG para eliminar el FDP y provocaron la ovulación en 14/14 animales permitiendo la ovulación de un folículo de nuevo reclutamiento en un protocolo de sincronización de estros con norgestomet. Por otra parte, Roche *et al.* (1999) utilizaron 250 mcg de un análogo de GnRH provocando la ovulación en 20/20 animales dando como resultado la emergencia de un nuevo folículo dominante. Sin embargo, la eliminación del FDP con estos protocolos necesita de la aplicación de una prostaglandina al momento del retiro del progestágeno ya que se forma un CL accesorio.

El líquido folicular (LF) se ha utilizado para alterar la dinámica folicular en ovejas (Hernández *et al.*, 1997) y en vacas por contener inhibina (De Kretser y Robertson, 1989). Después de la aplicación del LF se presenta una supresión del desarrollo folicular y se disminuye la producción de estradiol. Cuando el líquido folicular es aplicado durante el proestro, retrasa la presentación de estro (Hunter, *et al.*, 1988). Hernández *et al.* (1997) utilizaron líquido folicular equino (LFE) en ovejas en anestro (3 ml cada 8 h por 5 días) y encontraron que el líquido folicular equino suprimió las concentraciones de FSH. Así mismo, Kastelic *et al.* (1990) observaron que la aplicación de líquido folicular bovino en novillas suprime el crecimiento del folículo dominante y subordinado en los días 0-3, 3-6 y 6-9 del ciclo estral. En el mercado se cuenta con una forma comercial de extracto ovárico (Laboratorios Brovel) obtenido de ovarios frescos que suponemos contiene inhibina. Uno de los objetivos del presente trabajo fue el de utilizar el extracto ovárico y líquido folicular equino libre de esteroides como fuente de inhibina para evaluar su efecto en el folículo dominante persistente en un modelo de sincronización con implantes de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo.

El benzoato de estradiol (BE) también se ha utilizado en bovinos en esquemas de sincronización con progestágenos para alterar la dinámica folicular

(Rajamahendran y Mannikkam, 1994; Burke *et al.* 2000) El estradiol suprime la liberación de LH en la glándula pituitaria junto con la progesterona (Robertson *et al.*, 1989) presentándose el recambio folicular (Anderson y Day, 1994). La aplicación de 10 mg de BE y 100 mg de P₄ en el día 10 en un modelo de sincronización con implantes de norgestomet de 17 días, resulta en la atresia de un folículo dominante (Murray *et al.*, 1998). Burke *et al.* (2000) utilizaron 1 mg de BE en el día 13 del ciclo estral y encontraron que su aplicación suprime el crecimiento del FD y se presenta un nuevo FD 4.5 ± 0.2 días después. En ninguno de los trabajos anteriores se ha utilizado el BE para eliminar el FDP. Otro de los objetivos del presente trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de 1 mg de benzoato de estradiol sobre el recambio del folículo dominante persistente en un modelo de sincronización con implantes de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo en vacas Holstein.

La progesterona (P₄) y los progestágenos han sido utilizados para la eliminación del FDP (Savio *et al.*, 1993; Anderson y Day, 1994) Anderson y Day (1994) observaron que la atresia del FDP ocurrió en el 100% de los casos cuando inyectaron 100 mg de progesterona líquida. Sin embargo, la atresia solo ocurre si se aplican dosis extremadamente altas de progesterona que pueden mantener concentraciones elevadas en sangre hasta de 16 ng/ml (Rajamahendran y Manikkam, 1994). En estos esquemas el índice de concepción fue de 93.8% en las novillas que se les aplicó progesterona y de 57.1% en el grupo testigo (Anderson y Day, 1994)

Savio *et al.* (1993) obtuvieron el 100 % de recambio folicular en vacas sincronizadas con un implante de norgestomet cuando el implante fue substituido por un nuevo implante con 6 mg de norgestomet en el día 18 de iniciada la sincronización. Igualmente, Stock y Fortune (1993) aplicaron un nuevo CIDIR (Dispositivo Interno de Liberación Controlada) en el día 18 de un modelo de 28 días y lograron causar la atresia del FDP en 5 de 6 vacas. El 14% de las vacas que ovularon un FDP quedaron gestantes, contra el 73% de las vacas que presentaron recambio folicular. Así mismo, McDowell *et al.* (1998) aplicaron un

PRID (Dispositivo Interno de Liberación de progesterona) por 24 horas y provocaron la atresia del FDP en 5 de 6 vacas en un modelo de sincronización con implantes de norgestomet. Por otra parte, Mata *et al.* (2001) aplicaron 3 mg de norgestomet en vaquillas Holstein y su aplicación provocó el recambio del FDP en 6 de 8 vaquillas. Otro de los objetivos del presente trabajo fue el de evaluar el efecto de la aplicación de 1.8 mg de norgestomet im sobre el recambio del folículo dominante persistente en vacas Cebú/Holstein sincronizadas con implantes de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo.

Con el fin de mejorar la respuesta tanto en la presentación del estro como en la fertilidad, se ha utilizado gonadotropina coriónica equina (eCG) al final del tratamiento de los programas de sincronización e inducción de la actividad ovárica con progestágenos (Ramirez-Godinez *et al.*, 1998 y Páez *et al.*, 1999). Singh (1998) utilizó eCG en un programa de sincronización con progestágenos en vacas cebú en anestro e indujo el estro 81% de las vacas y 97% de prepúberes, sin embargo esta respuesta puede ser debida a que los animales fueron inyectados con valerato de estradiol al inicio del tratamiento. Páez *et al.* (1999) no encontraron efecto de 500 UI de eCG en el índice de concepción en vacas en anestro sincronizadas con norgestomet (14.2 vs 13.3%). El índice de concepción en otros trabajos con este tratamiento va de 14 a 62.9% a primer servicio (Páez *et al.*, 1999; Singh, 1998). La variación en los resultados de la presentación de estro e índice de concepción en los programas de sincronización con progestágenos y eCG, depende en el tipo de progestágeno, estado reproductivo, presencia de cría, aplicación de estradiol al inicio del tratamiento, tipo racial e Inseminación artificial (Tiempo fijo o a observación de calor) en cada trabajo. También se ha utilizado la eCG en vacas ciclando sincronizadas con progestágenos ó progesterona y el índice de concepción varía de 53.3 a 67%. Aunque la aplicación de eCG forma parte de los protocolos comerciales de inducción y sincronización de estro, no se conoce su efecto en las características del folículo ovulatorio. El último objetivo del presente trabajo fue evaluar la aplicación de la eCG en las características del folículo ovulatorio (índice de crecimiento y diámetro del folículo ovulatorio) y la

presentación del estro en vacas Cebú/Holstein sincronizadas con implantes de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo.

CAPITULO 2. REVISION DE LITERATURA

2.1 FISIOLÓGÍA DEL POSPARTO.

El periodo posparto se define como el tiempo transcurrido del parto a la involución uterina completa y se subdivide en: el periodo del puerperio que comienza al momento del parto y se continúa hasta que la glándula pituitaria responde a los estímulos de GnRH (inicio de sensibilidad) y el periodo conocido como posovulatorio que comienza en el momento de la primera ovulación y se continúa hasta que la involución se ha completado (Uscanga, 1996).

Se define como anestro a un estado de inactividad sexual, sin manifestaciones de estro. No es una enfermedad, constituye un signo de diversas condiciones (Hafez, 1997). La duración del anestro posparto es mayor en el ganado de carne (29 a 76 días) (Echternkamp y Gregory, 1999) que en ganado de lechero (15 a 21 días) (Rajamahedran y Taylor, 1990). En ganado de doble propósito de áreas tropicales el anestro posparto puede llegar a ser de 150 días (Anta *et al.*, 1989).

La duración del anestro posparto esta afectada por la involución uterina, amamantamiento, pérdida de condición corporal, condiciones patológicas y época del año (Yavas y Walton, 2000).

2.1.1 Involución uterina.

La involución uterina es la reducción del tamaño de los cuernos uterinos después del parto ocasionado por el desprendimiento de tejido y la regeneración del epitelio del útero (Kirakofe, 1980) El proceso se completa entre los 30 y 40 días posparto y se presenta de 15 a 20 días más rápido en el cuerno del útero no grávido (Yavas y Walton, 2000). Las vacas que se encuentran amamantando, la involución uterina es más rápida que en vacas que no amamantan, ya que el estímulo del amamantamiento induce la liberación de oxitocina (Yavas y Walton, 2000) la cual estimula la liberación de PGF_{2α} por el endometrio uterino y se da la

motilidad del útero (Del Vecchio *et al.*, 1990). La aplicación de oxitocina exógena se ha utilizado como un recurso para acelerar la involución uterina (Del Vecchio *et al.*, 1990) y mejorar la motilidad del útero. La involución uterina es dependiente tanto de la magnitud y duración de la liberación de PGF_{2α} (Guilbault *et al.*, 1984)

2.1.2 Efecto de la nutrición y la condición corporal en vacas posparto.

El metabolismo basal, actividad, crecimiento y energía de reserva, tienen prioridad sobre los procesos reproductivos, tales como el reinicio de la ciclicidad, el establecimiento y mantenimiento de la preñez (Grimard *et al.*, 1995; Short *et al.*, 1990). Durante el periodo posparto en vacas, el desarrollo reproductivo está limitado por el reducido consumo de energía (Short *et al.*, 1990) y trae como consecuencia un balance energético negativo (BEN). Un BEN ocurre en vacas lactando, tanto de carne como de leche. Se ha encontrado que el BEN decrece las concentraciones de LH, por consiguiente, retrasa el retorno a estro. Las vacas que se encuentran en BEN el crecimiento folicular es más lento que las que se encuentran en un balance energético positivo (BEP) (Lucy *et al.*, 1991b). La reducción en el consumo de energía y proteína antes del parto o después del parto reduce el contenido de gonadotropinas en la pituitaria, la capacidad de respuesta a la GnRH exógena y retrasa la pulsatilidad de LH prolongando la ciclicidad (Connor *et al.*, 1990). Un inadecuado consumo de energía en el posparto esta asociada a una secreción insuficiente de LH (Lucy *et al.*, 1991a). El BEN en vacas primíparas es más largo ya que se encuentran en etapa de crecimiento. Esto provoca que la ovulación llegue a presentarse hasta los 200 días posparto (Lucy *et al.*, 1992). Conforme el balance energético se incrementa, la frecuencia de pulsos de LH y el diámetro folicular aumenta (Lucy *et al.*, 1991a). Para reducir el BEN y el intervalo posparto se puede incrementar la energía en la dieta dos meses antes del parto (Espinoza *et al.*, 1995). También se ha observado que el consumo de energía dos semanas antes del parto (Lammonglia *et al.*,

1996) o cuatro semanas después del parto incrementa el número de folículos presentes en el ovario y reduce el intervalo posparto (Williams, 1989).

La condición corporal es un método efectivo para determinar las reservas de energía en vacas y es un reflejo del estado nutricional antes del parto (Widman *et al.*, 1982). Este método está basado en la observación y la palpación de la parte trasera del animal y de la región pélvica y es usualmente medida en una escala de 1 a 5 (Widman *et al.*, 1982). Las vacas deben tener una buena condición corporal (CC) para iniciar la ciclicidad. La CC al momento del parto es importante. Las vacas que paren con una CC ≤ 4 tienen una mayor duración del anestro posparto que las que tienen una CC ≥ 5 en la escala de 1 a 9 (Richards *et al.*, 1986, citado por Yavas y Walton 2000). Bosis *et al.* (1999) encontraron que las vacas con una CC baja, el índice de crecimiento del folículo, las concentraciones periféricas de LH e IGF-1 son reducidas comparadas con las vacas que presentan una buena CC.

La leptina se ha estudiado en ratones y primates como un factor ligado al estado nutricional que afecta la liberación de GnRH a nivel hipotalámico. También ha sido estudiada como factor importante en el inicio de la actividad reproductiva en vacas prepúberes (Foster y Nagatani, 1999). La leptina es una proteína secretada por los adipositos (Zhang *et al.*, 1994) y es considerada a ser el modulador del comportamiento alimenticio (Campfield *et al.*, 1995, citado por Foster y Nagatani, 1999). En la ausencia de leptina en ratones (*ob/ob* que no pueden producir leptina) o de la ausencia de su receptor (*db/db*, que no responden a la leptina), ocurre hiperfagia y una obesidad posterior (Coleman, 1978, citado por Foster y Nagatani, 1999). La leptina podría estar influyendo en el reinicio de la actividad ovárica en vacas con un estado nutricional bajo.

2.1.3 Efecto del Amamantamiento en el posparto y sincronización de estros.

En el periodo posparto temprano se presenta una ausencia de pulsos de LH que es debida a la disminución en los depósitos de LH en la pituitaria anterior y es independiente del amamantamiento (Nett, 1988). El destete completo después del parto no estimulan la liberación de LH y ovulación, si no hasta que los depósitos la pituitaria se vuelvan a llenar de LH, lo que ocurre entre el día 7 y 20 en ganado de leche (Peters *et al.*, 1981) y después del día 20 en ganado de carne (Odde *et al.*, 1980). Después de la recuperación en los depósitos de LH en el posparto tardío, la ausencia de pulsos de LH son dependientes del amamantamiento, el cual inhibe la secreción de GnRH (Nett, 1987). El amamantamiento es un factor importante en el reinicio de la actividad ovárica. Las vacas que se encuentran amamantando a su cría, desarrollan grandes folículos que no llegan a ovular, pues el amamantamiento inhibe la liberación de LH necesaria para la ovulación (Nett, 1987). Se ha estudiado que periodos cortos de remoción de la cría, incrementan la secreción de GnRH y LH a niveles similares a los encontrados en el proestro (Lamb *et al.*, 1999) También se ha encontrado que un destete completo, temporal (48 a 96 h) o parcial (restricción del amamantamiento por una o dos veces al día) incrementa los pulsos de LH (Myers *et al.*, 1989, citado por Yavas y Walton, 2000).

El mecanismo por el cual la remoción de la cría incrementa los pulsos de GnRH y LH no han sido completamente entendidos (Lamb *et al.*, 1999). Griffith y Williams (1996) sugieren que la interacción de estímulos auditivos, visuales y olfatorios de la cría en el amamantamiento suprimen la liberación de LH y la ovulación.

En los tratamientos para la sincronización de estro en vacas en anestro, se han observado incrementos en el índice de concepción al retirar la cría por 48 h (Geary *et al.*, 2001). Vacas a las que se les removió la cría por 48 h después de la sincronización con MGA exhibieron estro dentro de las 72 h comparadas con 240

h en el grupo testigo (Yelich *et al.*, 1995) Cabe señalar que el destete de la cría por 48 h no afecta su desarrollo (Zhang *et al.*, 1994). Por otra parte, Geary *et al.* (2001) encontraron que el retiro de la cría por 48 h en los programas de sincronización de la ovulación (Ovsynch y CO-Synch) se presenta una liberación en los pulsos de LH más rápida y de mayor amplitud que mejora la inducción de la ovulación en vacas en anestro.

2.1.4 Dinámica folicular en el posparto.

En vacas lecheras se pueden encontrar folículos medianos (5 a 10 mm) a los 5 días posparto o entre los días 7 a 15 posparto (Yavas y Walton, 2000). El primer folículo dominante posparto que se desarrolla, ovula entre el día 15 y el 27 en la mayoría del ganado lechero (Kestler *et al.*, 1979, citado por Yavas y Walton, 2000). En ganado de carne, folículos medianos se encuentran presentes entre el día 5 y 7 posparto y su número y medida avanza con el tiempo posparto (Kestler *et al.*, 1980). En el ganado de carne se pueden encontrar folículos dominantes entre el día 10 y 21 posparto (Kestler *et al.*, 1980); sin embargo muchos de ellos no ovulan (Crowe *et al.*, 1993), así se puede observar que el folículo sufre regresión o atresia antes de alcanzar la medida preovulatoria. Durante el periodo posparto ocurren numerosas oleadas foliculares antes de la primera ovulación (Crowe *et al.*, 1998). La exposición de un folículo ovulatorio a incrementos de pulsos de LH termina en la ovulación y la formación de un CL de vida media normal (Silveira *et al.*, 1993). La aplicación de gonadotropinas exógenas a un folículo dominante resulta en la ovulación, es evidente que la capacidad de respuesta del folículo a las gonadotropinas no es la limitante en la primera ovulación posparto. Si no es el efecto del amamantamiento que suprime la liberación de LH necesarias para que se de la primera ovulación (Crowe *et al.*, 1998).

2.1.5 Eje hipotálamo- hipofisiario.

En la vaca lechera el eje ovárico-hipofisiario es funcional entre los 25 a 40 días posparto; sin embargo la incompleta involución uterina obstruye el establecimiento de una preñez viable. El eje hipotálamo-pituitario en el ganado de carne es hipersensible a un efecto de retroalimentación negativa del estradiol ovárico, el cual retrasa la oleada preovulatoria de LH (Yavas y Walton, 2000), la supresión de FSH en la pituitaria anterior, (Crowe *et al.*, 1998), reducción en los niveles de LH, supresión de la actividad ovárica y la ovulación (Nett *et al.*, 1988). Durante la gestación el contenido de LH en la pituitaria se reduce en un 95%. Hacia el día 20 posparto este se va recuperando, y la liberación de LH se encuentra suprimida hasta el día 15 posparto. Nett *et al.* (1988) sugieren que la reducción del contenido de LH a nivel de hipófisis es un factor limitante en la reinicio de la ciclicidad en el posparto temprano en vacas de carne.

2.1.6 Otros factores que intervienen en la actividad ovárica posparto.

Vacas con partos gemelares (Echternkamp y Gregory, 1990), y vacas con distocia o retención placentaria presentan una mayor duración de anestro posparto (Doornbos *et al.*, 1984, citado por Yavas y Walton, 2000). La estación del año afecta el retorno a la ciclicidad en muchas especies por la duración de la exposición de luz (Fotoperíodo) (Garel, 1987). La glándula pineal secreta melatonina y es sensitiva a cambios en el fotoperíodo. La melatonina exógena prolonga el intervalo interpartos en las vacas que paren en primavera. Las vacas de carne que paren en otoño expuestas a largos días de luz durante el verano reinician la ciclicidad más rápido que las vacas que paren en primavera (King y Macleod, 1984)

2.1.7 Primera ovulación Posparto.

El escape de la retroalimentación negativa de los esteroides permite la recuperación de los patrones de pulsos de LH entre el día 13 y 19 posparto (Peters *et al.*, 1981). Cuando los niveles de LH en la hipófisis se recuperan y se termina el efecto negativo del estradiol en el eje hipotálamo hipofisiario, se presentan niveles circulantes de 17β estradiol de folículos en crecimiento (Chang *et al.*, 1981, citado por Yavas y Walton, 2000) El incremento de las concentraciones de estradiol por el folículo dominante induce un efecto positivo en la liberación de la oleada preovulatoria de LH, así se da la primera ovulación y el retorno a la ciclicidad (Lucy *et al.*, 1992).

2.2 DINÁMICA FOLICULAR.

La ultrasonografía transrectal ha sido usada para recolectar información acerca del crecimiento folicular en hembras bovinas (Savio *et al.*, 1988). El proceso de continuo crecimiento y regresión de los folículos antrales permite el desarrollo de un folículo preovulatorio y esto es conocido como "Dinámica Folicular". En las vacas la dinámica folicular durante un ciclo estral esta caracterizado por la presencia de dos a tres oleadas foliculares (Sirois y Fortune, 1988). El crecimiento folicular esta caracterizado por el desarrollo de uno o dos folículos no ovulatorios antes de la maduración de un folículo ovulatorio terminal. Dentro de la dinámica folicular hay un proceso de reclutamiento, selección y dominancia (Fortune, 1994).

2.2.1 Reclutamiento folicular.

El reclutamiento es el proceso en el cual un conjunto de folículos primarios es empujado a crecer por la estimulación de gonadotropinas provenientes de la pituitaria. La señal que estimula el reclutamiento de folículos es la elevación de

FSH (Ginther *et al.*, 2001). Hay varios trabajos en los cuales se involucra a la FSH como la hormona principal en el reclutamiento folicular. Por ejemplo después de la ovulación hay una elevación en plasma de FSH que precede a la primera oleada folicular del ciclo (Ginther *et al.*, 2001). También hay una elevación de FSH que precede a la segunda y tercera oleada folicular que coincide con el reclutamiento folicular (Adams *et al.*, 1992). En animales prepúberes se ha demostrado que se presentan elevaciones de FSH que coinciden con el reclutamiento folicular (Driancourt *et al.*, 2000). La disminución en plasma de FSH, resulta en la ausencia de folículos más grandes de 4 mm y la inyección de FSH reinicia un nuevo reclutamiento (Turzillo y Fortune, 1990). En el proceso de reclutamiento más de 7 folículos son estimulados a crecer cuando tienen un diámetro aproximadamente de 4 mm y continúan creciendo hasta 8 y 9 mm. En este proceso muchos folículos llegan a sufrir atresia (Gutiérrez *et al.*, 1997).

En el reclutamiento la FSH le proporciona a los folículos la capacidad de aromatizar estrógenos dentro de las células de la granulosa (Saumande, 1990). Así, los folículos tienen la capacidad de producir estradiol, estimular la producción de inhibina y folistatina, lo que le confiere al folículo ser seleccionado (Singh y Adams, 1998). Al parecer la LH no se encuentra involucrada con el reclutamiento folicular ya que se puede presentar cuando la LH se secreta en una alta frecuencia (fase lutea temprana) o en una baja frecuencia (fase lutea media) (Evans *et al.*, 1994). El factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) es importante en el reclutamiento folicular. Sus efectos se han demostrado por medio de la administración exógena de hormona de crecimiento, que resulta en un incremento en los niveles circulantes de IGF y con esto se incrementa el número de folículos reclutados en una oleada folicular (Gong *et al.*, 1991). La folistatina también es importante en el reclutamiento, ya que su inmunización incrementa el número de folículos reclutados en una oleada folicular (Singh *et al.*, 1997).

2.2.2 La selección folicular.

La selección es el proceso por el cual un folículo reclutado evita su atresia y así progresa hasta convertirse en dominante y eventualmente hasta su ovulación (Sirois y Fortune, 1990). El descenso de las concentraciones de FSH dos o tres días después del reclutamiento es el evento que marca el proceso de selección de un folículo. Hay una relación entre la selección y la disminución de la concentración de FSH. El descenso en los niveles de FSH es causado por la acción de la inhibina y estradiol que secretan folículos > 5 mm y ejercen una retroalimentación negativa sobre la pituitaria disminuyendo los niveles de FSH (Gibbons *et al.*, 1997). En la selección las concentraciones de FSH declinan por varios días mientras los folículos crecen entre un diámetro de 4 y 8 mm (Ginther *et al.*, 1999). Durante este tiempo el crecimiento de los folículos tienen un índice de crecimiento similar (Fase paralela de crecimiento) y de allí se dividen en un folículo dominante y varios folículos subordinados (Fase de desviación). La desviación se presenta cuando un folículo incrementa su índice de crecimiento mientras otros folículos disminuyen su crecimiento (Ginther *et al.*, 1999). La desviación ocurre cuando un folículo alcanza 8.5 mm de diámetro (Ginther *et al.*, 2001). La diferencia en diámetro entre dos folículos es de 0.5 mm y es equivalente a un periodo de crecimiento de 8 h (Kulick *et al.*, 1999). La desviación de crecimiento se establece en un periodo de 8 h cuando las concentraciones de FSH aun siguen declinando (Ginther *et al.*, 1999). Durante la fase paralela de crecimiento, tanto el folículo que será dominante, como los subordinados, intervienen en declinar las concentraciones de FSH (Gibbons *et al.*, 1997) mientras son dependientes de concentraciones de FSH (Ginther *et al.*, 1999). La diferencia en el diámetro entre dos folículos comienza simultáneamente con el incremento de estradiol en el fluido folicular y en sangre (Ginther *et al.*, 1999). La secreción de estradiol por el folículo más grande al comienzo de la desviación se da al mismo tiempo que reducción de los niveles de FSH (Ginther *et al.*, 1999).

Esta secreción de estradiol está estimulada por la LH (Ginther *et al.*, 2001). Otros factores del fluido folicular juegan un papel importante en la utilización de las gonadotropinas, incluyendo al factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF) y la inhibina (Goodman *et al.*, 1981). También se ha encontrado que los IGFs incrementan el diámetro del folículo seleccionado (Ginther *et al.*, 2001).

El folículo seleccionado adquiere receptores a LH en las células de la granulosa cuando alcanza un diámetro de 9 mm (Lucy *et al.*, 1992). La selección está asociada con la iniciación de la expresión de ARNm del receptor a LH en las células de la granulosa (Xu *et al.*, 1995). El primer folículo que desarrolla receptores a LH en células de la granulosa será capaz de sobrevivir en un ambiente de bajas concentraciones de FSH en el cual los otros folículos no podrían sobrevivir (Gong *et al.*, 1991).

2.2.3 Dominancia folicular.

La dominancia folicular es el proceso mediante el cual el folículo seleccionado inhibe el reclutamiento de un conjunto de nuevos folículos (Fortune, 1994). El primer folículo dominante (FD) puede ser identificado usando ultrasonografía entre los días 2 y 4 del ciclo estral. Este folículo alcanza un diámetro máximo entre el día 6 y 8 del ciclo (Savio *et al.*, 1988) y va disminuyendo su diámetro hasta dejar de ser detectable a la ultrasonografía en el día 15. Un segundo folículo dominante se desarrolla en el día 12 alcanzando su máximo diámetro en el día 16 (o en el día 19 en los ciclos en los cuales el segundo FD es el folículo ovulatorio). El tercer FD es identificado en el día 16 y alcanza su máximo diámetro en el día 21 (Savio *et al.*, 1988). El FD crece linealmente durante 6 días (fase de crecimiento) y se mantiene en esta medida aproximadamente el mismo periodo (fase estática de crecimiento) (Ginther *et al.*, 1989). Una nueva oleada de crecimiento no aparece hasta que el FD cesa de crecer o se encuentra en la parte temprana de la fase estática de crecimiento (Ko *et al.*, 1991). El FD

presente al momento de la regresión del cuerpo lúteo, llega a ovular (Fortune, 1994)

El primer requisito en la dominancia folicular, esta asociado con la aparición de receptores de LH en las células de la granulosa cuando el folículo tiene alrededor de 8 mm. Con esto, el FD tiene la capacidad de continuar creciendo en presencia de concentraciones basales de FSH (Xu *et al.*, 1995). La dominancia folicular del primer folículo dominante se pierde cuando la frecuencia de pulsos de LH es baja por acción de la progesterona luteal. De igual manera ocurre con el segundo folículo dominante, en caso de tres oleadas foliculares (Grimard *et al.*, 1995). El FD pierde la dominancia folicular cuando la LH se secreta a un pulso cada 3 o 4 horas (Savio *et al.*, 1993). Sin embargo, si la frecuencia de pulsos de LH se aumenta (un pulso cada 2 h), entonces el periodo de dominancia folicular se extiende. El FD es susceptible a cambios en la frecuencia de pulsos de LH y se ha demostrado en modelos de persistencia folicular. La aplicación de progesterona exógena de manera experimental rompe con la dominancia folicular ya que disminuye la frecuencia de pulsos de LH (Anderson y Day, 1994). La frecuencia de pulsos de LH indica la importancia en la dominancia folicular (Stock y Fortune, 1993)

Algunas hormonas que intervienen en la dominancia folicular incluyen a la inhibina, estrógenos, folistatina, activina e IGF. La inhibina es uno de los componentes del líquido folicular, la cual tiene un efecto inhibitorio sobre los niveles de FSH y folículos en crecimiento cuando es administrado en vacas. La reducción en plasma por el FD esta correlacionada con el cese de crecimiento de los folículos presentes en los ovarios (Turzillo y Fortune, 1993). La destrucción de un folículo dominante permite un ligero incremento de FSH que hace que el folículo subordinado llegue a crecer y ejercer dominancia (Ko *et al.*, 1991). La inhibina se incrementa conforme el folículo va creciendo y luego disminuye sus concentraciones justo antes de la ovulación o en asociación con la atresia folicular (Ireland *et al.*, 1983). Hay trabajos que demuestran la importancia de la inhibina en la dominancia folicular. El antisuero contra inhibina incrementa las

concentraciones circulantes de FSH (Kaneco *et al.*, 1995). Igualmente cuando el líquido folicular se encuentra libre de inhibina y es inyectado en vacas, las concentraciones circulantes de FSH no se alteran (Law *et al.*, 1992). También los estrógenos junto con la inhibina actúan directamente a nivel de la glándula pituitaria (Ireland *et al.*, 1983) ejerciendo un efecto de retroalimentación negativa suprimiendo la secreción de FSH (Baird *et al.*, 1991)

Otro componente del líquido folicular que actúa en forma de retroalimentación negativa sobre la secreción de FSH incluye a la folistatina. Actúa reduciendo la biosíntesis de FSH a nivel de la glándula pituitaria (Carrol *et al.*, 1989, citado por Singh y Adams, 1998) La folistatina es una proteína de alta afinidad y baja capacidad de unión por la activina, proteína que eleva la secreción de FSH. Por su unión a la activina, la folistatina reduce la secreción de FSH, interviniendo así en el proceso de dominancia folicular (Findalay, 1993). La activina tiene receptores en las células de la granulosa e induce la expresión de los receptores a FSH y LH en presencia de la FSH (Sugino *et al.*, 1988, citado por Singh y Adams, 1998). La FSH estimula la producción de folistatina la cual se une a la activina y promueve un balance favorable entre la relación inhibina/activina, hacia la inhibina (Singh y Adams, 1998)

Uno de los requisitos de la dominancia folicular, es la reducción de las proteínas ligadoras de los factores de crecimiento (IGFs) tales como IGFBP2 e IGFBP4, que limitan la utilización de los IGFs por su unión a ellos (Mihm *et al.*, 1997). Se ha encontrado que la activina junto con los IGFs pueden resultar en la proteólisis de IGFBP4 (Mazerbourg *et al.*, 1999). Esto resulta en una mayor cantidad de IGFs libres que tienen la habilidad de actuar sinérgicamente con la FSH y así incrementar la producción de estrógenos (Amstrong *et al.*, 1998). El IGF incrementa el diámetro del FD por estimular la mitosis de las células de la granulosa (Echternkamp *et al.*, 1990). Otras funciones de los los IGFs es incrementar la sensibilidad en las células de la granulosa a FSH (Monniaux *et al.*, 1997), estimular la producción de estradiol y reducir las concentraciones de FSH.

Así, el FD crece sobre bajas concentraciones de FSH donde los folículos subordinados no lo hacen (Gibbons *et al.*, 1997)

Los estrógenos ejercen un efecto negativo sobre la secreción de FSH. Con esta medida, el FD crece bajo concentraciones basales de FSH (Xu *et al.*, 1995). Sin embargo, concentraciones basales de FSH son también necesarias para ejercer dominancia (Turzillo y Fortune, 1993). El FD al ejercer dominancia, incrementa la producción de estradiol. En muchas especies de mamíferos incluyendo a los bovinos, la síntesis de estradiol folicular requiere de la cooperación de dos tipos de células y de dos tipos de gonadotropinas, las células de la teca producen andrógenos en respuesta a LH y las células de la granulosa aromatizan andrógenos a estradiol por la enzima aromatasa en respuesta a la FSH. El desarrollo folicular se da más tarde por efecto de las dos hormonas (Fortune, 1994). Los folículos dominantes son estrógenoactivos, estos producen 1.0×10^3 veces más estrógenos que los folículos subordinados y tienen mayor número de receptores a LH y FSH (Irelan y Roche, 1987). Sin embargo, la producción de estradiol por el folículo dominante no parece ser un requisito para establecer o mantener la dominancia folicular ya que la administración de sustancias que bloquean la síntesis de esteroides no interrumpen con la dominancia folicular (Weeb *et al.*, 1992).

2.2.4 Atresia folicular.

Durante la fase lútea el folículo dominante sufre atresia y es remplazado por un segundo o tercer folículo según sea el caso de la primera o segunda oleada folicular (Savio *et al.*, 1988). La atresia del primer folículo dominante coincide con el pico más alto de progesterona que mantiene disminuida la frecuencia de pulsos de LH (Ginther *et al.*, 1998). Por acción de la progesterona la frecuencia de pulsos de LH es mucho mayor en el diestro temprano que en el diestro tardío (Sirois y Fortune, 1990). La frecuencia de pulsos de LH sostiene el crecimiento del folículo dominante y determina su atresia (Savio *et al.*, 1993). Si el folículo dominante de la segunda o tercera oleada folicular es sometido a una mayor frecuencia de

pulsos de LH, entonces se presenta la maduración final del FD y la posterior ovulación (Bruce y Nazario, 1998). Cuando se disminuye la frecuencia de pulsos de LH con progesterona en los modelos de folículo dominante persistente se presenta su atresia (Murray *et al.*, 1998). Esto indica la importancia de la LH como causa de atresia del folículo dominante (Zinder *et al.*, 1996). El estradiol también es importante en la atresia folicular ya que se ha comprobado que su aplicación suprime la frecuencia de pulsos de LH (Burke *et al.*, 2000). El índice de atresia es de 1.9 y 3.9 mm/día y la duración de la atresia del primer y segundo FD es de 10 y de 4-6 días respectivamente (Savio *et al.*, 1988).

A diferencia de los folículos dominantes, la atresia de los folículos subordinados se da por una falta de aporte de FSH para seguir con su crecimiento. Esto es causado por el folículo dominante que disminuye la concentración de FSH necesarias para que los folículos subordinados sigan con su desarrollo. Entonces el proceso de atresia de los folículos subordinados puede ser visto como una respuesta a la falta de gonadotropinas (Driancourt, 2000). Sin embargo la atresia de un folículo dominante también puede ser causada por la disminución de las concentraciones de FSH (Turzillo y Fortune, 1993)

La atresia está fuertemente relacionada con un incremento en los IGFBPs los cuales bloquean la acción de los IGFs y por ende el desarrollo folicular (Monget *et al.*, 1993). Ciertamente hay un incremento demostrable de las IGFBP-2, 4 y 5 en los folículos atresicos que disminuyen la disponibilidad de los IGF (De la Sota *et al.*, 1996). Tanto las gonadotropinas como los factores de crecimiento son elementos esenciales para el mantenimiento de la población folicular. La disminución en la disponibilidad de los IGF debido al incremento de las IGFBP puede ser un mecanismo por el cual se induzca apoptosis y atresia en los folículos bovinos (Tilly, 1996).

2.3 SINCRONIZACIÓN DE ESTROS.

La sincronización de estros en vacas es una herramienta efectiva, especialmente cuando se usa la inseminación artificial. La principal razón de la sincronización de estros es el incrementar el uso de tecnologías que permiten el manejo reproductivo más eficiente de los bovinos (Rathbone *et al.*, 1998). Los métodos originales para la sincronización de estros involucran la extensión del diestro con progestágenos mientras se da la luteólisis del cuerpo lúteo en los días de tratamiento (Rathbone *et al.*, 1998). El otro método para la sincronización es la aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ o sus análogos sintéticos, que causan la regresión del cuerpo lúteo. Después de su aplicación se presenta el estro y la ovulación (Stock y Fortune, 1993).

Los progestágenos suprimen el estro y han sido utilizados para manipular el ciclo estral. Uno de los progestágenos utilizados ha sido el acetato de melengestrol (MGA), el cual suprime el estro cuando es administrado oralmente (0.5 mg vaca/día) (Anderson y Day, 1994). El MGA se utiliza en programas de sincronización. La duración del tratamiento varía entre 10 y 18 días con dosis de 0.5 a 1 mg por cabeza por día, ocurriendo el estro 6 días después, en el 70% de los animales (Odde, 1990).

El MGA ha sido utilizado en programas de 14 días con la aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ a los 17 ó 19 días posterior al retiro del MGA. Lam *et al.* (2000) encontraron que la aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el día 19 da como resultado un intervalo menor de la aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ a estro (56 \pm 1.1 h) que la aplicación en el día 17 (73.1 \pm 1.1 h).

El norgestomet (progestágeno sintético) (17 α -acetoxi-11- β -metil-19-norpreg-4-ene-3,20-dione) es usado para la sincronización de estros y es componente de los sistemas de sincronización de estros Syncromate -B (Sanofi Animal Health, Overland Park, K.S) y Crestar (Intervet International, Booxmeer, The Netherlands). El tratamiento consiste en un implante con 3 ó 6 mg de norgestomet que permanece subcutáneamente en el animal por 9 días. El norgestomet ejerce un efecto sobre el tracto reproductivo y el hipotálamo, suprime

la conducta estral y la ovulación (Kestler *et al.*, 1995) Al retiro del implante se presenta la conducta estral y la ovulación. Los animales presentan estro dentro de las 120 horas posteriores al retiro del implante (Odde, 1990) y la fertilidad después de la inseminación artificial es variable y depende del tiempo posparto, de la presencia de la cría y del estado metabólico o nutricional del animal (Rathbone *et al.*, 1998). Los tratamientos con norgestomet en presencia de un cuerpo lúteo resultan en una mejor fertilidad que cuando es aplicado en vacas que no tienen un cuerpo lúteo (Sánchez *et al.*, 1993).

La combinación del norgestomet con valerato de estradiol o benzoato de estradiol en una sola inyección, son utilizados al inicio del tratamiento con progestagenos o progesterona para la sincronización de estros. La incorporación de estradiol permite reducir el periodo de tratamiento sincronizador a 7 días (Macmillan *et al.*, 1991)

El mecanismo de acción del progestágeno junto con el estradiol es: a) suprimir el estro por medio del norgestomet (Kestler *et al.*, 1995), b) la inyección con valerato de estradiol que causa atresia del folículo antral y provoca el reclutamiento de un nuevo grupo de folículos de 4-5 días de la aplicación del tratamiento (Vasconcelos y Wiltbanck, 1994) y causa la regresión del cuerpo lúteo (Kestler *et al.*, 1995), ya que la aplicación del implante por si solo no afecta la formación ni la función del cuerpo lúteo (Peterson *et al.*, 2000).

Si el norgestomet es administrado en la primera mitad del ciclo estral, entonces se necesita la inyección de valerato de estradiol y norgestmet para inducir la regresión del cuerpo lúteo. Ha sido demostrado que el valerato de estradiol del tratamiento de Syncromate –B y Crestar, acelera la regresión del cuerpo lúteo (Tacher *et al.*, 1986). En un estudio de Thatcher *et al.* (1996) encontraron que al aplicar 17β estradiol en la segunda mitad del ciclo estral, se presentaron picos de 15-keto-13,14-dihydro-prostaglandin $F_{2\alpha}$ en sangre periférica antes de la luteólisis y concluyeron que el 17β estradiol induce la luteólisis por provocar la liberación de $PGF_{2\alpha}$ desde el útero. En otro trabajo más reciente se demostró que el valerato de estradiol aplicado a vacas histerectomizadas no

presentaron regresión del cuerpo lúteo, involucrando al útero como el principal causante de la luteólisis por la liberación de prostaglandinas (Peterson *et al.*, 2000).

Cuando el progestágeno es aplicado en el metaestro tiene un bajo nivel de sincronización (Kestler y Favero, 1996) y solo se presenta un 50% de respuesta. Esto es por que el valerato de estradiol no induce la regresión del cuerpo lúteo en esta etapa; así, las vacas tratadas en los días 1 y 2 del ciclo estral necesitan de dos o tres días adicionales para que el cuerpo lúteo se desarrolle y sea sensible a la acción luteolítica del valerato de estradiol (Garrett *et al.*, 1988)

Se ha demostrado que la aplicación de norgestomet inyectado también tiene un efecto positivo sobre la lisis del cuerpo lúteo en el metaestro (Fanning *et al.*, 1992)

Otro método para la sincronización de estros es la aplicación de dispositivos intravaginales impregnados con progesterona. En el mercado se encuentran dos productos, uno de ellos es el Dispositivo Intravaginal de Liberación Prolongada (PRID. con 1.55 g de P4, Sanofi Animal Health, Paris, Francia) y el Dispositivo Liberador de Droga Interno (CIDIR con 1.9 mg p4, InterAg, New Zealand) (Macmillan, *et al.*, 1991).

El CIDIR es aplicado en tratamientos de 14 a 15 días, con un porcentaje de retención del 99%. El dispositivo viene acompañado de una cápsula de 10 mg de benzoato de estradiol (BE) que se aplica al momento de la inserción del implante. La cápsula de BE promueve la luteólisis en el 43% de los casos cuando es aplicado en novillas. El tratamiento con CIDIR puede acortarse a 7 días con la aplicación de PGF2 α al retiro del CIDIR. El 99.6% de las vacas muestran estro después del tratamiento y el índice de concepción es de 57.7% (Macmillan *et al.*, 1991).

El porcentaje de vacas que entran en estro después del tratamiento con el CIDIR, depende de la etapa del ciclo estral en que se encuentre. Así, el porcentaje que entran en estro es mayor si el animal se encuentra en el diestro tardío y más

bajo en el diestro temprano ya que en este al retiro del CIDIR algunas vacas todavía presentan un cuerpo lúteo funcional (Macmillan, *et al.*, 1991)

2.3.1 Utilización de progestágenos en vacas en anestro.

Los progestágenos han sido utilizados para la inducción del estro en vacas en anestro y novillas prepúberes, (Smith *et al.*, 1987; Anderson y Day, 1994). Los tratamientos con progestágenos inducen el estro y permiten la ovulación que es potencialmente fértil (Ramírez-Godínez *et al.*, 1981). Los tratamientos cortos con progestágenos en vacas en anestro, puede incrementar el porcentaje de vacas que exhiben estro, inducir la ovulación e incrementar el índice de concepción a primer servicio (Fike *et al.*, 1997a).

Los mecanismos por los cuales los progestágenos inducen la ovulación en vacas en anestro y prepúberes es el incremento en la secreción de LH al retiro del efecto negativo del progestágeno sobre la liberación de LH (Anderson y McDowell, 1996). Los progestágenos suprimen la secreción de LH durante el tratamiento y al momento de su retiro se da un incremento, el cual aumenta la producción de estradiol y la maduración de un folículo hasta la ovulación. Las vacas en anestro que ovulan después del tratamiento forman un cuerpo lúteo de vida media normal (Smith *et al.*, 1987).

Brink y Kiracofe (1988) encontraron un 30% de fertilidad en vacas que se encontraban en anestro posparto tratadas con un implante de Syncromate-B. Al aplicar un implante de norgestomet Sánchez *et al.* (1995) encontraron concentraciones mayores de LH que en los grupos donde aplicaron 2, 4 y 8 implantes. Las concentraciones de LH encontradas en los grupos de 2 y 4 implantes fueron similares a las que se encuentran en la fase lútea media del ciclo estral normal (Rahe *et al.*, 1980). Esto indica que dosis altas de progestágeno suprimen de una mejor manera la liberación de LH, de manera que al momento del retiro del tratamiento se viene una descarga en su liberación, se da la maduración final del folículo y posterior ovulación (Brink y Kiracofe, 1988).

Se ha utilizado la inyección de 17β estradiol junto con el progestágeno durante la sincronización en vacas en anestro. Este mejora la presentación de estro y la ovulación, pero reduce el índice de concepción (Saiduddin *et al* , 1968). Sin embargo cuando se aplica 1 mg de benzoato de estradiol 24 a 48 horas después del retiro de progesterona (P_4) se induce el estro y la ovulación sin afectar la fertilidad (Xu y Burton, 1997).

2.3.2 Sincronización con prostaglandinas.

La prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) y sus análogos son utilizadas en la sincronización de estros. Estas actúan induciendo la regresión de un cuerpo lúteo entre los días 5 al día 17 del ciclo estral (Odde, 1990). Las vacas inyectadas entre el día 10 y 15 del ciclo estral tienen una mejor respuesta de estro, que las vacas que son inyectadas entre el día 5 y 9 del ciclo (Xu *et al* , 1997) El índice de concepción es más alto cuando la $PGF_{2\alpha}$ es inyectada en la fase lútea tardía que en la fase temprana (Watts y Fuquay, 1985) Una explicación a esta respuesta es que en el cuerpo lúteo, el número de receptores a $PGF_{2\alpha}$ se incrementa durante la fase lútea tardía, por eso se presenta una menor respuesta en la fase lútea temprana (día 5-9) (Rao *et al* , 1979, citado por Odde, 1990).

Los niveles de progesterona después de la aplicación de prostaglandinas disminuyen a niveles basales pocas horas después de su aplicación (Páez *et al* , 2000). En la Figura 1 se muestran los niveles de progesterona después de la aplicación de dos tipos de prostaglandina.

El programa más común que se ha utilizado en la sincronización de estros es la aplicación de $PGF_{2\alpha}$ a las vacas que tienen un cuerpo lúteo, seguido de la observación de estros e inseminación. Las vacas que no mostraron estro en el día 5, son inyectadas nuevamente y observadas por cuatro días más. Este sistema incrementa el índice de preñez comparado con el grupo testigo (Xu *et al* , 1997). Las desventajas de este sistema es que requiere de una mayor labor de detección de estros e inseminación, pero tiene la ventaja de requerir menos $PGF_{2\alpha}$

que el programa con dos aplicaciones de $\text{PGF}_{2\alpha}$ 10 y 12 días de separación. Con este método de dos aplicaciones de $\text{PGF}_{2\alpha}$ si todas las vacas están distribuidas en diferentes días del ciclo estral, aproximadamente el 70% deberán mostrar estro después de la primera inyección. Tanto las vacas que muestran estro como las que no lo muestran, tendrán para la segunda aplicación un cuerpo lúteo sensible a la acción de la prostaglandina, este sistema ha sido evaluado por Odde (1990) y se ha utilizado para la presincronización del estro en trabajos experimentales (Kestler y Favero, 1995; Páez *et al.*, 2000; Xu y Burton, 1997). Recientemente se ha mostrado que la fertilidad en vacas se reduce después de la sincronización con dos inyecciones de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en 13 días aparte; la reducción en la fertilidad se debe a que las vacas al momento de la segunda aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ se encuentran en la fase lútea temprana (Xu *et al.*, 1997) entre el día 6 y el 9 del ciclo estral disminuyendo así la respuesta a la $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Odde, 1990). La respuesta al estro se mejora cuando las vacas se encuentran en la fase lútea tardía al momento de la segunda inyección de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Xu *et al.*, 1997). Lo anterior explica algunas variantes en los resultados del programa de 2 inyecciones de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Odde, 1990).

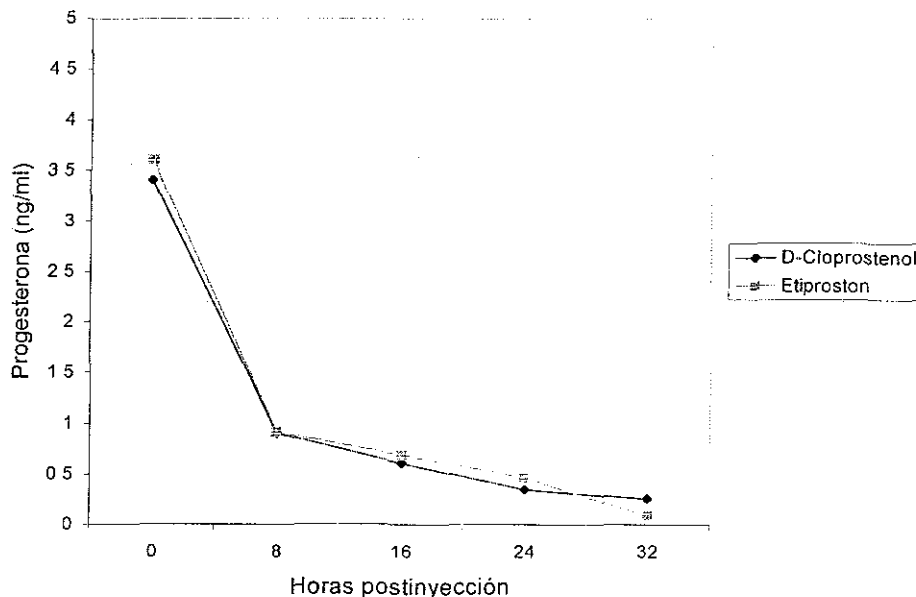


Figura 1. Niveles de progesterona en sangre después de la aplicación de prostaglandina $\text{PGF}_{2\alpha}$ en vacas ciclando (Páez *et al.*, 2000)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En un trabajo con ganado cebú con un cuerpo lúteo funcional encontraron una baja respuesta a la aplicación de PGF_{2α} (Pinheiro *et al* , 1998). Esto sugiere que la respuesta a la aplicación de la prostaglandina no solo es de acuerdo al día del ciclo estral, sino también al tipo racial.

La combinación de prostaglandinas con progestágenos ha sido utilizada 48 h antes del retiro con progesterona (PRID) mejorando la fertilidad de 54 a 67% en el grupo testigo en los programas de sincronización de estros en ganado de carne (Mialot *et al* , 1998)

2.3.3 Sincronización de oleadas foliculares en vacas.

Las vacas presentan oleadas foliculares cada 7-10 días en la mayoría de los casos; un incremento de FSH está asociado con la emergencia de la oleada y el incremento en los pulsos de LH determinan el destino del folículo dominante. Para precisar la presentación del estro y mejorar la fertilidad en el control del ciclo estral, es necesario inducir la regresión del cuerpo lúteo al termino de un tratamiento con progestágenos y que este coincida con la selección del folículo dominante (Roche *et al* , 1999). Muchas investigaciones se han enfocado en la eliminación del folículo dominante para permitir la emergencia de una nueva oleada folicular al termino de tratamientos con progestágenos (Bo *et al* , 1995; Roche *et al* , 1999) Una de las técnicas para la sincronización de las oleadas foliculares es la aspiración del folículo dominante que resulta en la emergencia de un nuevo folículo dominante 1 5 días más tarde y en la ovulación de un nuevo folículo al termino de la regresión del cuerpo lúteo (Tweagiramungu *et al* , 1994).

Los estrógenos y la progesterona también han sido utilizados para alterar la dinámica folicular. Ha sido comprobado que la progesterona exógena suprime el desarrollo folicular por suprimir la frecuencia de pulsos de LH (Burke *et al* , 1994). Los efectos combinados del estradiol y el progestágeno cuando son aplicados al mismo tiempo de la inserción del implante de norgestomet hace que el folículo dominante más grande disminuya en diámetro y el segundo folículo dominante

incrementa su diámetro. Presumiblemente se presenta una nueva oleada folicular (Bo *et al.*, 1995).

Burke *et al.* (2000) encontraron que al aplicar BE se estimula la atresia del folículo dominante y una nueva oleada folicular emerge de 4 a 5 días después del tratamiento. La aplicación de 1 mg de BE promueve el recambio folicular y sincroniza los eventos foliculares permitiendo la ovulación de un nuevo folículo dominante al retiro del tratamiento con progestágenos.

El BE se ha utilizado en programas de sincronización de la ovulación en vacas *Bos indicus*, junto con la aplicación de prostaglandinas. El tratamiento consiste en la aplicación de 1 mg de BE el día 0, PGF_{2α} el día 9 y una segunda dosis de BE (1 mg) el día 10. Después de la segunda aplicación del BE se presenta una nueva oleada folicular 4.36 ± 0.31 d. Este tratamiento promete una nueva alternativa para la sincronización de la oleada folicular (Burke *et al.*, 2000).

La aplicación de GnRH o sus análogos causan la ovulación por estimular la oleada preovulatoria de LH en la pituitaria con la subsiguiente formación de un cuerpo lúteo. Después de la aplicación del GnRH un nuevo folículo dominante aparece de 3 a 4 d (Twagiramungu *et al.*, 1994) o 1.6 ± 0.3 d (Roche *et al.*, 1999). La GnRH se ha utilizado 6 días antes de la aplicación de PGF_{2α} en la sincronización de la ovulación (Twagiramungu *et al.*, 1994). En ganado lechero los tratamientos para sincronización de la ovulación con PGF_{2α} y GnRH pueden comenzar a partir del día 50 posparto (Momcilovic *et al.*, 1998).

El Ovsynch es un tratamiento con GnRH que induce una nueva oleada folicular y provee un folículo dominante en fase de crecimiento al tiempo de la administración de prostaglandinas. La IA es a tiempo predeterminado. El tratamiento consiste en la aplicación de GnRH el día 0, PGF_{2α} el día 7 y una segunda inyección de GnRH en el día 8. Después de la segunda aplicación del GnRH la ovulación se presenta entre las 24 y las 32 horas. Este programa se ha comparado con el de una sola aplicación de PGF_{2α}, siendo el índice de fertilidad más alto en el grupo de Ovsynch el cual presenta ventajas económicas para el

control de la reproducción sin la necesidad de la detección de estros (Britt y Gaska, 1998).

La aplicación de un implante de norgestomet entre el día -7 y el día cero (aplicación de PGF_{2α} y GnRH) (Select Synch) ha sido utilizado también en los programas de sincronización de la oleada folicular en vacas que se encuentran en anestro, mejorando el índice de concepción (Stevenson *et al* , 2000).

Otro método para la sincronización de la oleada folicular es el CO-Synch el cual consiste en la aplicación de GnRH (100μ) en el día 0, prostaglandina en el día 7 y GnRH en el día 9 La inseminación artificial se lleva acabo al momento de la aplicación del GnRH (Geary *et al* , 2001).

Momcilovic *et al.* (1998) comparando tres métodos de sincronización, encontraron que el CO-Synch tuvo un mejor índice de concepción y menos días de parto-concepción a comparación de una sola aplicación de prostaglandina y dos aplicaciones de prostaglandina a 14 días aparte. El índice de concepción en la sincronización de la ovulación en ambos métodos (CO-Synch y Ovsynch) se puede mejorar retirando la cría 48 h antes de la aplicación de prostaglandina

Los tratamientos con norgestomet y hCG (Rajamahedran y Sianangama, 1992; Mata *et al.*, 2001) permiten el control del desarrollo y regresión del cuerpo lúteo, junto con la ovulación de un folículo de nuevo reclutamiento, este sistema se aplica 500 UI de hCG en el día 4 del ciclo estral. A las 48 horas después de la aplicación de hCG se da el reclutamiento de un nuevo folículo que ovula después de la aplicación de prostaglandina y el retiro del progestágeno (Niasari-Naslaji *et al.*, 1996).

De Renis *et al.* (1999) utilizaron 2000 UI de hCG 9 días antes de la aplicación de PGF_{2α} para la sincronización de la ovulación en vacas entre 55 y 90 días posparto.

2.3.4 Utilización del benzoato de estradiol en la sincronización de estros.

El estradiol inyectado en algunos tratamientos de sincronización de estros han producido cambios en los patrones de crecimiento folicular, especialmente durante la fase de crecimiento del folículo (Bo *et al.*, 1995). Una nueva oleada folicular emerge de 4 a 5 días después de la aplicación del estradiol (Burke *et al.*, 2000).

Se ha reportado que la administración del BE seguido del retiro de progestágenos en la sincronización de estros, mejora la incidencia de la ovulación en vacas posparto; 1 mg de benzoato de estradiol de 24 a 48 h después del retiro del CIDIR en vacas en anestro mejora el porcentaje de vacas que muestran estro. También la ovulación puede ser inducida con 1 mg de BE 24 a 48 horas después del retiro del progestágeno en tratamientos de 5 a 7 días (Macmillan *et al.*, 1995). En vacas en anestro posparto el BE aplicado de 24 a 30 h después del retiro de CIDIR es efectivo para inducir el estro y la ovulación (Bo *et al.*, 1995).

El índice de preñez en las vacas posparto es linealmente afectado por la aplicación del BE. Las vacas que reciben dosis altas de BE (1 mg) en programas de sincronización presentan un índice más alto de preñez que cuando se aplica el BE en dosis bajas, después del retiro del progestágeno (CIDIR). En general el BE incrementa las concentraciones de 17 β estradiol, la liberación de la oleada preovulatoria de LH, la proporción de vacas en estro, incrementa las concentraciones de LH, la proporción de vacas con liberación de LH y reduce el intervalo del retiro del CIDIR al pico de LH (Macmillan *et al.*, 1997).

Lammonglia *et al.* (1998) concluyeron que en vacas prepúberes y vacas posparto la sincronización puede ser mejorada usando PGF_{2 α} y CIDIR con la inyección de BE de 24 a 30 h después del retiro del CIDIR. La dosis efectiva es de 0.4 mg para vacas prepúberes y de 1 mg de BE en vacas posparto.

En un estudio en ganado lechero Macmillan *et al.* (1997) reportaron que 1 mg de BE inyectado en los días 12, 13, y 14 d después de la sincronización de estro e IA, sincroniza el retorno a servicio entre el día 9 y 10 después de la

aplicación del BE por la inducción de una nueva oleada folicular. La fertilidad del estro y del retorno a servicio se incrementó por el tratamiento y el índice de preñez del primer servicio se mantuvo sin ningún cambio

2.4 UTILIZACION DE LÍQUIDO FOLICULAR PARA ALTERAR LA DINAMICA FOLICULAR.

El líquido folicular bovino (LFB) es rico en hormonas glicoproteicas como la inhibina, que suprime la síntesis de FSH y su secreción a nivel de la glándula pituitaria (De Kretser y Robertson, 1989). El líquido folicular (LF) es un medio crudo y ha sido usado extensivamente como fuente rica en inhibina para examinar la función de la FSH en el desarrollo folicular en varias especies (Steinberger y Ward, 1988). La fracción proteínasea del LF en vacas al comienzo del estro (Turzillo y Fortune, 1990) o al momento de la ovulación suprime el desarrollo folicular (Kastelic *et al.*, 1990). Bergfelt *et al.* (1993) aplicaron LFB en vaquillas en el día 0 del ciclo estral (17 ml/cada 4 h) logrando suprimir el crecimiento del folículo dominante de la primera oleada folicular. Kastelic *et al.* (1990) utilizaron LFB en vaquillas en tres periodos del ciclo estral 0-3, 3-6, 6-11. El crecimiento folicular de la primera oleada folicular se suprime al aplicar el LFB en el periodo de 0-3 d. La aplicación entre el día 6 y 11 retrasa la emergencia de la segunda oleada folicular.

Hernández *et al.* (1997) suprimieron la secreción de FSH en ovejas en anestro con la aplicación de líquido folicular equino (LFE) libre de esteroides (3 ml i.v cada 8 h/5 d). En este estudio la aplicación de LFE alargó el intervalo de la aplicación de PGF_{2α} a la presentación de estro en las ovejas tratadas sugiriendo que el LFE retrasa el crecimiento del FD.

Un experimento de Miller *et al.* (1979) las novillas fueron tratadas con PGF_{2α} (Día 0). Al grupo tratado se le aplicó LFB (dos aplicaciones/3 d) o solución salina fisiológica (SSF) en el grupo no tratado. El intervalo de la aplicación de prostaglandina al estro fue aproximadamente de 2 d en el grupo de SSF y de 8

días en el grupo de LFB. La aplicación de LFB decrece las concentraciones plasmáticas de FSH durante el tratamiento con LFB y retrasa la presentación de la oleada preovulatoria de gonadotropinas.

2.5 PERSISTENCIA FOLICULAR.

En vacas el desarrollo folicular durante un ciclo estral normal es caracterizado por dos o tres oleadas foliculares por ciclo (Sirois y Fortune, 1988). Cada oleada comprende los procesos de reclutamiento, selección y dominancia. Posteriormente se da la selección de un folículo dominante el cual continúa creciendo mientras los otros sufren atresia. En un ciclo estral normal solo el folículo dominante de la última oleada (segunda o tercera) ovula, mientras el folículo dominante de la oleada anterior sufre atresia. En un estudio de Sirois y Fortune (1990) en el cual alargaron la fase lútea del ciclo estral en novillas, apoyan la hipótesis que niveles normales de progesterona promueven el recambio del folículo dominante y regula la sucesión de las oleadas foliculares.

La secreción de LH durante el ciclo estral en vacas está caracterizada por una alta frecuencia, baja amplitud de pulsos de LH durante el proestro y metaestro y por baja frecuencia y alta amplitud de pulsos durante el diestro (Schallenberger *et al.*, 1985) Kojima *et al.* (1990), reportaron que la aplicación de progestágenos después de la luetolisis inducida por la administración de PGF_{2α} en vacas, da como resultado un incremento en la frecuencia de los pulsos de LH en comparación con las vacas que tienen un cuerpo lúteo. Niveles de progesterona entre 1 y 2 ng/ml (niveles subluteales) mantienen una alta frecuencia de pulsos de LH que no permiten el recambio folicular y estimulan el crecimiento continuo del folículo dominante suprimiendo el crecimiento de otros folículos (Savio *et al.*, 1993) y persistiendo hasta la ovulación (Savio *et al.*, 1993). El crecimiento folicular anormal del folículo dominante está acompañado por altos niveles circulantes de 17β-estradiol (Kojima *et al.*, 1990) y hay una asociación entre elevadas

concentraciones de estradiol y aumento en la frecuencia de pulsos de LH (Sánchez *et al.*, 1995)

En vacas la administración de progestágenos o progesterona CIDIR (Savio *et al.*, 1993), MGA (Yelich *et al.*, 1997), Syncromate-B (Murray *et al.*, 1998), PRID (Zinder *et al.*, 1996) en dosis típicamente usadas para la sincronización de estros en ausencia de un cuerpo lúteo, resulta en un aumento en la frecuencia de pulsos de LH y el continuo crecimiento de un folículo dominante llamado folículo dominante persistente (FDP) (Kojima *et al.*, 1993; Sánchez *et al.*, 1995). El tratamiento con progestágenos al final de la fase lútea causa la extensión del periodo de dominancia del folículo ovulatorio (FDP) (Mihm *et al.*, 1994)

Las concentraciones de estradiol liberadas por el FDP son mayores a las liberadas por un FD del ciclo estral normal y da como resultado la alta frecuencia en los pulsos de LH (Sánchez *et al.*, 1995) Estas liberaciones de estradiol se parecen a las secretadas por un folículo preovulatorio en la fase folicular (Kinder *et al.*, 1996). Cuando se aumentan los niveles de progesterona, los niveles de 17β -estradiol se mantienen a concentraciones similares a la fase lútea (Sánchez *et al.*, 1995).

En un trabajo para estudiar la dominancia folicular, Kinder *et al.*, (1996) concluyeron que ligeros incrementos en la frecuencia de pulsos de LH, promueven el crecimiento prolongado del folículo dominante, ellos sugieren que el recambio de un folículo dominante durante el ciclo estral normal ocurre a través de un efecto de retroalimentación negativa de la progesterona luteal, la cual mantiene baja la frecuencia de pulsos de LH y la producción de estradiol.

El prolongado crecimiento del folículo dominante está asociado a una baja fertilidad al retiro del tratamiento de progestágenos en ausencia de un cuerpo lúteo (Stock y Fortune, 1993) En un estudio para determinar como la duración de la dominancia folicular altera el índice de preñez, Austin *et al.* (1999) realizaron un trabajo en el cual la duración de la dominancia (Dd) fue controlada causando la regresión del cuerpo lúteo al momento de la emergencia del folículo de la segunda oleada folicular. El folículo dominante se mantuvo por 4, 6, 8, 10 y 12

días. Estos autores encontraron que la duración de la dominancia (Dd) no afecta la fertilidad entre el día 2 y 8 (Dd2 8/9, Dd 4 19/28, Dd6 14/18, Dd8 34/48), sin embargo la fertilidad es afectada cuando se mantiene arriba de Dd10 de dominancia folicular (Dd 10 12/23, Dd12 2/17).

Las altas concentraciones de estradiol secretadas por el FDP están asociadas con un desarrollo embrionario anormal (Breuel *et al.*, 1993). En un trabajo para determinar la pérdida embrionaria temprana a partir de folículos dominantes persistentes Nasim *et al.* (1995) no encontraron diferencia significativa en la cantidad de embriones fertilizados recuperados de folículos dominantes persistentes y de folículos en crecimiento, sin embargo si hubo una mayor cantidad de embriones fertilizados recuperados a partir de folículos en crecimiento que de folículos persistentes. En este mismo trabajo los embriones recuperados de folículos persistentes no alcanzaron el estadio de desarrollo mayor a 16 células y los embriones de folículos en crecimiento tuvieron mejores características morfológicas que los embriones provenientes de folículos persistentes. La ovulación del folículo dominante persistente da como resultado la formación de un cuerpo lúteo el cual tiene una función normal (Lugo *et al.*, 1999).

2.6 METODOS PARA LA ELIMINACIÓN DEL FOLÍCULO DOMINANTE PERSISTENTE.

En vacas los tratamientos prolongados de progesterona en ausencia de un cuerpo lúteo resulta en la formación de un folículo dominante persistente (FDP) que se encuentra asociado con una alta frecuencia de pulsos de LH (Savio *et al.*, 1993; Ireland y Roche, 1982), altas concentraciones de 17β -estradiol (Sirois y Fortune, 1990), una precisa presentación del estro y disminución en el índice de fertilidad (Austin *et al.*, 1999). La forma para evitar el desarrollo de un FDP y es la aplicación de dosis altas de progestágenos a las usualmente utilizadas para la

sincronización de estros (dosis bajas) las cuales inhiben de mejor manera la frecuencia de pulsos de LH y permiten el recambio folicular (Savio *et al.*, 1993).

Savio *et al.* (1993) utilizaron un implante de norgestomet de 3 mg y PGF_{2α} en el día 8 del ciclo estral. Esto permitió el crecimiento de un FDP en presencia de alta frecuencia de pulsos de LH causadas por niveles subluteales de progesterona. En el día 10 a un grupo le aplicó un nuevo implante de progesterona de 3 mg de norgestomet. Los pulsos de LH disminuyeron después de la aplicación del nuevo implante en el grupo tratado y se presentó el recambio del FDP.

Savio *et al.* (1993) utilizaron un implante auricular de 6 mg de norgestomet a vacas presincronizadas en el día 8 del ciclo estral y se retiró el día 23. En el día 7 del ciclo todas las vacas tenían un folículo dominante verificado por la ultrasonografía. En el grupo tratado se aplicó un nuevo implante de 6 mg de norgestomet en el día 18 del ciclo que permitió el recambio del FDP. Las concentraciones de estradiol declinaron después del día 18 en el grupo tratado y en el grupo testigo, todas las vacas ovularon un FDP.

Anderson y Day (1994) en un programa de sincronización en novillas en ausencia de un cuerpo lúteo administraron MGA por 12 días. Con esto se desarrolló un folículo dominante persistente. En el día 9 del tratamiento aplicaron 200 mg de progesterona para eliminar al FDP. La aplicación de P₄ redujo las concentraciones de estradiol y la frecuencia de pulsos de LH. Esto permitió el recambio folicular y la ovulación de un nuevo folículo. En otro experimento administraron MGA por 14 días y la aplicación de 200 mg de P₄ en el día 12 del tratamiento. Después del tratamiento con P₄ se presentó recambio folicular y se mejoró la fertilidad comparado con el grupo testigo. Ellos concluyeron que la administración aguda de progesterona induce el recambio folicular e incrementa la fertilidad en vacas sincronizadas con MGA.

Para determinar la duración de concentraciones de progesterona necesarias para inducir la atresia del folículo dominante persistente McDowell *et al.* (1998) administraron 25 mg de PGF_{2α} en el día 6 o 7 del ciclo presincronizado y

un implante de norgestomet de los días 6 al 14. En el día 12 recibieron dos dispositivos intravaginales de liberación controlada (PRID) por 6 h, 24 h y sin tratamiento en el grupo testigo. La ovulación de un nuevo folículo fue inducida en 1/5 en el grupo de 6 h y en 4/5 vacas en el grupo de 24 h. En el grupo testigo, todas las vacas ovularon un folículo dominante persistente. Tanto en los grupos de 6 h y 24 h se presentó una disminución en los niveles de estradiol y LH consistentes con el recambio del folículo dominante persistente.

En un modelo para eliminar el FDP Cavalieri *et al.* (1998b) utilizaron un implante de 3 mg de norgestomet por 17 días y el día 0 una inyección de prostaglandina PGF_{2α}. Las vaquillas en el grupo 1 no recibieron tratamiento, en los grupos 2, 3, 4 y 5 recibieron por 24 h un CIDIR en los días 10, 12, 14 y 16 respectivamente. El tratamiento con un CIDIR en el día 14 y 16 retrasó el tiempo de ovulación y el día de emergencia del folículo ovulatorio comparado con los otros grupos. Se presentó menos variación en el tiempo de presentación de estro en las novillas tratadas en el día 10, comparado con los otros tratamientos. Las concentraciones de LH y estradiol decrecieron con el incremento de progesterona en los días de tratamiento con CIDIR e incrementaron de nuevo después del retiro del CIDIR. Ellos concluyeron que la aplicación de un periodo corto de progesterona 7 días antes (día 10) del día 17 resulta en una sincronización precisa del estro sin la ovulación de un folículo dominante persistente.

En un programa de sincronización de la ovulación en vaquillas *Bos indicus* Cavalieri *et al.* (1998a) evaluaron tres métodos para la eliminación del FDP, P₄ en solución oleosa (100 mg), P₄ en solución salina (100 mg) y un CIDIR por 24 horas. Todos los tratamientos se aplicaron en el día 10 y el retiro del implante se realizó el día 17. La administración de P₄ en solución oleosa fue más efectiva para la sincronización de la emergencia y ovulación de un nuevo folículo, que la aplicación de 100 mg en solución salina y la aplicación del CIDIR.

Mata *et al.* (2001) utilizaron 3 mg de norgestomet inyectado para la eliminación del folículo dominante, que causó el recambio del FDP y un nuevo folículo dominante alcanzó un diámetro de 10 mm o mayor a las 68 ± 38 4 h.

Yelich *et al* (1997) para eliminar el FDP en los tratamientos de progestágenos por 14 días de MGA (0.5 mg/vaca/día), administraron 5 mg de valerato de estradiol en el día 11 del tratamiento, dando como resultado el recambio folicular en 10 de 14 vacas.

2.7 GONADOTROPINA CORIÓNICA EQUINA (eCG).

La gonadotropina coriónica equina (eCG) es secretada por las cúpulas endometriales. Los niveles de eCG en la yegua comienzan a ser detectables en sangre entre los 32 y 40 días de la gestación (Kindahl *et al.*, 1982, citado por Ungerfeld, 1998), pudiendo encontrarse en la circulación hasta los 140 a 200 días (Roser *et al.*, 1989).

La eCG (PMSG) es una molécula glicoproteica, la cual tiene actividad de FSH y LH (Ungerfeld, 1998). Comparándola con otras gonadotropinas es la que contiene mayor cantidad de ácido sialico (10%) (Christakos y Bahl, 1979, citado por Ungerfeld, 1998). El ácido sialico es el responsable de la larga vida media ya que previene su degradación en el hígado (Morell, 1971, citado por Ungerfeld, 1998).

La acción específica de la eCG en la yegua está dirigida a producir la ovulación, la luteinización de folículos accesorios y prolongar la vida y la capacidad secretora de progesterona por parte de estos (Stewart y Allen, 1981, citado por Ungerfeld, 1998).

La eCG está compuesta de una subunidad alfa y una beta. La subunidad alfa tiene una secuencia de aminoácidos igual a la LH y FSH. La subunidad beta es responsable de la actividad de FSH y LH. La relación de la actividad de FSH:LH en distintas muestras comerciales analizadas es muy variable (Saumande, 1990). Esto puede ser debido a la microheterogeneidad en las composiciones tanto proteicas como glucídicas (Ungerfeld, 1998). La heterogeneidad en el componente glucido está presente en casi todas las glicoproteínas. Algunos

trabajos muestran que la actividad de FSH es significativamente mayor en las muestras obtenidas entre los días 60 y 90 de la gestación (Murphy *et al.*, 1984). Butnev *et al.* (1995) reportaron el aislamiento de tres variantes moleculares de eCG a partir de una misma preparación. Estas no fueron diferentes en composición aminoacídica, pero tienen diferente peso molecular de acuerdo a resultados cromatográficos. La diferencia fue atribuida solamente a diferente tamaño en la subunidad beta y esto es debido a diferente grado de glicolización en su extensión terminal. Esta variante de glicolización fue suficiente para producir diferentes afinidades a receptores. Estas diferencias son parcialmente responsables de las diferentes respuestas observadas cuando se utiliza eCG en tratamientos superovulatorios (Butnev *et al.*, 1995).

La permanencia en sangre de la eCG aporta ventajas para su aplicación en tratamientos superovulatorios, ya que con la administración de una sola dosis es suficiente para provocar el efecto deseado. La permanencia en circulación de la eCG es necesaria para mantener el estímulo gonadotrófico que requieren los ovarios para sostener la esteroidogénesis (Wang *et al.*, 1995). La vida media en bovinos es de 5 a 7 días (Yang *et al.*, 1991, citado por Ungerfeld, 1999). La primera fase de eliminación es en las primeras 36 h y su presencia en sangre es detectable de 10 u 11 días después de ser administrada (Yang *et al.*, 1991, citado por Ungerfeld, 1999). Sin embargo las características farmacológicas, deben ser tomadas como propias de cada preparación, ya que existe alta variabilidad entre las diferentes partidas comerciales (Saumande, 1990). Una forma purificada en condiciones estrictas, de forma que no se pierda ácido siálico, permanece más tiempo en circulación. La desialización parcial resulta en una rápida metabolización (Ungerfeld, 1998).

A partir de su purificación y bajo costo posibilita la utilización en trabajos en que se requiera inducir el desarrollo folicular. La eCG ha sido utilizada en tratamientos superovulatorios en bovinos (Hahn, 1992) y ovinos (Amstrong *et al.*, 1983). Su utilización en tratamientos superovulatorios presenta como ventajas su bajo costo, y sobre todo, la facilidad con que se utiliza. Esto a su vez, disminuye el

efecto estresante de otros tratamientos que requieren de la administración de múltiples dosis (Amstrong *et al.*, 1983). La eCG tiene algunos inconvenientes en su utilización y estos están relacionados a su principal ventaja -su larga vida media-, después de su aplicación se presentan desordenes durante la fase final de maduración de folículos (entre el pico de LH y la ovulación) (Dieleman y Bevers, 1987) También se produce un estímulo tardío excesivo sobre la población folicular, llevando a que numerosos folículos anovulatorios estén presentes al momento de realizar la colecta de embriones, provenientes de una oleada de desarrollo folicular posterior a la ovulación (Saumande, 1990). Esto ha sido asociado a una baja calidad embrionaria y se ha postulado que es originado la alta concentración de estrógenos postovulatoria (Booth *et al.*, 1975, citado por Ungerfeld, 1999). La administración de anticuerpos contra eCG ha sido utilizada como una técnica para mejorar el resultado superovulatorio en vacas y disminuir los efectos negativos de su larga permanencia en sangre (Bharat *et al.*, 1980).

La eCG se ha utilizado en programas de inducción y sincronización de estros para incrementar el desarrollo folicular y mejorar la fertilidad al termino de los tratamientos de sincronización (Kerr *et al.*, 1991; Páez *et al.*, 1999; Kastelic *et al.*, 1999). También ha sido utilizada junto con progestágenos en la inducción de la ciclicidad en vacas Cebú en anestro posparto (Singh *et al.*, 1998; Páez *et al.*, 1999) y en novillas (Rodríguez *et al.*, 1999).

Hipotetizando que la eCG estimula el crecimiento folicular del ovario y la producción de estrógenos, Sheldon *et al.* (2000) probaron la eCG para incrementar el índice de involución uterina sin tener éxito, sin embargo en ese estudio se encontraron que su aplicación incrementa el desarrollo folicular y la producción de estradiol.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPITULO 3. HIPOTESIS Y OBJETIVO

HIPOTESIS

La aplicación de extracto ovárico, líquido folicular equino, benzoato de estradiol y norgestomet estimulan el recambio del folículo dominante persistente en vacas sincronizadas con un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo

OBJETIVO

Evaluar el efecto del extracto ovárico, líquido folicular equino, benzoato de estradiol y norgestomet en el recambio del folículo dominante persistente en vacas sincronizadas con un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo.

CAPITULO 4. EXPERIMENTO 1

EFECTO DEL EXTRACTO OVÁRICO, LÍQUIDO FOLICULAR Y ESTEROIDES EN EL RECAMBIO DEL FOLÍCULO DOMINANTE PERSISTENTE EN VACAS HOLSTEIN SINCRONIZADAS CON UN IMPLANTE DE NORGESTOMET EN AUSENCIA DE CUERPO LÚTEO.

4.1 RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el efecto del extracto ovárico, líquido folicular equino, benzoato de estradiol y norgestomet en la dominancia del folículo persistente se llevaron a cabo tres estudios, utilizando el modelo de folículo dominante persistente (**FDP**). Las vacas recibieron un implante de norgestomet (**iNg**) simultáneamente con una inyección de prostaglandina (**PG**) (día 0) que mantienen niveles subluteales de progesterona y permite que el folículo dominante continúe su crecimiento durante el tratamiento con progestágeno. El recambio folicular (**RF**) fue determinado por ultrasonografía de los ovarios (**Uso**) y se comparó entre grupos mediante la prueba exacta de Fisher. En el estudio 1, la aplicación de extracto ovárico (**EO**) hidrosoluble (10 ml) por 5 días suprimió el desarrollo folicular >8 mm. Igualmente, 20 ml de **EO** por dos días provocó recambio del **FDP** en 2 de 4 vacas ($P>0.05$). En el estudio 2, la aplicación intramuscular de líquido folicular equino libre de esteroides (**LFE**) (20ml) por dos días provocó **RF** en 3 de 4 vacas ($P<0.05$). La aplicación de **LFE** en forma intravenosa ocasionó reacciones anafilácticas en 2 de 3 animales tratados y no provocó **RF** ($P>0.05$). En el estudio 3, el norgestomet (1.8 mg) provocó el **RF** en 3 de 4 vacas y el benzoato de estradiol (**BE**) provocó la ovulación del **FDP** en 3 de 4 vacas y el posterior desarrollo de un nuevo folículo ($P<0.05$). En las vacas testigo ($n=20$) no se presentó **RF**. Se concluye que la aplicación de benzoato de estradiol y norgestomet en la forma y dosis empleada estimulan el recambio del folículo dominante persistente. Adicionalmente, tanto el extracto ovárico como el líquido folicular equino estimularon el **RF**, sin embargo, no los consideramos una alternativa viable para el uso práctico debido al riesgo de reacciones adversas.

Palabras clave: Folículo dominante persistente, recambio folicular, extracto ovárico, líquido folicular equino, benzoato de estradiol y norgestomet.

4.2 INTRODUCCIÓN

Durante el ciclo estral se presentan de dos a tres oleadas de desarrollo folicular (Savio *et al.*, 1988). Cada oleada folicular concluye con el desarrollo de un folículo dominante, el cual suprime el crecimiento de folículos arriba de 4 mm de diámetro (Savio *et al.*, 1993). La regulación de las oleadas foliculares es consecuencia de una retroalimentación negativa de la progesterona producida por el cuerpo lúteo sobre la liberación de LH durante el ciclo estral. Durante el diestro la progesterona mantiene baja la frecuencia de pulsos de LH y con esto se presenta el recambio del folículo dominante (Savio *et al.*, 1993). Cuando la sincronización de estros en bovinos con progestágenos coincide con la ausencia de un cuerpo lúteo, se presenta un incremento en la frecuencia de pulsos de LH que estimula la persistencia anormal de la dominancia folicular (Folículo Dominante Persistente) (Savio *et al.*, 1993). En presencia de un folículo dominante persistente (FDP) los programas de sincronización tienen una baja fertilidad en comparación de los programas de sincronización en donde no se presenta la persistencia folicular (Anderson y Day, 1994). Se ha sugerido que la infertilidad después de la ovulación de un FDP es causa de: 1) un desarrollo folicular anormal, 2) exposición prolongada a concentraciones altas de estrógenos (Savio *et al.*, 1993), 3) alteraciones en el oocito (Revah y Buttler, 1996). Por esta razón se han utilizado tratamientos para prevenir la formación de folículos dominantes persistentes o estimular su atresia (Anderson y Day, 1994 y Savio *et al.*, 1993). La FSH también resulta necesaria para mantener la dominancia folicular, así, Turzillo y Fortune (1993) suprimieron la liberación de FSH utilizando la inhibina contenida en el líquido folicular bovino y provocaron la atresia del folículo dominante persistente en un modelo de sincronización con progestágenos en ausencia de un cuerpo lúteo. El líquido folicular equino ha sido utilizado para alterar la dinámica folicular en ovejas y se ha encontrado que su aplicación suprime el desarrollo folicular, retrasa la presentación del estro (Hunter *et al.*, 1988) y reduce las concentraciones de FSH (Hernández *et al.*, 1997). El extracto ovárico es una

sustancia obtenida de ovarios frescos por extracción hidrosoluble que suponemos contiene inhibina, hormona que tiene un efecto inhibitorio sobre la liberación de FSH. Ni el extracto ovárico ni el líquido folicular equino se han utilizado para causar el recambio del folículo dominante persistente en vacas en un modelo de sincronización con progestágenos en ausencia de un cuerpo lúteo.

El benzoato de estradiol en presencia de progesterona suprime la liberación de LH a nivel de la glándula pituitaria (Robertson *et al.*, 1989). Cuando es aplicado en tratamientos de sincronización con progestágenos (Rajamahendran y Manikan, 1994) se presenta recambio folicular ovulándose un folículo de nueva formación al final del tratamiento. El benzoato de estradiol no ha sido utilizado en modelos con un folículo dominante persistente para causar su recambio.

Los progestágenos y la progesterona se han utilizado para atresiar el folículo dominante persistente por suprimir la liberación de LH a nivel de la glándula pituitaria (Anderson y Day, 1994; Cavalieri *et al.*, 1998b; Austin *et al.*, 1999) y estimular una nueva oleada folicular (Savio *et al.*, 1993; Cavalieri *et al.*, 1998b; Austin *et al.*, 1999). Mata *et al.* (2001) al aplicar 3 mg de norgestomet causaron la atresia del folículo dominante persistente en 6 de 8 vaquillas Holstein. Anderson y Day (1994) reportaron que la atresia del folículo dominante persistente se da en el 100 % de los casos cuando se inyecta 100 mg de progesterona líquida. Sin embargo, este efecto se logró manteniendo niveles extremadamente altos de P₄ en sangre que pudieron mantener suprimida la frecuencia de pulsos de LH. La aplicación de un CIDIR por 24 h siete días antes del retiro del tratamiento sincronizador con un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo, resulta en una sincronización precisa con la ovulación de un folículo de nueva formación (Cavalieri *et al.*, 1998b). El objetivo del presente trabajo fue el de evaluar el efecto del extracto ovárico, líquido folicular equino, benzoato de estradiol y norgestomet sobre la persistencia del folículo dominante en vacas tratadas con un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo.

4.3 MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el Centro de enseñanza Práctica, Investigación, Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, localizado en el Km 29 de la carretera federal México- Cuernavaca. El clima de la región es c (w) (w) b (ij), que corresponde a semifrío-semihúmedo, con lluvias en verano y precipitación pluvial de 800 a 1200 mm (García, 1973).

4.3.1 Protocolo experimental

Este experimento constó de tres estudios. Se utilizaron 42 vacas Holstein ciclando. Las vacas se encontraban en producción con más de 60 días posparto y una condición corporal entre 2.5 y 3 (escala de 1 a 5; Widman *et al.*, 1982). Las vacas se encuentran en un sistema de semiestabulación; por la mañana son ordeñadas mecánicamente y posteriormente pasan a una pradera donde pastorean aproximadamente 1 h. Las vacas amamantan a sus crías por un periodo de 1 h y después son suplementadas con 1 kg de alimento balanceado y de 2 a 3 kg de ensilado de maíz ó heno de alfalfa o avena *ad libitum*. El destete de la cría se realizó a los 7 meses.

Para determinar si las vacas se encontraban ciclando se llevó a cabo una inspección ultrasonográfica en el día cero de cada estudio para determinar la presencia de cuerpo lúteo indicativo de ciclicidad.

En los tres estudios, la sincronización constó de la aplicación de un implante de norgestomet¹ (iNg) y 5 mg de prostaglandina sintética² (PG) (día 0). Con esto, de acuerdo con diversos autores se mantienen niveles subluteales de progesterona (Kinder *et al.*, 1996; McDowell *et al.*, 1998) y el desarrollo anormal

¹ Sincromate B. Sanofi Animal Health, Overland Park, K S

² Etiproston Lab Virbac México, S.A de C.V).

de un FD que alarga su dominancia hasta el retiro del implante de norgestomet (Savio *et al* , 1993).

Se llevo acabo ultrasonografía ovárica con un equipo de ultrasonido de Universal Medical System con un transductor de 7.5 MHz. Los días de la ultrasonografía fueron de acuerdo a cada modelo en cada estudio. En los tres estudios de este experimento el retiro del iNg se realizó el día de la última ultrasonografía.

La regresión del cuerpo lúteo después de la aplicación de la PG fue determinada por ultrasonografía en el día 1 y 2 postinyección.

En cada inspección se tomó el diámetro del folículo dominante (FD) y subordinados (Fs), así como el número de los folículos pequeños (≤ 4 mm)

Posteriormente se hizo un análisis retrospectivo de la dinámica folicular tomándose las siguientes definiciones:

Folículo dominante (FD): al folículo de mayor diámetro el día de la aplicación del iNg.

Folículo subordinado (Fs): al 2do folículo de mayor diámetro después del FDP.

Folículo dominante persistente (FDP): al folículo que mantuvo su dominancia funcional de la primera inspección ultrasonografica hasta el retiro del iNg o la aplicación del tratamiento.

Recambio folicular (RF): cuando el folículo dominante persistente disminuyó de tamaño y fue alcanzado en diámetro y substituido como dominante por otro folículo.

Tiempo a recambio folicular (TRF): tiempo en días en las cuales el folículo subordinado alcanzó en diámetro o rebasó al FDP después del día de la aplicación del tratamiento.

Índice de crecimiento: se tomó como el cambio diario en el diámetro del folículo dominante desde que fue visible hasta que alcanzó su máximo.

Folículo en etapa de crecimiento: cuando el folículo dominante presentó un índice de crecimiento $\geq 0.66/\text{día mm}$ sostenido a lo largo de por lo menos 4 días.

Folículo en etapa de meseta: cuando el folículo dominante presentó un índice de crecimiento <0.66 mm/día en 4 días

4.3.2 Análisis Estadístico

La tasa de recambio folicular (RF) fue comparado entre grupos mediante la prueba exacta de Fisher (Programa SAS 1999).

4.3.3 Experimento 1. Estudio 1. Primera parte.

Efecto del extracto ovárico en la dinámica folicular.

Para evaluar el efecto del extracto ovárico en el crecimiento folicular, se utilizaron dos vacas con cuerpo lúteo a la imagen del ultrasonido, indicativo de ciclicidad. Las dos vacas recibieron un iNg y una dosis de PG (Día 0). El iNg permaneció del día 0 hasta su retiro el día 18. Los ovarios fueron monitoreados por ultrasonografía del día 4 al día 18 para seguir el desarrollo folicular. Entre el día 4 y el día 8 los dos animales recibieron diariamente una inyección intramuscular de 10 ml de extracto ovárico³ (Figura 2). Cada mililitro de extracto ovárico contiene 52 mg de extractos hidrosolubles obtenidos de ovarios frescos completos, con 0.05 % de clorobutanol como preservativo.

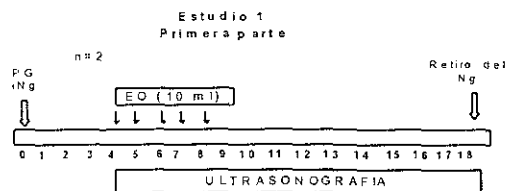


Figura 2. Diseño experimental utilizado para probar el efecto de el extracto ovárico sobre el crecimiento folicular en vacas sincronizadas con un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo (Estudio 1. Primera parte). PG Prostaglandina iNg Implante de norgestomet EO Extracto ovárico

³ Extracto Ovárico. Laboratorios Brovel, S.A de C.V

4.3.4 Experimento 1. Estudio 1. Segunda parte.

Efecto del extracto ovárico en la persistencia del folículo dominante.

Se utilizaron 10 vacas en diestro y se les aplicó una dosis luteolítica de PG. Siete días después del estro todas las vacas recibieron una segunda dosis de PG y un iNg (día 0) que permaneció por 7 días más. La formación de un folículo dominante persistente fue corroborada por ultrasonografía. En el día 2 las vacas fueron aleatorizadas en dos grupos y recibieron los siguientes tratamientos: Grupo EO (n=5), se le aplicó dos inyecciones de 20 ml de extracto ovárico im en el día 2 y 3 del ciclo y Grupo Testigo (n=5), se le aplicó 20 ml de solución salina fisiológica (SSF) el día 2 y 3 (Figura 3). La persistencia o el recambio del FDP fue determinada por ultrasonografía de los ovarios entre los días -2 al 7 del modelo.

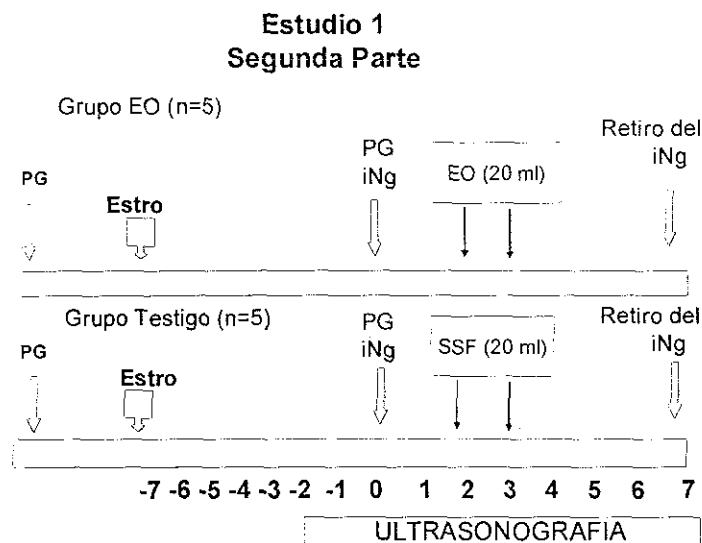


Figura 3 Diseño experimental para probar el efecto del extracto ovárico sobre la persistencia del folículo dominante en vacas sincronizadas con un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo (Estudio 1. Segunda parte) PG Prostaglandina iNg Implante de norgestomet, EO Extracto ovárico, SSF Solución salina fisiológica

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.3.5 Experimento 1. Estudio 2. Primera parte.

Efecto del líquido folicular equino intramuscular en la persistencia del folículo dominante.

Se utilizaron 10 vacas que se encontraban ciclando. Los animales recibieron una dosis luteolítica de PG y un iNg (día 0) que permaneció hasta su retiro el día 29. El día 20, las 10 vacas fueron aleatorizadas en dos grupos y recibieron el siguiente tratamiento: Grupo LFEim (n=5), se le aplicó una inyección intramuscular de 20 ml de líquido folicular equino (LFE) el día 20 y 21 y Grupo Testigo (n=5), recibió 20 ml de SSF el día 20 y 21 (Figura 4). La persistencia o el recambio folicular fue determinado diariamente por ultrasonografía de los ovarios del día 18 al 29.

El líquido folicular equino fue colectado de los ovarios de yeguas sacrificadas previo al estudio. Se recuperaron los ovarios después del sacrificio y fueron colocados en una hielera hasta la colección del líquido folicular dos horas más tarde. El LFE se aspiró de los folículos visibles y se recuperó en un sólo frasco de 300 ml. Posteriormente el LFE se centrifugó a 1500 xg durante 15 min a 4°C para la separación de detritos y se adicionó 10 mg/ml de carbón activado y 0.1 mg/ml de dextran permaneciendo en agitación por tres horas para remover las hormonas esteroides. El LFE se centrifugó nuevamente a 1500 xg para retirar las partículas de dextran y carbón y el sobrenadante se filtró (filtro No. 1. Whatman. No. Catalogo 1001150). Esta operación se repitió 3 veces. Al líquido obtenido se le adicionó 100 UI/ml de penicilina G sódica, se guardó en alícuotas de 20 ml y se conservó en congelación a -20°C hasta su utilización (Hernández *et al* , 1997).

Estudio 2 Segunda Parte

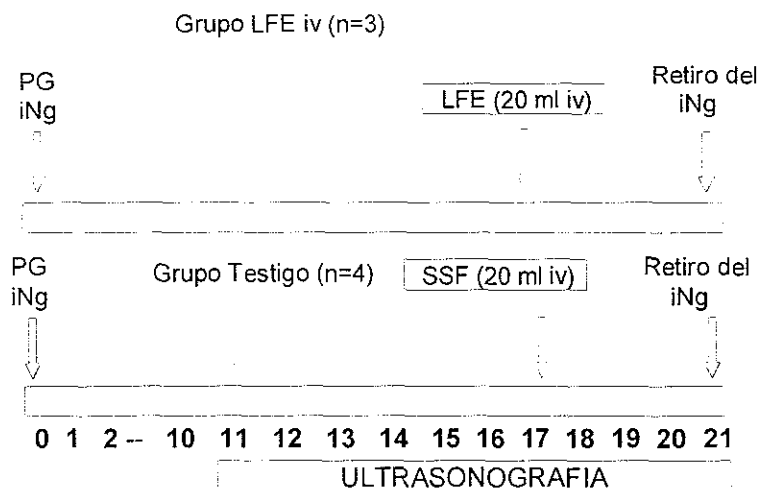


Figura 5 Diseño experimental utilizado para probar el efecto de 20 ml de líquido folicular equino intravenoso sobre la persistencia del folículo dominante en vacas sincronizadas con implantes de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo (Estudio 2. Segunda parte). PG Prostaglandina. iNg Implante de norgestomet. LFE Líquido folicular equino. SSF Solución salina fisiológica.

4.3.7 Experimento 1. Estudio 3

Efecto del benzoato de estradiol y norgestomet en la persistencia del folículo dominante.

Se utilizaron 11 vacas ciclando. Las vacas recibieron una dosis luteolítica de PG y un iNg (día 0) que permaneció hasta su retiro el día 26. El día 20 las vacas se aleatorizaron en tres grupos y recibieron uno de los siguientes tratamientos: Grupo BE (n=4), se le aplicó 1 mg de benzoato de estradiol im, Grupo NORG (n=4), se le aplicó 1.8 mg de norgestomet líquido de aplicación intramuscular y Grupo Testigo (n=3), recibió 3 ml de SSF (Figura 6). La persistencia o el recambio fue determinada por ultrasonografía del día 13 al 26.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Estudio 3

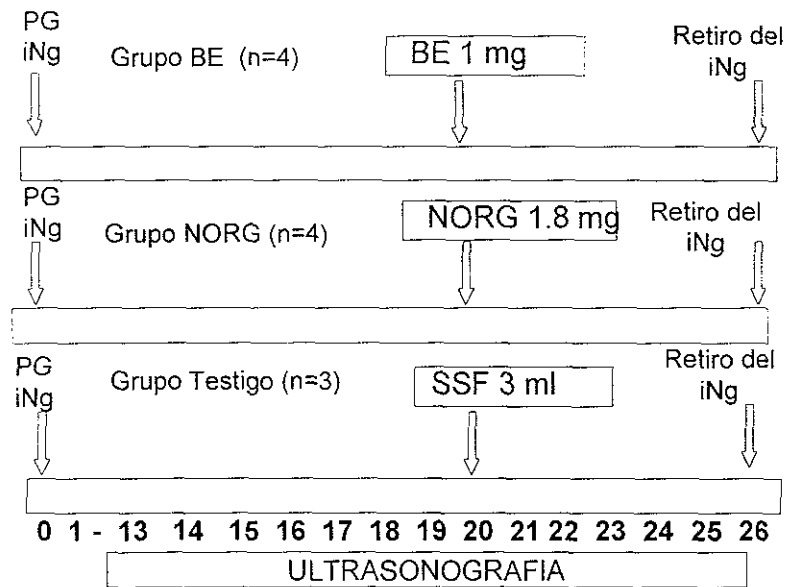


Figura 6 Diseño experimental utilizado para probar el efecto del benzoato de estradiol y norgestomet sobre la persistencia de folículo dominante en vacas sincronizadas con implantes de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo (Estudio 3). PG Prostaglandina iNg Implante de norgestomet NORG Norgestomet de aplicación intramuscular BE Benzoato de estradiol SSF Solución salina fisiológica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.4 RESULTADOS

En los tres estudios de este experimento las vacas presentaron un cuerpo lúteo al momento de la aplicación de la prostaglandina y se presentó regresión lútea a las 24 h después de su aplicación. Esto fue corroborado por ultrasonografía de los ovarios. Con el modelo de sincronización con progestágeno en ausencia de un cuerpo lúteo se desarrolló un folículo dominante persistente en 36 (94.7 %) vacas. Solo dos vacas quedaron fuera de los estudios por no cumplir con el modelo de folículo dominante persistente (5.2%).

4.4.1 Experimento 1. Estudio 1. Primera Parte.

Efecto del extracto ovárico en la dinámica folicular.

Durante los días de tratamiento con extracto ovárico ninguna de las dos vacas tratadas con EO por 5 días, mostró folículos mayores a 8 mm. Sin embargo, solo cuarenta y ocho horas después de haber retirado el tratamiento con EO (Figura 7) se presentó desarrollo de folículos >8 mm y de un folículo dominante. Además de la inhibición del desarrollo folicular, se observó laxitud de la vulva y falta de tono en la musculatura de la vagina, útero, y de ligamentos pélvicos. Estos signos desaparecieron al retirar el tratamiento.

4.4.2 Experimento 1. Estudio 1. Segunda parte.

Efecto del extracto ovárico en la persistencia del folículo dominante.

El crecimiento del folículo dominante fue acompañado por la disminución en diámetro del folículo subordinado. El diámetro promedio del folículo dominante en el día 2 en el grupo EO fue de 13 ± 2.16 mm y de 12.75 ± 2.06 en el grupo Testigo ($P > 0.05$). Una vaca de cada grupo quedó fuera de este estudio por que el folículo dominante sufrió atresia antes del día 2. El tratamiento con extracto ovárico provocó la regresión del FDP en 2/4 vacas. El recambio folicular en las dos vacas

se presentó a las 48 horas después de la primera inyección de extracto ovárico. En contraste, ninguna vaca (0/4) en el grupo Testigo presentó recambio del folículo dominante persistente ($P>0.05$) (Figura 8).

Del grupo de EO las dos vacas que presentaron recambio folicular tenían un folículo dominante en etapa de meseta con un índice de crecimiento de 0.62 mm/día. A comparación de las dos vacas que no presentaron recambio folicular tenían un folículo dominante en etapa de crecimiento con un índice de crecimiento de 1.12 mm/d.

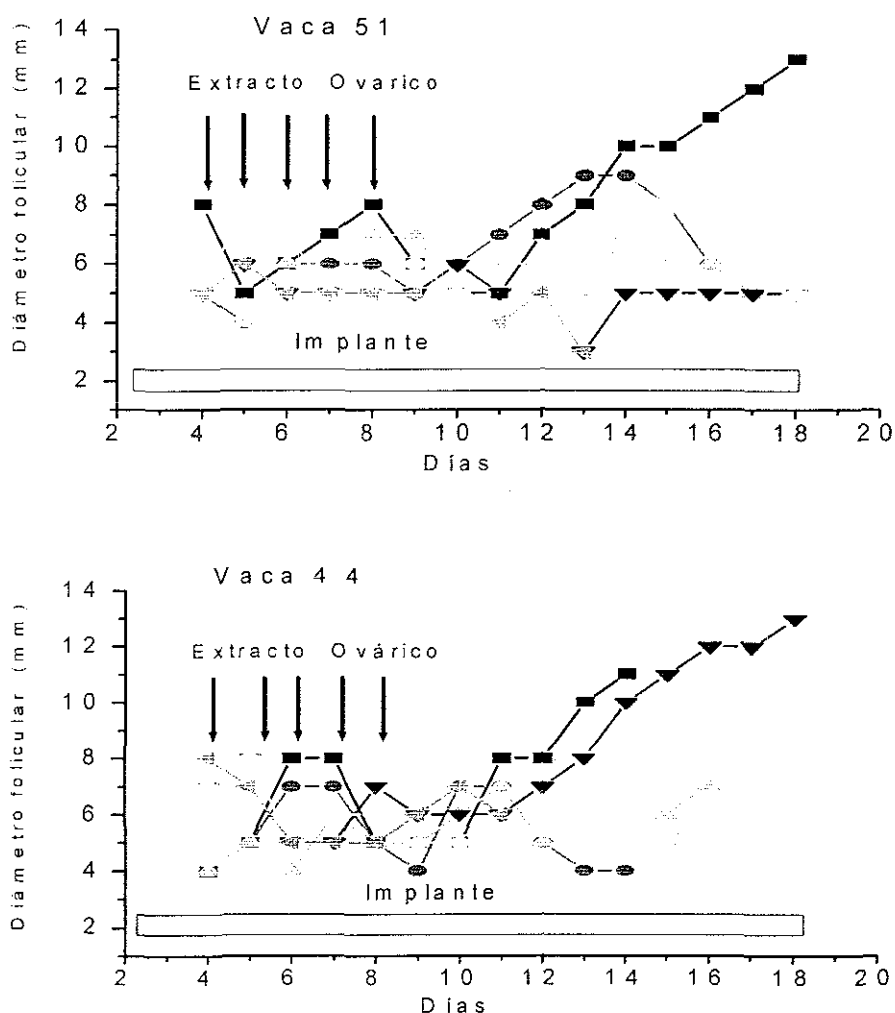


Figura 7. Diámetro de los folículos ováricos durante (d 4-8) y después (d 9-18) del tratamiento con extracto ovárico en las vacas sincronizadas con un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

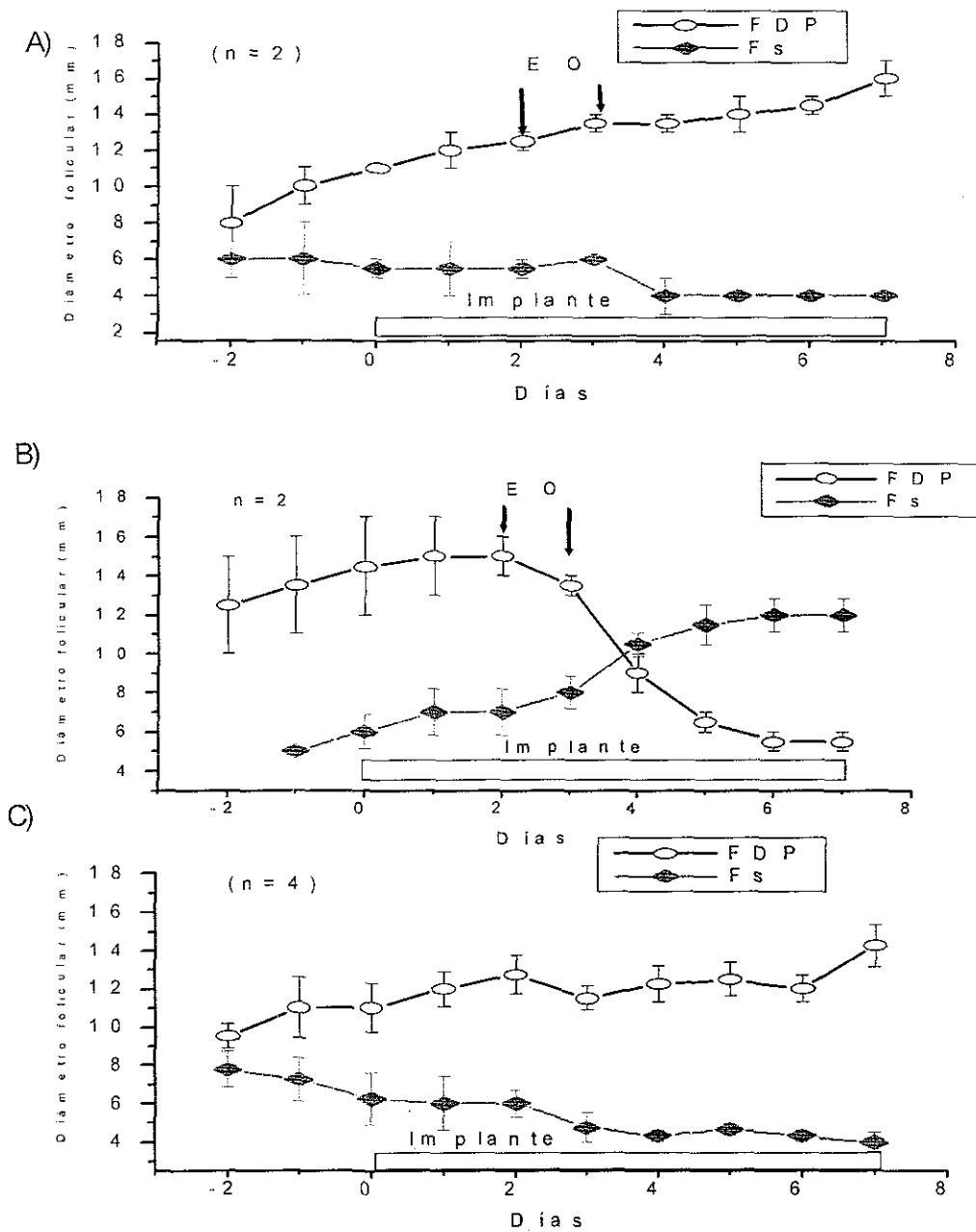


Figura 8. A) Vacas en las que la aplicación del extracto ovárico no provocó recambio folicular. Nótese que el FDP se encontraba creciendo. B) Vacas en las que la aplicación del extracto ovárico provocó el recambio folicular. Nótese que el FDP no se encontraba creciendo. C) Vacas en el grupo Testigo en donde no se presentó recambio folicular. Las vacas estaban sincronizadas con un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo. EO Extracto ovárico, FDP Folículo dominante persistente, Fs Folículo subordinado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.4.3 Experimento 1. Estudio 2. Primera parte.

Efecto del líquido folicular equino intramuscular en la persistencia del folículo dominante.

En el día 20 el diámetro del folículo dominante persistente fue de 17.2 ± 2.9 mm. El crecimiento del FDP fue acompañado con la disminución del folículo subordinado y ausencia de reclutamiento de folículos pequeños. El tratamiento con LFE ocasionó que en 3/5 vacas se presentara recambio del FDP. El recambio folicular se presentó a los 5 días (120 h). En contraste, ningún animal experimentó regresión del FDP en el grupo Testigo (0/5) (Figura 9). Se encontró diferencia significativa entre grupos ($P < 0.05$).

En el grupo de LFE im tanto las vacas que no presentaron recambio ($n=2$) como las que lo presentaron ($n=3$) por efecto del líquido folicular equino, tenían folículos dominantes en etapa de meseta.

4.4.4 Experimento 1. Estudio 2. Segunda parte.

Efecto del líquido folicular equino intravenoso en la persistencia del folículo dominante.

En este estudio el grupo LFE iv fue administrado en 3 vacas. Dos animales presentaron reacción anafiláctica muriendo una de ellas. En ambos grupos tenían folículos en etapa de crecimiento (Figura 10). La aplicación intravenosa de LFE no causó regresión del FDP (0/2) y ninguna vaca del grupo Testigo presentó recambio del FDP (0/4).

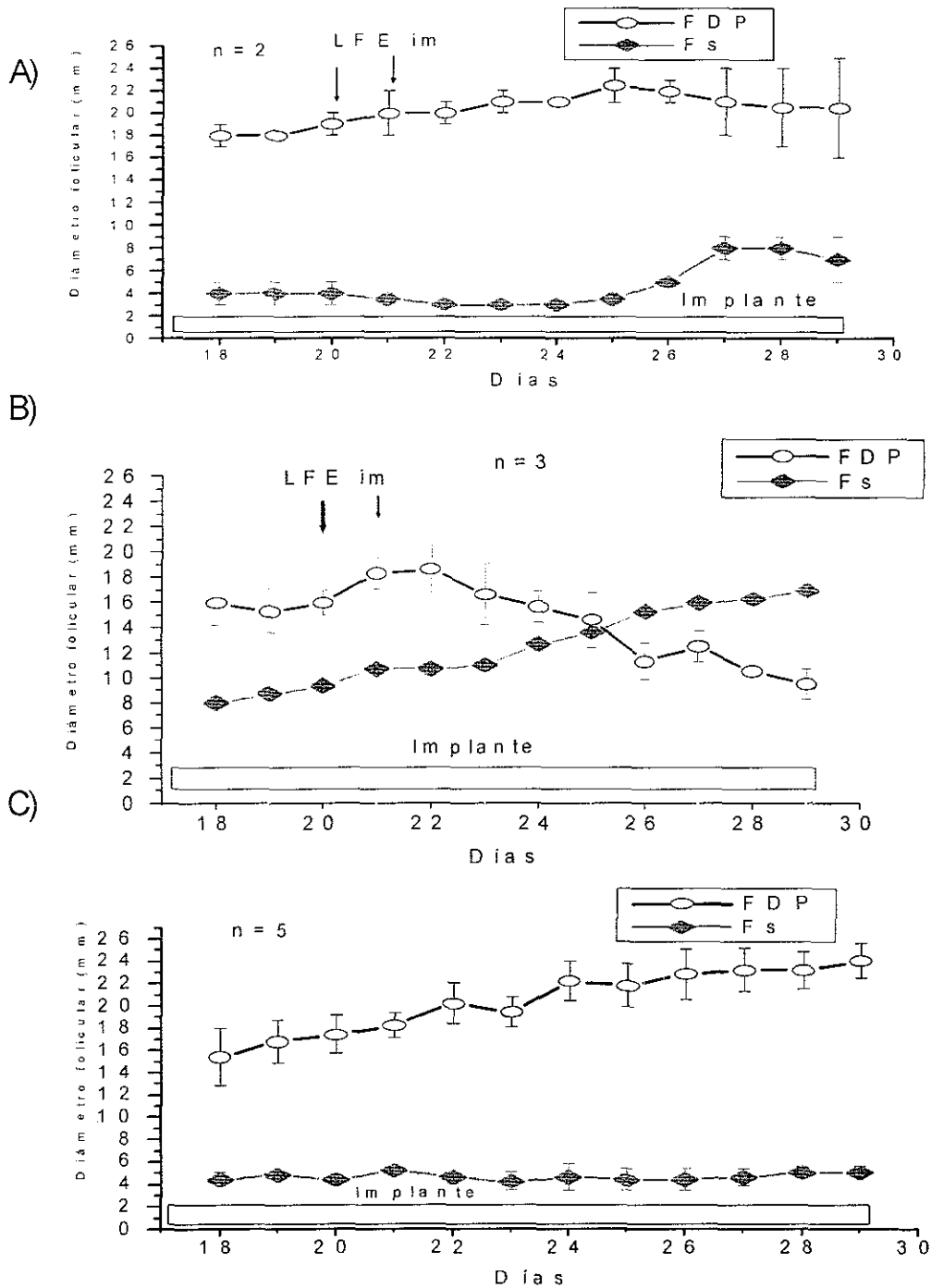


Figura 9. Diámetro del fólculo dominante persistente y subordinado. A) Vacas que se les aplicó LFE y no presentaron recambio del FDP. B) Vacas que se les aplicó LFE y presentaron recambio del FDP. C) Vacas del grupo Testigo en las cuales no se presentó recambio del FDP. Las vacas se sincronizaron con un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo. LFE Líquido folicular equino FDP Fólculo dominante persistente Fs Fólculo subordinado

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

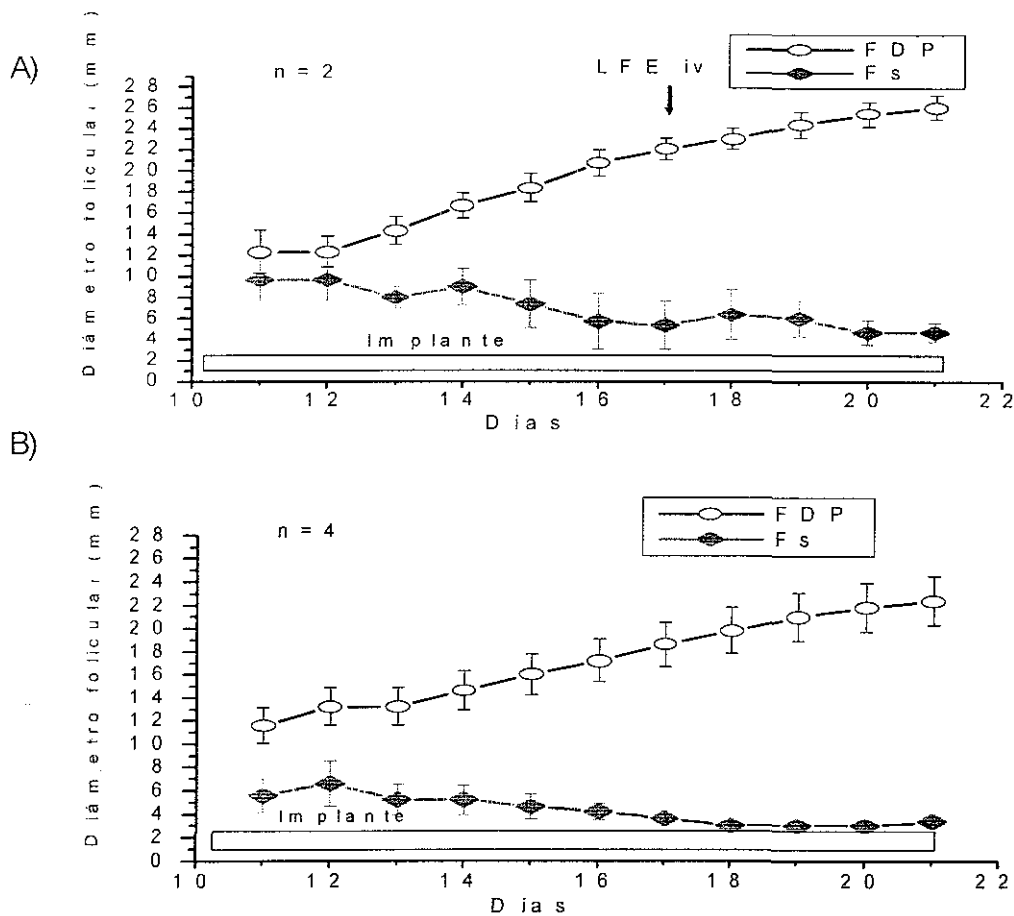


Figura 10 Diámetro del fólculo dominante persistente y subordinado de vacas sincronizadas con un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo. A) Vacas tratadas con LFE iv, las cuales no presentaron recambio del FDP. B) Vacas en el grupo Testigo, las cuales no fueron tratadas y no presentaron recambio del FDP. LFE Líquido folicular equino FDP Fólculo dominante persistente Fs Fólculo subordinado

4.4.5 Experimento 1. Estudio 3.

Efecto del benzoato de estradiol y norgestomet en la persistencia del fólculo dominante.

El diámetro promedio del FDP en los grupos de BE, NORG y Testigo fue de 21.33 ± 4.93 mm. La aplicación de 1 mg de benzoato de estradiol provocó la ovulación del fólculo en 3 de 4 vacas a las 72 ± 41.57 h después de su aplicación. Igualmente, el norgestomet provocó el recambio del FDP en 3/4 vacas, ocurriendo al tercer día después de la aplicación del norgestomet. En el grupo de NORG

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

tanto las tres vacas que presentaron recambio del FDP, como la que no presentó recambio tenían un folículo dominante en etapa de meseta. En el grupo Testigo no se presentó recambio del FDP (Figura 11).

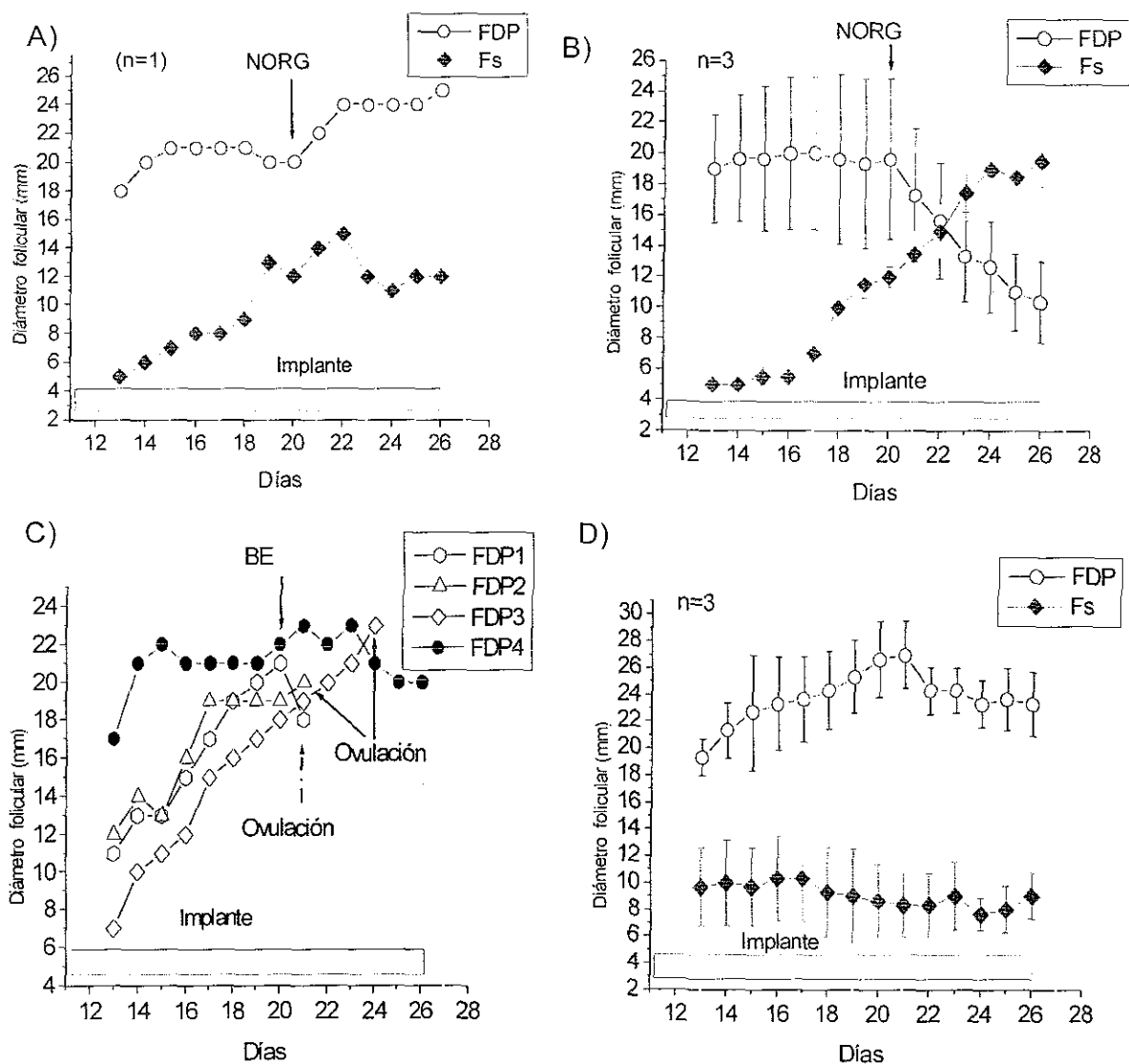


Figura 11. Diámetro del folículo dominante persistente y subordinado de vacas sincronizadas con un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo. A) Vaca tratada con 1.8 mg de norgestomet que no presentó recambio del FDP. B) Vacas que presentaron recambio del FDP después de la aplicación de 1.8 mg de norgestomet. C) Vacas tratadas con 1 mg de benzoato de estradiol. D) Vacas en el grupo Testigo. NORG Norgestomet de aplicación intramuscular BE Benzoato de estradiol FDP Folículo dominante persistente, Fs Folículo subordinado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el Cuadro 1 se muestra el porcentaje de vacas con recambio folicular dentro de cada tratamiento en los tres estudios del Experimento 1

Cuadro 1. Porcentaje de vacas que presentaron recambio folicular después de la aplicación de extracto ovárico, líquido folicular equino, norgestomet y benzoato de estradiol

| Tratamiento | Porcentaje (%) |
|---|----------------|
| Extracto ovárico (2 aplicaciones de 20 ml) | 50 (2/4) |
| Líquido folicular equino im (2 aplicaciones de 20 ml) | 60 (3/5) |
| Líquido folicular equino iv (20 ml) | 0 (0/3)+ |
| Norgestomet (1.8 mg) | 75 (3/4) |
| Benzoato de estradiol (1 mg) | 75 (3/4)* |
| Testigo | 0 (0/16) |

* La aplicación de 1 mg de benzoato de estradiol causó la ovulación del FDP en tres vacas

+ La aplicación de LFE intravenoso causó reacciones anafilácticas en dos vacas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4. 5 DISCUSION

La aplicación de un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo estimuló la formación de un folículo dominante persistente en la mayoría de los casos. Similares resultados se han encontrado en otros estudios en los cuales se trabaja con modelos para desarrollar persistencia folicular con la aplicación de implantes de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo (Savio *et al.*, 1993; McDowell *et al.*, 1998).

La aplicación de un implante con norgestomet suprimio el estro entre 8 y 29 días en nuestro modelo de persistencia folicular. En un trabajo similar al del presente trabajo reportaron que el estro se puede suprimir con un implante con 3 mg de norgestomet por 15 días. Cavalieri *et al.*, (1998) con implante con 6 mg de norgestomet por suprimieron el estro por un periodo de 17 días (Savio *et al.*, 1993). Esto comprueba que la aplicación de un implante con norgestomet es suficiente para poder suprimir el estro en modelos donde se estudia la persistencia folicular

En modelos para estudiar la persistencia folicular con progestágenos en ausencia de un cuerpo lúteo, no siempre se induce a la formación de un folículo dominante persistente (Mihm *et al.*, 1994; Rajamahendran y Manikkam, 1994; Austin *et al.*, 1999). De igual manera que ocurrió en nuestros estudios, al aplicar el implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo, no todas las vacas desarrollaron un FDP. Dos vacas del estudio 1, segunda parte, no desarrollaron un FDP. En este estudio las vacas presentaban la primera oleada folicular. Es posible que al momento de la aplicación de la prostaglandina las vacas sufrieran la regresión natural de la primera oleada folicular de manera que no desarrollaron un FDP, ya que se sabe que el primer folículo dominante se desarrolla en el día 4 y comienza su regresión entre el día 8 y 9 del ciclo estral (Sirois y Fortune, 1988). Otra explicación es que al momento de la regresión lútea tal vez las vacas presentaron una disminución gradual de progesterona ya que Shaham *et al.* (2000) encontraron que después de la aplicación de la prostaglandina y mientras las concentraciones de progesterona disminuyen gradualmente, se puede

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

presentar el recambio del folículo dominante a diferencia de cuando los niveles de progesterona se encuentran en su nivel más bajo y entonces se desarrolla un FDP

El tratamiento con líquido folicular equino provocó recambio folicular en 3 de 5 animales cuando fue aplicado por dos días. Posiblemente el recambio folicular se presentó por la supresión de las concentraciones de FSH por la inhibina contenida en el LFE. En efecto, la aplicación de líquido folicular suprime las concentraciones de FSH y no altera los niveles circulantes de LH (Law *et al.*, 1992). El líquido folicular libre de esteroides afecta el desarrollo folicular, retrasa la presentación del estró y la ovulación en vacas y en ovinos después de su aplicación (Ateimberg y Ward, 1988). Kastelic *et al.* (1990) suprimieron el crecimiento de la primera oleada folicular entre el día 0 y 3 del ciclo estral al aplicar líquido folicular bovino a novillas. Se sabe que en el proceso de dominancia folicular, el FD adquiere una mayor sensibilidad a la FSH, mientras que los subordinados son menos sensibles a la misma (Ginther *et al.*, 1999). Igualmente, se sabe que el FD, por efecto de la FSH, adquiere una mayor capacidad de respuesta a LH (Ginther, 1999). El desarrollo de receptores de LH en la células de la granulosa en los folículos de 8 mm le da al folículo dominante la capacidad de continuar su desarrollo en presencia de concentraciones basales de FSH y así ejercer dominancia (Xu *et al.*, 1995).

Turzillo y Fortune, (1993) aplicaron líquido folicular bovino y produjeron una disminución en las concentraciones de FSH ocasionando el recambio folicular en el 50% de las novillas tratadas; el índice de crecimiento del folículo dominante en el otro 50% disminuyó, retrasando la presentación del estró y ovulación. Ellos concluyen que el recambio se da por que el folículo dominante requiere de concentraciones basales de FSH para seguir creciendo y mantener así su dominancia funcional. Ya se han demostrado los efectos de la supresión de la FSH en plasma por el líquido folicular bovino (Ireland *et al.*, 1983) y equino (Hernández *et al.*, 1997). Sin embargo, el mecanismo de acción del líquido folicular para suprimir el crecimiento folicular no ha sido dilucidado por completo y

se cree que no solamente es mediado por la reducción de FSH en plasma. Law *et al.* (1992) aplicaron líquido folicular bovino libre de esteroides e inhibina a vaquillas y no encontraron diferencia en los niveles de FSH entre el grupo tratado y el grupo Testigo, sin embargo, el desarrollo folicular se suprimió y se retrasó la presentación del estro. Un resultado similar encontraron Campbell *et al.* (1991) al aplicar líquido folicular libre de inhibina en ovejas. Ellos sugieren que la supresión en el desarrollo folicular no está asociada solamente a la inhibina contenida en el LFB ya que el líquido folicular contiene una multitud de otros factores, algunos de los cuales han sido implicados en el desarrollo folicular. Para probar la hipótesis de que el líquido folicular suprime el crecimiento folicular independientemente de las concentraciones de inhibina, Bergfelt *et al.* (1993) aplicaron líquido folicular bovino en vaquillas con o sin FSH recombinante y encontraron diferencia en el desarrollo folicular entre el grupo de LFB + FSH y el grupo que solo se le aplicó LFB. Ellos concluyen que el efecto inhibitorio del LFB es debido a una reducción en plasma de FSH por la inhibina contenida en este. La discrepancia entre estos trabajos indica la necesidad de realizar estudios para determinar que otros factores además de la inhibina están involucrados en la supresión del desarrollo folicular.

En el presente trabajo después de las dos aplicaciones de LFE im, en 3/5 vacas el segundo folículo de mayor tamaño alcanzó en diámetro al folículo dominante y se hizo dominante. Presumiblemente, posterior a la atresia del folículo dominante, se presentó una elevación en plasma de FSH que permitió el desarrollo de un nuevo folículo para volverse dominante. Turzillo y Fortune (1993) encontraron algo similar y después de la aplicación de líquido folicular bovino se presentó una elevación, en plasma, de los niveles de FSH, que fueron coincidentes con el reclutamiento de una segunda oleada folicular.

Cuando el líquido folicular equino se aplicó vía iv, no se presentó recambio folicular. Posiblemente no se presentó respuesta al LFE ya que fue una sola aplicación de 20 ml. En otros trabajos en los cuales se utiliza el líquido folicular iv para alterar la dinámica folicular y retrasar la presentación de estro, se aplica

durante 2 a 8 días y de 3 a 17 ml de líquido folicular en aplicaciones dobles o triples por día (Kurt *et al.*, 1979; Kastelic *et al.*, 1990; Law *et al.*, 1992; Bergfelt *et al.*, 1993; Hernández *et al.* 1997).

Desafortunadamente el líquido folicular equino no podría ser utilizado para el control del desarrollo y la dominancia folicular en programas de sincronización del estro ya que en dos vacas después su aplicación provocó reacciones anafilácticas. Una de ellas murió después de esta reacción. Cabe señalar que las vacas no se les había aplicado anteriormente líquido folicular equino, así que descartamos la posibilidad de presensibilización

En la misma forma que el líquido folicular equino contiene sustancias que suprimen el desarrollo folicular, se esperaba que el extracto ovárico contuviese dichas sustancias. La aplicación de extracto ovárico (EO) por 5 días suprimió el crecimiento folicular en las dos vacas tratadas. Igualmente cuando el EO ovárico fue aplicado únicamente por dos días, 2 de 4 vacas presentaron recambio folicular. Se especula que por su forma de preparación el EO contiene inhibina u otros factores proteínicos que suprimen el crecimiento folicular. Si es así, entonces el mecanismo por el cual se suprimió el desarrollo folicular fue que la inhibina actuó disminuyendo las concentraciones de FSH impidiendo el reclutamiento y el crecimiento folicular. Sabemos que la inhibina secretada por el folículo dominante es la responsable de regular las concentraciones de FSH en plasma ya que bloquea su liberación a nivel de la pituitaria anterior (Goodman *et al.*, 1981). Es posible que al retiro del tratamiento con EO se presentara un incremento en la FSH que promovió el desarrollo de un nuevo folículo hasta convertirse en un folículo dominante. En un trabajo de Turzillo y Fortune (1993) mencionan la importancia de la FSH en la dominancia folicular y así, al aplicar líquido folicular bovino, se suprimieron las concentraciones de FSH y con esto se presentó el recambio del folículo dominante persistente (FDP) en un modelo similar al nuestro.

La aplicación de extracto ovárico tuvo efectos secundarios cuando se aplicó por 5 días. En los dos animales estudiados se observó laxitud de la vulva, falta de tono en la musculatura de la vagina, útero, y ligamentos pélvicos. Esto es similar a

lo que ocurre en la fase del proestro del ciclo estral por acción de los estrógenos (Uscanga, 1996) Sin embargo, por ser el EO un extracto hidrosoluble, el contenido de estrógenos debe ser bajo. Otros factores que pudieran haber causado dichos efectos son la relaxina producida por el cuerpo lúteo que disminuye el contenido de colágeno en la matriz extracelular de la sínfisis puvica y cervix (Uscanga, 1996) Por esta razón, el extracto ovárico no es una alternativa para el control del desarrollo folicular en programas de sincronización con progestágenos ya que puede tener reacciones adversas además de que su contenido no especifica que tipo de proteínas contiene.

La aplicación de estradiol provocó la ovulación del FDP en 3 de 4 animales. Estas observaciones son consistentes con lo encontrado por Murray *et al.* (1998) en donde al aplicar 10 mg de 17β estradiol en el día 10 en un modelo de sincronización con implantes de norgestomet por 17 días, se presentó la ovulación en 7 de 10 vacas. Ellos encontraron que la aplicación de estradiol estimuló la oleada preovulatoria de LH y la ovulación se presentó en presencia del implante. En el presente trabajo al momento de la aplicación del benzoato de estradiol en el día 20, los 4 animales posiblemente tenían un folículo receptivo a la LH. Se sabe que los efectos de supresión de un implante de norgestomet no son suficientes para prevenir la oleada preovulatoria de LH (Mihm *et al.*, 1994; Anderson y Day, (1994). También se ha demostrado que en 16 días de tratamiento con un implante de norgestomet se permite la liberación de una mayor cantidad de pulsos de LH ya que mantiene bajos niveles de progestágeno en sangre a diferencia de los primeros días (Sánchez *et al.*, 1995) Burke *et al.* (2000) encontraron que después de la aplicación de 1 mg de benzoato de estradiol los niveles sanguíneos de estradiol son más altos que los encontrados en el ciclo estral y que estos pueden estimular la liberación de LH con la posterior ovulación. En el presente trabajo presumiblemente la aplicación de 1 mg de benzoato de estradiol fue suficiente para inducir la oleada preovulatoria de LH y la ovulación mientras el implante mantenía niveles bajos de progestágeno en la sangre.

La aplicación de 1.8 mg de norgestomet provocó el recambio folicular en el 75% de las vacas (3/4). Estos datos son consistentes con los encontrados por Mata *et al.* (2001) quienes encontraron que se presenta el 75% de recambio folicular al aplicar norgestomet im en un modelo de sincronización similar al nuestro. La regresión del folículo dominante después de la aplicación del norgestomet, puede ser el resultado de la supresión de los pulsos de LH necesario para que el folículo dominante sufriera atresia y se presentara el recambio y una nueva oleada folicular. En el presente trabajo no se midieron las concentraciones de LH pero en otros trabajos se ha determinado que la regresión del folículo dominante ocurre cuando se presenta una baja frecuencia y baja amplitud de los pulsos de LH después de la aplicación de 150 mg de progesterona (Rajamahendran y Manikkan, 1994) un CIDIR por 24 h (McDowell *et al.*, 1998) o tres implantes de norgestomet (Fike *et al.*, 1997b). Esto es similar a lo que ocurre en el diestro en el ciclo estral en donde se presenta una inhibición de la liberación de LH por la progesterona luteal y que resulta en la regresión del folículo dominante y la emergencia de una nueva oleada folicular (Lucy *et al.*, 1992).

Los resultados de los presentes estudios indican que el estado de crecimiento del folículo afecta la respuesta a los tratamientos para causar su atresia. La aplicación de extracto ovárico, líquido folicular equino y norgestomet causaron la regresión del folículo dominante persistente cuando este se encontraba en etapa de meseta. En efecto, en un estudio de Cavalieri *et al.* (1998b) encontraron que la aplicación de un CIDIR nuevo causó la atresia del FDP en el 90.5% cuando los folículos se encontraban en etapa de meseta y tan solo el 14.13% en aquellos que se encontraban en etapa de crecimiento. Estos resultados junto con los del presente trabajo nos dicen que el estado de crecimiento folicular puede influir en la respuesta al tratamiento para la eliminación del FDP.

En conclusión, el norgestomet provocó la atresia del folículo dominante persistente en vacas sincronizadas con progestágenos. El benzoato de estradiol causó el recambio folicular por ovulación del FDP. Adicionalmente, aunque el

extracto ovárico y el líquido folicular equino estimularon el recambio folicular, no los consideramos una alternativa viable para el uso práctico debido al riesgo de reacciones adversas.

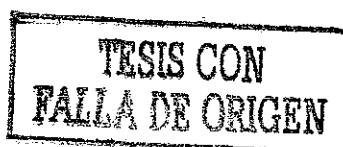
CAPITULO 5. EXPERIMENTO 2

EFFECTO DEL NORGESTOMET EN EL RECAMBIO DEL FOLÍCULO DOMINANTE Y FERTILIDAD EN VACAS F1 (CEBÚ-HOLSTEIN) SINCRONIZADAS CON IMPLANTES DE NORGESTOMET CON O SIN eCG Y EN AUSENCIA DE UN CUERPO LÚTEO.

5.1 RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el efecto del norgestomet en el recambio del folículo dominante (**RF**) y su efecto en la fertilidad se utilizaron 55 vacas Holstein/Cebú a las cuales se les aplicó simultáneamente un implante de norgestomet **iNg** y prostaglandina **PG** (día 0). El grupo NORG (n=28) recibió 1.8 mg de norgestomet el día 5 y el grupo Testigo (n= 27) no recibió tratamiento. El día 9 se retiró el implante, se realizó destete temporal por 72 h, además las vacas fueron divididas dentro de sus tratamientos para recibir (n=23) o no (n=27) 500 UI de eCG. Las vacas fueron inseminadas 12 h después del estro. El efecto del norgestomet y la etapa de desarrollo folicular (crecimiento ó meseta) en el **RF** se analizó por X^2 . El efecto del **RF** en el tiempo de presentación de estro y fertilidad se analizó por T de Student. El efecto de la eCG en el tamaño del folículo ovulatorio y tiempo de presentación del estro se analizó por T de Student. El día 0 y 1, 50 vacas presentaron regresión lútea en respuesta a la **PG**. En el grupo de NORG el 40% (10/25) de las vacas presentaron **RF** contra el 16% (4/25) del grupo Testigo ($P<0.05$). La eCG no tuvo efecto en el índice de crecimiento (1.68 ± 0.2 mm/día), tamaño del folículo ovulatorio (16.74 ± 0.6 mm) y tiempo de presentación del estro (37.92 ± 3.75 h) ($P>0.05$). No se encontró efecto del **RF** sobre el tiempo de presentación del estro (41.1 ± 5.33 h), ni sobre el índice de concepción (60%) ($P>0.05$). Sin embargo, la etapa de desarrollo folicular al momento del tratamiento con norgestomet influyó en la respuesta a éste, el 66.6% (6/9) de las vacas que se encontraban en etapa de meseta presentaron **RF** contra el 25% (4/16) de aquellas que se encontraban en etapa de crecimiento ($P=0.046$). Se concluye que la aplicación del norgestomet provocó el recambio del folículo dominante en vacas sincronizadas con implantes de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo. Además, la eCG no tuvo ningún efecto en las características del folículo ovulatorio ni en la presentación del estro.

Palabras clave: Norgestomet, Recambio folicular, eCG e índice de concepción.



5.2 INTRODUCCIÓN

Durante el ciclo estral se presentan de dos a tres ondas de desarrollo folicular y la ovulación se da cuando los niveles de progesterona disminuyen (Savio *et al.*, 1988). El recambio folicular durante el ciclo está mediado por la frecuencia de pulsos de LH que mantiene la secreción de progesterona luteal. Algunos sistemas de sincronización con progestágenos o progesterona, no son capaces de imitar un cuerpo lúteo funcional y así disminuir eficazmente la liberación de LH (Kojima *et al.*, 1990). En ausencia de un cuerpo lúteo, el incremento en la frecuencia de los pulsos de LH prolonga el crecimiento del folículo dominante (Persistencia folicular) (Sirois y Fortune, 1990) y reduce la fertilidad (Savio *et al.*, 1993; Stock y Fortune, 1993). Se han desarrollado varios modelos para la eliminación de un FDP en la sincronización de estros y así mejorar la fertilidad. Una de las alternativas es provocar la ovulación del FDP con la aplicación de hCG (De Renis *et al.*, 1999) o GnRH (Roche *et al.*, 1999). Niasari-Naslaji *et al.* (1996) aplicaron 500 UI de hCG para eliminar el FDP y provocaron la ovulación en 14/14 animales permitiendo la ovulación de un folículo de nuevo reclutamiento en un protocolo de sincronización de estros con norgestomet. Sin embargo, la eliminación del FDP con estos protocolos necesitan de la aplicación de una prostaglandina al momento del retiro del progestágeno ya que se forma un CL accesorio (Niasari-Naslaji, 1996; De Renis *et al.*, 1999; Roche *et al.*, 1999;).

También se han desarrollado varios modelos para la eliminación del folículo dominante persistente en la sincronización de estros con base en progestágenos (Savio *et al.*, 1993) y progesterona (Anderson y Day, 1994; McDowell *et al.*, 1998). Estos inducen la regresión del folículo dominante persistente por el decremento en la frecuencia de pulsos de LH (Bergfeld *et al.*, 1995) Mata *et al.*, (2001) aplicaron 3 mg de norgestomet im 5 días después de poner el implante y lograron eliminar el folículo dominante en 6 de 8 vaquillas Holstein. La respuesta del ganado Cebú o sus cruza a la sincronización o inducción del estro es más variable a la obtenida

en razas Holstein, probablemente debido a diferencias en la dinámica folicular (Gutiérrez *et al.*, 1995).

La gonadotropina coriónica equina (eCG) se ha utilizado para inducir la ovulación y mejorar la fertilidad en los programas de sincronización con progestágenos. El índice de concepción con este tratamiento va de 14 a 62% a primer servicio (Singh, 1998; Páez *et al.*, 1999). La variación del índice de concepción obtenido depende del tipo de progestágeno, estado reproductivo, presencia de la cría, aplicación de estradiol al inicio del tratamiento, tipo racial e inseminación artificial (Tiempo fijo o a observación de calor). Se piensa que la eCG influye en las características del folículo ovulatorio, aunque no existe claridad de este efecto y de la forma en que lo consigue. Los objetivos de este trabajo fueron evaluar el efecto del norgestomet en el recambio del folículo dominante en vacas Holstein/Cebú sincronizadas con implantes de norgestomet y eCG, además de evaluar el efecto de la gonadotropina coriónica equina en las características del folículo ovulatorio y la presentación de estro en vacas sincronizadas con implantes de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo.

5.3 MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se llevó a cabo en el Centro Experimental de Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT) Rancho "El Clarín" de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, ubicado en el Km 5.5 carretera federal Martínez de la Torre-Tlapacoyan, municipio de Tlapacoyan Veracruz a 20° 3' de longitud Oeste a 151 m.s.n.m. El clima es cálido húmedo de tipo AF (m) (e) con una temperatura y precipitación media anual de 23.4° y 1840 mm.

5.3.1 Protocolo experimental

Se utilizaron 55 vacas Holstein/Cebú amamantando con más de 60 días posparto (84.6 ± 13.43 d), con un peso promedio de 470 kg y una condición corporal promedio de 2.4 (escala de 1 a 5; Widman *et al*, 1982). Todas las vacas se encontraban en producción y eran ordeñadas una vez al día. Durante el ordeño las vacas tenían acceso a melaza *ad libitum*. Después de ser ordeñadas las vacas amamantaron a sus crías por un periodo de 30 minutos, después fueron pasadas a un corral donde se les proporcionó 1 ½ kg de alimento balanceado con 18 % de proteína. Después las vacas fueron llevadas al potrero para pastorear en praderas con los pastos Insurgentes (*Brachiaria brizanta*), Señal (*Brachiaria decumbens*), Estrella de Africa (*Cynodon plectostachyus*) y la leguminosa Araquis (*Arachis pintoi*).

A todos los animales se les insertó un implante subcutáneo (día 0) en la parte externa de la oreja, el implante contiene 3 mg de norgestomet⁴ y permaneció *in situ* por 9 días. Se realizó ultrasonografía transrectal de los ovarios para determinar la presencia o ausencia de cuerpo lúteo. A los animales que presentaban cuerpo lúteo se les aplicó una dosis luteolítica de 15 mg de luprostiol⁵. A los animales que no sufrieron regresión del cuerpo lúteo a las 24 horas, recibieron una segunda dosis de prostaglandina (día 1). El modelo de la

⁴ Crestar® Laboratorios Intervet S A

⁵ Prosolvin Laboratorios Intervet®

aplicación de un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo se ha utilizado para estudiar la persistencia folicular, ya que se sabe que con este modelo se mantienen niveles subluteales de progesterona y se desarrolla un folículo dominante persistente (Sirois y Fortune, 1990; Stock y Fortune, 1993; Savio *et al* , 1993).

En el día 5 las vacas fueron divididas al azar en 2 grupos para recibir 1.8 mg de norgestomet líquido, grupo NORG (n=28) y el grupo Testigo (n= 27) que no recibió tratamiento. El día 9 se retiró el implante, se realizó un destete temporal por 72 h y las vacas fueron divididas dentro de sus tratamientos para recibir o no 500 UI de eCG.

Diariamente a partir de la inserción del implante y hasta la presentación del estro se realizó ultrasonografía de los ovarios. El método para examinar los ovarios fue el siguiente: a) se removieron las heces del recto; b) el transductor fue insertado dentro del recto protegido con un guante de palpación rectal con un gel elaborado con carboximetilcelulosa; c) se localizó el útero; d) se realizaron movimientos laterales para la localización de cada ovario, primero el ovario derecho y luego el izquierdo; e) cada ovario fue observado de dirección longitudinal desde su cara lateral a la porción medial y viceversa. Se tomó el diámetro del folículo dominante y los folículos subordinados, así mismo, se contó el número de folículos pequeños (≤ 4 mm) presentes en cada ovario. Las mediciones fueron determinadas usando la escala en mm que es provista por el ultrasonido. El diámetro tomado en la ultrasonografía representa solo la medida del antro folicular. Se tomó la localización relativa de cada folículo mayor a 4 mm y fueron registrados en una hoja de campo. Este procedimiento se realizó por una sola persona y permitió seguir los patrones de crecimiento y regresión individual de cada folículo, así como su localización dentro del ovario.

Se consideró como:

Folículo dominante persistente (FDP): al folículo que mantuvo su dominancia de la primera inspección ultrasonográfica hasta la aplicación del tratamiento o el retiro del implante

Recambio folicular (RF): cuando el folículo dominante persistente disminuyó de tamaño y fue alcanzado en diámetro y substituido como dominante por otro folículo.

Índice de crecimiento: se tomó como el cambio diario en el diámetro del folículo dominante desde que fue visible hasta que alcanzó su máximo.

Para evaluar el efecto del norgestomet en el tamaño del folículo dominante se dividieron los folículos en ≤ 9 ó ≥ 10 mm según la clasificación de Savio *et al.* (1988)

Se consideró que un folículo se encontraba en estado de crecimiento si entre el día 1 y el día 5 el folículo crecía ≥ 0.66 mm/día en promedio, tomando en cuenta que esto significa un crecimiento neto en ese periodo de 3.5 mm, siendo este superior al posible error en la estimación del diámetro (estimado en ± 1 mm). Si en cambio, el índice de crecimiento entre el día 1 y 5 fue de < 0.66 mm/día entonces se tomó como folículo en estado de meseta

Tiempo a recambio folicular (TRF): se tomó como el tiempo en días de la aplicación del norgestomet al momento en que el FD fue alcanzado ó superado en diámetro por un folículo de menor diámetro.

Tiempo de presentación de estro (TPE): se calculó de acuerdo a las horas transcurridas del retiro del implante a la presentación de estro.

Diámetro del folículo ovulatorio: se tomó como el diámetro máximo del folículo dominante al día de la presentación del estro.

Se colectó una muestra de sangre a todas las vacas en el día cero para determinar la concentración de progesterona, considerando niveles ≥ 1 ng como indicativo de la presencia de un cuerpo lúteo. Adicionalmente, a ocho vacas de cada grupo se les tomó una muestra de sangre diariamente entre los días 0 al 10, esto para confirmar que el modelo utilizado de la aplicación de una prostaglandina y un implante de norgestomet mantenía niveles subluteales de progesterona en sangre. Las muestras de sangre se colectaron utilizando agujas del 20 por 1 ½ en tubos de 10 ml al vacío (Vacutainer) por la vena coccígea. Las muestras de sangre fueron mantenidas en refrigeración hasta su centrifugación y fueron

centrifugadas a 2500 xg para la separación del suero, el mismo que fue recuperado en alícuotas de 3 ml. El suero se conservó a -4°C hasta determinar las concentraciones de P_4 por radioinmunoanálisis de fase sólida (RIA) en el laboratorio de la FMVZ, UNAM.

A partir de la mañana del retiro del implante se llevó a cabo el destete temporal de la cría por 72 h. La detección de estro se realizó por observación continua a partir de las 24 h de retirado el implante hasta las 120 h. Para facilitar la detección de estro los animales se les asignó un número progresivo que fue pintado en la parte costal de cada vaca con pintura vinílica blanca. Las actividades fueron registradas en una hoja de campo. La inseminación artificial se llevó a cabo a las 12 horas de iniciado el estro y se utilizó semen de toros de fertilidad probada.

El diagnóstico de gestación se realizó por ultrasonografía en el día 40 después de la inseminación artificial.

El índice de concepción: se tomó como el número de vacas que fueron diagnosticadas como gestantes, entre número de inseminadas

5.3.2 Análisis estadístico

El efecto del norgestomet en el recambio folicular, presentación de estro y tasa de gestación fue analizada por χ^2 . El efecto de la eCG en el tamaño folicular y tiempo de presentación del estro fue evaluado por una T de Student. El efecto de la eCG sobre la tasa de gestación se analizó por χ^2 . Adicionalmente se analizó el efecto del recambio folicular sobre el tiempo de presentación de estro y fertilidad por T de Student y χ^2 . El efecto de la etapa de desarrollo folicular (crecimiento ó meseta) sobre el recambio folicular se analizó por χ^2

5.4 RESULTADOS

El día 1 y 2 del experimento 50 vacas presentaron regresión lútea corroborada por ultrasonografía. Sin embargo, cinco vacas que fueron eliminadas del estudio por no presentar regresión lútea. De las 50 vacas 22 (44%) presentaron concentraciones de progesterona >1 ng/ml indicativo de un cuerpo lúteo funcional y 28 (56%) presentaron concentraciones de $P_4 < 1$ ng/ml el día 0. En el grupo NORG el 25% (2/8) y en el grupo Testigo el 37.5% (3/8) de los animales muestreados tuvieron un cuerpo lúteo ya que presentaron niveles de progesterona >1 ng/ml el día cero antes de la aplicación de prostaglandina. Después de la aplicación de la prostaglandina (día 0) se presentó una disminución en los niveles de progesterona indicativo de la regresión lútea en las vacas muestreadas en los dos grupos. La aplicación del implante en ausencia de un CL mantuvo niveles promedio de 0.63 ± 0.32 ng/ml durante los nueve días del tratamiento en todos los animales muestreados (Figura 12).

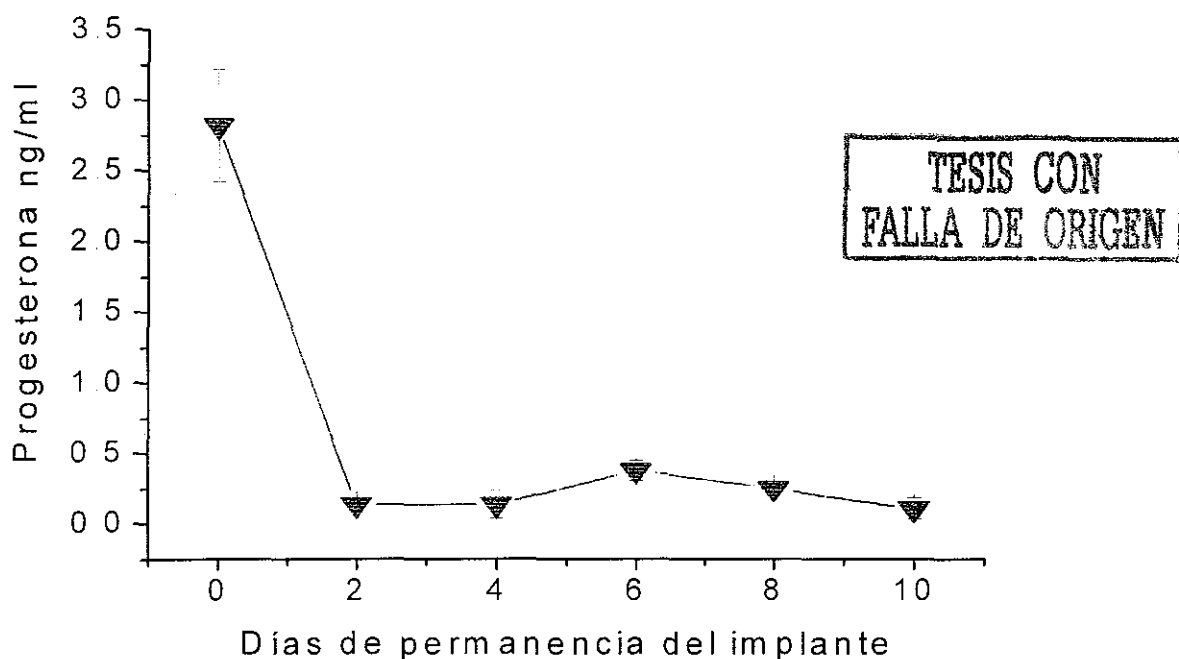


Figura 12. Concentraciones de progesterona en 16 vacas tratadas con un implante de norgestomet y 15 mg de luprostiol en el día 0 y hasta el día 10.

Al retiro del implante de norgestomet, 35 de 50 animales presentaron estro y 21 de 35 (60%) se diagnosticaron como gestantes al día 40 postinseminación.

En el grupo NORG (n=25) el folículo dominante que estaba presente en el día de la aplicación del implante (día 0) mantuvo su dominancia hasta la aplicación del tratamiento en el día 5. El diámetro promedio del folículo dominante en ambos grupos fue de 10.76 mm \pm 2.42 en el día 5. El 40% de las vacas (10/25) presentaron recambio del folículo dominante después de la aplicación del norgestomet mientras que en el grupo Testigo se presentó recambio folicular solo en el 16% (4/25) (P<0.05). El recambio folicular se presentó dos días después (36 \pm 8.19 h) de la aplicación del norgestomet. En la Figura 13 se muestra el diámetro de los folículos dominantes y subordinados en las vacas del grupo NORG que no presentaron recambio folicular (Figura 13 A) o que lo presentaron (Figura 13 B) después de la aplicación de 1.8 mg de norgestomet.

La aplicación del norgestomet en el día 5 no afectó la presentación del estro después del retiro del implante. En el grupo NORG presentaron estro 15/25 (60 %) de las vacas, mientras que en el grupo Testigo lo hicieron 20/25 (80 %) (P>0.05). De igual manera, no se encontró diferencia en la tasa de gestación en el día 40 entre el grupo NORG (10/21; 47.6%) y el grupo Testigo (11/21; 52.4%) (Cuadro 2). La media de TPE para el grupo de NORG fue de 41.89 \pm 5.02 y de 35.18 \pm 2.99 h para el grupo Testigo (P>0.05).

Cuadro 2. Porcentaje de vacas que presentaron recambio folicular, estro y porcentaje de fertilidad en vacas tratadas o no con 1.8 mg de norgestomet im en el día 5 de un programa de sincronización con un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo.

| Grupo | No | Recambio Folicular % | Presentación de estro % | Índice de Concepción |
|---------|----|----------------------|-------------------------|----------------------------|
| NORG | 25 | 40 (10) ^a | 60 (15) ^a | 47.6 (10/21) ^{a*} |
| Testigo | 25 | 16 (4) ^b | 80 (20) ^a | 52.4 (11/21) ^{a*} |

Literales distintas en la misma columna, indica diferencia significativa (P< 0.05).

* De las 50 vacas, 21 quedaron gestantes de 35 que presentaron estro

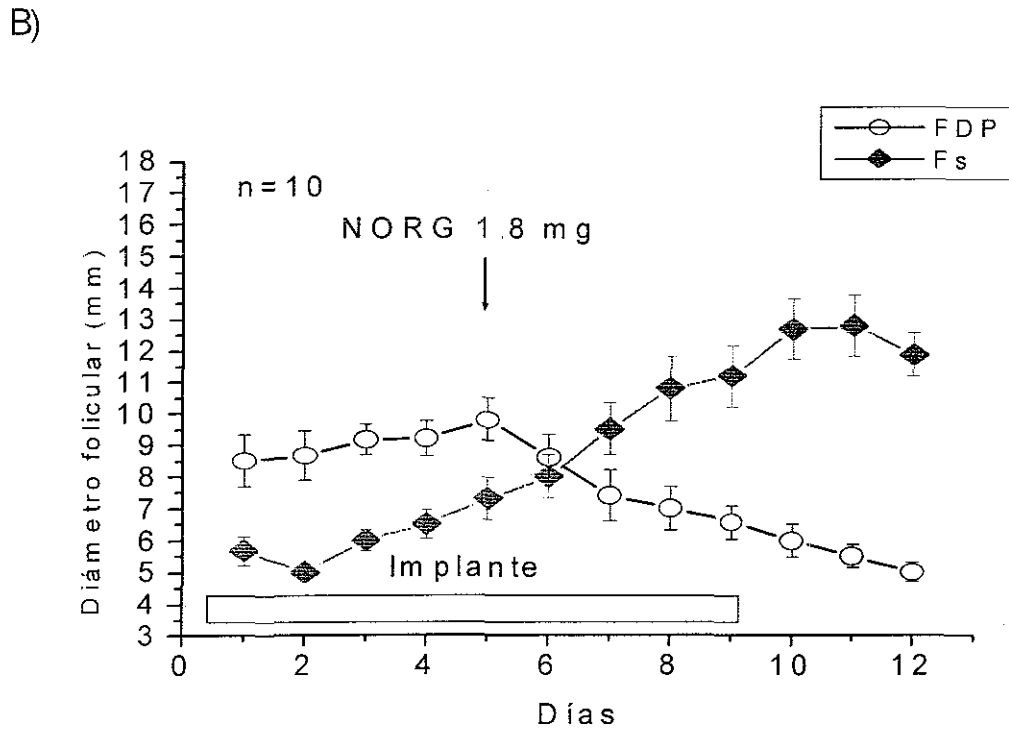
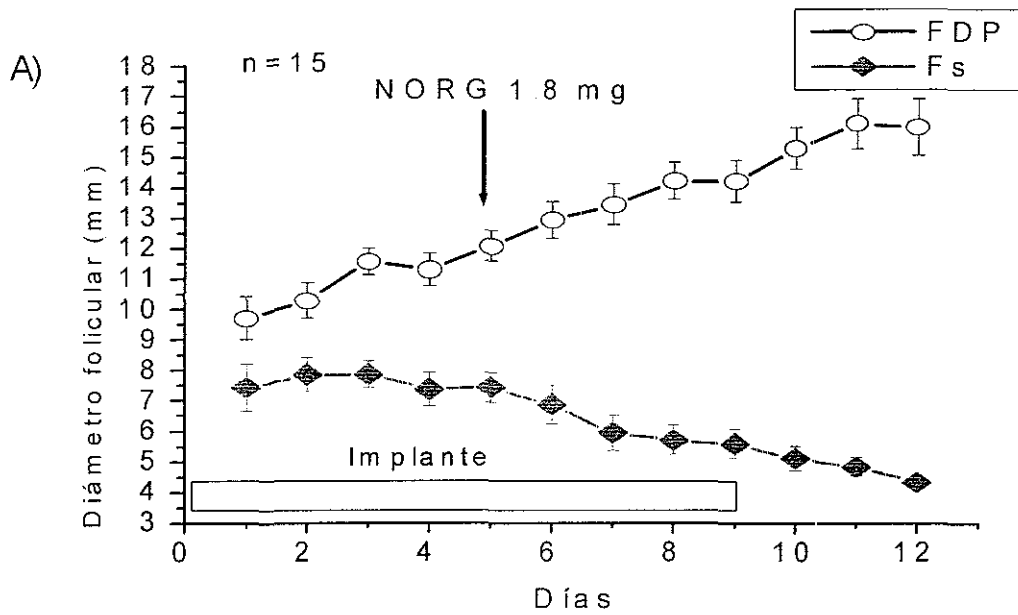


Figura 13. Diámetro del folículo dominante persistente y subordinado en vacas sincronizadas con un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo. A) Vacas que recibieron 1.8 mg de norgestomet el día 5 y no presentaron recambio folicular. B) Vacas que recibieron 1.8 mg de norgestomet el día 5 y presentaron recambio folicular. NORG Norgestomet de aplicación intramuscular FDP Folículo dominante persistente Fs Folículo subordinado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el día del retiro del implante se aleatorizaron las 50 vacas dentro de su grupo original (NORG o Testigo) para recibir o no 500 UI de eCG. No se encontró efecto de la eCG ($P > 0.05$) en el índice de crecimiento del folículo dominante (eCG, 1.73 ± 0.2 vs. No eCG 1.63 ± 0.2 mm/día). El diámetro del folículo ovulatorio el día de la presentación de estro no fue afectado por la aplicación de eCG ($P > 0.05$). Igualmente, el número de vacas que presentaron estro no varió entre las que recibieron ($n=17$) o no recibieron ($n=18$) eCG al momento del retiro del implante ($P > 0.05$) (Cuadro 3). No se encontró diferencia ($P > 0.05$) en la respuesta a eCG entre las vacas que tuvieron un cuerpo lúteo funcional previo al estudio (concentraciones de $P_4 > 1$ ng/ml)

El índice de concepción no fue mejorado por ($P > 0.05$) por la aplicación de eCG, así, de las vacas tratadas con eCG ($n=23$) quedaron gestantes 9/21 (42.8%) y 12/21 (47.2%) de las vacas que no recibieron eCG ($n=27$).

Cuadro 3. Índice de crecimiento del folículo dominante (IC) de la aplicación de eCG a la presentación de estro, diámetro del folículo ovulatorio (DFO) el día de la presentación de estro y tiempo de presentación de estro (TPE) en vacas que presentaron estro ($n=35$) después de la sincronización con un implante de norgestomet y fueron tratadas o no con 500 UI de eCG

| Grupos | No. | IC | DFO | TPE | TPE |
|--------|-----|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| | | Media (mm) | Media (mm) | Media (h) | Varianza (h^2) |
| No eCG | 18 | 1.63 ± 0.20 | 16.44 ± 0.4 | 39.37 ± 3.1 | 213.55 |
| eCG | 17 | 1.73 ± 0.27 | 17.05 ± 0.8 | 36.47 ± 4.4 | 335.34 |

No se encontró diferencia significativa entre grupos ($P > 0.05$).

En el Cuadro 4 se muestra el tiempo que transcurrió entre el retiro del implante en las vacas que presentaron recambio folicular por efecto del norgestomet y las que no lo presentaron.

De las 10 vacas que presentaron recambio folicular por efecto del norgestomet, dos de ellas no presentaron estro y quedaron fuera del análisis de

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

tiempo de presentación de estro (TPE). No se encontró diferencia en el TPE entre las vacas que recambiaron y presentaron estro (n=8) y las que no recambiaron y presentaron estro (n=27). Sin embargo, en la prueba de T de Student para la dispersión del tiempo de presentación de estro, mostró diferencia significativa entre grupos (P= 0.03) y las vacas sin recambio folicular presentaron estro de manera más sincrónica y compacta que las vacas en las que hubo recambio folicular.

Cuadro 4. Tiempo y dispersión de la presentación de estro en vacas que después de la aplicación de norgestomet presentaron o no recambio del folículo dominante.

| | No. Animales | Medias y EE | Varianza |
|---------------------|--------------|--------------------------|---------------------|
| Sin recambio | 27 | 35.32± 2.54 ^a | 174.40 ^a |
| Con recambio | 8 | 46.88± 8.13 ^a | 529.90 ^b |

Literales distintas en la misma columna indican diferencia significativa (P< 0.05).

No se encontró efecto de la presencia de folículos ≤ 9 ó ≥ 10 mm en el recambio folicular en respuesta a la inyección de norgestomet (P> 0.05). El 50% (n=5) de los animales del grupo NORG y que presentaron recambio folicular el diámetro del folículo dominante fue ≤ 9 mm y el otro 50% (n=5) presentaron un folículo ≥ 10 mm al momento de la aplicación del norgestomet (día 5). Sin embargo, de los 10 animales que presentaron recambio folicular por efecto del norgestomet, se encontró efecto del estado de crecimiento del folículo dominante sobre la respuesta al norgestomet, así el 66.6% (6/9) de las vacas que se encontraban en etapa de meseta presentaron recambio folicular mientras que el 25% (4/16) que se encontraban en etapa de crecimiento presentaron recambio folicular. (P=0.046) (Figura 14). El índice de concepción no fue afectado por el recambio folicular, ya que el 75% (6/8) de las vacas que presentaron recambio folicular y fueron inseminadas quedaron gestantes, contra el 55.55% (15/27) de las que no recambiaron (P>0.05).

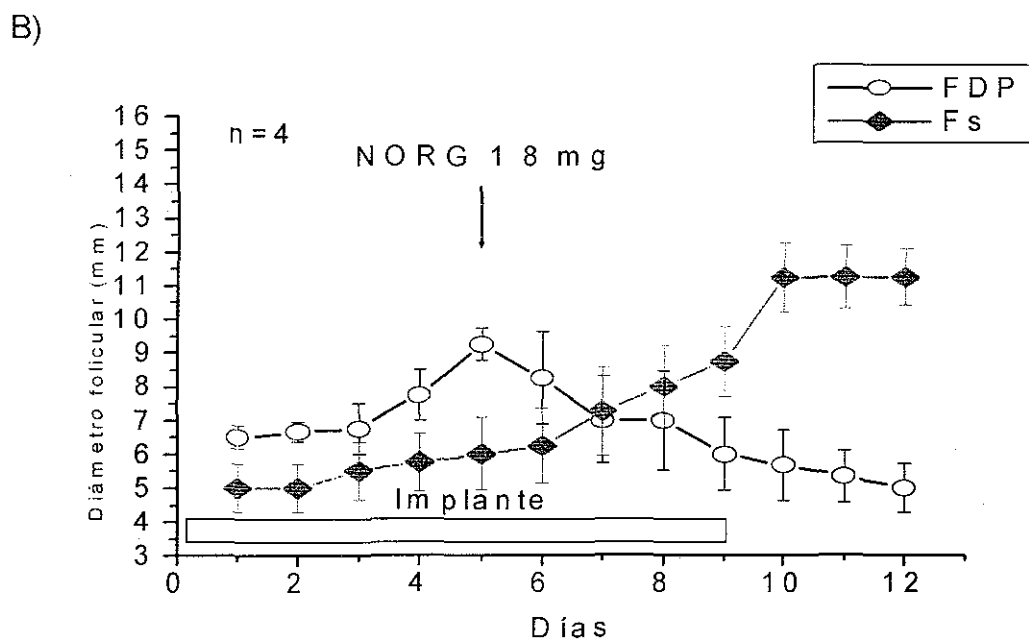
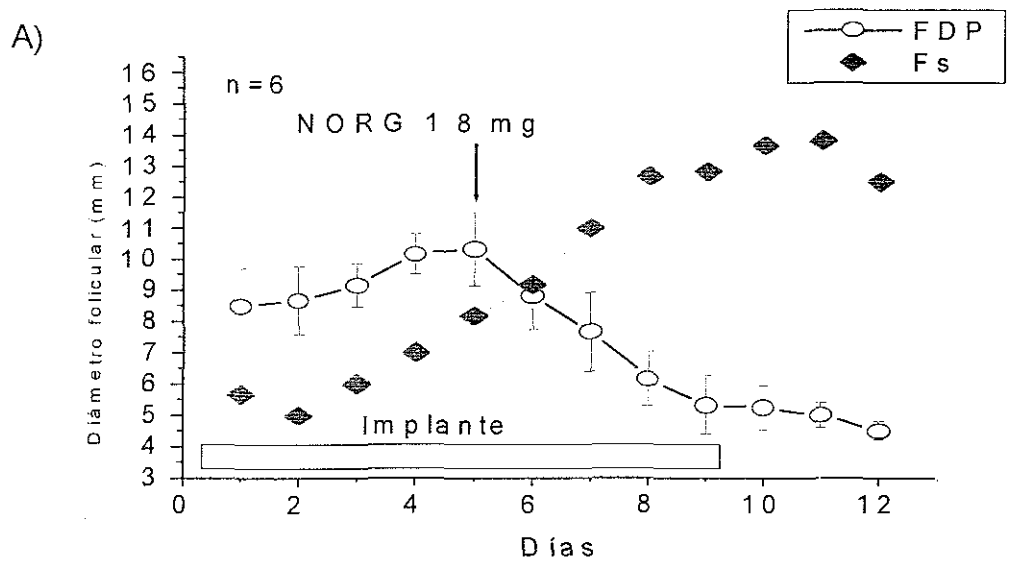


Figura 14. Diámetro del folículo dominante persistente y subordinado en vacas sincronizadas con un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo. A) Las vacas cuyo folículo estaba en etapa de meseta al momento de la aplicación de 18 mg de norgestomet y presentaron recambio folicular. Por el contrario, las vacas cuyo folículo estaba en etapa de crecimiento y tuvieron recambio folicular después del tratamiento con 18 mg de norgestomet (B). NORG Norgestomet de aplicación intramuscular, FDP Folículo dominante persistente, Fs Folículo subordinado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.5 DISCUSION

En este estudio se utilizó el modelo para producir folículos dominantes persistentes con la aplicación de un implante de norgestomet y prostaglandina. Esto provocó una caída de los niveles de progesterona y se mantuvieron en niveles subluteales durante los nueve días de tratamiento en las vacas muestreadas.

El tratamiento con progestágenos para la sincronización de estros en ausencia de un cuerpo lúteo resultan en el desarrollo de un folículo dominante persistente. Este modelo en el que se mantienen niveles subluteales de progesterona se han utilizado para estudiar la persistencia folicular ya permite un incremento en la frecuencia de pulsos de LH y con esto el desarrollo de un folículo dominante persistente (Fike *et al.*, 1997b; Cavalieri *et al.*, 1998a; Mihm *et al.*, 1994) Los datos del presente trabajo son consistentes con los encontrados por otros autores en modelos similares para estudiar la persistencia folicular (Austin *et al.*, 1999; Cavalieri *et al.*, 1998a) Aunque en este trabajo no se midieron las concentraciones de LH, se ha reportado que con niveles subluteales de progesterona en sangre se aumenta la frecuencia de pulsos de LH (Sánchez *et al.*, 1993). Stock y Fortune, (1993) encontraron que hay una correlación negativa entre las concentraciones de progesterona y los niveles de LH. También está demostrado que el desarrollo del folículo dominante persistente ocurre consistentemente con el incremento en la frecuencia de pulsos de LH (Sirois y Fortune, 1990; Savio *et al.*, 1993).

En el presente trabajo en 46 de 50 vacas, el folículo dominante presente en el día cero siguió desarrollándose y mantuvo su dominancia hasta el día del tratamiento o hasta el día del retiro del implante en las que no fueron tratadas. El modelo de persistencia folicular está ya muy bien caracterizado por su alta cantidad de animales que presentan un folículo dominante persistente y por ello ha sido utilizado para el estudio de la dominancia folicular (Austin *et al.*, 1999; Fike *et al.*, 1997b; Rajamahendran y Manikkam, 1994) Sin embargo, la persistencia

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

folicular no se presenta en todos los casos aun cuando hay niveles subluteales de progesterona en sangre. En un trabajo de McDowell *et al* (1998) 4 de 19 animales no presentaron un folículo dominante persistente cuando se aplicó un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo. En un trabajo de Anderson y Day, (1994) al sincronizar con 0.5 mg de MGA (0.5 mg/vaca) en ausencia de cuerpo lúteo, no se desarrolló un folículo dominante persistente en 3 de 13 animales.

La aplicación de 1.8 mg de norgestomet im 5 días después de la inserción del implante con progestágeno provocó el recambio del folículo dominante en el 40% de los casos. Los resultados del presente trabajo son consistentes con los encontrados por Mata *et al.* (2001) quienes al aplicar 3 mg de norgestomet im lograron causar el recambio del 75% de los FDP en un modelo igual al del presente trabajo. Similarmente, Savio *et al* (1993) y Fike *et al.* (1997b) obtuvieron un 100% de recambio folicular al aplicar 1 y 3 implantes con 6 mg de norgestomet. En el presente trabajo, la menor tasa de recambio folicular puede deberse a una menor dosis de norgestomet utilizada (1.8 mg) que probablemente no fue suficiente para suprimir la frecuencia de pulsos de LH y así causar el recambio del folículo dominante en todos los casos. Aunque en este trabajo no medimos LH, creemos que la regresión del folículo dominante como en otros trabajos, es causada por la inhibición de la liberación de LH y al bajar la frecuencia de pulsos de LH se presentó el recambio folicular (Rajamahendran y Manikan, 1994; McDowell *et al.*, 1998). Igualmente, el norgestomet en implantes se ha utilizado para causar la atresia del FDP al disminuir la frecuencia de pulsos de LH. Savio *et al.* (1993) utilizaron un implante nuevo de norgestomet, en un modelo de persistencia folicular y lograron causar la atresia del FDP. En un trabajo similar Fike *et al.* (1997b) provocaron la atresia del FDP al insertar 3 implantes auriculares con 6 mg de norgestomet en el día 7 de un modelo de sincronización con un implante de norgestomet por 9 días. Estos trabajos indican que la aplicación de norgestomet en cualquiera de las presentaciones es efectiva para estimular la atresia del FDP en modelos de sincronización con progestágenos en ausencia de un cuerpo lúteo

Se han utilizado otros tratamientos para causar la atresia del FDP. Savio *et al.* (1993) utilizaron un dispositivo de liberación de progesterona (CIDIR) en el día 8 de un modelo de persistencia folicular y este tratamiento causó la atresia en el 100% de los FDP. Cavalieri *et al.* (1998b) con la aplicación de 100 mg de progesterona provocaron el recambio del FDP en el día 10 de un programa de sincronización con progestágenos en ausencia de un cuerpo lúteo. McDowell *et al.* (1998) determinaron el tiempo necesario de niveles altos de progesterona en sangre para causar la atresia del FDP y encontraron que el aplicar un dispositivo de liberación de progesterona (PRID) por 24 horas es suficiente para suprimir la frecuencia de pulsos de LH y provocar el recambio del FDP en el 80% de las vacas tratadas. En general tanto la progesterona como los progestágenos son efectivos para causar el recambio de folículos dominantes persistentes en modelos de sincronización de estros con progestágenos a excepción del MGA (Kojima *et al.*, 1993)

El tiempo de recambio folicular ocurrió 36 h después de la aplicación del norgestomet en el presente trabajo. En otra investigación, McDowell *et al.* (1998) después de la aplicación de un nuevo CIDIR el FDP tenía 15 mm de diámetro y el recambio folicular se presentó a las 72 h. Anderson y Day (1994) después de la aplicación de 200 mg de progesterona, observaron el recambio folicular a las 192 h, y el promedio del folículo dominante fue de 21 mm. Savio *et al.* (1993) al aplicar un implante nuevo de norgestomet en el día 18 del tratamiento con progestágenos en ausencia de un cuerpo lúteo, obtuvieron recambio folicular a las 144 h y el promedio del folículo al momento del tratamiento fue de 25 mm. A diferencia de los trabajos anteriores el tiempo de recambio folicular en nuestro trabajo se presentó más rápido posiblemente porque el folículo dominante tenía en promedio $10.76 \text{ mm} \pm 2.42 \text{ mm}$ el día de la aplicación del norgestomet im, así el folículo subordinado alcanzó mucho más rápido al folículo dominante persistente

Aunque no existe consenso del efecto que tiene la eCG en los tratamientos de sincronización, se argumenta que estimula la ovulación en animales no ciclando y la presentación de estro más compactos (Driancourt, 2000). Sin

embargo, en nuestro trabajo la aplicación de eCG al final del tratamiento con progestágenos no estimuló el crecimiento del folículo ovulatorio (1.73 vs 1.63 mm/día), ni el diámetro del mismo el día de la presentación de estro. A nuestro saber, no existen trabajos donde se han medido las características del folículo ovulatorio con la aplicación de eCG en programas de sincronización con progestágenos. Otros autores mencionan que la eCG solo estimula el desarrollo de folículos pequeños (Sheldon y Dobson, 2000). Monniaux *et al.* (1984) aplicaron 2000 UI de eCG y encontraron que su aplicación incrementa el número de los folículos preantrales. Otro efecto que encontraron de la eCG es que reduce el índice de atresia de los folículos antrales. Al parecer la eCG solo actúa como un agente superovulatorio aumentando el número de folículos primarios que entran en la fase de crecimiento protegiendo a los folículos antrales de sufrir atresia (Moor *et al.*, 1984) y no actuando sobre el crecimiento del folículo ovulatorio.

Otra de las características que se le atribuyen a la eCG es que estimula la presentación de estro (Drainacurt, 2000). Sin embargo, en el presente trabajo la eCG no afectó el porcentaje de animales en estro (48.5 vs 51.42 %). Sánchez *et al.* (2001) no encontró diferencia en la presentación del estro cuando aplicó 250 UI de eCG en un programa de sincronización con progesterona (CIDIR). Igualmente, Pedroso y Roller, (1997) no encontraron diferencias en la presentación del estro al aplicar 250, 500 y 750 UI de eCG en un programa de sincronización con progestágenos. Kastelic *et al.* (1999) encontraron diferencia en la presentación del estro entre las vacas que se les aplicó 500 UI de eCG (75%) en comparación a las que no recibieron (44%). Sin embargo en este trabajo al principio del tratamiento se aplicó valerato de estradiol (VE), es por esto que la presentación de estro no puede ser explicada por la aplicación de eCG ya que el VE puede inducir la presentación de estro sin la ovulación (Larson y Kiracofe *et al.*, 1995).

Como la eCG tiene efecto de FSH y LH (Ungerfeld, 1998), se ha utilizado en programas de superovulación en bovinos (Wang *et al.*, 1995) y ovinos (Bland *et al.*, 1991). La eCG por su larga vida media se ha utilizado en una sola aplicación (Wang *et al.*, 1995). También se ha utilizado al final del tratamiento con

progestágenos con el fin de mejorar la respuesta en la presentación del estro (Kerr *et al.*, 1991; Páez *et al.*, 1999) y mejorar la fertilidad en vacas en anestro (Narasimha *et al.*, 1996). En nuestro trabajo el 44% de las vacas tuvieron un cuerpo lúteo y se puede especular que era el número de vacas que se encontraban ciclando el día de la inserción del implante de norgestomet. No se encontró diferencia en la presentación de estro entre la aplicación o no de eCG. Tampoco se observó diferencia en la presentación del estro de las vacas del grupo de eCG que tuvieron un cuerpo lúteo. Por lo anterior no se puede inferir que la eCG estimuló la presentación del estro de mejor manera en las vacas que se encontraban en anestro en comparación de las que se encontraban ciclando al inicio del tratamiento.

En cuanto al tiempo en que se presenta el estro después de retirar el implante y al aplicar eCG fue de 36.47 h y es similar a lo encontrado por Sánchez *et al.* (2001) (37.40 h). Sin embargo, en este trabajo ni en el de Sánchez *et al.* (2001) se encontraron diferencias significativas en el tiempo de presentación de estros debida al tratamiento con eCG.

La eCG ha sido utilizada con el propósito de mejorar la fertilidad en vacas sincronizadas con progestágenos (Kerr *et al.*, 1990; Páez *et al.*, 1999). En nuestro trabajo la aplicación de eCG no mejoró el índice de concepción entre los grupos ($P > 0.05$). Kastelic *et al.* (1999) no encontraron diferencia en la fertilidad al aplicar eCG (82%) o no (67.8%) en un programa de sincronización con norgestomet.

Cuando se analizó el tiempo de presentación del estro en animales que tuvieron o no recambio folicular no se observó efecto de éste. Sin embargo, la dispersión de presentación de estro fue mayor en las vacas que presentaron recambio folicular. Esto puede interpretarse que en vacas que no tuvieron recambio folicular ya tenían un folículo completamente desarrollado y maduro al momento de retirar el implante, mientras que aquellas vacas que tuvieron recambio folicular el folículo presente estaba en estadios de desarrollo temprano y tardaron más tiempo en madurar el folículo. Estos datos fueron consistentes con los de Mata *et al.* (2001) que al aplicar 3 mg de norgestomet para atresiar al FDP,

encontró una mayor dispersión en el tiempo de presentación de estro comparado con el grupo testigo.

Se sabe que la persistencia folicular altera de forma negativa la fertilidad (Stock y Fortune, 1993; Anderson y Day, 1994) por las grandes cantidades de 17β estradiol secretadas por el FDP que alteran el ambiente oviductual (Binelli *et al.*, 1999) y producen alteraciones en el oocito (Borchert *et al.*, 1999). Fike *et al.* (1997b), Anderson y Day (1994) y Mihm *et al.* (1994) han encontrado que la fertilidad se mejora después de provocar el recambio del FDP con la aplicación de progestágenos o progesterona. Mihm *et al.* (1994) determinaron que el periodo de dominancia folicular que puede afectar la fertilidad es de 10 días. En el presente trabajo, no se encontró efecto del recambio folicular sobre la fertilidad. Austin *et al.* (1999) midieron la fertilidad después de controlar la dominancia folicular por 2, 4, 6, 8, 10 y 12 días con un CIDIR en ausencia de un cuerpo lúteo y encontraron que la fertilidad se disminuye entre un 10 a un 25% cuando el folículo persiste por 2 y 9 días y entre 35 a un 75% si el folículo persiste por 10 a 12 días. Inferimos que el periodo de dominancia del FDP en el presente trabajo no afectó la fertilidad ya que los folículos se encontraban en distintas etapas de desarrollo y que no fueron suficientes los 9 días de dominancia folicular para que alteraran la fertilidad.

En el presente trabajo encontramos diferencia significativa del efecto del estado de crecimiento del folículo dominante persistente (meseta o crecimiento) sobre la respuesta a la inyección de norgestomet. La aplicación del norgestomet causó el recambio de una mayor proporción a los folículos en etapa de meseta (66%) en comparación con la etapa de crecimiento (25%). Esto fue similar a lo encontrado por Cavalieri *et al.* (1998) en un modelo de persistencia folicular de 18 días, provocaron el recambio del FDP de mejor manera en los folículos en etapa de meseta (90.5%) que los que se encontraban en etapa de crecimiento (14.13%) mediante la aplicación de un CIDIR. La respuesta en el recambio de los folículos dominantes al tratamiento con norgestomet, tal vez pueda ser el número de receptores de LH presentes en los folículos y la dependencia de estos folículos a LH para seguir desarrollándose. Rajamahendran

y Manikan (1994) encontraron que durante los estados tempranos de crecimiento, los folículos son menos dependientes de LH para sobrevivir y entonces serán menos dependientes o susceptibles a los tratamientos agudos con progesterona, los cuales reducen la frecuencia de pulsos de LH. Estos resultados junto con los del presente trabajo infieren que el estado de crecimiento folicular puede influir la respuesta al tratamiento con progesterona y progestágenos para provocar el recombio del FDP.

CAPITULO 6. CONCLUSIONES

1. La aplicación de líquido folicular equino estimula el recambio folicular en vacas Holstein con un folículo dominante persistente sincronizadas con un implante de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo, sin embargo, no se puede considerar como una alternativa ya que puede causar reacciones adversas después de su aplicación

2. La aplicación de extracto ovárico suprime el desarrollo folicular cuando es aplicado por 5 días en vacas Holstein.

3. La aplicación de benzoato de estradiol estimula el recambio folicular por causar la ovulación del folículo dominante persistente en programas de sincronización con progestágenos en vacas Holstein.

4. La aplicación de norgestomet provocó recambio del folículo dominante persistente en vacas Cebú/Holstein sincronizadas con implantes de norgestomet en ausencia de un cuerpo lúteo

5. La aplicación de 1.8 mg de norgestomet es mucho más efectiva cuando se aplica en folículos en etapa de meseta que en etapa de crecimiento

6. La eCG no tuvo ningún efecto en las características del folículo ovulatorio ni en la presentación del estro en vacas sincronizadas con norgestomet en vacas Cebú/Holstein.

CAPITULO 7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, G.P., Matteri, R.L., Kastelic, J.P., Ko, J.C.H. y Ginther, O.J. 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 94: 177-188.
- Amstrong, D.G., Baxter, G., Gutierrez, C.G., Hogg, C.O., Glazyrin, A.L., Cambell, B.K., Bramley, T.A., Webb, R. 1998. Insuline like grow factor binding protein 2 and 4 messenger ribonucleic acid expresion in bovine ovarian follicles: Effect of gonadotropins and developmental status. *Endocrinology* 139: 2146-2154
- Anderson, L.H. y Day, M.L. 1994. Acute progesterone administration regresses persistent dominant follicle and improves fertility of cattle in which estrus was synchronized with melengestrol acetate. *J. Anim. Sci.* 72 (11): 2955-2961.
- Anta, E., Rivera, A., Galina, C., Porras, A. y Zarco, L. 1989. Análisis de la información publicada en México sobre eficiencia reproductiva de los bovinos 2. Parámetros Reproductivos. *Vet. Mex.* 20.
- Armstrong, D.T. and Evans, G. 1983. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology*. 19: 31-42.
- Austin, E.J., Mihm, M., Ryan, M.P., Willians, D.H. y Roche, J.F. 1999. Effect of duration of dominance of the ovulatory follicle on onset of estrus and fertility in heifers. *J. Anim. Sci.* 77 (8): 2219-2226.
- Baird, D.T., Cambell, B.K., Mann, G.E. y McNeilly, A.S. 1991. Inhibina and oestradiol in the control de FSH in the sheep. *J. Reprod. Fertil.* 43 Suppl: 125-128.
- Bergfelt, R.D., Plata Madrid, H. y Ginther, J.O. 1993. Counteraction of the follicular inhibitory effect of follicular fluid by administration of FSH in heifers. *Can. J. Anim. Sci.* 74:633-639
- Bergfeld, E.G.M., Kojima, F.N., Cupp, A.S., Wehrman, M.E., Peters, K.E., Mariscal, V., Sanchez, T. Y kinder, J.E. 1996. Changing dose of progesterone results in sudden changes in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of 17 α estradiol in bovine females. *Biol. Reprod.* 54: 546-553.

Bharat, B., Aggarwal., Susan W.F., Papkof, H. y Seidel, E. Jr 1980. Biochemical properties of equine chorionic gonadotropin from two different pools of pregnant mare sera. *Biol. Reprod.* 23: 570-576.

Binelli, M., Hampton, J., Buhi, C.W. and Thatcher, W.W 1999. Persistent dominant follicle alters pattern of oviductal secretory proteins from cows at estrus. *Biol. Reprod.* 61: 127-134.

Bland, M.P., Goulding, D. y Roche, J.F. 1991. Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology* 35:1-5.

Bo, G.A., Adams, G.P., Caccia, M., Tributo, H. y Mapletoft, R.J. 1994. Follicular wave dynamics after estradiol- β treatment of heifers with or without a progesterone implant. *Theriogenology*. 41: 1555-1569.

Borchet, K. M., Farin, C.E. and Washburn, S.P. 1999. Effect of estrus synchronization with norgestomet on the integrity of oocytes from persistent follicles in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 77: 2742- 2748.

Bossis, I., Wettemann R.P., Welty S.D., Vizcarra J.A., Spicer L.J. y M.G. Diskin. 1999. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: Ovarian and endocrine function preceding cessation of ovulation. *J. Anim. Sci.* 77: 1536-1546.

Breuel, K.F., Lewis, P.E., Schrick, F.N., Lishman A.W., Inskeep, E.K. y Butcher R.L. 1993. Factors affecting fertility in the postpartum cow: Role of the oocyte and follicle in conception rate. *Biol. Reprod.* 49:214-220.

Brink, J.T. and Kiracofe 1988. Effect of estrous cycle stage at synchronmate B treatment on conception and time to estrus in cattle. *Theriogenology* 29 : 2: 513-518.

Britt, J.S. y Gaska, J. 1998. Comparison of two estrus synchronization programs in large, confinement- housed dairy herd. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 212 (2):210-212.

Bruce D.M. y Nazario P. 1998. Control de la foliculogenesis bovina por factores endocrinos y paracrinis. Centre de Recerche in Reproducci3n Animal. Memorias del Congreso Internacional de reproducci3n Bovina.

Burke, C R., Mihm, M., Macmillan, K.L y Roche, J.F. 1994. Some effects of prematurely elevated concentrations of progesterone on luteal and follicular characteristics during the estrous cycle in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 35: 27-39.

Burke, C R., M.L. Day., C.R. Bunt, y K.L. Macmillan. 2000. Use a small dose of estradiol benzoate during diestrus to synchronize development of the ovulatory follicle in cattle. *J. Anim. Sci.* 78: 145- 151.

Butnev, V Y., Gotschall, R R., Baker, V.L y Bousfield, G.R. 1995. Equine CG forms with different receptor binding activities. *Biol. Reprod.* 52 (Suppl):74.

Cambell, B K., Picton, H.M., Mann, G.E., Mc Neilly A.S and Baird, D.T. 1991. Effect of steroid and inhibin-free ovine follicular fluid on ovarian follicles and ovarian hormone secretion. *J. Reprod. Fertil.* 93: 81-96

Campfield. L A., Smith, F.J., Guisez, Y., Devos, R y Burn, P. 1995. Recombinant mouse OB protein: Evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*: 269: 546-549. (Medline)

Carrol, R S., Corrigan, A.Z., Gharib, S D., Vale, W Y y Chin, W W. 1989. Inhibin, activin, and follistatin: Regulation of follicle-stimulation hormone messenger ribonucleic acid levels. *Molec. Endocrinol.* 3: 1969-1976.

Cavalieri, J., Kinder, J.E y Fitzpatrick, L A. 1998a. Effect of acute treatment with progesterone on the timing and synchrony of ovulation in *Bos indicus* heifers treated with a norgestomet implant for 17 days. *Theriogenology*. 112 (2): 249-58.

Cavalieri, J., Coleman, C., Kinder, J.E y Fitzpatrick, L A. 1998b. Comparison of three methods of acute administration of progesterone on ovarian follicular development and the timing and synchrony of ovulation in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*. 49 (7):1331-43.

Chang, C H., Gimenez, T y Henricks, D.M. 1981. Modulation of reproductive hormones by suckling and exogenous gonadal hormones in young beef postpartum. *J. Reprod. Fertil.* 63: 31-38.

Christakos, S., y Bahl, O. 1979. Pregnant Mare Serum Gonadotropin. Purification and physicochemical, biological, and immunological characterization. *J. Biol. Chem.* 54: 4253-4261

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Coleman, D.L. 1978. Obese and diabetes: Two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 14: 141-148.
- Connor, H.C., Houghton, P.L., Lemenager, R.P., Malven, P.V., Parfet, J.R. and Moss, G.E. 1990. Effect of dietary energy, body condition and calf removal on pituitary gonadotropins, gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and hypothalamic opioids in beef cows. *Domest. Anim. Endocrinol.* 7: 403-411.
- Crowe, M.A., Goulding, D., Baguisi, A., Boland, M.P. y Roche, J.F. 1993. Induced ovulation of the first postpartum dominant follicle in beef suckled cows using a GnRH analogue. *J. Reprod. Fertl.* 99: 551-555.
- Crowe, M.A., Padmanabhan, V., Mihm, M., Beitsins, I.Z. y Roche, J.F. 1998. Resumption of follicular waves in beef cows is not associated with periparturient changes in follicle-stimulating hormone heterogeneity despite major changes in steroid and luteinizing hormone concentration. *Biol. Reprod.* 58: 1445-1450.
- De Kretser, D.M., y Robertson, D.M. 1989. The isolation and physiology of inhibin and related proteins. *Biol. Reprod.* 40: 33-47.
- De la Sota, R.L., Simmen, F.A., Diaz, T. y Thacher, W.W. 1996. Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. *Biol. Reprod.* 55: 803-812.
- De Renis, F., Allegri, M. y Seidel, G.E. Jr. 1999. Estrus synchronization and fertility in postpartum dairy cattle after administration of human chorionic gonadotrophin (HCG) and prostaglandin F₂ α analog. *Theriogenology* 52 (2): 259-69.
- Del Vecchio, R.P., Chase, C.C., Bastidas, P. y Randel, R.D. 1990. Oxitocin-induced changes in plasma 13, 14 dihydro 15 keto prostaglandin F₂ alpha concentration on days 10, 20 and 30 postpartum in the bovine. *Anim. Sci.* 68: 4261-4266.
- Dieleman, S.J. y Bevers, M.M. 1987. Effects of monoclonal antibody against PMSG administered shortly after the preovulatory LH surge on time and number of ovulations in PMSG:PG-treated cows. *J. Reprod. Fertl.* 81: 533-542.
- Doornbos, D.E., Bellows, R.A., Burfening, P.J. y Knapp, B.W. 1984. Effects of dam age, prepartum nutrition and duration of labor on productivity and postpartum reproduction in beef females. *J. Anim. Sci.* 59: 1-10.

Driancourt M.A. 2000. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*. 55: 1211-1239

Echternkamp, S E., Spicer, L J., Gregory, K E., Canning, S F., Hammond, J.M. 1990. Concentrations of insulin-like growth factor-I in blood and ovarian follicular fluid of cattle selected for twins. *Biol. Reprod*. 43: 8-14

Echternkamp, S E and Gregory, K.E. 1999. Effects on postpartum reproductive performance in cattle selected for twins births. *J. Anim. Sci.* 77: 48-60

Espinoza, J L., Ramirez-Godinez, J A , Jimenez, J A y Flores, A. 1995. Effects of calcium soaps of fatty acids on postpartum reproductive activity in beef cows and growth of calves. *J. Anim. Sci.* 73: 2888-2889

Evans, A. O., Adams, G.P. y Rawlings, N.C. 1994. Follicular and hormonal development in prepuberal heifers from 2 to 36 weeks of age. *J. Reprod Fertil.* 102: 463-470

Fanning, M.D., Spitzer, J C , Burns, G.L y Plyler, B.B. 1992. Luteal function and reproductive response in suckled beef cows after metaestrus administration of a norgestomet implant and injection of oestradiol valerate with various dosages of injectable norgestomet. *J Anim. Sci* 70: 1352-1356.

Fike, K E , Day, M.L , Inskeep, E.K., Kinder, J.E., Lewis, P.E., Short, R.E y Hafs, H D 1997a. Estrus and luteal function in suckled beef cows that were anestrous when treated with an intravaginal device containing progesterone with or without a subsequent injection of estradiol benzoate. *J Anim. Sci.* 75: 2009-2015

Fike, K.E , M E. Wherman, E.G.M., Bergfeld, F.N., Kojima y J.E. Kinder. 1997b. Prolonged increased concentrations of 17 β -estradiol associated with development of persistent ovarian follicles do not influence conception rates in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 75:1363-1367.

Findalay, J K 1993. An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol. Reprod*. 48:15-23.

Fortune, J E 1994. Ovarian Follicular Growth and Development in Mammals. *Biol. Reprod*. 50: 225-232

- Foster, D L. y S Nagatani 1999 Physiological perspective on leptin as a regulator of reproduction: Role in Timing Puberty Biol. Reprod. 60: 20-215.
- García, E. 1987 Modificaciones al sistema de clasificación climática de Kopen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana. 4ª. Edición México: UNAM
- Garel, J.P., Gauthier, D., Petit, M y Thimonier, J. 1987. Influence of photoperiod on the postpartum changes in live weight and ovarian function in suckled cow. Reprod. Nutr. Dev. 27: 305.
- Garrett, J.E., Geisert, R.D., Zavy, M.T y Gries, L.K. 1988 Effect of exogenous progesterone on prostaglandin F2 α release and the interoestrous interval in the bovine. Prostaglandins. 36: 85-96.
- Geary, T.W., Whittier J.C., Hallford, D. M., y M.D. MacNeill. 2001. Calf removal improves conception rates to the Ovsynch and CO-Synch protocols. J. Anim. Sci. 79:1-4
- Gibbons, J.R., Wiltbank, M.C., Ginther, O.J. 1997. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. Biol. Reprod. 57: 1066-1073.
- Ginther, O.J., Bergfelt, D.R., Kulick, L.J., Kot, K. 1999 Selection of the dominant follicle in cattle: Establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. Theriogenology. 52: 1079- 1093.
- Ginther, O.J., Bergfelt, D.R., Beg, M.A. and Kot, K. 2001. Follicle selection in cattle: Role of luteinizing hormone. Biol. Reprod. 64: 197-205.
- Gong, J.G., Bramley, T.A., Webb, R. 1991. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: Follicular populations and peripheral hormones. Biol. Reprod. 45: 941-949.
- Goodman, R.L., Pickover, S.M y Karsch, F.J. 1981 Ovarian feedback control of follicle-stimulating hormone in the ewe: Evidence for selective suppression. Endocrinology. 108: 772-777.
- Griffith, M.K y Williams, G.L. 1996 Roles of maternal vision and olfaction in suckling-mediated inhibition of luteinizing hormone secretion, expression of

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

maternal selectivity, and lactation performance of beef cows Biol. Reprod 54: 761-768.

Grimard, B., Humblot, P., Ponter, A.A., Mialot, J.P., Sauvant, D y Thibier, M. 1995. Influence of postpartum energy restriction on energy status, plasma LH and oestradiol secretion and follicular development in suckled beef cows. J. Reprod. Fertil. 104: 173-179.

Gutiérrez, C., Galina, C.S., Zarco, L y Rubio L. 1995 Evaluation of ovarian activity in gyr and Indubrazil crossbred Holstein heifers during the months of march to; June in the wet tropics of México Int. Animal. Sci 10: 17-20

Gutierrez, C.G., Cambell, B.K y Webb, Y 1997 Development of long term bovine granulosa cell culture system: Induction and maintenance of estradiol production, response to FSH and morphological characteristics Biol. Reprod 56: 608

Hahn, J. 1992. Attempts to explain and reduce variability of superovulation. Theriogenology. 38:269-275.

Hernández, C.J., Murcia, M.C., Valencia, M.J., Rojas, M.S., Zárate, J.M., Zarco, Q.L. 1997. Efecto de líquido folicular equino libre de esteroides sobre la secreción de FSH en ovejas en anestro estacional y la presentación de estro inducido con PGF_{2α} en ovejas ciclando. Vet. Mex. 28 (2). 117-121.

Hunter, M.G., Hindle, J.E., McLeod, B.J y McNelly, A.S 1988. Treatment with bovine follicular fluid suppresses follicular development in gonadotrophin-releasing hormone-treated anoestrous ewes. J Endocrinol 119:95-100.

Ireland, J.J y J.F. Roche. 1982 Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: Changes in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotropin receptors. Endocrinology 111 :2077.

Ireland, J.J., Curato, A.D. and Wilson. 1983. Effect of charcoal-treated bovine follicular fluid on secretion of LH and FSH in ovariectomized heifers. J. Anim. Sci. 57: 1512-1516.

Kaneco, H., Nakasanishi, Y., Akagi, S., Arai, K., Taya, K., Watanave, G., Sasmoto, S y Hasegawa, Y. 1995. Inmunoneutralization of inhibin and estradiol during the follicular phase of the estrous cycle in cows. Biol. Reprod:53: 931-939.



- Kastelic, J.P., Ko, JCGH y Ginter, O.J. 1990. Suppression of dominant and subordinate ovarian follicles by a proteinaceous fraction of follicular fluid in heifers. *Theriogenology*. 34: 499-509.
- Kastelic, J.P., Olson, W O., Martinez, M., Cook, R B y Mapletoft, R J 1999 Synchronization of estrus in beef cattle with norgestomet and estradiol valerate. *Canadian Veterinary Journal*. 40 (3): 173-178.
- Kerr, D.R., Mc. Gowan, M.R., Carroll, C.L., y Baldock, F.C. 1991 Evaluation of three estrus synchronizations regimens for use in extensively management *Bos indicus* and *Bos taurus/indicus* heifers in northern Australia. *Theriogenology*. 36: 129-141
- Kestler, D J., Garverik, H.A., Bierschwal, C.J., Elmore, R.G y Youngquist, R.S. 1979. Reproductive hormones associated with normal and abnormal changes in ovarian follicles in postpartum dairy cows. *J. Dairy. Sci* 62: 1290-1296.
- Kestler, D J., Troxel, T.R y Hixon, D L 1980 Effect of days postpartum and exogenous GnRH on reproductive hormone and ovarian changes in postpartum suckled beef cows. *Theriogenology*. 13: 287-296.
- Kestler, D J., Favero, R.J., Troxel, T R 1995. A comparison of Hydron and silicone implants in the bovine norgestomet and estradiol valerate estrus synchronization procedure. *Drug Dev Ind. Pharm.* 21: 475-485.
- Kestler, D J y Favero, R J. 1996 Oestrus synchronization in beef females with norgestomet and oestradiol valerate: 2.Factors limiting and enhancing efficacy. *Agric. Pract.* 17, 12-17.
- Kindahl, H., Knudsen, O., Madej, A y Edqvist, L E. 1982. Progesterone, prostaglandinF2-alpha, PMSG and oestrone sulphate during early pregnancy in the mare. *J Rep. Fert. (Suppl)* 32: 353-359
- Kinder, J.E., Kojima, F.N., Bergfelt, E G.M., Wehrman, M.E y Fike, K.E 1996. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. *J. Anim. Sci* 74: 1424-1440.
- King, GJ y Macleod, G K. 1984. Reproductive function in beef cows calving in the spring or fall. *Anim. Reprod. Sci.* 6: 225-266.

- Kiracofe, G H 1980. Uterine involution: Its role in regulating postpartum intervals. *J Anim Sci.* 51 (Suppl 2): 16-28.
- Ko, JCH., Kastelic, J P., Del Campo, M.R y Ginther, O J. 1991. Effects of dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. *J. Reprod. Fert* 91: 511-519.
- Kojima, N., Stumpf, T.T., Cupp, A.S., Werth, L.A., Roberson, M.S., Wolfe, M.W., Kittok, R.J y Kinder, J.E. 1990. Effect of progestin and two levels of progesterone (P_4) on secretion of luteinizing hormone (LH) and 17β estradiol (E_2). *J. Anim. Sci:* 68 (Suppl 1) 440-441. (Abstract 503).
- Kojima, N., Stumpf, T.T., Cupp, A.S., Werth, L.A., Roberson, M.S., Wolfe, M.W., Kittok, R.J y Kinder, J.E. 1992. Exogenous progesterone and progestins as used in estrous synchrony regimens do not mimic the corpus luteum in regulation of LH and 17β -estradiol in circulation of cows. *Biol. Reprod.* 47: 1009-1017.
- Kojima, F.N., Werman, M.E., Caddy, G.A., Bergfeld, E.G., Cupp, A.S., Werth, L.A., Mariscal, V., Sanchez, T., Kittok, R.J, y Kinder, J.E. 1993. Melengestrol acetate (MGA) does not suppress secretion of luteinizing hormone (LH) and 17β estradiol (E_2) in a dose dependent fashion like endogenous progesterone (P_4) in bovine females. *J Anim Sci.* 71 (Suppl. 1): 215 (Abstr).
- Kulick, L.J., Kot, K., Wiltbank, M.C., Ginther, O J. 1999. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology.* 52: 913-921.
- Kurt, F.M., Critser, J.K., Rowe R.F y Ginther, O J 1979. Ovarian effects of bovine follicular fluid treatment in sheep and cattle. *Biol. Reprod.* 21. 537-544.
- Lamb, G.C., Miller, B.L., Lynch, J.M., Thompson, K.E., Heldt, J.S., Loest, C.A., Grieger, D.M y Stevenson J.S. 1999. Twice daily suckling but not milking with calf presence prolongs postpartum anovulation. *J. Anim. Sci.* 77: 2207-2218.
- Lamb, G.C., Nix, D.W., Stevenson, J.S y Corah, L.R. 2000. Prolonging the MGA-PGF_{2 α} interval from 17 to 19 days an estrus synchronization system for heifers. *Theriogenology.* 53 (3): 691-8.
- Lammonglia, M.A., Willard, S.T., Oldman, J.R y Randel, R.D. 1996. Effects of early fat and season on steroid hormone profiles before parturition and hormonal,

cholesterol, triglycerides, follicular patterns, and postpartum reproduction in brahman cows. *J Anim. Sci* 74: 2253-2262.

Lammonglia, M A , Short R E. Bellows, S E , Bellows, R.A., MacNeil, M D y Hafs, H.D 1998. Induced and synchronized estrus in cattle: Dose titration of estradiol benzoate in prepuberal heifers and postpartum cows after treatment with an intravaginal progesterone-releasing insert and PGF_{2α}. *J. Anim. Sci.* 76: 1662-1670.

Larson, R.L. y Kirakofe, G.H. Estrus after treatment with syncro-mate B in ovariectomized heifers is dependent on the injected estradiol valerate. *Theriogenology* 1995: 44. 177-187

Laurderdale, J.W., McAllister, J.F., Oody, E.L y Kratzer, D.D. 1980. Pregnancy rate in beef cattle injected once with PGF_{2α}. *J. Anim. Sci* 51 (Suppl.1): 296 (Abstr).

Law, A.S., Baxter, G., Logue, D.N., O'Shea, T y Webb, R 1992. Evidence for the action of bovine follicular fluid factor(s) other than inhibin in suppressing follicular development and delaying oestrus in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 96: 603-616.

Lucy, M. C., Staples C R., Thacer, W W , Erikson, P S., Cleale, R. M., Firkings, J.L., Murphy, M R., Clark, J H y Brodie, B.O. 1992. Influence of diet composition, dry matter intake, milk production, and energy balance, on time of postpartum ovulation and fertility in dairy cows. *Anim. Prod* (In press).

Lucy, M C , Staples, C.R., Michel, F. M y Thatcher, W.W. 1991a. Effect of feeding calcium soaps to early postpartum dairy cows on plasma prostaglandin F_{2α}, luteinizing hormone and follicular growth. *J. Dairy. Sci.* 74: 483

Lucy, M.C., De la Sota, R.L., Staples, C.R y Thatcher, W.W. 1991b. Effect of dietary calcium salts of long chain fatty acids (CaLCFA), energy intake, and lactation on ovarian follicular dynamics in Holstein dairy cows. *J Anim. Sci.* 68 (Suppl.1): 451 (Abstr)

Lugo, S.L, Hernández, J.C y López, L.L. 1999. Función del cuerpo lúteo a partir de la ovulación de un folículo dominante persistente, e vaquillas Holstein tratadas con un dispositivo intravaginal de liberación de progesterona (CIDIR-B, en ausencia de un cuerpo lúteo. *Vet Mex;* 30 (1); 95-98

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Macmillan, K.L., Taufas, V.K., Barnes, D y Day, A.M. 1991 Plasma progesterone concentrations in heifers and cows treated with a new intravaginal device. *Anim Repro. Sci* 26: 25-40

Macmillan, K.L., Taufas, V.K., Day, A.M., McDougall, S. 1995 Some effects of using progesterone and oestradiol benzoate to stimulate oestrus and ovulation in dairy cows with anovulatory anoestrus. *Proc NZ. Soc. Anim. Prod.* 55: 239-241.

Macmillan, K.L., Taufas, V.K. y Day, A.M. 1997. Manipulating ovaries follicle wave patterns can partially synchronize returns to service and increases the pregnancy rate to second insemination. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.* 57:237.

Mata, C.A., González, P.E., Hernández, C.J., Zarco, Q.L. 2001. Eliminación del folículo dominante persistente en modelos de sincronización del ciclo estral con progestágenos en bovinos. *Vet Mex.* 32 (1): 19-25

Mazerbourg, S., Zapf, J., Bar, R.S., Brigstock, D.R., Lalou, C., Binoux, M., Monget, P. 1999. Insulin like growth factor binding protein-4 proteolytic degradation in ovine preovulatory follicles: studies of underlying mechanics. *Endocrinology*: 140: 4175-4184.

McDowell, C.M., Anderson, L.H., Kinder, J.E. y Day, L.M. 1998. Duration of treatment with progesterone and regression of persistent ovarian follicle in cattle. *J. Anim. Sci.* 76: 850- 855.

Mialot, J.P., Ponsart, C., Gipoulou, C., Bihoreau, J.L., Roux, M.E., Deletang, F. 1998 The fertility of autumn calving suckler beef cows is increased by the addition of prostaglandin to progesterone and eCG estrus synchronization treatment. *Theriogenology*. 49 (7):1353-63

Mihm, M., Baguisi, A., Boland, M.P. y Roche, J.F. 1994. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. *J. Anim. Rep. Sci.* 102: 123-130

Mihm, M., Good, T.E.M., Ireland, J.J., Knight, P.G., Roche, J.F. 1997. Decline in serum FSH alters key intrafollicular growth factors involved in the selection of the dominant follicle in heifers. *Biol. Reprod.* 57: 1328-1337.

- Miller, K.F., Crister, J.K., Rowe, R.F. y Ginther, O.J. 1979. Ovarian effects of bovine follicular fluid treatment in sheep and cattle. *Biol. Reprod.* 21: 537-544.
- Monget, P., Monniaux, D., Pisselet, C., Durand, P. 1993. Changes in insulin-like growth factor-1 (IGF-1), IGF-2, and their binding proteins during growth and atresia of ovine ovarian follicles. *Endocrinology.* 132: 1438-1446.
- Monniaux, D., Mariana, J.C. y W.R. Gibson. 1984. Action of PMSG on follicular populations in the heifers. *J. Reprod. Fertil.* 70: 243-253.
- Monniaux, D., Huet, C., Besnard, N., Clement, F., Bosc, M., Pisselet, C., Monget, P., Mariana, J.C. 1997. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 51: 3-23.
- Moor, R.M., Kruip, Th.A.M. y Green, D. 1984. Intra-ovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation. *Theriogenology.* 21: 103-116.
- Morell, A., Gregoriadis, G. y Scheinberg, H. 1971. The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. *J. Biol. Chem.* 246:1461-1467.
- Murphy, B., Mapletoft, R., Manns, J. y Humphrey, W. 1984. Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology.* 21:117-125.
- Murray, J.A., Cavalieri, J., D'Occhio, M.J., Whyte, T.R., Maclean, L.J. y Fitzpatrick, L.A. 1998. Treatment with progesterone and 17 beta-oestradiol to induce emergence of a newly-recruited dominant ovulatory follicle during oestrus synchronisation with long-term use of norgestomet in Brahman heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 27: 50 (1-2):11-26.
- Myers, T.R., Myers, D.A., Gregg, D.W. y Moss, G.E. 1989. Endogenous opioid suppression of release of luteinizing hormone during suckling in postpartum anestrous beef cows. *Domest. Anim. Endocrinol.* 6: 183-190.
- Narasimha Rao, A.V., Narasimha Rao, A. Y Venkatramaiah, P. 1985. Induced puberty in prepuberal zebu heifers treated with norgestomet and pregnant mare serum gonadotropin. *Theriogenology.* 26. 1: 27-36.

- Nasim A, F., Neal, S., Roy, L., Butcher y Keith, E. I. 1995. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biol. Reprod.* 52: 1129-1135.
- Nett, T.M. 1987. Function of the hypothalamic-Hypophyseal axis during the postpartum period in ewes and cows. *J. Reprod. Fertil. (Suppl)* 34: 201.
- Nett, T.M., Cerman, D., Braden, T., Manns, J., Niswender, G. 1988. Pituitary receptors for GnRH and estradiol, and pituitary content of gonadotropins in beef cows II. Changes during the postpartum period. *Domest. Anim. Endocrinol.* 5: 81-89.
- Niasari-Naslaji, A., Jilella, D., Fenwick, D., Kinder, J.E y M.J.D. Occhio. 1996. Estrus synchronization and fertility after the control of formation and regression of the corpus luteum, and emergence of the ovarian dominant follicle in cattle. *Theriogenology.* 46: 1451-1465.
- Odde, K.G., Ward, H.S., Kiracofe, G.H., McKee, R.M y Kittok, R.J. 1980. Short estrus cycles and associated serum progesterone levels in beef cows. *Theriogenology* 14: 105-112.
- Odde, K.G. 1990. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. *J Anim. Sci.* 68:817-830.
- Páez, M.R., López, S.F y Lamothe, Z.C. 1999. Combinación de diferentes dosis de progestágenos con eCG para la resolución del anestro posparto en vacas *Bos taurus/Bos indicus*. FMVZ. U.V. Tesis de Licenciatura.
- Páez, M.R., Ruiz, L., Guarneros, J., Camacho, J.Y y Hernández, J. Evaluación del efecto de dos análogos de prostaglandina F_{2α} sobre la regresión del cuerpo lúteo y la presentación de estro en ganado lechero. 2000. XXIV Congreso Nacional de Buiatría. Pag 303.
- Papkoff, H. 1981. Variations in the properties of equine chorionic gonadotropin. *Theriogenology.* 15: 1- 11
- Pedroso, R. y Soller, F. 1997. Tecnología para la regulación del ciclo estral, la superovulación y el diagnóstico precoz de gestación en el ganado bovino. Revisión bibliográfica. *Rev. Cub. Reprod. Anim.* 23: 1-22.

- Peters, A.R., Lamming, G.E., Fisher, M.W. 1981. A comparison of plasma LH concentration in milked and suckling postpartum cows. *J. Reprod. Fertil.* 62: 567-573.
- Peterson, C.A., Huhn, J.C. y Kestler, D.J. 2000. Norgestomet- and oestradiol valerate-induced luteolysis is dependent upon the uterus. *J. Reprod. Fertil.* 58: 253-259.
- Pinheiro, O.L., Barros, C.M., Figueiredo, R.A., Valle, E.R., Encarnacao, R.O. y Padovani, C.R. 1998. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F_{2α} or norgestomet and estradiol valerate. *Theriogenology* 49 (3): 667-681.
- Rahe, C.H., Owens, R.E., Fleeger, J.L., Newton, H.L. and Harms, P.G. 1980. Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle. *Endocrinology*. 107: 498.
- Rajamahendran, R. y Taylor, C. 1990. Characterization of ovarian activity in postpartum dairy cows using ultrasound image and progesterone profiles. *Anim. Reprod. Sci.* 22: 171-180.
- Rajamahendran, R. y Sianangama, P.C. 1992. Effect of human chorionic gonadotropin (hCG) on dominant follicles in cows: Accessory corpus luteum formation, progesterone production and pregnancy rates. *J. Reprod. Fertil.* 95: 577-584.
- Rajamahendran, R. y Mannikkam, M. 1994. Effects of exogenous steroid hormones on the dominant follicle maintained by a norgestomet implant in heifers. *Can. J. Anim. Sci.* 74: 457.
- Ramirez-Godinez, J.A., Kirakofe, G.H., Mc Kee, R.M., Schalles, R.R., y Kittok, R.J. 1981. Reducing the incidence of short estrus cycles in beef cows with norgestomet. *Theriogenology* 15: 613-623.
- Ramirez-Godinez, J.A., Rodriguez, A.F., Espinoza, C.C. y Valdez, S.R. 2000. Uso de la PMSG or PGF_{2α} al retirar el implante de SMB en las vacas productoras de carne. *Agrociencia* 34: 423-428.

Rao, C.V., Estergreen, V.L., Carmen, F.R. y Moss, G.E. 1979. Receptors for gonadotrophin and prostaglandin F₂ α in bovine corpora lutea of early, mid and luteal phase. *Acta Endocrinol* 91: 529-537, (Medline).

Revah, I. And Butler, W.R. 1995. Premature maturation of bovine oocytes obtained from prolonged dominant follicles. *Biol. Reprod (Suppl)* 52: 80 (Abstr).

Richards, M.W., Spitzer J.C., y Warner, M.B. 1986. Effect of varying levels of postpartum nutrition's and body conditions at calving on subsequent reproductive performance in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 62: 300-306.

Roche, J.F., Austin, E.J., Ryan, M., O'Rourke, M., Mihm, M. y Diskin, M.G. 1999. Regulation of follicle wave to maximize fertility in cattle. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54: 61-71.

Rodríguez, S.R. 1999. Reducción de la edad al primer parto en vaquillas *Bos taurus/Bos indicus* mediante la aplicación de progestágenos y Gonadotropina coriónica equina en el trópico Mexicano. Tesis de Maestría. UNAM.

Roser, J. Y. Lofstedt, R.M. 1989. Urinary eCG patterns in the mare during pregnancy. *Theriogenology* 32: 607-622.

Rathabone, M.J., Macmillan, K.L., Inskeep, K., Burggraaf, S. y Bunt, C.R. 1998. Fertility regulation in cattle. *J. Controlled. Release.* 54: 117-148.

Sánchez, M.B. 2001. Efecto del tratamiento con Gonadotropina Coriónica Equina y norgestomet sobre las características de la fase lútea en vacas y novillotas cebú en el trópico húmedo. Tesis de Maestría. FMVZ UNAM.

Sánchez, T., Wehrman, M.E., Bergfeld, E.G., Peters, K.E., Kojima, F.N., Cupp, A.S., Mariscal, V., Kimok, R.J., Rasby, R.J. y Kinder, J.E. 1993. Pregnancy rate is greater when the corpus luteum is present during the period of progestin treatment to synchronize time of estrus in cows and heifers. *Biol. Reprod.* 49:1102-1107.

Sanchez, T., Wherman, M.E., Kojima, F.N., Cupp, A.S., Bergfeld, E.G., Peters, K.E., Mariscal, V., Kittok, R.J., y Kinder, J.E. 1995. Dosage of the synthetic progestin, norgestomet, influences luteinizing hormone pulse frequency and endogenous secretion of 17 β -estradiol in heifers. *Biology of reproduction.* 52: 464-469.

SAS. Copyright © 1999 by SAS Institute Inc , Cary, NC, USA. Statical Analysis System Institute, Inc.

Saumande, J. 1990. Culture of bovine granulosa cells in a chemically defined serum free medium. The effect of insulin and fibronectin on the response to FSH. *J. Steroid Biochem.* 38: 189-196.

Savio, J.D , Keenan, L., Boland, M.P y Roche, J.F. 1988. Patterns of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J. Reprod Fertil* 83: 663.

Savio, J.D , Tacher, W.W , Badinga, L , De la Sota, R L y Wolfeson, D. 1993. Regulation of dominant follicle turnover during the estrous cycle in cows. *J Reprod Fertil.* 97:197-203.

Schallenberger, E., Schondorfer, A.M y Walters D L. 1985. Gonadotropins and ovarian steroids in cattle. L Pulsatile changes of concentration in the jugular vein throughout the oestrous cycle. *Acta Endocrinologica* 108: 312-321.

Shaham-Albalacy, A., Rosenberg, M., Folman, Y. Graver, Y. Meidan, R. And Wolfenson. 2000 Two methods of inducing low plasma progesterone concentrations have different effects on dominant follicles in cows. *J Dairy. Sci* 83: 2771-2778.

Sheldon, I M y Dobson, H. 2000 Effect of administration of eCG to postpartum cows on folliculogenesis in the ovary ipsilateral to the previously gravid uterine horn and uterine involution. *J. Reprod. Fertil* 1191. 157-63.

Short, R E, Bellows, R.A., Staigmiller, R.B., Berardinelli, J.G., Custer, E.E. 1990. Physiological mechanics controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. *J Anim. Sci* 68: 799-816

Silveira, P.A , Spoon, R.A., Ryan, D.P y Williamms, G.L. 1993. Evidence for maternal behavior as a requisite link in suckling-mediated anovulation in cows. *Biol Reprod* 49: 1338-1346.

Singh, J , Brogliatti, G M., Christiensen, C.R., Adams, G.P. 1997. Active immunization against follistatin and its effects on FSH, follicle development and superovulation in heifers. *Theriogenology.* 52: 49-66

- Singh, J. Y Adams, G P. 1998 Immunohistochemical distribution of follistatina in dominant and subordinate follicles and corpus luteum of cattle Biol. Reprod. 59: 561-570.
- Singh, U., Khurana, N.K., Inderjeet 1998 Plasma progesterone profiles and fertility status of anestrus Zebu cattle treated with norgestomet-estradiol-eCG regimen Theriogenology. 50 (8):1191-1199
- Sirois J y Fortune, J.E. 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by ultrasonographic. Biol. Reprod. 39: 308-317.
- Sirois, J y Fortune, J. 1990. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: A model for studying ovarian follicular dominance. Endocrinology. 127: 916-925.
- Smith, V. G , Cenault, J. R., McAllister, J.F. y Lauderdale, J W. 1987. Response of posparum beef cows to exogenous progestogens and gonadotropin releasing hormone. J. Anim. Sci. 64: 540-551
- Steinberger, A. y Ward, D.N. 1988. Inhibin. Knobil and J.P. Niell, ads. The physiology of reproduction. Raven Press. New York, NY. 567-583
- Stevenson, J.S., Yhomsosn, K.E., Forbes, W.L., Lamb, G.C., Grieger, D.M y Corah, L.H. 2000. Synchronizing estrus and (or) ovulation in beef cows after combinations of GnRH, nosgertomet , and prostaglandin F_{2α} with or without timed insemination J Anim. Sci. 78 (7): 1747-1758.
- Stewart, F y Allen, W.R. 1981. Biological function and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrhops. J. Rep. Fert 62: 527-536
- Stock, AE y Fortune, J.E. 1993 Ovarian follicular dominance in cattle: Relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters Endocrinology. 132: 1108-1114.
- Sugino, H., Nakamura, T., Hasegawa, Y., Miyamoto, K., Abe, Y , Igarash, M., Eto, Y., Shibai, H , Titani, K. 1988. Erythroid differentiation factor can modulate follicular granulosa cell functions. Biochem. Biophys. Res. Commun. 153: 281-288.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Thatcher, W.W., De la Sota, R.L., Schmitt, E.J. P., Diaz, T.C., Bandinga, L., Simmen, F.A., Staples, C.R. y Drost, M. 1996. Control and management of ovarian follicles in cattle, to optimize fertility. *Reprod Fert Dev* 8: 203-217.
- Tilly, J.L. 1996. Apoptosis and ovarian function. *Rev. Reprod* 1:162-172.
- Turzillo, A.M. y Fortune, J.E. 1990. Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 89: 643-653.
- Turzillo, A.M. y Fortune, J.E. 1993. Effects of suppressing plasma FSH on ovarian follicular dominance in cattle. *Journal Reprod. Fertil.* 98: 113-119.
- Twagiramungu, H., Guilbault, L.A., Proulx, J.G. y Dufour, J. 1994. Influence of corpus luteum and induced ovulation on ovarian follicular dynamics in postpartum cyclic cows treated with Burselin and Cloprostenol. *J. Anim. Sci.* 42:1796-1805.
- Uscanga, L. Manual de ginecología y Obstetricia. FMVZ U.V. 1996.
- Ungerfeld, R. 1998. Gonadotropina Coriónica Equina: Caracterización y utilización. Department of Clinical Chemistry Faculty of Veterinary Medicine.
- Vasconcelos, J.L.M. y Wiltbank, J.R. 1994. Effects of syncromate- combined with GnRH on follicular dynamics and time of ovulation. *J. Anim. Sci.* 72 (Suppl.1), 346 Abstr.
- Wang, X., Kole, A.R. y Geenwald, G.S. 1995. *In vitro* and *in vivo* evidence on the site of neutralization of equine chorionic gonadotrophin (eCG) by an eCG antiserum. *J. Reprod. Fertil.* 104: 237-241.
- Watts, T.L. y Fuquay, J.W. 1985. Response and fertility of dairy heifers following injection with PGF_{2α} early, middle and late diestrus. *Theriogenology*. 23: 655.
- Widman, E.E., Jones, G.M., Wagner, P.E. 1982. Dairy body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *J. Dairy Science*. 65: 495.
- Willians, G.L. 1989. Modulation of luteal activity in postpartum beef cows through changes in dietary lipid. *J. Anim. Sci.* 67: 785-793.

- Xu, Z., Garverick, H.A, Smith, G W Smith, M.F, Hamilton, S A, Youngquist, R.S. 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.
- Xu, Z,Z y Burton, L.J. 1997. Reproductive performance of postpartum anoestrus dairy cows treated with progesterone and oestradiol benzoate NZ Vet. J.:45:213-214
- Xu, Z Z., Burton, L.J , Macmillan, K L 1997 Reproductive performance of lactating dairy cows following estrus synchronization regimens with PGF₂ α and progesterone Theriogenology 47:687-701
- Yang, L.G , Han, Z K., Wu, F , Zhang, X.J., Lin, YX y Zhu, Z.L. 1991. Measurement of PMSG by enzyme immunoassay in blood serum of buffalo cows after administration of PMSG Acta Vet Zoot. Sin. 22: 9-14.
- Yavas, Y. y Walton. 2000 Postpartum acyclicity in suckled beef cows: A review. Theriogenology 54: 25-55.
- Yelich, J.V , Holland, M D., Chutz, D N y Odde, K G 1995. Synchronization of estrus in suckled postpartum beef cows with melengestrol acetate, 48 h calf removal and PGF₂ α . Theriogenology. 43: 401-410.
- Yelich, J.V., Geisert, R D., Schmitt, R A.M., Morgan, G L., y McCann, J.P. 1997. Persistence of the dominant follicle during melengestrol acetate administration and its regression by exogenous estrogen treatment in beef cattle. J. Anim Sci. 75: 745-754.
- Zhang, Y, Proenca, R , Maffei, M , Barone, M., Leopold, L y Friedman, J. M 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, Nature. 372: 425-432.