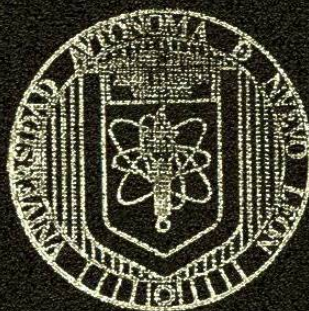


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA

SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**EFECTO DE LA MEGLUMINA DE FLUNIXIN Y LA
PROGESTERONA COMO AUXILIARES EN EL
MANTENIMIENTO DE LA GESTACION
EN BOVINOS**

POR

MVZ LUIS RICARDO PEREZ GARCIA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
EN PRODUCCION ANIMAL**

MARIN, N. L.

FEBRERO, 2001

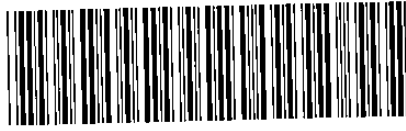
TM

Z5071

FA

2001

P4

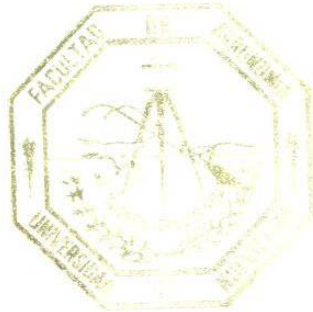


1020145983

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA

SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



EFEECTO DE LA MEGLUMINA DE FLUNIXIN Y LA
PROGESTERONA COMO AUXILIARES EN EL
MANTENIMIENTO DE LA GESTACION
EN BOVINOS

POR

MVZ LUIS RIARDO PEPEZ GARCIA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
EN PRODUCCION ANIMAL

MARIN, N. L.

FEBRERO, 2001

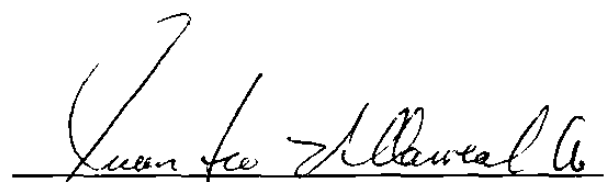
TM
Z5071
FA
2001
P4





FONDO
TESIS

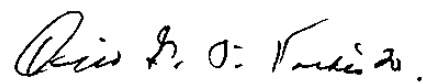
**EFFECTO DE LA MEGLUMINA DE FLUNIXIN Y LA
PROGESTERONA COMO AUXILIARES EN EL MANTENIMIENTO
DE LA GESTACION EN BOVINOS.**

APROBACION DE TESIS


Dr. Juan Francisco Villarreal Arredondo
Asesor Principal


Ph.D. Javier Gollín Negrete
Co - asesor


Ph.D. Javier García Cantú
Co - asesor


Ph.D. Ciro G. S. Valdés Lozano
Subdirector de Estudios de Posgrado FAUANL

MARIN, N. L.

FEBRERO, 2001.

RESUMEN BIOGRAFICO.

Luis Ricardo Pérez García

Candidato al Grado de Maestro en Ciencias en Producción Animal

Tesis : Efecto de la Meglumina de Flunixin y la Progesterona Como Auxiliares en el Mantenimiento de la Gestación en Bovinos.

Campo de estudio : Reproducción Animal.

Biografía

Datos personales : Nacido en México, D. F., el 22 de Agosto de 1966; hijo de Luis Ricardo Pérez Velázquez y Leticia Gpe. García Chowell. Casado con Elizabeth Cervantes Ramos desde Septiembre de 1991 y con dos hijos, Luis Ricardo y Jorge Alfonso Pérez Cervantes.

Educación : Egresado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia de la Universidad Autónoma de Zacatecas, con el grado y título de Médico Veterinario y Zootecnista en 1990.

Experiencia Profesional :

- MAHPROSA; Tehuacán, Pue. Gerente de Servicio Técnico (Mayo de 1999 a la fecha).
- Técnico evaluador del Proyecto de Evaluación del Programa Ganado Mejor en el estado de Nuevo León (COTEGAN - FAUANL) (Octubre de 1998 a Marzo de 1999).
- Crown West Farms Inc., Aldergrove, B. C., Canadá (Febrero 1992 - Febrero 1996), posición de Farm Manager además de responsable del área de reproducción.
- Agroasemex, Guanajuato (Abril 1991 - Enero 1992), posición de Promotor Ganadero.
- Médico Veterinario, práctica privada (1990 - 1992).

Mientras atendía la Universidad:

- Red Móvil Nacional en el Estado de Zacatecas (Junio 1990 - Febrero 1991), posición de Promotor Rural y Comunitario.
- Secretaría de Salubridad y Asistencia del Estado de Zacatecas, Departamento de Inspección Sanitaria (Enero 1990 - Junio 1990), posición de Inspector Sanitario.
- Programa de Desarrollo Rural del Gobierno del Estado de Zacatecas (Junio 1989 - Diciembre 1989), posición de Promotor Rural.
- Asistente Veterinario, Clínica Veterinaria "Tresa", Guanajuato, Gto (Octubre 1983 - Septiembre 1990).

TABLA DE CONTENIDO.

Capítulo	Página
I Resumen	i
II Summary	iv
III Dedicatorias	vii
IV Agradecimientos	viii
V Lista de tablas	x
VI Lista de figuras	xi
VII Lista de abreviaturas	xiii
1. Introducción	1
1.1 Justificación.	1
1.2 Impacto económico de la pérdida de la gestación.	3
1.3 Objetivos.	5
1.4 Hipótesis.	6
2.0 REVISION DE LITERATURA	7
2.1 Factores que afectan la fertilidad: generalidades.	7
2.1.1 Estado nutricional, peso y condición corporal.	7
2.1.2 Estado reproductivo.	8
2.1.3 Factores endócrinos.	9
2.1.4 Edad.	10
2.1.5 Factores medioambientales	10
2.1.6 Factores inmunes o incompatibilidad inmunológica	13

2.1.7	Factores anatomo - fisiológicos.	13
2.2	Factores relacionados con la técnica reproductiva utilizada.	17
2.2.1	Inseminación artificial.	17
2.2.1.1	Inseminación a tiempo inadecuado.	17
2.2.1.2	Técnica y experiencia del inseminador.	18
2.2.1.3	Calidad del semen.	18
2.2.2	Transferencia de embriones.	18
2.2.2.1	Tipo de embrión utilizado.	19
2.2.2.2	Técnica utilizada.	19
2.2.2.3	Higiene.	20
2.2.2.4	Sincronización entre donadora y receptora.	20
2.2.2.5	Calidad de los embriones.	20
2.3	Alternativas utilizadas para aumentar la fertilidad.	21
2.3.1	Factores liberadores de gonadotropinas (GnRH).	22
2.3.2	Gonadotropina coriónica humana (hCG).	23
2.3.3	Progesterona.	24
2.3.4	Interferones exógenos, análogos y recombinantes.	26
2.3.5	Manejo de la alimentación mediante la administración de lípidos de sobrepeso.	28
2.3.6	Inhibidores de prostaglandinas.	29
2.3.6.1	Meglumina de flunixin	31
2.4	Cuerpo lúteo.	34
2.4.1	Aspectos morfológicos del cuerpo lúteo.	34
2.4.1.1	Células esteroideogénicas.	34
2.4.1.1.1	Células lúteas pequeñas.	35
2.4.1.1.2	Células lúteas grandes.	36
2.4.1.1.3	Gránulos secretores.	37
2.4.1.2	Células no esteroideogénicas.	38
2.4.1.2.1	Células endoteliales.	39
2.4.1.2.2	Fibroblastos.	39
2.4.1.2.3	Macrófagos.	40
2.4.2	Luteinización.	40
2.4.2.1	Cambios morfológicos asociados con la luteinización.	42

2.4.2.1.1	Cambios preovulatorios.	42
2.4.2.1.2	Cambios postovulatorios.	43
2.4.2.1.3	Angiogénesis y vascularización en el cuerpo lúteo.	43
2.4.2.2	Cambios esteroidogénicos.	46
2.4.2.2.1	Citocromo P- 450 _{scc} .	46
2.4.2.2.2	3βHSD.	47
2.4.2.2.3	Citocromo P - 450 _{17α} - Hidroxilasa.	47
2.4.2.2.4	Citocromo P - 450 _{arom} .	48
2.4.2.2.5	β caroteno.	48
2.4.2.3	Producción de otras sustancias.	49
2.4.2.3.1	Oxitocina.	49
2.4.2.3.2	Prostaglandinas.	50
2.4.2.3.3	Estradiol 17β.	50
2.4.2.4	Secreción de progesterona estimulada por LH.	50
2.4.3	Luteólisis.	51
2.4.3.1	Síntesis de PGF _{2α} y otros eicosanoides.	53
2.4.3.2	Secreción de PGF _{2α} .	55
2.4.3.3	Catabolismo de los eicosanoides.	55
2.4.3.4	Receptores de PGF _{2α} en el cuerpo lúteo.	58
2.4.3.5	Efecto de la PGF _{2α} en el cuerpo lúteo.	59
2.4.3.6	Efecto de la PGF _{2α} sobre el embrión.	60
2.4.4	Mecanismos adicionales involucrados en la función lútea.	60
2.4.4.1	Interacción entre células esteroidogénicas lúteas grandes y pequeñas.	61
2.4.4.1.1	Mediadores intercelulares entre células grandes y pequeñas.	62
2.4.4.2	Interacción entre células esteroidogénicas y no esteroidogénicas.	64
2.4.4.3	Interacción entre células lúteas y células inmunes.	66
2.5	Mecanismo de reconocimiento materno y establecimiento de la gestación	69

2.5.1	Activación del mecanismo de reconocimiento materno y secreción de b1FN - τ .	70
2.5.2	Mecanismo de acción de b1FN - τ .	71
2.5.3	Falla del mecanismo de reconocimiento materno.	73
3.0	MATERIALES Y METODOS	80
3.1	Localización.	80
3.2	Experimento I en vientres inseminados artificialmente.	81
3.2.1	Animales.	81
3.2.2	Manejo de los animales.	81
3.2.3	Sincronización de estros.	82
3.2.4	Detección de estros.	82
3.2.5	Inseminación.	83
3.2.6	Diseño experimental y tratamientos.	83
3.2.7	Obtención y conservación de muestras sanguíneas y análisis de laboratorio.	84
3.2.8	Diagnóstico de gestación.	85
3.2.9	Análisis estadístico.	85
3.3	Experimento II en vaquillas nulíparas.	87
3.3.1	Animales.	87
3.3.2	Sincronización de estros.	87
3.3.3	Detección de estros.	87
3.3.4	Diseño experimental y tratamientos.	88
3.3.5	Obtención y conservación de muestras sanguíneas y análisis de laboratorio.	88
3.3.6	Análisis estadístico.	89
4.0	RESULTADOS Y DISCUSION	90
4.1	Indices reproductivos.	90
4.1.1	Indice de no retorno (INR).	90
4.1.2	Indice de concepción (IC).	91
4.1.3	Indice de parición (IP).	93
4.1.4	Indice de pérdida de la gestación (IPG).	94
4.1.5	Porcentaje de parición (%P)	98
4.1.6	Porcentaje de gestaciones perdidas (%GP)	100
4.1.7	Servicios por concepción (SPC)	104

4.1.8 Fertilidad a primer servicio (FPS).	104
4.2 Intervalo entre estros.	105
4.2.1 Intervalo entre estros en vacas.	105
4.2.2 Intervalo entre estros en vaquillas.	110
4.3 Análisis hormonales.	111
4.3.1 Efecto del tratamiento con meglumina de flunixin (T1) sobre los niveles de progesterona en vacas.	112
4.3.2 Efecto del tratamiento con dispositivos CIDR (T2) sobre los niveles de progesterona en vacas.	114
4.3.3 Efecto del tratamiento con meglumina de flunixin y dispositivos CIDR (T3) sobre los niveles de progesterona en vacas.	115
4.3.4. Efecto del tratamiento con meglumina de flunixin (T1) sobre los niveles de progesterona en vaquillas.	119
4.3.5 Efecto del tratamiento con dispositivos CIDR (T2) sobre los niveles de progesterona en vaquillas.	119
4.3.6 Efecto del tratamiento con meglumina de flunixin y dispositivos CIDR (T3) sobre los niveles de progesterona en vaquillas.	120
5.0 CONCLUSIONES	123
6.0 RECOMENDACIONES	128
7.0 BIBLIOGRAFIA	130
8.0 APENDICE	146

RESUMEN .

Luis Ricardo Pérez García

Fecha de Graduación: Mayo, 2000.

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Agronomía

Título del Estudio : Efecto de la Meglumina de Flunixin y la Progesterona como Auxiliares en el Mantenimiento de la Gestación en Bovinos.

Número de Páginas : 188

**Candidato para el grado de Maestro
en Ciencias en Producción Animal
con especialidad en Reproducción**

Area de Estudio: Reproducción Animal.

Propósito y Método del Estudio: Las pérdidas embrionarias representan entre el 30 y el 40 % de las causas del pobre desempeño reproductivo en bovinos, ocurriendo éstas principalmente alrededor del día 18 de gestación. Su incidencia es del 10 % en vaquillas pero puede llegar hasta el 50 % en vacas. De ahí que se han empleado varios métodos para incrementar los índices de establecimiento de la gestación, la mayoría enfocados hacia el apoyo de la función lútea a partir del día 14 del ciclo estral. El objetivo del presente trabajo fué evaluar si la aplicación de meglumina de flunixin y su combinación con progesterona durante la gestación temprana incrementa la fertilidad en vientres bovinos sincronizados e inseminados artificialmente.

Se utilizaron 66 vientres de raza Charolais divididos en dos temporadas de empadre. Después de ser sincronizados e inseminados artificialmente se asignaron a cuatro tratamientos: T1) meglumina de flunixin (Finadyne®) 2.2 mg / kg IM c/12 hrs por 7 días (días 7 al 13 postservicio)(n = 19); T2) dispositivo intravaginal CIDR-B (EAZI - breed©) conteniendo 1.9 grs de progesterona natural micronizada (días 7 al 20 postservicio)(n = 19); T3) combinación de tratamientos 1 y 2 (n = 9); T4) grupo control (n = 19) Se obtuvieron muestras sanguíneas para determinar niveles de progesterona mediante RIA y se practicaron dos diagnósticos de gestación, el primero el día 33 postservicio mediante ultrasonografía transrectal y e segundo el día 60 mediante palpación

rectal. El efecto de los tratamientos sobre el desempeño reproductivo fue analizado por el método de ji - cuadrada mediante tablas de contingencia. Los parámetros reproductivos evaluados fueron los índices de no retorno a estro a los 33 y 65 días postservicio (INR1 e INR2), los índices de concepción a los 33 y 60 días postservicio (IC1 e IC2), los índices de pérdida de la gestación a los 60 días postservicio y después de los 60 días postservicio (IPG1 e IPC2) los índices de parición (IP), los porcentajes de parición (% P), los porcentajes de pérdida de la gestación totales, a los 60 días postservicio y después de los 60 días postservicio (%GP, %GP1 y %GP2), así como el intervalo entre el servicio y la presentación del estro. Los niveles de progesterona fueron evaluados mediante análisis de varianza y análisis de comparación de medias (t - Student para variables independientes). Valores de $p < .05$ se consideraron como estadísticamente significativos.

Paralelamente se realizó una prueba con 16 vaquillas en edad reproductiva de la raza Holstein Friesian. Después de ser sincronizados los estros artificialmente fueron asignadas al azar a uno de los cuatro tratamientos probados en las vacas adultas ($n = 4$), colectándose muestras sanguíneas para la determinación de progesterona por radioinmunoanálisis (RIA) y su análisis estadístico mediante análisis de varianza y análisis de comparación de medias (t - Student para variables independientes). El intervalo entre estros se analizó mediante ji - cuadrada. Valores de $p < .05$ se consideraron como estadísticamente significativos.

Contribuciones y Conclusiones : De acuerdo con los resultados obtenidos la aplicación de meglumina de flunixin después del servicio incrementa efectivamente el desempeño reproductivo en vientres bovinos, incrementando los índices de concepción y parición, y disminuyendo el número de servicios por concepción. Sin embargo, puede teorizarse que favorece el desarrollo de embriones de aptitud inferior que puede predisponer su pérdida en etapas posteriores de la gestación al ser sometidos a situaciones severas de estrés.

La aplicación de meglumina de flunixin después del servicio aparentemente prolongó el ciclo estral tanto en vacas como en vaquillas no gestantes ($39 + 10.8$), lo que concuerda con lo reportado por otros autores. Sin embargo debido a los niveles de progesterona encontrados durante todo el período de muestreo puede concluirse que esta alteración en la presentación de estros se debió a la presentación de cuerpos lúteos de vida corta con baja capacidad de producción de progesterona y de estros silenciosos debido a una pobre capacidad esteroideogénica de los folículos presentes después del tratamiento, y a un hipotético efecto del tratamiento sobre LH. Esto es apoyado por la presentación de los estros manifiestos después del servicio en un período equivalente a la duración de un ciclo estral promedio medido a partir del

momento en que se detectaron los niveles más bajos de progesterona sin presentación de signos de estro y la aparición del estro manifiesto.

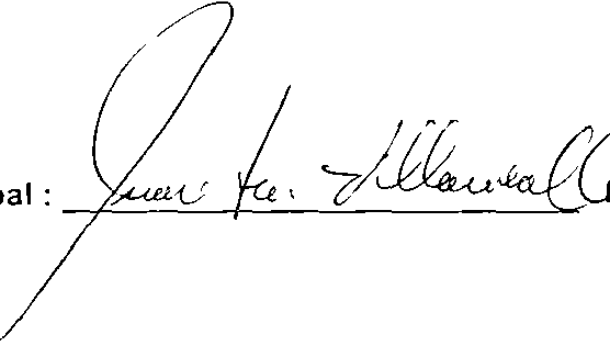
Por otro lado, la aplicación en forma conjunta de meglumina de flunixin con dispositivos intravaginales CIDR - B afecta negativamente a la fertilidad. Aunque se incrementa el índice de concepción, en el presente trabajo el efecto negativo más patente fue el gran porcentaje de gestaciones perdidas después del día 60 postservicio. También se observó descarga vaginal constante de distinto grado, variando desde la forma mucosa hasta la mucopurulenta, durante el tratamiento y al momento del retiro del CIDR además de la presencia de fluido uterino al ser examinados los vientres mediante ultrasonografía, sugiriendo irritación y estados infecciosos genitales en la mayoría de los animales dentro de este tratamiento. Otro efecto negativo es la posibilidad de afectar a largo plazo la capacidad reproductiva de los vientres al inducir una metritis infecciosa con tendencia a la cronicidad, permaneciendo abiertos después de tres servicios o la presentación de intervalos entre el primero y segundo servicios de más de 65 días.

En conclusión, la aplicación de meglumina de flunixin después del servicio puede ser una alternativa para incrementar la fertilidad en los bovinos inseminados artificialmente y los resultados obtenidos sugieren su potencial utilización durante la transferencia de embriones.

Sin embargo, no resulta aconsejable la utilización combinada de meglumina de flunixin y dispositivos intravaginales CIDR.

Palabras clave : meglumina de flunixin, progesterona, prostaglandinas, gestación, embrión.

Firma del Asesor Principal :



Juan Carlos Alvarado

SUMMARY .

Luis Ricardo Pérez García

Graduation date: May, 2000.

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Agronomía

Title of research work : Effect of flunixin meglumine and progesterone as an aid for pregnancy maintenance in the bovine.

Number of Pages : 188

**Candidate for the degree of Master of
Science in Animal Production**

Subject main area: Animal production, Animal Reproduction.

Objectives and Methods for research work: Embryo loss represents from 30 to 40 % of causes of low reproductive performance in cattle, mostly occurring before day 18 of pregnancy, with an incidence of about 10 % in heifers and up to 50 % in cows. Therefore, different methods have been used to increase pregnancy and calving rates, although mostly focused on support of luteal function from day 14 of estrous cycle. The present study was designed to evaluate whether supplementation of flunixin meglumine alone or combined with progesterone after AI and during early pregnancy enhance embryo survival and corpus luteum maintenance, thus increasing conception and calving rates. It was hypothesised that fertility would be maximised if endometrial $\text{PGF}_{2\alpha}$ secretion is inhibited during early pregnancy and growth rate of retarded development embryos is accelerated. It is known that the embryo plays an active role in the luteolytic process from 3 to 4 days before the corpus luteum becomes dysfunctional.

Over a period of two breeding seasons 66 full french Charolais cows of different reproductive status (55 multiparous cows and 11 heifers), artificially synchronised and inseminated were blocked by weight and age and randomly assorted to 4 treatments (T): T1) Flunixin meglumine (Finadyne ®) 2.2 mg / kg im twice a day (0700 and 1900 h) for 7 days, initiating on day 7 after estrus detection (n = 19), T2) CIDR - B intravaginal device containing 1.9 g of natural progesterone (EAZI - breed ©) for 13 days, being inserted on day 7 after estrus detection (n = 19), T3) Combination of treatments 1 and 2 (n = 9), and T4)

control group (n = 19). Blood samples were collected once a day on days 0, 3, 5, 7 to 15, 21, 22 and 33, after AI (day 0 was AI breeding day) and progesterone concentrations were determined by radioimmunoassay. Pregnancy status was confirmed by transrectal ultrasonography and rectal palpation at 33 and 60 days after AI, respectively. After AI all cows were observed for estrus in regular basis three times a day until day 65; estrus after day 65 were no detected.

The effect of treatments on reproductive performance was analysed using chi - square through contingency table analysis. Reproductive parameters considered were non return rate at 33 (INR1) and 65 (INR2) days after AI, pregnancy rate at 33 (IC1) and 60 (IC2) days after AI, calving rate (IP), pregnancy loss rate at 60 days after AI (IPG1) and after day 60 post - AI (IPG2), percentage of pregnancies lost at day 60 after AI (%GP1), after day 60 (%GP2) and total (%GP), and interval between AI and estrous activity. Progesterone blood serum levels were analysed by ANOVA and means compared by Independent samples t - test. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

Contributions and conclusions: Results indicate that flunixin supplementation during early pregnancy after AI reduce effectively embryo loss rate increasing the pregnancy and calving rates and reducing the number of services per conception. However, it can be theorised that allowing development of embryos of lower aptitude exists the possibility of lose them in advanced stages of pregnancy mostly under severe stressful conditions.

Apparently, in the flunixin treatment group the estrous cycle was extended in non pregnant cows and heifers (39 ± 10.8) as previously reported for other authors. However, in this case, based on hormonal profiles (progesterone levels) found along the sampling period can be theorised that this alteration in estrus presentation was due not to an actual extension of cycle, but to a short luteal phase and silence heat presence. This could be caused by a poor or diminished steroidogenic activity of follicles after the treatment and an hypothetical effect of treatment over LH and luteotropic prostaglandin supply to the corpus luteum and FSH to the follicles during follicle recruitment and follicular wave development. This is supported by the fact that estrus (standing heat) were detected after AI in a time that correspond to an estrous cycle period length average, measured from the time at which progesterone levels were lower and no heat was detected to the time of the onset of estrual activity and standing heat.

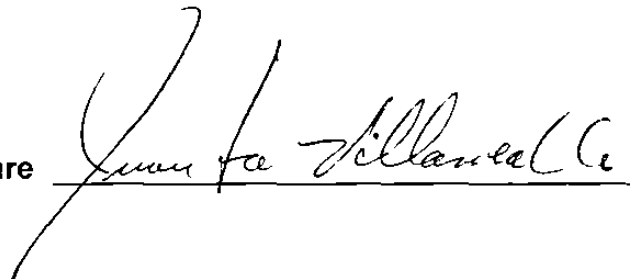
In the other hand, its combination with progesterone supplementation provided by CIDR device had a detrimental effect on fertility. Even when pregnancy rate was increased, pregnancy loss rate was increased too, in particular after day 60 post - AI. Also there was observed a consistent increment in vaginal discharge of various degrees, variable from light mucous to purulent form, from couple

days of device insertion through treatment period and at CIDR removal time, and presence of fluids in uterus when examined by ultrasonography what suggest a form of irritation and infection of genitalia and reproductive tract.

There is the possibility of impair the reproductive capability in the long term by inducing a chronic infectious metritis. In this work, 3 cows remain open after 3 matings and 3 required 2 or 3 matings to get pregnant, but the period between first and second services was longer than 65 days. Therefore, it is not advisable the use of flunixin meglumine combined with intravaginal CIDR devices.

Key words : flunixin meglumine, progesterone, prostaglandins, pregnancy, embryo.

Main advisor signature

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line. The signature is cursive and appears to read "Juan Carlos Villanueva".

DEDICATORIAS.

A mis hijos, Luis Ricardo y Jorge Alfonso, con todo mi amor.

A mi esposa, Elizabeth, quien siempre ha estado conmigo sin importar las circunstancias.

A mis padres.

A todos aquellos que de alguna forma han tenido confianza en mí y me han apoyado, tanto en mi vida privada como profesional.

AGRADECIMIENTOS.

A mis padres y familia política por todo el apoyo recibido durante cada proyecto que he decidido emprender.

A CONACYT por el apoyo financiero prestado para realizar estudios de posgrado.

A la Subdirección de Estudios de Posgrado de la Facultad de Agronomía de la UANL por mi formación académica como Maestro en Ciencias.

AL Dr. Juan F. Villarreal Arredondo por su interés y colaboración en mi formación profesional y su participación en el desarrollo del presente trabajo como asesor; gracias por su sincera amistad.

A mi comité de Tesis, Ph.D Javier Colín Negrete y Ph.D Javier García Cantú, tanto por su contribución como catedráticos en mi formación como Maestro en Ciencias como su participación en la dirección y asesoría durante la realización de éste trabajo. Gracias por sus aportaciones.

Al Dr. Emilio Olivares por su valiosa ayuda y asesoría en el análisis estadístico del presente trabajo.

A Laboratorios Shering Plough, en especial al Dr. Jorge Bächtold Sotelo, por el apoyo recibido para la realización de este proyecto.

Al programa CONACYT / SIREYES, por el apoyo financiero para la realización de este proyecto de investigación.

Al programa PAICYT de la UANL, por los fondos complementarios para la finalización del proyecto de investigación.

A mis compañeros y también candidatos al grado de Maestro en Ciencias, Ing. Raúl Hernández Macías, MVZ Luis Antonio Moreno Flores y MVZ Juan Antonio Hernández Ballesteros, por su desinteresado apoyo durante el tiempo que compartimos y en el que establecimos una gran amistad y conformamos un excelente equipo de trabajo.

A la Dra. Mayela Gallegos de la Hoya, por sus comentarios, los cuales ayudaron a enriquecer este trabajo.

Al Dr. Rigoberto González González y a la M.C. Juanita Aranda Ruiz, del laboratorio de biotecnología de la FAUANL, por las facilidades y atenciones prestadas no solamente durante el desarrollo del trabajo, sino durante toda mi estancia en esta Facultad.

Al Centro de Investigaciones Agropecuarias de la FAUANL, Campo Experimental El Canadá y Campo Experimental de Zootécnica de la FAUANL, por su apoyo en el desarrollo de éste trabajo.

Al Ing. Jorge Adrián Rivera Moxica, y a Ramón Estrada, futuro Ingeniero Agrónomo, por la ayuda prestada siempre que fue necesario, en especial durante el desarrollo del trabajo de campo del presente proyecto.

LISTA DE TABLAS .

Tabla		Página
1	Indices reproductivos.	94
2	Indices de pérdida de la gestación.	96
3	Porcentajes de parición.	100
4	Porcentaje de gestaciones perdidas.	101
5	Servicios por concepción y fertilidad a primer servicio.	105
6	Intervalo entre el servicio y la presentación de estros en vacas.	110
7	Intervalo entre estros en vaquillas.	111
8	Concentración de progesterona en vacas gestantes combinados los empadres 1997 y 1998.	117
9	Concentración de progesterona en vacas no gestantes combinados los empadres 1997 y 1998.	118
10	Concentración de progesterona por tratamiento en vaquillas.	122

LISTA DE FIGURAS .

Figura		Página
1	Inhibición de la vía metabólica del ácido araquidónico	33
2	Mecanismo luteotrópico en las células lúteas bovinas.	41
3	Mecanismo de control de la síntesis de progesterona en el cuerpo lúteo.	52
4	Biosíntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y otros productos del ácido araquidónico.	56
5	Síntesis de $\text{PGF}_2 \alpha$ relacionada con bajos niveles de progesterona.	57
6	Receptores hormonales uterinos y su relación durante el ciclo estral en rumiantes.	74
7	Modelo hipotético de la activación génica inducida por interferón bovino - tau.	75
8	Secuencia de eventos en el mecanismo de activación génica estimulado por interferón bovino - tau.	76
9	Vías alternas en la inhibición de $\text{PGF}_2 \alpha$ inducida por interferón bovino - tau.	77
10	Índices reproductivos por tratamiento.	102
11	Porcentajes de concepción, parición y gestaciones perdidas por tratamiento	103

Figura		Página
12	Concentración de progesterona en vacas gestantes combinados los empadres 1997 y 1998.	117
13	Concentración de progesterona en vacas no gestantes combinados los empadres 1997 y 1998.	118
14	Concentración de progesterona en vaquillas.	122

LISTA DE ABREVIATURAS.

AA	Acido araquidónico
AdC	Adenil ciclasa
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
AG	Acidos grasos
AL	Acido linoléico
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
B	Blastocisto, blastocito
Be	Blastocisto expandido
bIFN - τ	Interferón bovino tau
bIFN - α	Interferón bovino alfa
bIFN - τ R	Receptor de interferón bovino tau
Bt	Blastocisto temprano
bUCRP	Proteina de reacción cruzada de ubiquitina bovina
Ca ⁺⁺	Ion calcio
CEH	Colesterol ester hidrolasa
CaM	Calmodulina
CIDR	Dispositivo intravaginal de liberación controlada
CL	Cuerpo lúteo
COX	Enzima ciclooxigenasa
CPSF	Complejo proteina STAT fosforilada
DAG	Diacil glicerol
DHT	Acido dihidroeuicosatrienoico
DNA - BP	Proteina de unión a DNA
E ₂	Estradiol
E ₂ R	Receptor de estradiol
ECGF	Factor de crecimiento celular endotelial
EET	Acido epoxieicosatrienoico
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EOX	Enzima epoxigenasa
EPSI	Factor inhibidor de la síntesis de prostaglandinas endometriales
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FSH	Hormona folículo estimulante
GDP	Guanosin difosfato
GTP	Guanosin trifosfato
GnRH	Factor liberador de gonadotropinas
H	Hormona
HBMF	Factor de crecimiento heparínico
hCG	Gonadotropina coriónica humana
HDL	Lipoproteinas de alta densidad

HPETE	Ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos
I	Inositol
IA	Inseminación artificial
IFN	Interferón
IGF	Factor de crecimiento insulínico
IL- 1 β	Interleukin 1 β
IP	Inositol fosfato
IP ₂	Inositol bifosfato
IP ₃	Inositol trifosfato
IRF	Factor de respuesta a interferón
ISRE	Elementos de respuesta estimulados por interferón
IVF	Fertilizado in vitro
IVM	Madurado in vitro
JAK	Familia de cinasas Janus
JAK - 1	Cinasa Janus - 1
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LH	Hormona luteinizante
LHR	Receptor de la hormona luteinizante
LOX	Enzima lipoxigenasa
LT	Leucotrienos
LTS	Leucotrieno sintetasa
MC	Membrana celular
MCP - 1	Proteína monocito quimioattractante - 1
MHC	Complejo de histocompatibilidad principal
ml	Mililitros
min	Minutos
mg	Miligramos
mol	Molécula
MP	Metaloproteinasas
M _r	Peso molecular
NCAMP	Molécula adherente de células neurales
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NSAID	Desinflamatorios no esteroideos
α IFN - τ	Interferón ovino tau
OT	Oxitocina
OTR	Receptor de oxitocina
P ₄	Progesterona
P ₄ R	Receptor de progesterona
P - 450 _{arom}	Enzima citocromo P - 450 aromatasa
P - 450 _{scc}	Enzima citocromo P - 450 de separación de cadenas laterales de colesterol
P - 450 _{17α}	Enzima citocromo P - 450 17 alfa - hidrolasa
PCS	Enzima prostaciclina sintetasa

PG	Proteína reguladora de unión guanil nucleótido, proteína G
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGEM	13,14 - dihidro - 15 - keto - PGE ₂
PGF _{2α}	Prostaglandina F ₂ alfa
PGFM	13,14 - dihidro - 15 - keto - PGF _{2α}
PGG	Endoperóxido cíclico de prostaglandinas G
PGH	Endoperóxido cíclico de prostaglandinas H
PGI ₂	Prostaglandina I ₂ , prostaciclina
PGS	Enzima prostaglandina sintetasa
PI	Fosfatidil inositol
PIP	Fosfatidil inositol fosfato
PIP ₂	Fosfatidil inositol bifosfato
PKA	Protein cinasa A
PKC	Protein cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PRID	Dispositivo intravaginal de liberación de progesterona
rbIFN - τ	Interferón bovino tau recombinante
roIFN - τ	Interferón ovino tau recombinante
R	Receptor
RE	Reticulo endoplásmico
RNA _m	Acido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
SOR	Radical supróxido
STATP	Proteínas transductoras de señales y activadoras de transcripción.
T _C	Linfocitos T citotóxicos
T _H	Linfocitos T auxiliares
TE	Transferencia de embriones
TGF	Factor transformador de crecimiento
TIMP	Inhibidores tisulares de metaloproteinasas
TNF	Factor de necrosis tumoral
TXA ₂	Tromboxano A ₂
TXS	Enzima tromboxano sintetasa
UI	Unidades internacionales
3βHSD	Enzima 3β-hidroxi esteroideshidrogenasa/Δ ⁵ - Δ ⁴ - isomerasa
15 - PGDH	Enzima 15 - hidroxyl - prostaglandina dehidrogenasa
13, 14 - PGR	13, 14 - prostaglandina reductasa
13,14 - dihidro - 15 - keto - PGMs	13,14 - dihidro - 15 - keto - metabolitos de prostaglandina

1.0 INTRODUCCION .

1.1 Justificación.

La eficiencia reproductiva ocupa un lugar prioritario al evaluar la rentabilidad de cualquier hato ganadero, ya que el desempeño reproductivo afecta directamente a las utilidades a través de la baja producción debida a una cantidad excesiva de días abiertos y el incremento en el intervalo entre partos, la producción de reemplazos y la proporción existente entre los vientres desechados en forma voluntaria e involuntaria.

Anteriormente el alto índice de retornos a estro después del servicio era atribuido a fallas en la fertilización. Sin embargo, varios estudios muestran que la alta incidencia de muerte y pérdida embrionaria temprana es una de las principales causas de pobre desempeño reproductivo (Maurer y Echterkamp, 1985; Maurer y Chenault, 1983; Ayalon, 1978; Ayalon, 1984).

Maurer y Echterkamp (1985) clasifican las causas de repetición de estros en varias categorías dentro de las cuales el 75 % de ellas están relacionadas con la función ovárica y disfunciones endocrinas foliculares y lúteas. El 25 % restante corresponde a anomalías del aparato reproductor (11 %) y anomalías cromosomales (14 %)

Se ha estimado que las pérdidas embrionarias representan entre el 30 y el 40 % de las causas de falla reproductiva con una incidencia de alrededor del 10 % en vaquillas pero que puede incrementarse hasta el 50 % en vacas, mientras que las fallas en la fertilización representan solo el 15 % (Sreenan y Diskin , 1987).

El desarrollo de la transferencia de embriones y la fertilización in vitro soluciona el problema de las fallas en la fertilización. Sin embargo, los resultados generales obtenidos a la fecha mediante estas técnicas son contradictorios, ya que las tasas de gestación establecidas tienen un rango muy amplio de variabilidad y desde el punto de vista del productor su utilización no justifica su costo económico, por lo que cada vez son más los productores que abandonan su práctica. Su relativo fracaso se debe a factores intrínsecos al embrión y/o a su manipulación, o que se presentan en el útero de la donadora o la receptora.

Parece ser que independientemente del tipo de ganado y el sistema de producción los embriones más susceptibles son aquellos en etapa de desarrollo temprano (6 - 20 días después de la ovulación). La pérdida gradual de embriones ocurre generalmente entre los días 8 y 18, en lo que coinciden varios investigadores (Roche et al., 1981; Sreenan y Diskin, 1987). En vientres repetidores el 42 % de las pérdidas embrionarias tempranas ocurren entre los días 6 y 7, inmediatamente después de que el embrión ha entrado en el útero

(Ayalon, 1978).

1.2 Impacto económico de la muerte y pérdida embrionaria.

El costo de producción de una cría mediante diferentes sistemas ha sido analizado por Orozco (1996), reportando valores que se incrementan en función del mérito genético, raza, época del año, zona geográfica, etc. El costo de producción de una cría mediante inseminación artificial es de US\$36.25 por servicio y producida mediante monta directa es de US\$31.60. Los animales destinados a transferencia embrionaria (tanto donadoras como receptoras) son generalmente mantenidas en condiciones que garanticen la sobrevivencia embrionaria y el establecimiento de la gestación que implican un manejo especializado que por supuesto significa un mayor desembolso económico. El costo de la transferencia varía de acuerdo al tipo de embrión utilizado, servicio técnico y la calidad genética de los padres, con un costo mínimo promedio de US\$114.56 por embrión congelado y US\$107.25 por embrión fresco (Orozco,1996).

Desde 1979 Bellows et al. reconocen cuatro factores que reducen la producción neta de becerros después de analizar datos provenientes de hatos de ganado de carne servidos mediante monta natural a lo largo de 14 años. Atribuyen el 60 % de la reducción en la producción a fallas en la fertilización y a muerte embrionaria. Muerte perinatal, muerte en el periodo nacimiento - destete y muerte fetal durante la gestación en conjunto, representan el 40 %

restante.

Maurer y Echterkamp (1985) con base en datos de la producción de becerros mediante IA y monta directa recopilados durante un periodo de 4 años concluyen que la reducción en la producción de becerros como resultado de la diferencia entre vientres gestantes y no gestantes 60 días después de finalizado el periodo de empadre promedió el 51.8 % de la reducción total de la producción de becerros en ese periodo. Aunque el número de vientres clasificados como repetidores del total de las vacas servidas fue bajo (1.0 - 1.7%), el promedio de repetidoras no gestantes fue del 10 %. En comparación, el número de repetidoras en ganado lechero puede variar del 10 al 18 % (Ayalon, 1984; Pelissier, 1970).

En México los desechos involuntarios de ganado lechero representan alrededor del 60 % del total de los animales eliminados del hato. De éstos el 23 % se deben a problemas reproductivos, muy por encima del resto de las causas de desecho (problemas de ubres, por ejemplo, que es la siguiente en importancia representan el 15 %) (Medina, 1997). En los Estados Unidos de Norteamérica se ha estimado que las pérdidas netas anuales en los ingresos debido a deficiente desempeño reproductivo en ganado lechero ascienden a US\$116.00 anuales por vaca, y que el incremento de solamente el 5% en la tasa de concepción puede incrementar el ingreso anual neto en US\$1226.00 (Pelissier, 1982, Hady et al ,1993; citados por De Jarnette.1994)

En ganado de carne, especialmente en sistemas de producción extensivos, la situación es más drástica ya que generalmente se depende de temporadas de empadre estacionales bien establecidas por lo que los vientres deben quedar gestantes en el menor tiempo posible. Un desfase en el ciclo estral o retorno a estro después del servicio puede ocasionar que no se encuentren gestantes al final de la temporada de empadre y sin oportunidad de volver a ser servidas. La muerte embrionaria generalmente es acompañada de la persistencia prolongada del cuerpo lúteo (CL) y por consiguiente del retraso en el retorno a estro que puede variar de 3 a 6 semanas (Beal et al., 1992; Kaestelic et al., 1988). Además de la reducción en la producción de becerros vivos, representa pérdidas económicas debido a gastos por concepto de manejo y alimentación y probablemente estos vientres serán desechados a causa de su aparente pobre desempeño reproductivo ya que no justifican su permanencia en el hato. Es difícil establecer el número de desechos con exactitud ya que es muy variable pero puede llegar a ser hasta del 100 %, lo que dependerá de las condiciones durante ese año y del tipo de productor.

1.3 Objetivo.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar si la aplicación de meglumina de flunixin y su combinación con progesterona en etapas tempranas de la gestación bloquea el mecanismo luteolítico temprano, estimula la sobrevivencia y desarrollo del embrión y ayuda al establecimiento de la gestación mejorando la fertilidad en bovinos, especialmente a primer servicio

1.4 Hipótesis.

Las hipótesis planteadas para el desarrollo del presente trabajo fueron las siguientes:

- a) La aplicación de meglumina de flunixin inhibe la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante la etapa de la gestación temprana ayudando al mantenimiento del CL y establecimiento de la gestación.

- b) La combinación de meglumina de flunixin con progesterona reproduce el efecto fisiológico del bIFN - τ durante el periodo de reconocimiento de la gestación manteniendo el CL mediante la inhibición de la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial y permitiendo el desarrollo embrionario y el mantenimiento de la gestación.

2.0 REVISION DE LITERATURA.

2.1 Factores que afectan a la fertilidad : generalidades.

La inseminación artificial y la transferencia de embriones nos permiten lograr el avance genético con mayor rapidez y conservar material genético por tiempo indeterminado manteniendo un número mínimo de animales. Sin embargo, nos tenemos que enfrentar con el problema de la infertilidad, que significa tanto la pérdida del material genético valioso como la frustración por el tiempo y trabajo invertidos. Para el productor además representa un incremento en costos y en no pocas ocasiones pérdida económica. Solamente serán discutidos de manera general los factores relacionados directamente con la pérdida de la gestación durante el período postservicio y de la gestación temprana, ya que es el período en el cual se enfoca este trabajo.

2.1.1 Estado nutricional, peso y condición corporal.

Los efectos nutricionales sobre la reproducción dependerán de la naturaleza del elemento en déficit (energía, proteína, vitaminas o minerales). Sin embargo, bajo los sistemas tradicionales de producción usualmente se encuentran deficiencias en más de uno de estos elementos (Mukasa – Mugerwa, 1989c). Generalmente el estado nutricional de un animal es estimado mediante su peso y condición corporal. Cada individuo tiene un peso corporal óptimo o “crítico” para reproducirse y aquellos animales que se encuentran por debajo de este

punto crítico tienen menor probabilidad de quedar gestantes (Mukasa - Mugerwa, 1989c). La condición corporal es la calificación subjetiva del estado nutricional del animal con base en la estimación visual de la cantidad de grasa y músculos corporales (Mukasa - Mugerwa, 1989c). Cambios en la condición corporal pueden ser de utilidad para estimar el nivel de desempeño reproductivo, debido a que una pobre condición física generalmente refleja estados de subnutrición, desnutrición, enfermedad crónica o parasitosis severa, predisponentes de la disminución de la fertilidad. En general, los estados de subnutrición o desnutrición están relacionados con la reducción de la función lútea y baja respuesta ovárica a LH.

2.1.2 Estado reproductivo.

La lactancia en especial tiene un efecto negativo tanto sobre el peso como en la condición corporal, ya que la vaca utiliza las reservas corporales para mantener la lactancia en respuesta al amamantamiento y al ordeño. Este efecto es mayor en vacas primíparas jóvenes que en vacas con mayor número de partos y de mayor edad (Mukasa - Mugerwa, 1989a).

La presentación de ciclos cortos postparto contribuyen al incremento de la infertilidad durante los primeros 30 o 40 días postparto. El estro seguido de ovulación destinada a desencadenar un ciclo corto es normal y fértil. Sin embargo, el cuerpo lúteo (CL) involucrena antes de que el ovario reciba la señal de la existencia de una "gestación" (Ramirez Godínez et al., 1982). El CL

es más pequeño y secreta menos progesterona (P_4), aún cuando la secreción de gonadotropinas es normal, por lo que su desarrollo también debería ser normal (Garverick et al., 1988; Manns et al., 1983). Probablemente su regresión prematura sea forzada por las altas concentraciones de $PGF_{2\alpha}$ producidas por el útero como parte del mecanismo de involución uterina (Short et al., 1990).

2.1.3 Factores endocrinos.

El transporte retardado o acelerado del óvulo como resultado de un desbalance estrógeno - progesterona es causa predisponente de la pérdida de la gestación en el período preimplantación. Altas concentraciones de estrógeno aceleran el ritmo de descenso del embrión enviándolo al útero prematuramente. Bajas concentraciones de estrógenos disminuyen el ritmo de descenso, retrasando la llegada del embrión al útero. Estos cambios en el ritmo de transporte embrionario provocan estados de asincronía entre la etapa de desarrollo embrionario y el estado fisiológico del útero provocando la pérdida embrionaria. Se ha encontrado una correlación estrecha entre la concentración de P_4 y la producción de bINF - τ embrionaria; a mayor concentración de P_4 la producción de bINF - τ es mayor, y viceversa (Kerbler et al., 1997). Concentraciones de P_4 anormalmente bajas impiden la preparación uterina para recibir al embrión y pudieran retrasar el desarrollo del embrión, mientras que la secreción disminuída de bINF - τ por el embrión es incapaz de desencadenar el mecanismo de reconocimiento de la gestación y bloquear el mecanismo luteolítico

2.1.4 Edad.

En ganado lechero la mayor eficiencia reproductiva se presenta entre los 3 y 4 años de edad, comienza a disminuir ligeramente entre los 5 y 7 años, y sufre un marcado descenso en animales de 7 años de edad o mayores. En ganado de carne existe una mayor variación, pero generalmente el mayor nivel de eficiencia reproductiva se presenta entre los 4 y 9 años de edad (Bearden y Fuquay, 1997a). En ganado cebuino (*Bos Indicus*) el pico de fertilidad se presenta entre los 6 y 7 años de edad (Mukasa - Mugerwa, 1989a).

2.1.5 Factores medioambientales.

Aunque ésta categoría incluye más factores, el estrés calórico y el ocasionado por manejo han sido señalados como los de mayor relevancia. Los estados de tensión térmica han sido reconocidos como los principales causantes de la disminución en la eficiencia reproductiva en la mayoría de las especies domésticas. Influyen directamente sobre los gametos y principalmente sobre los embriones y además interfieren con el mecanismo de reconocimiento temprano y la capacidad embrionaria para inhibir la secreción de prostaglandinas debido a alteraciones en la secreción endócrina. Generalmente, si la temperatura ambiental causa un incremento de 1°C en la temperatura corporal afecta negativamente a los embriones (Bearden y Fuquay, 1997b), particularmente durante las dos semanas siguientes al servicio (Ryan et al.(1993), citado por Gordon 1994b). Aunque muchos de los embriones sometidos a estrés termico son dañados pueden continuar su

desarrollo pero no son capaces de implantarse (Bearden y Fuquay, 1997b). Gordon (1994b) establece que la exposición crónica de los embriones a temperaturas de 40°C por 60 horas tiene como resultado la pérdida embrionaria. Biggers et al. (1987) reportan en uno de sus estudios que aunque la tasa de gestación no fue significativamente alterada, el peso de los embriones si fue menor bajo estrés calórico y sugieren que el estrés calórico pudiera aumentar la mortalidad embrionaria. Geisert et al. (1988) encontraron que vacas sufriendo estrés térmico entre los días 8 y 17 de gestación sufrieron alteraciones en el ambiente uterino, así como en el crecimiento y actividad secretora del embrión. Registraron incrementos en la temperatura rectal y una reducción en el peso del embrión, así como un incremento en el contenido de calcio y proteínas en el cuerno uterino ipsilateral al ovario del CL de gestación. Al trabajar con tejido endometrial colectado el día 17 del ciclo de vacas gestantes y no gestantes Putney et al. (1988a) señalan que sin importar el estado reproductivo de los vientres al ser sometidos a estrés calórico la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ sufre un rápido incremento, mientras que el tratamiento con oxitocina (OT) (1 UI/ mg de tejido) induce un incremento en la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial de vacas ciclando sin importar la temperatura. El endometrio de vacas gestantes no responde a la estimulación de OT a 39°C; sin embargo, la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por OT se incrementa cuando los vientres son sometidos a estrés calórico lo que compromete la viabilidad del embrión durante la etapa temprana de gestación. Observaron también que la producción de $\text{bINF-}\tau$ se reduce en un 72 % en condiciones de estrés

calórico, coincidente con el incremento de la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial, además de incrementarse la secreción de PGE_2 . Posteriormente (1998b) los mismos autores observaron que el tratamiento con OT (100 UI) incrementó la concentración promedio de PGFM, pero el incremento fue mayor en vacas ciclando y en vacas gestantes con embriones de desarrollo retardado comparado con vacas gestantes y embriones de desarrollo normal. Bajo estrés térmico, encontraron un incremento en la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y PGE_2 tanto en vacas ciclando como en vacas gestantes, aunque este incremento fue menor en vacas gestantes con embriones desarrollados normalmente.

El estrés ocasionado en los animales mediante el manejo, como el aislamiento, la restricción, los cambios de alimentación, vacunación y desparasitación, transporte, inseminación, transferencia, etc., es un factor que también afecta la fertilidad. Se cree que su efecto se lleva a cabo mediante el sistema endócrino con participación de la corteza adrenal y catecolaminas. En presencia de estrés la hipófisis anterior secreta ACTH que a su vez estimula la liberación de cortisol y otros glucocorticoides de la corteza adrenal que interfieren principalmente con el mecanismo de LH y pueden producir disminución del flujo sanguíneo hacia el CL debido a alteraciones en la presión sanguínea sistémica. Aunque es una respuesta de corta duración puede afectar la fertilidad si el animal se encuentra en un momento crítico del ciclo. Se ha observado principalmente en ganado de carne ya que generalmente no está acostumbrado a permanecer en confinamiento y al manejo de forma rutinaria,

como el ganado lechero (Bearden y Fuquay, 1997a).

2.1.6 Factores inmunes o incompatibilidad inmunológica.

La incompatibilidad inmunológica puede afectar tanto a la fecundación como causar la muerte embrionaria. El embrión puede actuar como antígeno mediante sus genes complementarios paternos, que desencadenan una respuesta inmunológica ocasionando la muerte embrionaria. La presencia de anticuerpos contra semen en secreciones uterinas ha sido reportada por Muñoz de Cote et al. (1980), lo que sensibiliza a la madre contra el producto al que posteriormente reconocerá como un antígeno o agente extraño provocando su eliminación. Así mismo, el estado homocigótico dentro de grupos sanguíneos ha sido relacionado con fallas en la fertilización y la pérdida embrionaria (Hafez, 1996).

2.1.7 Factores anatomo - fisiológicos.

Zemjanis (1980) menciona y clasifica varios factores de este tipo que afectan la fertilidad.

2.1.7.1 Defecto en la ovogénesis.

Teóricamente los óvulos defectuosos pueden ocasionar muerte embrionaria temprana. Las únicas evidencias con que se cuenta son circunstanciales ya que por razones obvias su diagnóstico es imposible y es difícil obtener información experimental confiable. Aunque la etiología es desconocida se cree

que pudieran estar involucrados factores genéticos (Zemjanis, 1980).

2.1.7.2 Ovulación retardada.

Puede ocasionar envejecimiento del óvulo que es acompañado por cambios degenerativos. La fertilidad del óvulo es normal, a menos que el tiempo transcurrido sea demasiado. El índice de pérdidas es elevado en embriones provenientes de éste tipo de óvulos (Zemjanis, 1980).

2.1.7.3 Ovaritis.

La inflamación ovárica severa, uni o bilateral, interfiere tanto con la ovogénesis como con la ovulación y la luteinización. Puede ser causada por trauma, generalmente a la palpación, o por infecciones genitouterinas ascendentes. El pronóstico dependerá del grado de inflamación (Zemjanis, 1980).

2.1.7.4 Hidrosalpinx.

La distensión del oviducto debido a la acumulación de fluidos puede involucrar uno o más segmentos o al oviducto en su totalidad. Puede ser ocasionada por trauma o infecciones ascendentes (Zemjanis, 1980).

2.1.7.5 Perisalpingitis.

Es resultado de la formación de adherencias entre el mesosálpinx y el mesovario, incluyendo muchas veces a la fimbria. Afecta la fertilidad

principalmente al interferir con la motilidad oviductal (Zemjanis, 1980).

2.1.7.6 Salpingitis.

Es la inflamación del oviducto pero sin la presencia de obstrucción. Puede ser ocasionada por infecciones ascendentes (Zemjanis, 1980).

2.1.7.7 Desordenes del útero, incluidos desórdenes anatómicos, funcionales e infecciosos.

La metritis y la endometritis son asociadas con atonía e inercia uterinas. Ocasionan fiebre, depresión y pueden evolucionar hacia una metritis crónica. Generalmente van acompañadas de infección, piometra y/o mucometra y si no son tratadas rápidamente pueden ocasionar la presencia de abscesos uterinos y el ascenso de la infección hacia el oviducto ocasionando salpingitis y ovaritis. Las infecciones del tracto reproductivo son contraídas generalmente al parto, en condiciones de retención placentaria y durante distocias y abortos. La inseminación y la transferencia de embriones pueden también ser causales de su aparición. Estas infecciones son causadas por varios agentes bacterianos (*Brucella abortus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Campylobacter fetus*, *Corynebacterium pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aureoginosa*, *Staphilococco spp* y *Streptococco spp*); protozoanos (*Trichomona fetus*) y agentes virales como los virus de rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y diarrea viral bovina (BVD) (Zemjanis, 1980)

Aunque el útero es capaz de eliminar infecciones, esta habilidad está relacionada con la actividad ovárica. Durante el periodo de dominancia de P_4 el útero es altamente susceptible debido a que el pH del útero es bajo, lo que permite el crecimiento bacteriano. Las secreciones uterinas no poseen efecto detoxificante, el epitelio es menos permeable a las bacterias y la presencia de leucocitos está retrasada ya que el sistema leucocitario es estimulado en etapas posteriores. Por el contrario, durante la etapa de dominancia folicular (proestro y estro) se facilita la defensa uterina ya que por acción estrogénica y prostaglandínica se incrementa la vascularización uterina, la lámina propia de la mucosa se encuentra edematizada y permeable, y se incrementa el número y la acción de los macrófagos. Además las secreciones uterinas en esta etapa son moderadas (Mukasa - Mugerwa, 1989b).

Otros desórdenes uterinos asociados con disminución en la fertilidad son los desórdenes cervicales, como la falla o deficiencia cervical para sellar el orificio hacia cavidad uterina, la aplasia segmental que puede presentarse en cualquier segmento uterino), la cervicitis y los abscesos paracervicales y pericervicales. Estos últimos afectan la fertilidad cuando su contenido es drenado hacia el interior del canal cervical y cavidad uterina (Zemjanis, 1980). La formación de adherencias, fibrosis y posteriormente cicatrices en el útero interfieren con el establecimiento de la gestación dependiendo del grado, situación y extensión de la lesión (Zemjanis, 1980).

2.2 Factores relacionados con la técnica reproductiva utilizada.

Además de los factores generales mencionados anteriormente existen factores inherentes a la técnica reproductiva utilizada (IA / TE) que afectan la fertilidad y al establecimiento de la gestación.

2.2.1 Inseminación Artificial.

Comprende principalmente tres factores: la inseminación a tiempo inadecuado, la técnica utilizada y experiencia del inseminador, y la calidad del semen (Bearden y Fuquay,1997c).

2.2.1.1 Inseminación a tiempo inadecuado, que incluye la deficiencia en la detección de celos y la inseminación a tiempo fijo.

Las deficiencias en la detección de celos se relacionan principalmente con el poco tiempo destinado a su detección, desinterés durante la observación y a la inexperiencia de quien la realiza. Sin embargo también debemos considerar la ocurrencia de celos silenciosos e irregulares (Bearden y Fuquay,1997c). Como alternativa para solucionar las deficiencias en la detección de estros se ha recomendado realizar la inseminación a tiempo fijo después de la sincronización de estros. Sin embargo, se ha visto que la presentación de estros se distribuye en el tiempo de una manera muy amplia que dependerá del método de sincronización utilizado, ocasionando que muchos de los animales sean servidos en tiempo inadecuado, ya sea antes o después del tiempo óptimo(Bearden y Fuquay,1997c)

2.2.1.2 Técnica y experiencia del inseminador.

Incluye el manejo deficiente del termo, el manejo y la descongelación deficiente del semen, la deposición de semen en sitio inadecuado, la poca higiene durante la inseminación y la inducción de lesiones uterinas durante la inseminación y manipulación del útero (Bearden y Fuquay, 1997c).

2.2.1.3 Calidad del semen.

Los servicios infértiles con toros de alta fertilidad probada se deben principalmente a pérdidas o mortalidad embrionaria, mientras que aquellos de toros de baja fertilidad se deben principalmente a fallas en la fecundación y muerte embrionaria. Asumiendo que el toro del cual se colectó el semen es de fertilidad probada, la calidad del semen puede ser alterada por deficiencias en la colección, procesamiento, manejo y almacenamiento del semen. El semen puede ser también una vía importante en la transmisión de enfermedades infecciosas debido a deficiencias en el control sanitario y el uso inadecuado u omisión de antibióticos en los diluyentes (Bearden y Fuquay, 1997c).

2.2.2 Transferencia de Embriones.

Debido a que presenta una mayor complejidad técnica, la transferencia de embriones presenta un mayor número de variables de las que depende su éxito o fracaso. Entre los principales factores relacionados con la fertilidad podemos mencionar el tipo de embrión utilizado, la técnica utilizada, aspectos sanitarios, la sincronía fisiológica entre el grado de desarrollo embrionario y el estado

uterino al momento de la transferencia y la calidad de los embriones transferidos (Gordon, 1994a).

2.2.2.1 Tipo de embrión utilizado, obtenido in vivo o fertilizado in vitro congelado o fresco.

Los embriones obtenidos in vivo se comportan de manera diferente a los obtenidos in vitro. Utilizando embriones frescos de buena calidad es posible obtener entre el 60 y 70 % de gestaciones, mientras que con embriones obtenidos in vitro se obtiene de 50 a 60 % (Palma y Brem, 1993). La pérdida embrionaria entre los días 35 y 90 es mayor en embriones producidos in vitro (20 %) que en los obtenidos in vivo (12 %) (Gordon, 1994a). La transferencia de embriones congelados presenta menor porcentaje de fertilidad (50 - 60 %) que la transferencia de embriones en fresco o conservados en medios de cultivo por periodos cortos de 1 o 2 horas. El mayor porcentaje de fertilidad se obtiene con embriones transferidos en fresco dentro del rango de 1 hora posterior a la colección.

2.2.2.2 Técnica utilizada en la transferencia.

De acuerdo con Palma y Brem (1993), se obtienen 10 a 20 % más gestaciones mediante el método quirúrgico que mediante el método no quirúrgico. La baja tasa de gestaciones obtenida mediante transferencia no quirúrgica es debida principalmente a dos factores. Primeramente a introducción del catéter implica el acarreo de infecciones hacia el útero vía vaginal (Palma y Brem, 1993), y

segundo, a trauma uterino y liberación de prostaglandinas (Gordon, 1994a). La introducción del instrumental de transferencia incrementa las probabilidades de que ocurra dicho trauma, además de que implica manipulación del útero, ocasionando una respuesta inflamatoria con la consecuente migración de macrófagos y células inmunes que convierten al útero en un ambiente adverso para el embrión (Gordon, 1994a).

2.2.2.3 Higiene.

Una higiene deficiente permite la introducción y exposición uterina a agentes externos irritantes y patógenos. Al momento de la transferencia se incrementa el riesgo de infecciones debido a que el útero es más susceptible a éstas una semana después del estro que durante el estro (Gordon, 1994a).

2.2.2.4 Sincronización entre donadora y receptora.

Lo ideal es la obtención de una exacta sincronía entre donadora y receptora. Sin embargo, una diferencia de ± 1 día es aceptable, aunque debe esperarse cierta reducción en el índice de fertilidad. Cuando la diferencia entre donadora y receptora es de ± 2 días los resultados obtenidos son muy pobres por lo que incluso algunos autores recomiendan no realizar la transferencia en éstos casos (Gordon, 1994a).

2.2.2.5 Calidad de los embriones.

Los mayores porcentajes de fertilidad se obtienen con embriones de calidad

excelente o grado 1, tanto en fresco como congelados. Embriones calificados como grado 2 (buena calidad) y grado 3 (pobre calidad) son apropiados para la transferencia en fresco, aunque debe esperarse una reducción en la fertilidad, en especial con embriones grado 3 (de Armas y Solano, 1995). El porcentaje de gestaciones con embriones grados 1 y 2 es del 60 al 70 % (Palma y Brem, 1993). Los embriones grado 4 (malos) son de aptitud muy variable y son apropiados para la transferencia en fresco pero obviamente la fertilidad es mucho menor que en la transferencia de embriones grados 1, 2 y 3 (de Armas y Solano, 1995). Sin embargo, embriones clasificados como dudosos pueden ser cultivados durante unas horas (2 a 4 horas) y su desarrollo evaluado. Su transferencia es decisión del evaluador y los resultados obtenidos pueden ser muy variables (Palma y Brem, 1993).

2.3 Alternativas utilizadas para incrementar la fertilidad.

Debido a que el objetivo primario de una empresa ganadera es la producción de una cría viva como base de su manejo sustentable (el ganado lechero además debe sostener una lactancia por año) se han realizado muchos intentos para garantizar el establecimiento de la gestación y elevar la fertilidad por medio de diversos métodos, como el uso de P_4 y progestágenos, GnRH, hCG, interferónes y sus recombinantes, y la manipulación de la alimentación. Sin embargo, todos los tratamientos arrojan resultados hasta la fecha contradictorios e inconsistentes.

2.3.1 Factores liberadores de gonadotropinas (GnRH).

Se han llevado a cabo trabajos en los que la aplicación de GnRH se ha realizado en varias etapas del ciclo que incluyen al momento de la sincronización de estros, al momento del servicio y varios tiempos postinseminación (12 horas, día 5, día 7 y día 11 - 14) con resultados muy variables. De acuerdo con Mann y Lamming (1995) su aplicación ocasiona la reducción de la concentración de estradiol (E_2) plasmático y la reducción de $PGF_{2\alpha}$, así como el incremento en la concentración de P_4 . Silcox et al. (1995) reportan que al ser suministrada 48 horas después de la aplicación de prostaglandinas durante la sincronización es efectiva sincronizando el tiempo de ovulación pero no altera la fertilidad. Mee et al. (1993) observaron que su aplicación al momento de la inseminación incrementa la proporción de células lúteas grandes en el CL en desarrollo, aumenta la concentración de P_4 asociada con un descenso de LH sérico, estimula la secreción pulsátil de FSH e incrementa la sobrevivencia embrionaria, pero solamente en vacas repetidoras.

Su aplicación después del servicio ha arrojado resultados inconsistentes. Mientras Lefever et al. (1991) reportan que su aplicación 12 horas postservicio no incrementa la sobrevivencia embrionaria, otros autores reportan incrementos en etapas posteriores. Burke et al (1996) reportan un incremento en la tasa de concepción y gestación a primer servicio relacionado con el incremento de P_4 plasmática con la aplicación de GnRH el día 5

postinseminación. Sin embargo, estos resultados estuvieron altamente correlacionados con la condición corporal. Schmitt et al. (1996a) obtuvieron incrementos en la fertilidad al aplicar GnRH el día 7, pero esto después de la ovulación de un folículo persistente dominante de la primera onda folicular. Stevenson et al. (1993) no observaron incremento en la tasa de gestaciones en forma consistente al aplicar GnRH entre el día 11 y 14 después de la inseminación a pesar de prolongar la vida del CL, alterar el número y distribución de folículos e incrementar la concentración de P_4 . Anteriormente, Rettmer et al. (1992) reportaron que la GnRH no prolonga la función lútea en vaquillas durante esta etapa.

2.3.2 Gonadotropina coriónica humana (hCG).

La hCG estimula la formación de cuerpos lúteos accesorios por su efecto sobre los folículos grandes en fase lútea temprana aumentando la producción de P_4 endógena y por lo tanto incrementando su concentración plasmática. Kerbler et al. (1997) reportan un aumento en la fertilidad (75 % con tratamiento vs. 64.7 % en el control) al aplicar 1500 UI de hCG el día 5 postservicio. Por otro lado, Schmitt et al. (1996c), reportan que su aplicación el día 5 postservicio es igual de efectiva que la GnRH para inducir cuerpos lúteos accesorios, sin embargo no observaron incrementos en la fertilidad al aplicarlo en animales sujetos a estrés térmico. Observaron además mayores concentraciones de P_4 en animales en los que se estableció la gestación especialmente en vaquillas

La principal desventaja que presenta es que su uso repetido puede inducir la

formación de anticuerpos que neutralizan la molécula de hCG (Surdby y Torjesen, 1978).

2.3.3 Suplementación de progesterona (P₄) y progestágenos a varios tiempos después del servicio.

Ya que la pérdida embrionaria se ha relacionado con niveles bajos de P₄ se ha realizado la suplementación de P₄ natural o sintética mediante varios métodos que incluyen el uso de dispositivos vaginales de liberación de P₄, implantes auriculares, inyección parenteral e intravenosa o en forma oral. La manera en que la P₄ influye el crecimiento y desarrollo fetal es desconocida, sin embargo, está comprobado que juega un papel muy importante en el desarrollo embrionario y establecimiento de la gestación (Ashworth y Bazer, 1989; Ashworth et al., 1989). En vacas servidas que presentan luteólisis la concentración de P₄ tanto en plasma como en leche es más baja durante la segunda mitad de la fase lútea que en vacas gestantes (Mann y Lamming, 1995; Lamming et al., 1989; Lukesewska y Hansel, 1980).

La P₄ estimula la producción de secreciones endometriales necesarias para el desarrollo del embrión en la fase temprana de la gestación (Geisert et al., 1992) y su administración en esta etapa ocasiona cambios en el ambiente uterino por condiciones similares a las encontradas en etapas posteriores o avanzadas de gestación. La P₄ estimula el desarrollo embrionario (Kleeman et al., 1994, Walker et al., 1992), inhibe el desarrollo de receptores de OT (Beard

et al., 1994a; McCracken , 1980) y suprime la concentración de OT endometrial (Lau et al., 1993). El tratamiento de vacas con P_4 entre los días 1 - 4 de gestación tiene como resultado cambios en la secreción de polipéptidos durante los días 5 - 14 y un incremento de la secreción de bIFN- τ en el día 14, sugiriéndose que estos cambios son directa o indirectamente responsables del incremento en el desarrollo del embrión para el día 14 (Garret et al., 1988a).

Robinson et al. (1989), obtuvieron incrementos del 30 % en la fertilidad al insertar PRIDs por una semana los días 7 y 10 postservicio en vacas Holstein. También Macmillan et al. (citado por Gordon, 1990a) reportan diferencias significativas (79.2 % vs. 65.7 %) al utilizar CIDRs en los días 6, 7 o 9 del ciclo por un periodo de 6 - 12 días. Por el contrario, Van Cleeff et al. (1991b) no obtuvieron incremento en la fertilidad (57.9 CIDR vs 53.6 % control) utilizando CIDR del día 7 al 13 postservicio, y en un trabajo posterior en 1996 reportan además que la suplementación de P_4 dentro de los primeros 2 días postinseminación reduce la viabilidad embrionaria, comparando los vientres tratados y no tratados entre los días 17 y 22 postinseminación. Esto puede explicarse mediante evidencias que indican que niveles prematuros muy elevados de P_4 estimulan la secreción endometrial prematura de $PGF_{2\alpha}$ provocando ciclos estrales cortos tanto en vaquillas como en vacas (Garret et al., 1988b; Wilmut et al., 1985; Battista et al 1984)

En ovinos también ocurre una alteración en la secreción de proteínas endometriales al administrar P_4 entre los días 4 y 9 de gestación (Ashworth y Bazer, 1989). El tratamiento de borregas con P_4 durante los tres primeros días de gestación estimula el crecimiento fetal (Kleeman et al., 1994). La exposición de embriones ovinos a P_4 in vitro tiene como resultado el desarrollo de fetos de mayor masa corporal después de ser transferidos a borregas receptoras (Walker et al., 1992). Crisman et al. (1980) proponen que el tratamiento con P_4 durante este periodo acelera el movimiento del embrión desde el oviducto hacia el útero por lo que el crecimiento fetal puede ser consecuencia del trastorno en la migración embrionaria, al existir asincronía entre el estado fisiológico del útero ya influenciado por P_4 y el estado de desarrollo del embrión.

2.3.4 Interferón bovino- τ exógeno, análogos y recombinantes.

La habilidad del bIFN- τ para estimular el establecimiento de la gestación probablemente se debe al rescate del embrión retardado en su crecimiento pero normal en su desarrollo y potencialmente viable mediante la activación natural del mecanismo de reconocimiento de la gestación, ya que de otra forma no será capaz de mantener el CL (Roberts et al., 1996). Ejerce su acción antiluteolítica mediante la inducción de un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas endometriales (EPSI) (Meyer et al., 1995, Danet - Desnoyers et al., 1993) que inhibe la secreción pulsátil de prostaglandinas $F_{2\alpha}$ (Meyer et al., 1996, Spencer et al., 1995) y suprime los receptores de OT uterinos que a

su vez estimulan una mayor secreción de prostaglandinas (Wolfenson et al., 1993; Lafrance , 1985).

La suplementación del complejo glicoprotéico bIFN - τ (interferón bovino - τ) en forma exógena puede ser un medio para compensar la deficiencia en su secreción por parte del embrión. Sin embargo, su obtención y purificación requiere de grandes cantidades de conceptus, limitando su disponibilidad y volviendo impráctica su utilización en pruebas de campo con gran número de animales (Thatcher et al., 1997; Meyer et al., 1996). Por lo tanto, su aplicación se ha circunscrito a estudios de su efecto sobre el CL y la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$. La secuencia de aminoácidos de bIFN - τ presenta 50 % de analogía con bIFN - α y 80 % con oIFN - τ , pero su purificación y obtención también es impráctica. Esta relación estructural es apoyada por la similitud funcional interespecífica en rumiantes (Bazer et al., 1994).

Existen también los interferones recombinantes, como el rbIFN (- α y - τ) y el rolFN (- α y - τ). Su administración intramuscular y en algunos casos intrauterina se ha relacionado con bajas en la fertilidad (alrededor del 10 %) y la presentación de hipertermia (Thatcher et al , 1997; Bainbridge et al., 1996). A su vez se asocian con el descenso temporal de P_4 y LH plasmático (Thatcher et al., 1997; Barros et al., 1992b). Al igual que el interferón trofoblástico endógeno, el rbIFN- τ inhibe la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y suprime los receptores de OT uterinos (Meyer et al , 1995 , Danet- Desnoyers et al , 1993). Sin

embargo de acuerdo con Bainbridge et al. (1996) su administración sistémica no es farmacocinéticamente análoga a la infusión uterina o a la secretada por el embrión y es posible que actúe en tejidos diferentes, como en sistema nervioso central, hipófisis u ovarios. Alrededor del 20 % de los animales experimentales utilizados en varios trabajos no han mostrado respuesta al tratamiento con $\text{bIFN} - \tau$, y se ha sugerido la variabilidad entre la vida media del CL entre individuos y variaciones en la respuesta a hormonas como la OT, P_4 , LH y el mismo $\text{bIFN} - \tau$ para explicar la falta de respuesta por parte de algunos individuos (Thatcher et al., 1997; Meyer et al., 1995).

2.3.5 Manejo de la alimentación mediante la administración de lípidos de sobrepaso.

Algunos autores sugieren que el mecanismo antiluteolítico puede ser estimulado mediante la dieta a través de la alteración del estado lipídico endometrial y el suministro de ácidos grasos no saturados que pueden actuar en forma sinérgica con el $\text{bIFN} - \tau$. Con base en el hecho de que el ácido linoléico es un inhibidor competitivo de la prostaglandina endoperoxi - H - sintetasa (PGS) y que los microsomas endometriales de vacas a los 17 días de gestación son ricos en ácido linoléico no esterificado Thatcher et al. (1997) han propuesto al ácido linoléico como un medio para suprimir la secreción de prostaglandinas en forma controlada. El ácido linoléico puede ser convertido en ácido araquidónico o en ácido dihomo - gamma - linoléico, los cuales pueden actuar como sustrato para PGS. Sin embargo, cuando el principal sustrato

metabolizado por PGS es ácido dihomo - gamma - linoléico, son producidas prostaglandinas de la serie 1 a expensas de prostaglandinas de la serie 2. De tal forma, el ácido linoléico actúa como inhibidor competitivo del metabolismo de ácido araquidónico por PGS disminuyendo la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Wilkins et al. (1996) reportan un incremento en la fertilidad en vacas alimentadas con 35 % de grasa protegida rica en ácido linoléico sin encontrar efecto del tratamiento sobre el peso y la condición corporal, lo que sugiere un efecto directo sobre el sistema reproductivo. Las harinas y aceites de pescado contienen alrededor del 8 % de grasas de las cuales dos terceras partes son ácidos grasos no saturados de cadena larga, principalmente ácido eicosapentaenoico y docosahexaenoico, los cuales no son biohidrogenados en el rúmen y reducen la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Al ser incluidos como parte de la dieta, Coelho et al. (1997) y Thatcher et al. (1997) encontraron correlación con el incremento en la fertilidad.

2.3.6 Inhibidores de prostaglandinas.

La inhibición de la síntesis de prostaglandinas puede ser lograda mediante varias sustancias que inhiben la vía metabólica del ácido araquidónico. Sin embargo la respuesta varía dependiendo del nivel al que actúan las diferentes sustancias. Las drogas corticosteroides actúan de manera indirecta mediante la inducción de la síntesis de lipocortina que inhibe la acción de la fosfolipasa A_2 , inhibiendo tanto a las ciclooxigenasas como a las lipooxigenasas al mismo tiempo (Campbell y Halushka, 1996) Los antiinflamatorios no esteroides

(NSAID) actúan solamente a nivel de las ciclooxigenasas, aunque de manera no selectiva sobre COX - 1 y COX - 2, bloqueando la síntesis de PGG₂, PGH₂, y todos los metabolitos siguientes, pero no influyen sobre las lipooxigenasas (Campbell y Halushka, 1996). De los anteriores los más utilizados han sido los NSAID ya que poseen gran poder de inhibición prostaglandínica, principalmente los derivados del ácido salicílico, la indometacina, pirozalidindionas (fenilbutazona, oxifenbutazona) y últimamente la meglumina de flunixin. Sin embargo su aplicación se ve limitada ya que presentan efectos secundarios si su aplicación se realiza por periodos de tiempo prolongados y la dosis necesaria para obtener una respuesta adecuada es muy elevada, principalmente en el caso de derivados del ácido acetil salicílico. Como efectos colaterales pueden inducir la aparición de erosiones y úlceras gástricas e intestinales al inhibir la síntesis de PGI₂ y PGE₂ que actúan como citoprotectores en la mucosa gástrica e intestinal inhibiendo la secreción ácida, intensificando el flujo sanguíneo por la mucosa y estimulando la secreción mucosa intestinal. Los NSAID alteran la función plaquetaria prolongando el tiempo de coagulación o hemorragia, ya que evitan la formación de tromboxano A₂ (TXA₂) que es el factor de agregación plaquetario, pudiendo dar como resultado la presentación de anemias debido a la pérdida hemática. Además, los NSAID disminuyen el flujo sanguíneo renal y la filtración glomerular, que puede desencadenar insuficiencia renal aguda, además de estimular la retención de sodio y agua al disminuir la inhibición de la resorción de cloruro inducida por prostaglandinas y la hormona antidiurética ocasionando edema

(Insel, 1996).

2.3.6.1 Meglumina de flunixin.

La meglumina de flunixin - 2(2' metil-3'- trifluorometilaniilina) del ácido nicotínico - es un antiinflamatorio no esteroide y no narcótico que inhibe a la enzima ciclooxigenasa. Disminuye la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y las sustancias relacionadas con el ácido araquidónico, lo que se refleja en la disminución de la concentración periférica del metabolito 15 - keto 13 , 14 - dihidro - $\text{PGF}_{2\alpha}$ (PGFM) (Odensvik et al., 1997; Fuentes, 1992). Inhibe la luteólisis y extiende el ciclo estral en vaquillas no gestantes al suministrarse tanto parenteral como oralmente (Odensvik et al., 1997; Odensvik y Gustafsson, 1994; Aiumlamai et al., 1990). La meglumina de flunixin tiene la ventaja, al menos hasta la fecha, de no presentar los efectos secundarios que presentan el resto de los desinflamatorios no esteroides.

La aplicación de 1 gr de meglumina de flunixin IM c/8 horas aplicado entre los días 4 y 7 después del estro en vientres servidos disminuyó la secreción de prostaglandinas por 6 - 8 horas pero no mejoró la fertilidad postparto. Buford et al. (1996) proponen que esto se debió probablemente a que la secreción de prostaglandinas puede presentarse en forma más continua en el periodo postparto que en vacas ciclando, pudiendo ser el CL una importante fuente secundaria de prostaglandinas, especialmente en vacas con cuerpos lúteos de vida corta. En otro experimento realizado por los mismos autores la tasa de

fertilidad se incrementó significativamente cuando se aplicó meglumina de flunixin junto con la práctica de lutectomía y la suplementación de P₄ en vacas postparto. Aunque los animales tratados con meglumina de flunixin presentan niveles elevados de P₄ y eficiente inhibición de prostaglandinas en muchos casos la gestación no se ha logrado establecer (Buford et al., 1996; Odensvik y Gustafsson, 1994; Aiumlamai et al., 1990). Sin embargo, en los trabajos realizados hasta ahora los tratamientos fueron aplicados en etapas posteriores al día 14 o anteriores al día 8 postovulación.

A pesar de que varios autores reportan la disminución de prostaglandinas durante un periodo de 6 - 8 horas (Buford et al., 1997; Odensvik y Gustafsson, 1994; Aiumlamai et al., 1990), Meyer (1995) obtuvo plasma libre de prostaglandinas de una vaca tratada con meglumina de flunixin (1 gr/inyección IM) con intervalo de 12 horas, 38 días postparto, tomando la muestra a analizar 4 horas después de la última aplicación. De acuerdo con Fuentes (1992) su efecto máximo se presenta a las 12 horas de aplicación y puede durar hasta 24 horas.

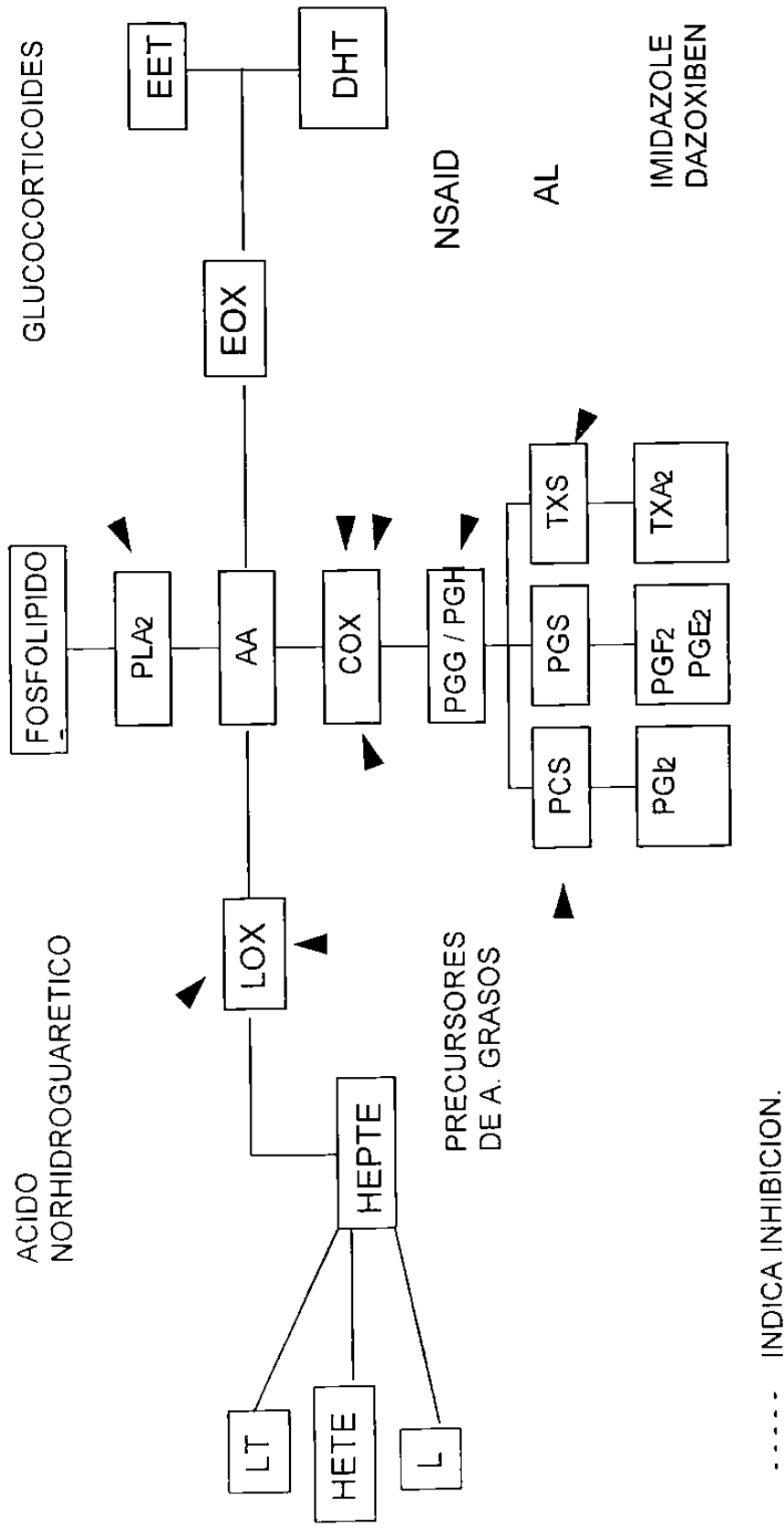


Figura 1.- Inhibición de la vía metabólica del ácido araquidónico (adaptado de Kankofer y Hoedemaker, 1993).

2.4 Cuerpo lúteo.

El cuerpo lúteo es una glándula endocrina temporal desarrollada a partir del folículo ovárico después de la ovulación que juega un papel clave en muchos procesos reproductivos incluyendo la duración del ciclo estral, el reconocimiento de la gestación, la sobrevivencia embrionaria y el mantenimiento de la gestación. Su producto endocrino primario es la P_4 aunque también secreta prostaglandinas, relaxina, OT, vasopresina y en algunas especies E_2 (Niswender et al., 1986). La P_4 prepara al endometrio para la implantación y mantiene la gestación, bloqueando la ovulación. Si no hay fecundación la función lútea declina, reanudándose el ciclo ovulatorio. La regulación de la función lútea está regida por factores tróficos y líticos presentes durante todo el ciclo estral y del balance de estos factores depende la estimulación o inhibición de la síntesis y secreción de P_4 .

2.4.1 Aspectos morfológicos del cuerpo lúteo.

El CL está formado por células esteroideogénicas (células lúteas grandes y pequeñas) y no esteroideogénicas (células endoteliales, fibroblastos y macrófagos).

2.4.1.1 Células esteroideogénicas.

Existen dos tipos de células lúteas esteroideogénicas, células lúteas grandes y células lúteas pequeñas, y entre ambas constituyen el 70 % del volumen total del CL. Ambos tipos producen P_4 y poseen receptores de PGE_2 , PGI_2 y $PGF_{2\alpha}$.

(Smith et al., 1994). Existe diferencia entre ellas en la respuesta a la estimulación hormonal y secreción de P_4 . En general, las células lúteas pequeñas presentan mayor respuesta al estímulo de LH mientras que el efecto luteolítico de $PGF_{2\alpha}$ es mayor sobre las células lúteas grandes. Las células lúteas pequeñas también son estimuladas por las prostaglandinas, pero en este caso, la producción de P_4 es estimulada y no deprimida como en el caso de las células lúteas grandes. Activadores no hormonales de la vía proteína - cinasa A como la fosfocolina y el dibutilil AMPc incrementan la concentración de AMPc en ambos tipos celulares, sin embargo, la producción de P_4 solo es incrementada en las células lúteas pequeñas (Wiltbank, 1994).

2.4.1.1.1 Células lúteas pequeñas.

Se derivan de la teca interna del folículo y conforman el 25 - 26 % del total de las células lúteas, equivalente al 20 % del volumen total del CL (Wiltbank, 1994). Su diámetro varía de 10 a 20 μm . Típicamente poseen un núcleo excéntrico, membrana superficial lisa con microvellosidades, retículo endoplásmico liso y rugoso, complejo de Golgi, mitocondrias elongadas localizadas cerca del núcleo y poseen abundantes gotas lipídicas difusamente distribuidas en el citoplasma durante todas las etapas del ciclo estral y gestación. En vacas gestantes el retículo endoplásmico liso se presenta en forma de remolino concéntrico. Entre células lúteas pequeñas adyacentes existen uniones adherentes. Poseen mayor cantidad de receptores para LH por lo que son más sensibles a esta hormona y su respuesta es mediada por el

sistema AMPc - adenil - ciclasa. Su producción basal de P_4 es baja, sin embargo se incrementa al ser estimuladas por LH (Fields y Fields, 1996).

2.4.1.1.2 Células lúteas grandes.

En etapas tempranas del ciclo se derivan de la granulosa, pero en etapas tardías se derivan también de células lúteas pequeñas originadas de la teca interna. Representan solamente el 3 - 4 % del total de células lúteas, pero constituyen hasta el 40 % del volumen total del CL (Wiltbank, 1994). Su diámetro es de 25 μm o mayor. Poseen núcleo central redondeado, retículo endoplásmico liso bien desarrollado distribuido uniformemente en el citoplasma y presentan un mayor número de mitocondrias que las células lúteas pequeñas, de forma esférica densamente acomodadas en el citoplasma y que contienen inclusiones durante la involución y regresión del CL. En la vaca gestante contienen numerosos gránulos secretores adheridos a la membrana que almacenan y transportan material de secreción mediante exocitosis. Durante la fase temprana del ciclo estral y la gestación presentan una disminución en la cantidad de gotas lipídicas. A diferencia de las células pequeñas no existen uniones adherentes entre células adyacentes (Fields y Fields, 1996). Son responsables de la mayor parte de la secreción basal de P_4 (80 %) y también producen OT (Wiltbank, 1994). La mayor parte de sus receptores son para $\text{PGF}_{2\alpha}$ y E_2 y poseen pocos receptores para LH. La producción de P_4 es controlada por el sistema Ca^{++} - fosfatidil inositol - cinasa C (Fields y Fields, 1996)

2.4.1.1.3 Gránulos secretores.

Aunque se ha reportado que ambos tipos celulares poseen gránulos celulares secretores solamente las células lúteas grandes las poseen en gran número. Se localizan en la región paranuclear del citoplasma extendiéndose hacia el exterior de la superficie celular en donde se lleva a cabo la exocitosis. Los gránulos secretores individuales miden 150 - 300 nm de diámetro y se localizan uniformemente distribuidos en el citoplasma, aunque pueden observarse agrupados en racimos o formando un canalículo en dirección a la membrana citoplasmática (Fields y Fields, 1996). El área citoplasmática conteniendo los gránulos agrupados presenta ausencia de mitocondrias y se caracteriza por una extensa red filamentosa (Fields et al., 1985). La población de gránulos secretores fluctúa durante el ciclo estral y la gestación. El mayor número de gránulos ha sido observado mediante tinción diferencial entre los días 7 y 14 del ciclo mientras que solamente pocos son observados en los días 3, 17 y 19 del ciclo, que es alrededor del 5 % (Fields et al., 1992). En el día 3 del ciclo estral el número de células conteniendo gránulos es mínimo, 3 %, y alcanza su pico el día 7, 84 %. El día 11 es del 64 %, disminuyendo el día 14 a 26 % para permanecer bajo los días 17 con 16 % y 8 % al día 19. La disminución del número de gránulos ocurre al mismo tiempo en que los receptores de OT uterinos se encuentran en su pico más alto y la concentración de LH es baja, momento que precede a los pulsos luteolíticos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterinos. Si hay gestación el número de granulos no disminuye a la mitad del ciclo y se mantienen en un nivel elevado hasta e día 20 Sin embargo casi desaparecen

alrededor del día 30. Alrededor del día 75 nuevamente se observa un gran número de gránulos que se incrementa constantemente hasta el día 200 para después declinar nuevamente (Fields y Fields, 1996).

Anteriormente se pensaba que los gránulos acumulaban P_4 para su secreción y que los gránulos serían transportados hacia la membrana citoplasmática en donde el contenido sería liberado por exocitosis. Sin embargo, estudios recientes indican que no acumulan P_4 pero contienen OT, neurofisisina y posiblemente relaxina. En vacas ciclando los gránulos contienen OT y neurofisisina. En la mitad de la gestación los gránulos no contienen OT pero se ha sugerido que contienen relaxina, aunque esto no ha sido demostrado en rumiantes (Fields et al., 1980). Al parto, después de la dilatación del cervix, el cuerpo lúteo expresa nuevamente RNAm para la síntesis de OT (Ivell et al., 1995).

2.4.1.2 Células no esteroideogénicas.

Representan del 60 al 70 % del total de las células del CL aunque solamente forman el 14 % de su volumen total. Aunque la composición estructural varía a través de la vida del CL siempre existe una mayor cantidad de células no esteroideogénicas en relación con esteroideogénicas (O'Shea et al., 1989). Su importancia reside en su activa participación en el control de la vascularización e irrigación ovárica y lútea y en su participación en los procesos de uterización y luteólisis, ya sea de manera directa o mediante factores de

secreción estimulando o inhibiendo la producción de P_4 . Este grupo incluye células endoteliales, fibroblastos y macrófagos.

2.4.1.2.1 Células endoteliales.

Representan el 13 % del volumen del CL y el 52 % del total de células lúteas. Su diámetro es de alrededor 11 μm . Recubren el lumen del sistema microvascular del CL. Secretan factores o mensajeros químicos que aparentemente están involucrados tanto en procesos luteolíticos como luteotrópicos al actuar como hormonas locales estimulando o inhibiendo la secreción de P_4 (como en el caso de la endotelina -1). Además las células endoteliales modulan el sistema vascular mediante la producción de vasodilatadores como los factores relajantes derivados del endotelio y PGI_2 , así como de vasoconstrictores como las endotelinas (endotelinas -1, -2, -3 y - β) y factores conocidos como factores constrictores derivados del endotelio (Milvae et al., 1996; Wiltbank, 1994).

2.4.1.2.2 Fibroblastos.

Constituyen el 10 % del número celular total del CL y el 6 % de su volumen. Su diámetro es de 15 μm (Wiltbank, 1994). Se asocian con componentes estructurales tisulares y producen glicosaminoglicanos, colágeno y citocinas. Morfológicamente son similares a las células esteroideogénicas pequeñas, incluyendo la presencia de lípidos y una membrana nuclear altamente convolucionada y el centriolo, por lo que se ha sugerido que el fibroblasto

indiferenciado pudiera actuar como célula madre de la que derivan las células lúteas esteroideogénicas (Niswender et al., 1986).

2.4.1.2.3 Macrófagos.

Presentan actividad fagocitaria y además intervienen en las respuestas inmunes involucradas en la regresión del CL .

2.4.2 Luteinización.

El proceso de luteinización involucra la transición del folículo ovulatorio en un CL altamente vascularizado capaz de secretar grandes cantidades de P_4 . La preparación y transformación de las células lúteas inicia antes de la ovulación, incluso puede ocurrir luteinización en ausencia de ovulación. Esto involucra el crecimiento y diferenciación celular con la subsecuente remodelación de tejido, angiogénesis y cambios químicos y endócrinos. La hormona luteinizante (LH) es el factor luteotrópico más importante en la vaca y en numerosas especies (Niswender et al., 1986; Hansel y Blair, 1996). Sin embargo, se han descrito tanto la presencia de receptores para la hormona folículo estimulante(FSH) en el CL bovino como la secreción de pulsos adicionales de FSH en relación a los de LH (Walters et al., 1984). Se ha relacionado la secreción preovulatoria de estas dos hormonas como iniciadoras de los cambios ocurridos durante la luteinización.

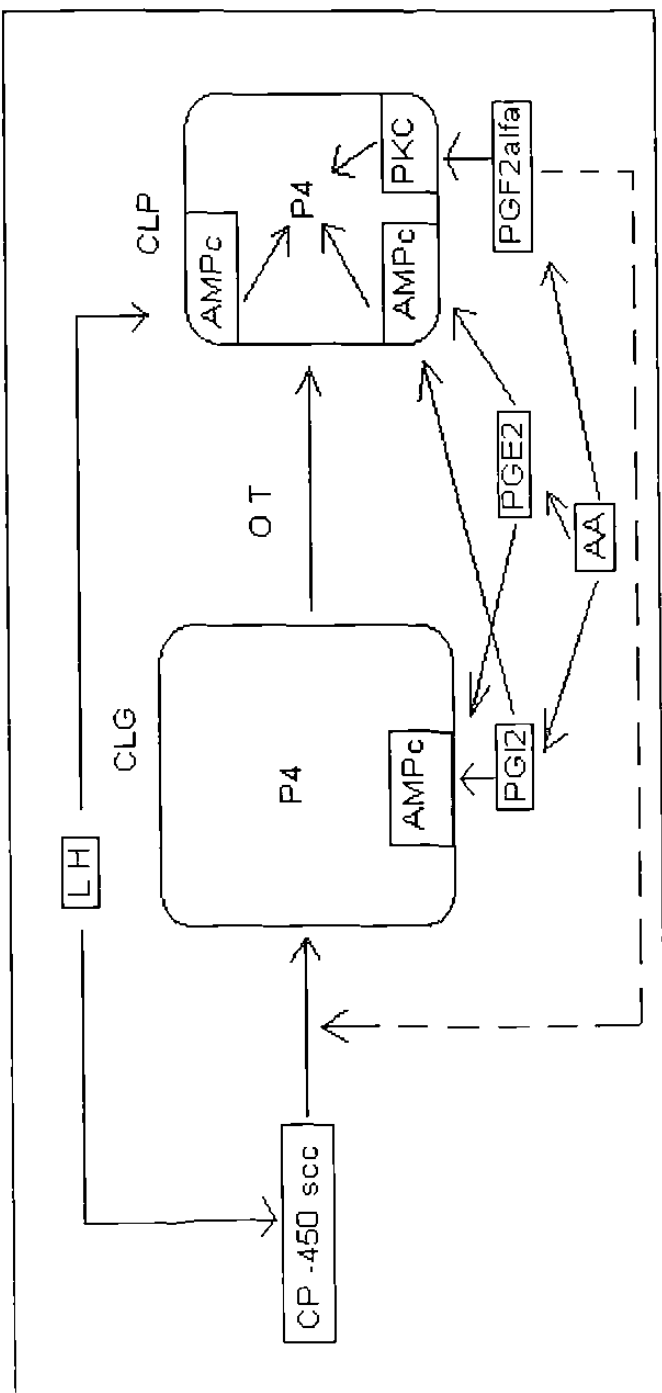


Figura 2 - Mecanismo luteotrópico en las células lúteas bovinas (adaptado de Hansel y Blair, 1996).

2.4.2.1 Cambios morfológicos asociados con la luteinización.

Para describir los cambios morfológicos y estructurales asociados con la luteinización éste proceso se ha dividido cronológicamente en dos periodos, los cambios que ocurren antes de la ovulación o preovulatorios, y los posteriores a ésta o postovulatorios.

2.4.2.1.1 Cambios preovulatorios.

Después de la aparición de gonadotropinas el diámetro folicular se incrementa y la pared folicular se pliega ligeramente. Las áreas de unión entre las células de la granulosa disminuyen, las células se dispersan y el ovocito flota libremente. El sistema microcirculatorio de la teca interna sufre cambios importantes que han sido caracterizados en orden cronológico por Cavender y Murdoch (1988): 1) vasodilatación, 2) incremento de la permeabilidad vascular, 3) edema tisular, 4) congestión, 5) isquemia, 6) lesión vascular y 7) angiogénesis.

La hiperhemia folicular es resultado de la liberación de histamina y producción de PGE_2 , que ocasionan contracción del endotelio y relajación de la musculatura lisa dando como resultado vasodilatación y aumento en la permeabilidad capilar. Es probable que la hiperhemia folicular participe en la luteinización facilitando el acceso de LH hacia las células de la granulosa (Smith et al.,1994). A la permeabilidad capilar incrementada le sigue la edematización tisular y la extravasación de proteínas sericas y eritrocitos hacia

el interior de la pared folicular (Cavender y Murdoch, 1988).

2.4.2.1.1 Cambios postovulatorios.

Después de la ruptura folicular la pared folicular se pliega facilitando la migración de fibroblastos, células endoteliales y células de la teca interna hacia la región central del cuerpo lúteo en desarrollo. La remodelación del tejido y la migración celular es facilitada por el rompimiento de la membrana basal que separa la capa granulosa avascular y la teca interna (O'Shea et al., 1989). Después de la ovulación se ha observado evidencia de mitosis en las células de la teca interna, células endoteliales y fibroblastos, además de su migración hacia el interior del CL en desarrollo. Las células de la granulosa se hipertrofian, lo que se asocia con un incremento en la relación citoplasma: núcleo y ocurren cambios en los organelos celulares que incluyen el aumento en el número y complejidad de las mitocondrias e incremento en el tamaño del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico liso.

2.4.2.1.2 Angiogénesis y vascularización en el cuerpo lúteo.

La angiogénesis o neovascularización es un proceso clave para el desarrollo, función y mantenimiento del CL. Más aún, existe evidencia de que la angiogénesis continuada es importante para la función lútea ya que la proliferación de células no esteroideogénicas especialmente vasculares, es continua durante la mitad del ciclo lúteo a un ritmo y cantidad sustancial y se mantiene durante toda la gestación (Wiltbark, 1994, Graziul - Bilska et al.,

1992). Durante la fase lútea el 65 - 95 % del total del aporte sanguíneo ovárico fluye hacia el CL, aproximadamente el 60 % de la superficie de la membrana plasmática de las células esteroideogénicas se encuentra adyacente a los capilares y el 20 % del volumen del CL corresponde a espacio vascular. El flujo sanguíneo hacia el CL es de 30 ml/ min x gr de tejido, mientras que el flujo hacia el ovario sin presencia de CL es de solamente 3 ml/min x gr de tejido (Wiltbank, 1994). Estos datos sugieren que la vascularización e irrigación del CL es importante no solamente para el transporte de P_4 producida hacia el sistema circulatorio sino también para garantizar la eficiencia en el aporte hormonal, nutritivo y de sustratos hacia el CL, ya que la elevada tasa de flujo sanguíneo, el área exagerada de membrana plasmática de las células lúteas en contacto con el área vascular y la alta permeabilidad de los capilares lúteos permiten el fácil intercambio de proteínas y hormonas entre células lúteas y torrente sanguíneo (Wiltbank, 1994).

La angiogénesis inicia con el rompimiento de la membrana basal, una barrera interior de la pared folicular que impide que la capa celular de la granulosa sea invadida por la red vascular de la teca formada por colágeno, fibronectina y laminina. El rompimiento de esta membrana poco después de la ruptura folicular permite el paso de células endoteliales, fibroblastos, macrófagos y células de la teca interna hacia la capa granulosa. Este rompimiento es mediado por enzimas proteolíticas, como metaloproteinasas (MP), cuya producción es estimulada por el factor de crecimiento fibroblástico (FGF). El

FGF además presenta actividad mitogénica y quimiotáctica sobre las células endoteliales. La actividad de las metaloproteinasas es regulada por inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP) (Smith et al., 1995).

Al rompimiento de la membrana basal le sigue la migración y proliferación de células endoteliales que tiene como resultado que pequeñas ramificaciones de los capilares de la teca se dirijan hacia la capa granulosa. En las células endoteliales el ritmo al que normalmente se desarrolla la mitosis es lento. Sin embargo, durante la formación del CL la velocidad se incrementa dramáticamente (Smith et al., 1994). La proliferación y migración de las células endoteliales son controladas por factores angiogénicos y anti - angiogénicos, aunque mucho se ha especulado en cuanto a su origen, ya que se han identificado tanto factores de crecimiento relacionados con la heparina como factores estimuladores de la proliferación celular. Entre los candidatos más aceptados se encuentran el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento celular endotelial (ECGF), el factor transformador de crecimiento α y β (TGF - α y - β), la angiogenina y el factor de necrosis tumoral (TNF) (Smith et al., 1994). Sin embargo, de acuerdo con Hansel y Blair (1996), la PGI_2 , es uno de los factores luteotrópicos conocidos secretados por el propio CL que pudiera controlar la rápida proliferación vascular durante el crecimiento del CL.

2.4.2.2 Cambios esteroidogénicos.

La síntesis de hormonas esteroides es regulada por la disponibilidad de colesterol y la expresión de enzimas esteroidogénicas específicas que a su vez sufren cambios a partir de la secreción preovulatoria de gonadotropinas. El colesterol puede ser obtenido a partir de lipoproteínas de alta o baja densidad (HDL o LDL), que es la forma en que se encuentra circulando en la sangre, o del colesterol no esterificado asociado con membranas celulares y el esterificado y almacenado en gotas lipídicas, ambas formas observadas en células lúteas. El colesterol penetra en las células mediante la unión de las lipoproteínas a receptores de membrana específicos y una vez en el interior de la célula debe ser transportado hacia la mitocondria, lo que es facilitado por la proteína transportadora de esteroides 2 y la proteína - cinasa A (PCA) (Niswender et al., 1986). Las lipoproteínas son desdobladas mediante procesos enzimáticos para iniciar la esteroidogénesis.

2.4.2.2.1 Citocromo P- 450 de separación de las cadenas laterales del colesterol (P- 450_{scc}).

El primer paso en la síntesis de P₄ es la conversión de colesterol a pregnenolona dentro de la mitocondria mediante la enzima P - 450. Esta se localiza en la membrana mitocondrial y ha sido identificada en el CL durante las fases temprana, media y media - tardía (CL en etapas I, II y III), aunque en concentraciones mayores durante las fases media y media tardía (Rodgers et al 1983) Las gonadotropinas estimulan la actividad de esta enzima y se han

encontrado evidencias de que el EGF y el IGF incrementan su actividad en las células de la granulosa (Hinshelwood et al., 1993; citado por Milvae et al., 1996).

2.4.2.2.2 3 β - Hidroxi esteroideshidrogenasa / Δ 5- Δ 4 Isomerasa (3 β HSD).

La pregnenolona es movilizada desde la mitocondria hacia el retículo endoplásmico liso en donde la enzima 3 β HSD cataliza la conversión de pregnenolona a progesterona. El incremento de la actividad enzimática de 3 β HSD en el CL facilita la alta tasa de biosíntesis de P₄. Su actividad enzimática es cuatro veces mayor en el CL que en el folículo preovulatorio, manteniéndose elevada durante la mayor parte del ciclo estral y disminuyendo durante la luteólisis (Couet et al., 1990).

2.4.2.2.3 Citocromo P - 450 17 α - Hidroxilasa (P - 450_{17 α}).

Esta enzima microsomal es expresada por las células tecales de folículos en desarrollo y es necesaria para la conversión de pregnenolona o P₄ a andrógenos, que posteriormente son aromatizados a estrógeno por las células de la granulosa. Es abundante en los folículos antrales pero no es detectable en el CL en etapas I a IV (Rodgers et al., 1983). La secreción preovulatoria de gonadotropinas inicia una rápida disminución en la expresión génica de P - 450_{17 α} que se refleja en la disminución en la síntesis de andrógenos y estrógeno e inicia la secreción de grandes cantidades de P₄ en el tejido lúteo.

2.4.2.2.4 Citocromo P- 450 aromatasa (P - 450_{arom}).

Es clave en la síntesis de E₂. Cataliza la aromatización de andrógenos de 19 C de origen tecal a estrógenos de 18 C en la capa granulosa. La expresión de P - 450_{arom} en el tejido ovárico de los rumiantes tiene un patrón similar al de P - 450_{17α}. Después de la secreción preovulatoria de gonadotropinas el RNAm de P - 450_{arom} disminuye rápidamente.

Los cambios durante la luteinización inhiben la expresión génica de P - 450_{17α} y P - 450_{arom} (Smith et al., 1994), lo que pudiera explicar la ausencia de síntesis de E₂ en el CL de los rumiantes.

2.4.2.2.5 β caroténo.

El color amarillo característico del CL se debe a la presencia de altas cantidades de β caroténo, precursor de vitamina A. En el ovario y en otros tejidos productores de esteroides tiene una función antioxidante. Protege a los esteroides del daño por oxidación, ya que las enzimas citocromo P- 450 involucradas en la síntesis de esteroides producen radicales oxígeno (Young et al., 1995; citado por Milvae et al., 1996). Su deficiencia ha sido altamente asociada con disminución en la producción de hormonas esteroides y de la fertilidad (Luck et al., 1995).

2.4.2.3 Producción de otras sustancias.

2.4.2.3.1 Oxitocina (OT).

Durante el periodo periovulatorio se incrementa la expresión génica de OT. La concentración de OT se incrementa durante la fase lútea temprana, alcanza su pico durante la mitad de la vida lútea y disminuye en forma paralela a la secreción de P_4 . Durante el diestro tardío se incrementa la respuesta endometrial a la OT, lo que coincide con el incremento en la concentración de receptores de OT que llega a ser 500 veces mayor, y se ha observado una relación inversamente proporcional entre la concentración de receptores de OT endometriales y la concentración de P_4 plasmática en este periodo (Parkinson et al., 1990). La OT es producida principalmente por células de la granulosa y ha sido identificada en los gránulos secretores de vacas y borregas (Rodgers et al., 1983). Se han identificado receptores de OT en el cuerpo lúteo (Fuchs et al., 1990), oviducto (Ayad et al., 1990) y miometrio (Sheldrick y Flint, 1981). Esto sugiere que la OT puede estar involucrada de manera endocrina o parácrina en la secreción de P_4 en el CL, en el transporte de gametos, y directa o indirectamente en la luteólisis.

Miyamoto y Schams (1991) demostraron que la OT estimula la secreción de P_4 del CL bovino in vitro cuando se establecía el contacto entre células, aunque Lutz et al. (1991) no encontraron cambios en la concentración de P_4 circulante al iniciar el tratamiento con OT durante la fase lútea media. Luck (1989) propone que la OT pudiera estimular la contracción de la musculatura lisa de

oviducto y útero, lo que influye sobre el transporte de gametos y el embrión. Se ha reportado la inducción de contracciones uterinas en borregas mediante aplicación de OT (Porter y Lye, 1983).

2.4.2.3.2 Prostaglandinas.

Las células lúteas producen prostaglandinas durante el desarrollo del CL. La producción de PGE_2 y PGI_2 se incrementa en el CL durante la fase lútea temprana y su inhibición durante los días 4 a 6 del ciclo disminuye la producción de P_4 y el tiempo de vida del CL, lo que sugiere un papel autócrino. El tejido lúteo contiene grandes cantidades de PGI_2 sintetasa que convierte el PGH a PGI_2 . Esta conversión es mayor durante el desarrollo del CL. Ya que es un potente vasodilatador puede actuar regulando el flujo sanguíneo durante el desarrollo lúteo, incrementándolo, con lo cual también se incrementa el flujo de luteotropina que llega al CL. También se ha sugerido un efecto directo sobre las células lúteas (Smith et al., 1994)

2.4.2.3.3 Estradiol 17β .

Actúa principalmente aumentando el suministro de colesterol hacia las células lúteas e incrementando su transporte hacia las mitocondrias (Milvae et al., 1996).

2.4.2.4 Secreción de progesterona estimulada por LH.

La LH estimula la secreción de P_4 al acoparse a su receptor activando el

sistema adenil - ciclasa, el cual sintetiza AMPc, que funge como mensajero intracelular responsable de la activación de las enzimas involucradas en la síntesis de P_4 . Cuando el receptor de LH está desocupado, el guanosin difosfato (GDP) se une a la proteína de unión guanil nucleótido (proteína G) que es inactiva. Al unirse la LH a su receptor ocasiona cambios estructurales en la proteína G, activándola. EL GDP es convertido en guanosin trifosfato (GTP), la hidrólisis de GTP es inhibida y la proteína G activada acopla el complejo LH - receptor con adenil - ciclasa. La adenil ciclasa a su vez sintetiza AMPc que estimula a la protein - cinasa A (PKA) que fosforila a las enzimas que participan en la síntesis de esteroides e incrementa el transporte de colesterol hacia la mitocondria para su conversión a pregnenolona (Milvae et al., 1996).

2.4.3 Luteólisis.

Como mecanismo natural normal en ausencia de gestación el CL sufre regresión morfológica y funcional dando lugar a otro nuevo ciclo. Esta regresión se caracteriza por la supresión de la producción de P_4 y destrucción celular que involucra la reducción del suministro vascular, cambios en la membrana lipídica, la proliferación de tejido conectivo, un incremento en la desorganización celular y la degeneración y fagocitosis de las células lúteas. Sin embargo, aún cuando se lleva a cabo la fertilización y la gestación es esperada ya que existe un embrión viable, en ocasiones el CL sufre regresión prematura, lo que impide el establecimiento de la gestación. La sustancia

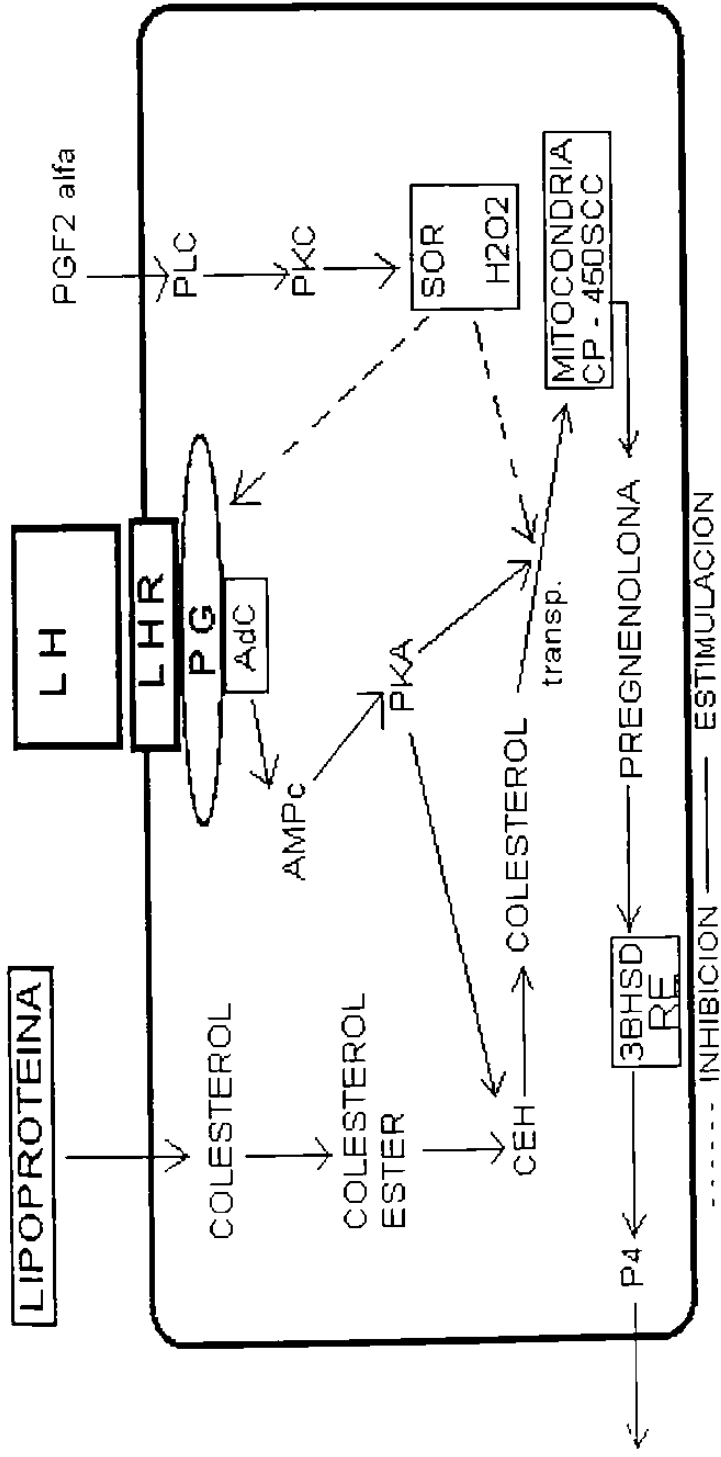


Figura 3 - Mecanismo de control de la síntesis de progesterona en el cuerpo lúteo (adaptado de Milvae et al., 1996)

luteolítica en rumiantes es la $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial secretada de manera pulsátil y que llega al ovario mediante un sistema o mecanismo de transferencia de contracorriente venoarterial, aumentando su concentración al momento de la luteólisis.

2.4.3.1 Síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y otros eicosanoides.

Las prostaglandinas son ácidos carboxílicos insaturados de 20 carbonos y un anillo ciclopentano derivados del ácido araquidónico (AA) liberado de fosfolípidos por la acción de la fosfolipasa A_2 (PLA_2). Los eicosanoides son producidos exclusivamente dentro de la membrana plasmática celular. Hormonas, autocoides y otras sustancias interactúan con los receptores de la membrana plasmática que se acoplan con las proteínas G, activando directamente a las fosfolipasas (A, C, o ambas) o incrementando la concentración citosólica de calcio, que también activa a las fosfolipasas. Los estímulos físicos también inducen la penetración de calcio a la célula al alterar la membrana, activando a la PLA.

La PLA_2 hidroliza el enlace éster sn - 2 y de los fosfolípidos de la membrana, sobre todo la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, liberando ácido araquidónico que sirve como sustrato para la síntesis de eicosanoides. La PLC desdobla el enlace fosfodiéster formando un 1 - 2 - diglicérido. Posteriormente, el AA es liberado a partir del diglicérido por acción de lipasas de diglicérido y de monoglicérido (Campbell y Halushka, 1996; Hadley 1996). Una vez

liberado, el AA es metabolizado hasta ser convertido en productos intermedios, los endoperóxidos intermedios (PGG y PHG) por acción de la enzima ciclooxigenasa, y en ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos (HPETE) por acción de la enzima lipooxigenasa. Estos productos intermedios son convertidos en PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 , TXA_2 (PGG y PHG) o leucotrienos (LT)(HPETE) por acción de enzimas específicas, como son prostaglandina sintetasa G y H, prostaciclina sintetasa, tromboxano sintetasa, o leucotrieno sintetasa, respectivamente. La interconversión de PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$ es catalizada por una 9 - cetoreductasa (Campbell y Halushka, 1996; Hadley, 1996).

La ciclooxigenasa presenta dos isoformas: COX - 1 y COX - 2. La primera se expresa en forma constitutiva en casi todas las células, mientras que la segunda no se encuentra normalmente pero es inducida por factores séricos, citocinas y factores de crecimiento. Ambas poseen dos actividades, una de sintetasa de endoperóxido que oxigena y produce una estructura en anillo en el ácido graso precursor no esterificado formando endoperóxido cíclico de PPG, y una actividad de peroxidasa que transforma PGG en PGH (Campbell y Halushka, 1996). En general, todos los tejidos pueden sintetizar los productos intermedios PGG y PGH a partir del ácido araquidónico libre pero su biotransformación dependerá de las enzimas y su cantidad relativa presentes en el tejido.

2.4.3.2 Secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

La secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante la luteólisis depende de la unión de OT ovárica con receptores endometriales estableciéndose un círculo de retroalimentación (Flint y Sheldrick, 1983). La OT liberada por la hipófisis libera a su vez $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial en pequeñas cantidades. Esta liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ desencadena la secreción de OT adicional del CL que se une a sus receptores endometriales y estimula una mayor secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial (Silvia et al., 1991; Roberts et al., 1996). Las bajas concentraciones de P_4 tienen como resultado un aumento en la concentración de E_2 que estimula el desarrollo de los receptores de OT y la producción de prostaglandinas (Lamming y Mann, 1995; Beard y Lamming, 1994; Beard et al., 1994).

El factor limitante en el control de la secreción de $\text{PGF}_2 \alpha$ es la disponibilidad de ácido araquidónico y la tasa de síntesis de prostaglandinas. El IP_3 contribuye al incremento de la secreción mediante la estimulación de la actividad de PLA_2 al inducir incrementos de Ca^{++} ; y el DAG mediante la activación de PKC. Posteriores incrementos en AA son producidos por la metabolización del DAG mediada por DAG lipasas.

2.4.3.3 Catabolismo de los eicosanoides.

Los metabolitos del AA son muy activos pero su vida media es muy corta. Son transformados en productos inactivos mediante hidrólisis en presencia de agua

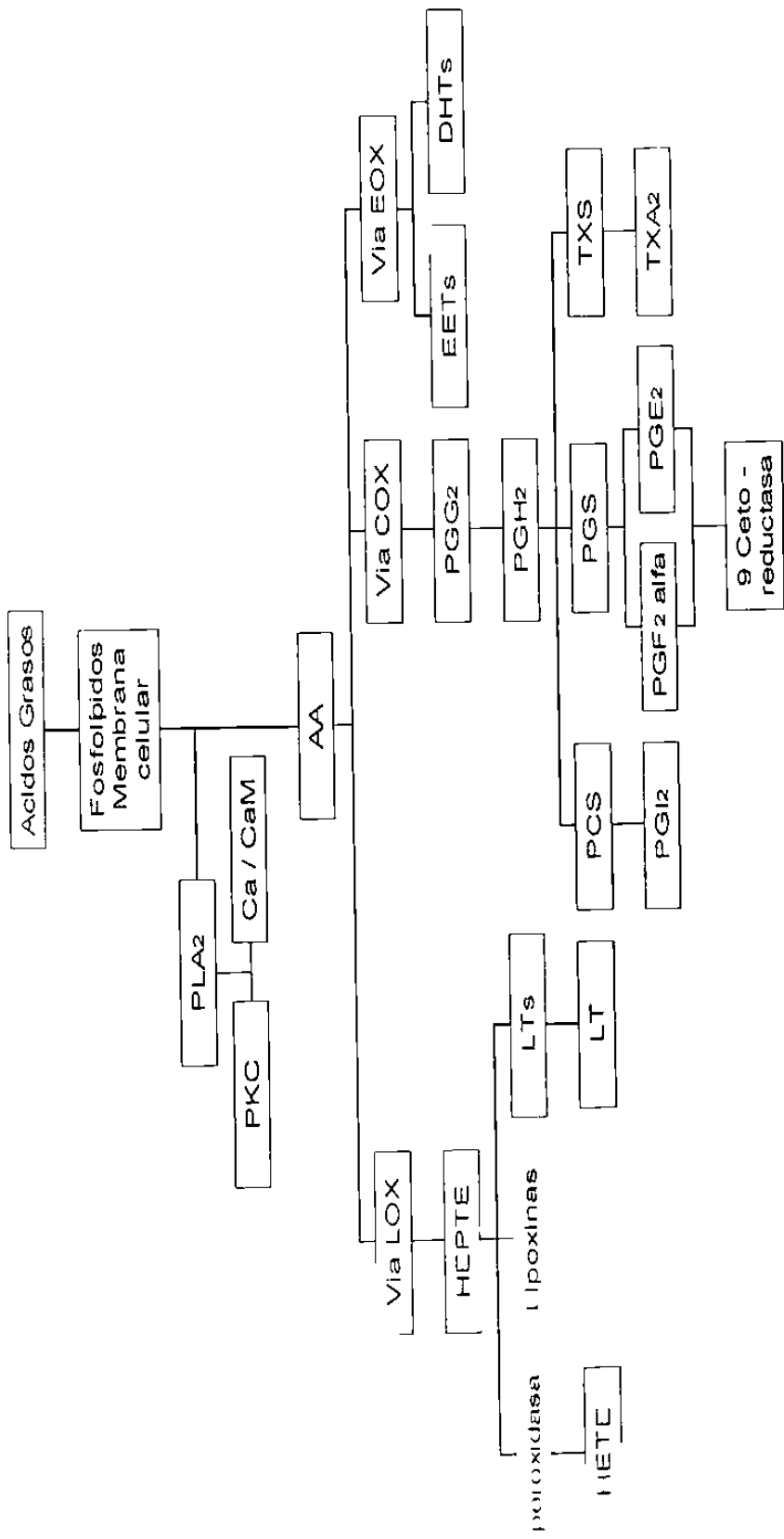


Figura 4.- Biosíntesis de PGF_{2α} y otros productos del ácido araquidónico (adaptado de Hadley, 1996).

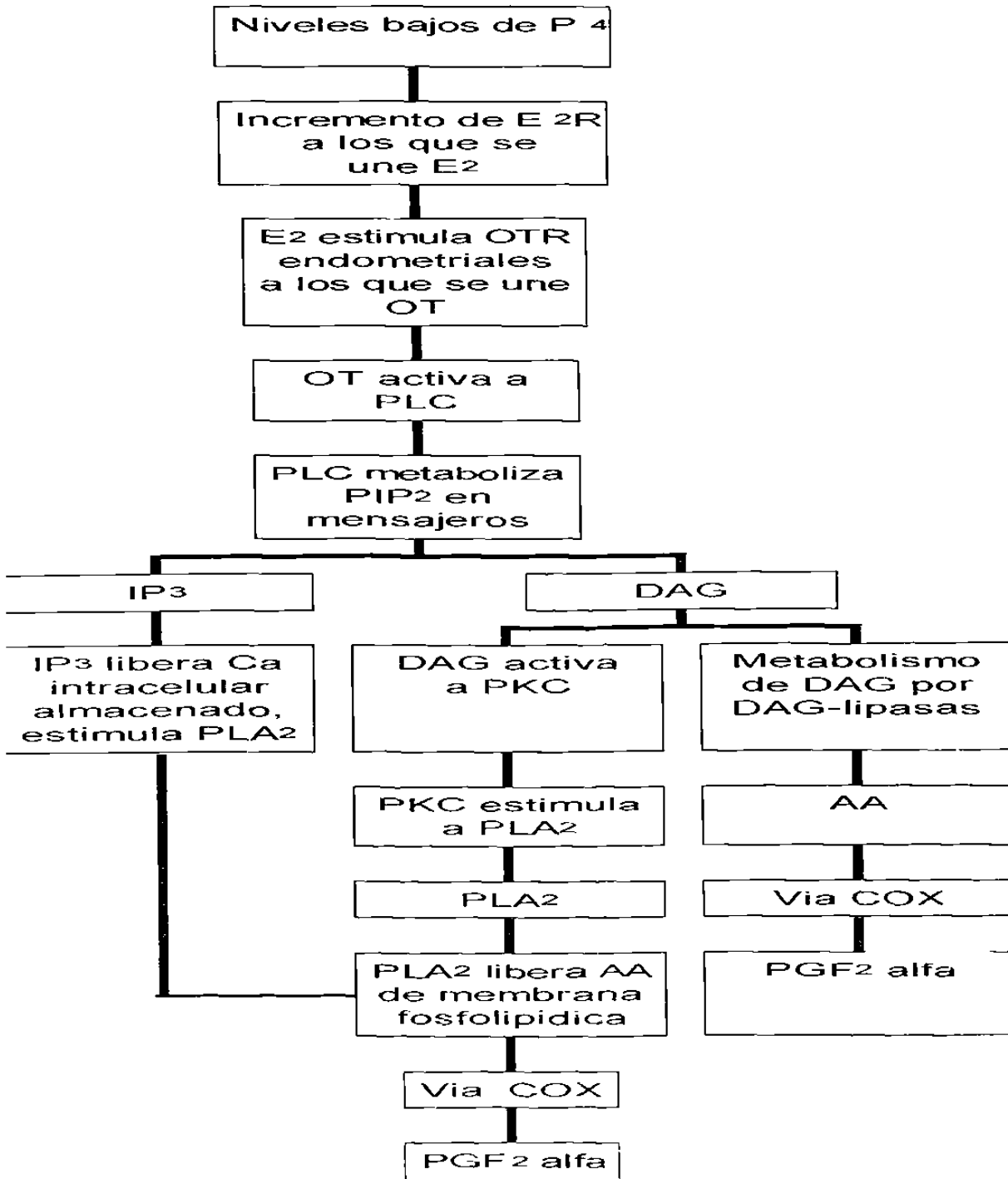


Figura 5.- Síntesis de $PGF_2\alpha$ relacionada con bajos niveles de P_4 (adaptado de Thatcher et al., 1997)

o son inactivados por enzimas localizadas en pulmones, hígado, riñones y en la placenta. La enzima de mayor importancia clínica en la inactivación de las prostaglandinas es la enzima 15 - PGDH, que mediante oxidación del grupo 15-hidroxy produce derivados 15 - keto. Está presente en el útero de animales gestantes y su actividad es mayor en la porción materna de la placenta que en la parte fetal (Kankofer y Hodemaker, 1993). La remoción del doble enlace en la posición C 13 - 14 y la conversión a 13, 14 - dihidro - 15 - keto - PGM mediante la 13, 14 - prostaglandina reductasa resulta en los metabolitos PGFM y PGEM. Estos poseen una vida media más larga que sus precursores y pueden ser utilizados como marcadores para determinar los niveles de prostaglandinas en la circulación periférica (Kankofer y Hodemaker, 1993).

2.4.3.4 Receptores de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el cuerpo lúteo.

El CL presenta receptores para $\text{PGF}_{2\alpha}$ que aumentan su afinidad hasta en 200 veces entre los días 13 y 20 del ciclo estral. Sin embargo, durante los días 1 - 5 del ciclo el CL es refractario al efecto de la $\text{PGF}_{2\alpha}$, lo que no puede ser atribuido a la falta de receptores ya que su presencia ha sido demostrada en esta etapa (Wiltbank et al., 1994). Según algunos autores esta refractariedad puede ser debida a otros factores como son una vascularización incompleta que implica un reducido flujo sanguíneo hacia el CL y por lo tanto de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Wise et al., 1982), a una diferenciación deficiente o incompleta de los mecanismos degenerativos en las células luteas, a deficiencias en el acoplamiento de los receptores de $\text{PGF}_{2\alpha}$ con el Ca^{++} intracelular o a niveles

bajos de Ca^{++} intracelular (Wiltbank et al., 1994). Sakamoto et al. (1995) reportaron que el RNAm para los receptores de prostaglandinas se incrementan progresivamente a partir de la fase temprana del ciclo hacia la fase tardía y su concentración se encuentra marcadamente reducida durante la regresión del CL, aunque otros autores no han encontrado diferencias en la concentración o afinidad de los receptores en diferentes etapas del ciclo (Milvae et al., 1996).

2.4.3.5 Efecto de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el cuerpo lúteo.

Son varias las acciones celulares reportadas en el CL inducidas por la $\text{PGF}_{2\alpha}$. Disminuye grandemente el flujo sanguíneo lúteo debido a su efecto vasoconstrictor, induce cambios en la membrana celular que afectan la capacidad de unión de los receptores y además provoca el desacoplamiento de los receptores de LH y adenil - ciclasa (Milvae et al., 1996). Además disminuye el número de receptores de LH suprimiendo la producción de P_4 estimulada por LH (Pate y Condon, 1984; Spicer et al., 1981), disminuye las enzimas esteroidogénicas lúteas y altera su actividad, como es el caso de la colesterol esterasa, la colesterol sintetasa (Berhman et al., 1971: citado por Pate, 1996) y la 3β -hidroxiesteroideshidrogenasa (Hawkins et al., 1993) que pueden afectar el balance normal de colesterol y la esteroidogénesis disminuye la cantidad de prostaciclina lútea, estimula la actividad de fosfolipasa C en las células lúteas grandes y pequeñas, incrementa la cantidad de inositol trifosfato y calcio libre intracelular, y altera la actividad de la protein - cinasa C (Milvae et al., 1996).

En general, estos cambios tienen como resultado una disminución en la producción de P_4 lútea, una disminución en la producción de prostaglandinas luteotrópicas y la estimulación de la síntesis de una mayor cantidad de $PGF_{2\alpha}$ provocando finalmente la completa involución del CL.

2.4.3.6 Efecto de la $PGF_{2\alpha}$ sobre el embrión.

Se ha sugerido un efecto tóxico directo de la $PGF_{2\alpha}$ sobre el embrión. En bovinos, Schrick et al. (1993) reportan una correlación negativa entre la concentración de $PGF_{2\alpha}$ uterina y la calidad de los embriones el día 6. Maurer y Beier (1976) reportaron que la $PGF_{2\alpha}$ afecta negativamente al desarrollo de embriones de conejo de 2, 4 y 8 células desarrollados in vitro, reduciéndose el número de mórulas y blastocistos tempranos a las 24 y 48 horas de cultivo, respectivamente.

2.4.4 Mecanismos adicionales involucrados en la función lútea.

Aunque la $PGF_{2\alpha}$ inicia la luteólisis funcional son necesarios mecanismos adicionales para completarla y en los que están involucrados muchos otros componentes celulares. Existe evidencia de comunicación entre los diferentes tipos de células lúteas. Aunque la naturaleza de esta comunicación e interacción celular no ha sido completamente explicada se cree que interviene de manera importante en la función lútea, tanto en la luteinización como en la luteólisis. Muchas de las sustancias que desencadenan la respuesta de las células lúteas son producidas localmente y pudieran actuar como factores

reguladores parácrinos / autócrinos modulando las respuestas celulares lúteas a señales hormonales.

Esta comunicación intercelular puede ocurrir de dos formas :

- a) las señales pueden ser transmitidas mediante transferencia directa del contenido celular (célula a célula) como en la transferencia de moléculas mensajeras intracelulares a través de espacios o canales de comunicación amplificando una señal hormonal inicial, y
- b) a través de productos de secreción, como señales parácrinas que influyen sobre varias células adyacentes simultáneamente, generalmente tipos celulares heterogéneos.

2.4.4.1 Interacción entre células esteroideogénicas lúteas grandes y pequeñas.

Redmer et al. (1991) determinaron que las células lúteas pequeñas se comunican por contacto tanto con las células grandes como con otras células pequeñas mediante la formación de canales de unión identificados mediante transmisión electrónica en cultivos celulares, y que no existe comunicación entre células grandes. La comunicación entre células grandes y pequeñas es estimulada tanto por LH como por $PGF_{2\alpha}$ pero no cuando ambas hormonas se combinan. Posteriormente, Del Vecchio et al. (1994) determinaron que existía sinergismo entre células grandes y pequeñas, ya que la síntesis de P_4 aumentaba al poner ambos tipos de células en contacto. Mas aún, demostraron

que para una máxima estimulación de la síntesis de P_4 por LH era necesario que las células establecieran contacto (Del Vecchio et al., 1995).

2.4.4.1.1 Mediadores intercelulares entre células grandes y pequeñas.

Las células lúteas secretan gran cantidad de compuestos que pueden actuar como mediadores parácrinos, entre ellos prostaglandinas, péptidos, factores de crecimiento y esteroides.

a) Prostaglandinas. El CL contiene gran cantidad de ácido araquidónico y produce grandes cantidades de prostaglandinas, principalmente PGI_2 , seguida de PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$, cuyas concentraciones son mayores durante la fase lútea temprana (Rodgers et al., 1983; Milvae y Hansel, 1983). Las tres tienen un efecto estimulador de la secreción de P_4 en las células lúteas pequeñas, mientras que en las células grandes la $PGF_{2\alpha}$ inhibe el efecto estimulador de LH, PGE_2 y PGI_2 (Alila et al., 1988). Del Vecchio et al. (1994) observaron que la adición de ácido araquidónico a un sistema de perfusión secuencial incrementa la secreción de P_4 si el medio es aplicado desde las células pequeñas hacia las células grandes y disminuye si es aplicado en sentido inverso. Con base en este hallazgo, Pate (1996) propone que las células pequeñas convierten el ácido araquidónico en prostaglandinas estimuladoras, como PGI_2 mientras que las células grandes lo metabolizan en prostaglandinas inhibitoras, como $PGF_{2\alpha}$. Sin embargo reconoce la posibilidad de que el responsable de éste efecto sea el propio ácido araquidónico o algún producto de la lipoxigenasa

b) Péptidos. Existe suficiente evidencia que sugiere la existencia de un mecanismo de retroalimentación entre la OT lútea y la $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina durante la luteólisis. La OT está presente solamente en las células lúteas grandes y su secreción es estimulada por $\text{PGF}_{2\alpha}$ mediante la activación de protein - cinasa C e incrementos de calcio intracelular y calpastatina (Orwing et al., 1994; Cosola - Smith et al., 1990). Bajas concentraciones de OT estimulan la producción de P_4 mientras que altas concentraciones la inhiben, lo que sugiere que la OT sintetizada en las células lúteas grandes actúa como regulador parácrino de la esteroidogénesis (Tan et al., 1982). Esto es apoyado por el hecho de que el CL posee receptores de OT que presentan mayor actividad de unión en células que corresponden a los días 8 - 12 del ciclo estral (Okuda et al., 1992; Fuchs et al., 1990).

c) Factores de crecimiento. Probablemente el factor de crecimiento insulínico (IGF) interviene en la comunicación intercelular lútea, ya que IGF - 1 y su RNAm se expresan en el tejido lúteo, con una mayor concentración durante la mitad del ciclo (Einspanier et al., 1990). El CL posee receptores de membrana para IGF - 1 y se ha observado que estimula la secreción de P_4 y en altas concentraciones estimula la secreción de OT (Sauerwein et al., 1992; Einspanier et al., 1990). En otros trabajos se ha observado un incremento en la producción de P_4 inducido por factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento transformador - β (TGF - β) y factor de crecimiento nervioso (NGF) en cuerpos lúteos microdia zados. Sin embargo, no se han obtenido los

mismos resultados con células cultivadas disociadas (Miyamoto et al., 1992).

d) Esteroides. Se ha sugerido que la P_4 actúa dentro del CL. En células bovinas cultivadas la P_4 disminuye la producción basal de $PGF_{2\alpha}$ y PGI_2 , inhibe la síntesis de prostaglandinas estimulada por citocinas e incrementa los receptores de LH (Pate, 1996). Smith et al. (1995) han reportado la presencia y expresión de RNAm de receptores de P_4 en el CL ovino, sin embargo no han sido determinados en el CL bovino.

2.4.4.2 Interacción entre células esteroidogénicas y no esteroidogénicas.

La red microvascular del CL y la mayor parte de las células lúteas no esteroidogénicas son células endoteliales. Tanto éstas células como las células lúteas esteroidogénicas presentan moléculas adherentes similares a las moléculas adherentes de las células neurales (NCAMP) por lo que se ha propuesto que estas moléculas pudieran intervenir en la unión entre células endoteliales y células lúteas, ya que ambas las presentan (Mayerhofer, 1992). Girsh et al. (1995) sugieren que existe una relación funcional entre las células lúteas y endoteliales basados en la observación de la estimulación de la producción de P_4 en células similares a las células lúteas grandes inducida por las células endoteliales y proponen que este efecto es mediado por la PGI_2 . Observaron también que la $PGF_{2\alpha}$ inhibe la producción de P_4 estimulada por LH y la fosfocolina, tanto en cultivos mixtos de células lúteas y endoteliales como en cortes histológicos de tejido lúteo pero no en células lúteas grandes

aisladas. Esto implica la necesidad de la presencia de células endoteliales para que se manifieste el efecto inhibitor de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre las células lúteas grandes. Además, la endotelina - 1 producida por las células endoteliales inhibe la síntesis de P_4 y PGI_2 en las células lúteas pero estimula la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$, por lo que la endotelina - 1 pudiera actuar como agente luteolítico local (Milvae et al., 1996).

El desarrollo del CL implica remodelación tisular y proliferación celular que involucra a factores mitógenos y angiogénicos que estimulan la proliferación de células endoteliales que ya han sido identificados en el CL bovino durante el ciclo estral y la gestación, y han sido caracterizados como factores de crecimiento asociados a heparina (HBGF) (Pate, 1996). Zheng et al. (1993) identificaron los factores HBGF - 1 y HBGF - 2 en el citoplasma de células lúteas grandes y pequeñas y observaron que el patrón del HBGF - 2 es paralelo al grado de desarrollo vascular lúteo. Otros compuestos que pudieran influenciar la proliferación de células endoteliales y fibroblastos son los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs). Estos factores inhibidores han sido encontrados en varias especies y se ha sugerido su participación durante la luteinización y luteólisis (Smith et al., 1994). En ovinos la máxima expresión del TIMP- RNAm es durante la fase lútea temprana y su mayor concentración se encuentra en las células lúteas grandes (Smith et al., 1995) En los bovinos se han identificado los factores TIMP - 1 y TIMP - 2. pero en este caso su expresión aumenta durante la luteólisis (Juengel et al., 1994) Los

hallazgos mencionados anteriormente sugieren que las células endoteliales pueden intervenir en la esteroidogénesis en las células lúteas y las células esteroidogénicas estimulan la proliferación de células endoteliales. La esteroidogénesis puede también estar regulada por péptidos y transmisores neurales ováricos, ya que se ha encontrado que la producción de P_4 es estimulada por la adrenalina, la noradrenalina y la serotonina, tanto in vivo como in vitro (Battista et al., 1987; Battista y Condon, 1986).

2.4.4.3 Interacción entre células lúteas y células inmunes.

La ovulación, luteinización y luteólisis desencadenan respuestas inmunes e inflamatorias en las que intervienen células inmunes activas que influyen sobre las células lúteas mediante una interacción directa, célula a célula, o a través de la secreción de citocinas. Durante la fase lútea están presentes macrófagos que aumentan su número antes del inicio de la luteólisis. La señal para la infiltración de macrófagos no ha sido identificada, pero se cree que involucra a la proteína monocito quimioattractante - 1 (MCP-1).

Dentro del CL la activación de células inmunes puede ser facilitada por un incremento en las moléculas tipo Complejo de Histocompatibilidad Principal (MHC) en la superficie celular lútea. En el día 6 del ciclo estral las células lúteas presentan moléculas MHC clase I y muy pocas clase II. Sin embargo, alrededor del día 10, el 80 % de las células lúteas grandes presentan moléculas clase II incrementándose para el día 18 y presentándose también en

las células pequeñas. La cantidad de moléculas MHC disminuye durante la etapa temprana de la gestación, lo que coincide con el bajo número de células inmunes lúteas en vacas gestantes y el tiempo del rescate del CL durante la etapa de reconocimiento materno (Benyo et al., 1991).

Las células lúteas y las células inmunes pueden también interactuar mediante productos de secreción que actúan como mediadores intercelulares, como las citocinas, prostaglandinas y probablemente esteroides y factores de crecimiento. Las citocinas inhiben la esteroidogénesis estimulada por la FSH y la proliferación y diferenciación celular de la granulosa aunque en algunos casos estimula la esteroidogénesis en células tecales. La mayoría de las citocinas estimulan la producción de prostaglandinas en las células lúteas por lo que es posible que estimulen el desarrollo lúteo temprano al incrementar la concentración de PGI_2 . Sin embargo, la mayoría de los efectos de las citocinas coinciden con la regresión lútea. Aunque generalmente actúan de manera sinérgica, el Interleukin - 1β (IL - 1β), el factor de necrosis tumoral - α (TNF - α) e interferón - γ (IFN - γ) individualmente inhiben la síntesis de P_4 estimulada por LH en células lúteas bovinas cultivadas con poco efecto sobre la esteroidogénesis basal y producen incremento de la producción de prostaglandinas en las células lúteas (Benyo y Pate, 1992; Fairchild y Pate, 1991; Nothnick y Pate, 1990).

La presencia del IFN - γ y del TNF - α en forma conjunta ocasiona luteólisis (Benyo y Pate, 1992). Cuando ambos están presentes (TNF- α y IFN- γ) se

incrementa la producción de prostaglandinas lúteas probablemente mediante la estimulación de la actividad de la fosfolipasa A_2 y la formación de radicales libres, mecanismo que pudiera estar involucrado en la citólisis lútea mediada por citocinas (Pate, 1995). La producción lútea de prostaglandinas estimulada por el $IL - 1\beta$ es aparentemente mediante la activación de la fosfolipasa A_2 y en menor medida de la fosfolipasa C, incrementando primeramente la disponibilidad de ácido araquidónico para el metabolismo de prostaglandinas, mientras que el $TNF - \alpha$ activa solamente a la fosfolipasa A_2 pero no a la fosfolipasa C (Pate, 1996).

Las citocinas pueden estimular la regresión del CL mediante la regulación de la expresión de moléculas MHC en las células lúteas. Tanto el $TNF - \alpha$ como el $IFN - \gamma$ ocasionan incremento en la expresión de las moléculas MHC clase I en células lúteas bovinas cultivadas (Benyo y Pate, 1992; Fairchild y Pate, 1989). Puede ser que esto promueva la acción de células T_c en contra de las células lúteas. Además, el $IFN - \gamma$ induce moléculas MHC clase II en las células lúteas, que propician el reconocimiento autoantigénico por las células T_H y una mayor estimulación en la producción de citocinas (Fairchild y Pate, 1989).

En general, el efecto estimulador de la producción de prostaglandinas de las citocinas es inhibido por altas concentraciones de P_4 (Pate, 1995) por lo que es posible que las altas concentraciones de P_4 presentes durante la mitad de la vida lútea bloqueen la acción de las citocinas sobre las células del CL. Cuando

disminuyen los niveles de P_4 las citocinas actúan inmediatamente incrementando la síntesis de prostaglandinas lúteas (Pate, 1996). Además las prostaglandinas a su vez tienden a estimular la proliferación de células inmunes y la secreción de citocinas y las mismas citocinas estimulan la expresión de receptores de otras citocinas (Pate, 1995). El TNF - α presenta gran similitud con el IFN - τ secretado durante el periodo de reconocimiento materno y en presencia de P_4 es capaz de inhibir la inducción de moléculas clase II por el IFN - γ en las células lúteas (Pate, 1995).

2.5 Mecanismo de reconocimiento materno y establecimiento de la gestación.

Para que la gestación en rumiantes sea establecida es necesaria la supresión de los pulsos luteolíticos de $PGF_{2\alpha}$ endometrial (Spencer et al., 1995), la supresión del incremento de receptores de OT uterinos (Flint et al., 1992; Bazer et al., 1991) y el aumento en los niveles de P_4 requeridos para el mantenimiento de un ambiente adecuado para el desarrollo del embrión (Kerbler et al., 1997; Geisert et al., 1992). Para que esto ocurra el embrión debe señalar su presencia en el útero, desencadenando una serie de eventos conocidos como "mecanismo de reconocimiento temprano de la gestación " o "mecanismo de reconocimiento materno" que tiene como objetivo bloquear el proceso luteolítico (Hafez, 1996; Odensvik y Gustafsson , 1994). Este mecanismo está basado en la relación sincrónica entre el mecanismo luteolítico de la madre y la capacidad del embrión para enviar las senales biologicas de

su presencia en el útero, al que debe llegar en una determinada etapa de desarrollo (Knickerbocker et al., 1986). Aunque generalmente se señala al día 16 como el periodo de reconocimiento materno, ya ha sido establecido que mucho tiempo antes de ese momento ya hubo comunicación fisiológica entre la madre y el embrión (Hansel, 1989).

2.5.1 Activación del mecanismo de reconocimiento materno y secreción de bIFN - τ .

El embrión interviene en el proceso luteolítico 3 o 4 días antes de que el CL se vuelva disfuncional (Roberts et al., 1996) activando el mecanismo de reconocimiento temprano por medio de un complejo glicoprotéico perteneciente a la familia de los interferones (interferón tipo I), el interferón bovino tau (bIFN - τ), anteriormente llamado proteína trofobástica bovina. El bIFN - τ es un inhibidor no competitivo del sustrato del ácido araquidónico, es sensible a las proteasas y presenta las formas de M_r de 25,000 - 35,000 y de 70,000 - 75,000 (Gross et al., 1988). Es secretado en grandes cantidades por las células mononucleadas del trofoectodermo (Roberts et al., 1996) y su secreción depende del grado de desarrollo del embrión (Kerbler et al., 1997) incrementándose a medida que transcurre el crecimiento y el cambio de aspecto embrionario de esférico a tubular y de tubular a filamentoso (Thatcher et al., 1997) por lo que la rápida expansión del trofoblasto y la formación del blastocelo son esenciales para que la señal iniciada por el embrión sea

captada por el útero de manera adecuada y la luteólisis sea inhibida (Geisert et al., 1992; Maurer y Chenault, 1983).

Se ha observado que los embriones madurados y fertilizados in vitro (IVM - IVF) secretan bINF - τ en la etapa de blastocisto (Thatcher et al., 1997). Hernandez - Ledezma et al. (1992) señalan que su secreción inicia entre los 8 y 9 días posfertilización cuando el embrión alcanza la etapa de blastocisto expandido, pero la continua viabilidad y producción de bINF - τ requiere de la exposición del embrión al ambiente uterino. Thatcher et al. (1989) señalan además que solamente es producido eficientemente por embriones de 15 mm o mayores. Aunque este factor antiluteolítico puede aparecer en el inicio de la formación del blastocisto como ya se ha señalado (día 7 - 8 postovulación), manifiesta su mayor actividad alrededor del día 14 - 16 postovulación.

2.5.2 Mecanismo de acción de bINF - τ .

El bINF - τ ejerce su acción antiluteolítica mediante varios mecanismos. Induce la secreción de un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas endometriales (EPSI) (Meyer et al., 1995 ; Danet - Desnoyers et al., 1993) que inhibe la secreción pulsátil de $PGF_2\alpha$ (Spencer et al., 1995) y suprime los receptores de OT uterinos que a su vez permiten una mayor secreción de prostaglandinas (Wolfenson et al., 1993; Lafrance , 1985)

Es aceptado hasta ahora que durante el metaestro del ciclo estral en los rumiantes en el epitelio uterino están presentes receptores de OT. También se

encuentran receptores de P_4 pero muchos de ellos se encuentran desocupados debido a los bajos niveles de P_4 circulantes por lo que la síntesis de los receptores de OT no puede ser suprimida. Durante el diestro los receptores de E_2 son bajos, al igual que el E_2 circulante, y los receptores de P_4 inician el bloqueo de la síntesis de los receptores de E_2 y OT, lo que dura alrededor de 10 o 12 días. En el diestro tardío los receptores de P_4 permiten la síntesis de receptores de E_2 y OT, lo que es facilitado por el incremento en la tasa de secreción de E_2 en los folículos ováricos. Posteriormente, la secreción pulsátil de OT por el CL y la hipófisis inducen la secreción de pulsos luteolíticos de $PGF_2\alpha$ endometrial, destruyendo el CL. Sin embargo, si el embrión está presente en el útero la secreción de bIFN - τ actúa en el epitelio endometrial estabilizando los receptores de P_4 y posiblemente al PR RNAm inhibiendo el incremento de receptores de E_2 y el ER RNAm, y en consecuencia también la síntesis de receptores de OT es inhibida. Aparentemente, además el embrión secreta PGE_2 que actúa incrementando la resistencia del CL hacia el potencial efecto luteolítico de la $PGF_2\alpha$.

El bIFN - τ además regula la expresión génica de los receptores de P_4 y estrógenos (Van den Berg et al., 1987; Scambia et al., 1991; citados por Bainbridge, 1996) y posee una potente actividad antiviral, inmunosupresora y antiproliferativa típica de los interferones (Pontzer et al., 1991; Roberts, 1989; Pontzer et al., 1988) lo que aumenta la importancia de su influencia en la implantación y mantenimiento de la gestación. La acción del bIFN - τ pudiera

circunscribirse al epitelio luminal uterino como proponen Thatcher et al. (1989) y Bazer et al. (1991), lo cual permitiría la síntesis de prostaglandinas en el estroma, principalmente PGE_2 , mientras las células epiteliales involucradas en la luteólisis son suprimidas.

2.5.3 Falla del mecanismo de reconocimiento materno.

El inicio del mecanismo de reconocimiento de la gestación puede no establecerse debido a que existe asincronía entre la madre y el embrión ocasionada por una gran variedad de factores. Entre éstos se encuentran la fertilización retardada del óvulo, el inicio tardío de la primera división meiótica que retarda la maduración del ovocito (Roberts et al., 1996), las diferentes tasas de eclosión de los embriones (Roberts et al., 1996; Hansel, 1981; Lamming et al., 1989; Ayalon, 1978; Erb et al., 1976), el desarrollo inadecuado del folículo dando origen a un CL de vida corta con menor capacidad esteroidogénica y un menor número de receptores para LH y por consiguiente desbalance hormonal (Roberts et al., 1996 ; Ashworth et al., 1989), la maduración nuclear y citoplasmática asincrónica de folículos ovulados con periodos de dominancia prolongados debido probablemente a la influencia del incremento en E_2 que afecta la función del oviducto (Mihm et al., 1994; Ahmad et al., 1994), una mala sincronización entre donadora y receptora en el caso de transferencia

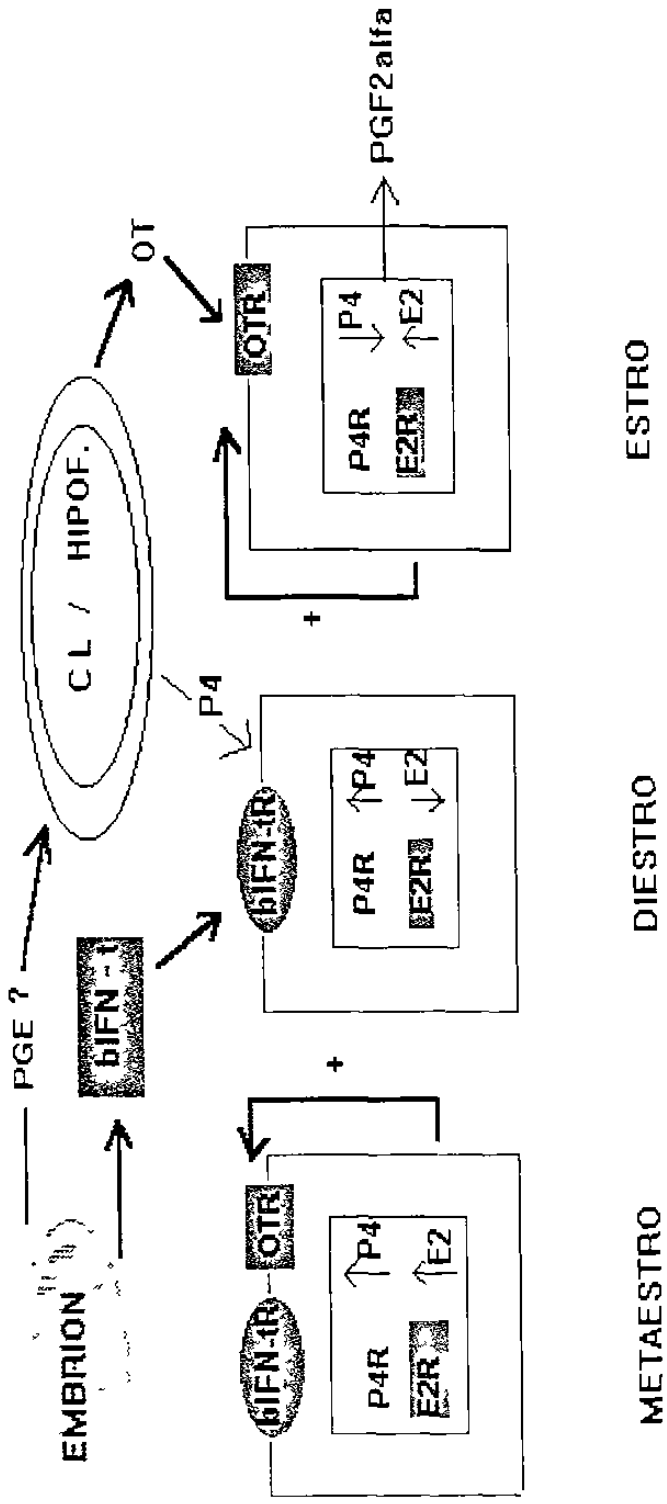


Figura 6 - Receptores hormonales uterinos y su relación durante el ciclo estral en rumiantes (adaptado de Bazer, 1992).

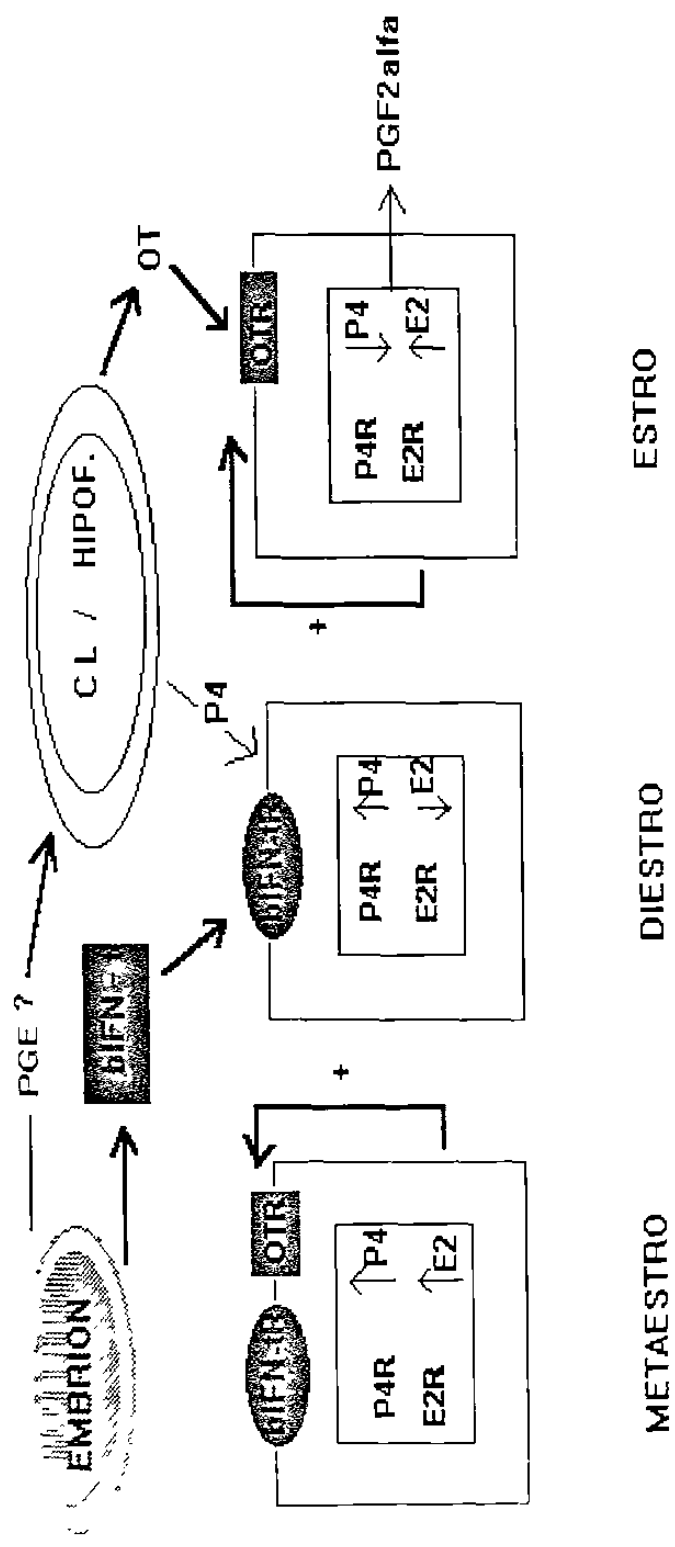


Figura 6.- Receptores hormonales uterinos y su relación durante el ciclo estrol en rumiantes (adaptado de Bazer, 1992).

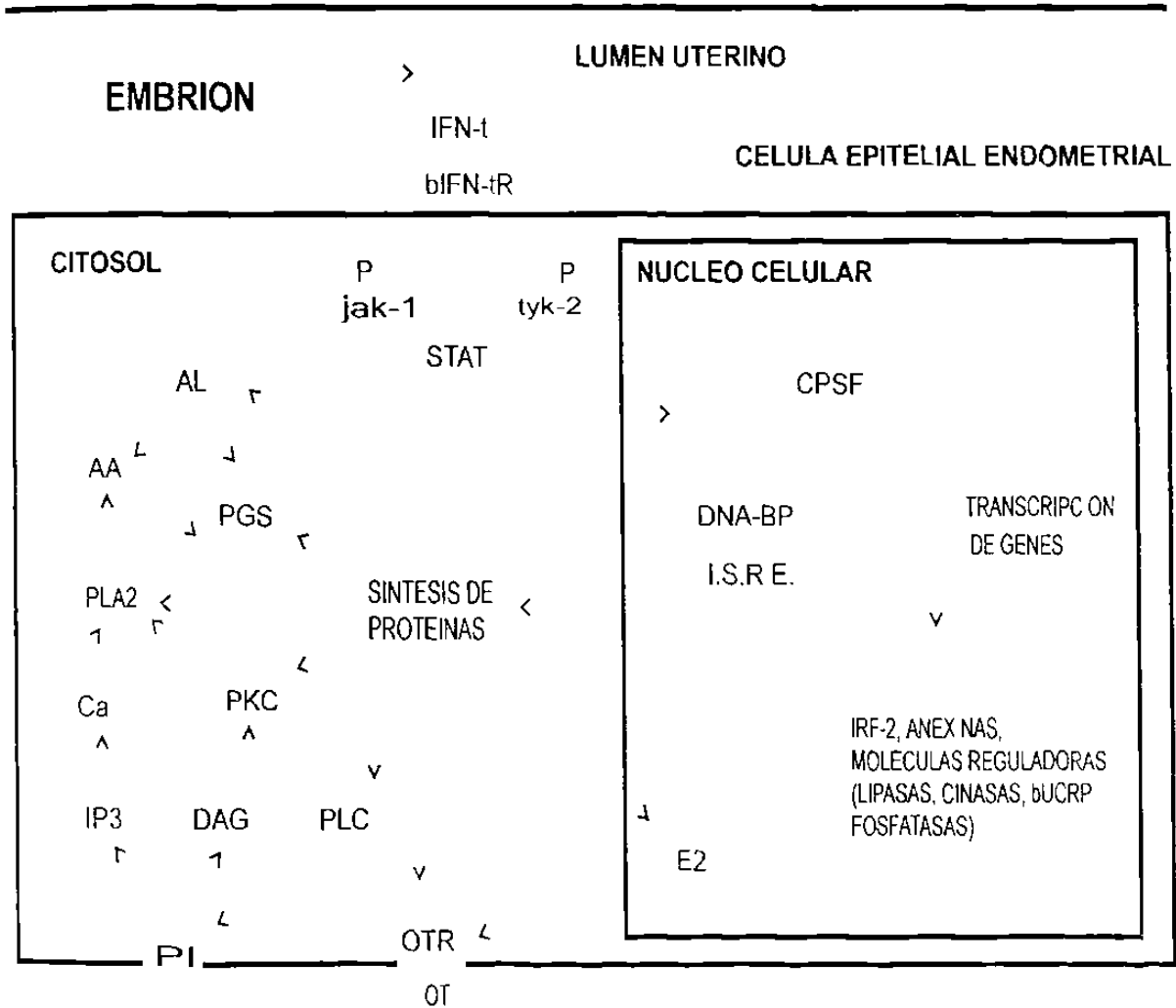


Figura 7.- Modelo hipotético de la activación génica inducida por el bIFN - τ (adaptado de Thatcher et al 1997).



Figura 8.- Secuencia de eventos en el modelo hipotético del mecanismo de activación génica estimulado por el bINF τ (adaptado de Thatcher et al., 1997).

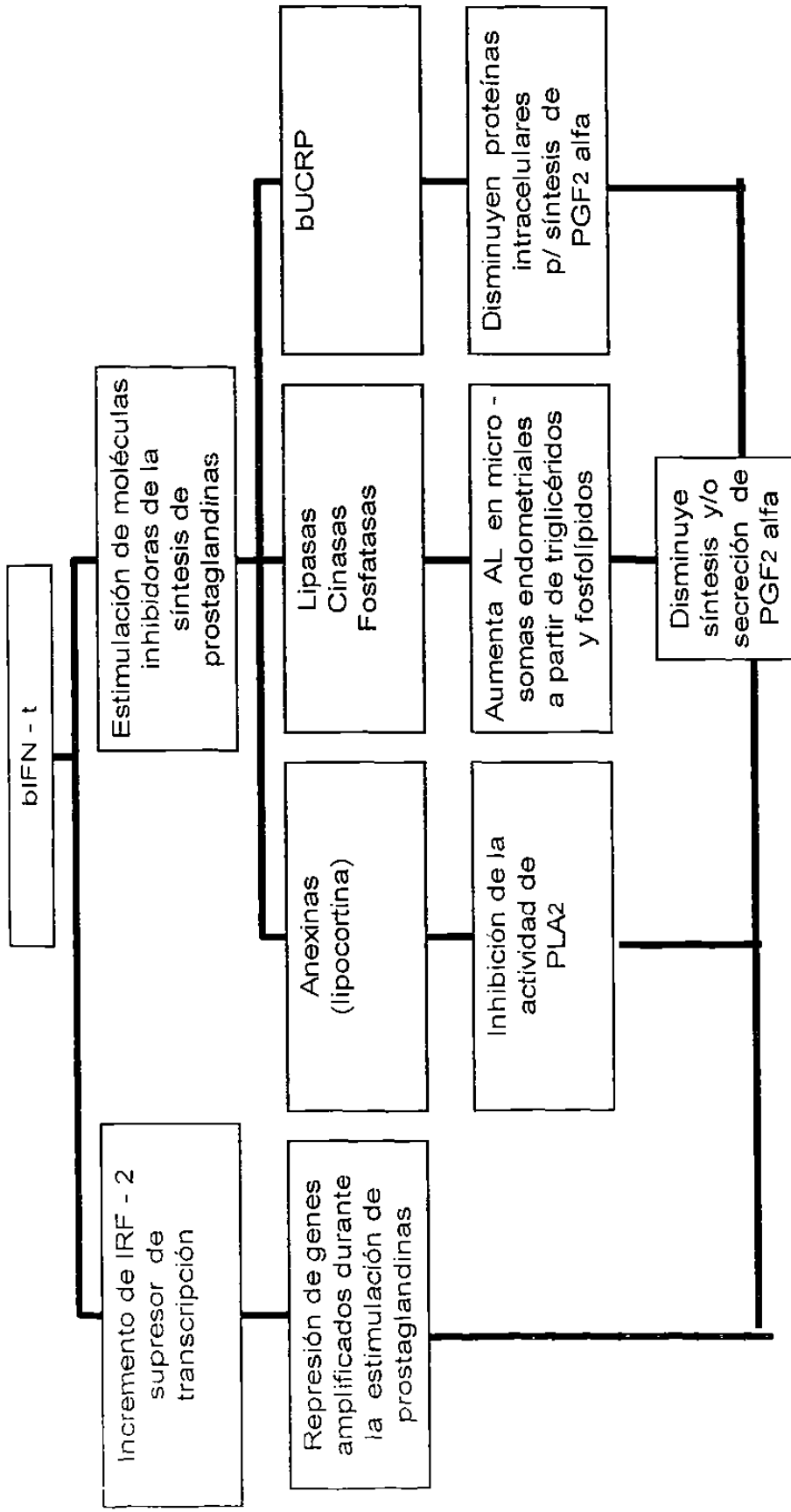


Figura 9.- Vías alternas para la inhibición de $PGF_{2\alpha}$ inducida por el bIFN - τ (adaptado de Thatcher et al., 1997).

de embriones, y problemas asociados con el manejo reproductivo del hato (deficiencias en la detección de calores y servicios realizados a tiempo inadecuado, que implican la fertilización retardada del óvulo). Todo esto puede provocar retraso en el desarrollo del embrión y una falla en el mantenimiento del CL y su funcionamiento. Si el embrión llega al útero (día 5 postovulación) en una etapa de desarrollo inferior o retrasada no será capaz de producir bIFN - τ en el momento o cantidad apropiada para activar el mecanismo de reconocimiento temprano de la gestación, ocurriendo luteólisis (Thatcher et al., 1989; Sreenan y Diskin, 1987 ; Seidel, 1980) .

En todas las condiciones anteriormente mencionadas el común denominador es su asociación con las reducidas concentraciones de P_4 en la circulación materna en vientres no gestantes, mientras que los vientres en los que la gestación es establecida los niveles tienden a ser elevados, incrementándose aún más a medida que avanza la gestación. Se han asociado valores bajos de P_4 en plasma con la proporción de animales que presentan luteólisis después del servicio (Mann y Lamming, 1995). En vacas servidas que presentan luteólisis la concentración de P_4 tanto en plasma como en leche es más baja durante la segunda mitad de la fase lútea en comparación con las vacas que presentan gestación (Mann y Lamming, 1995; Lamming et al., 1989; Lukesewska y Hansel, 1980).

En transferencia de embriones, Remnsen (1987) observó una fuerte correlación

entre la concentración de P_4 el día de la transferencia (día 7 u 8) y el índice de gestaciones obtenidas, reportando 20 % de gestaciones en animales con niveles de 2 ng / ml de suero o menos y un incremento de hasta el 74 % en receptoras con niveles de 2 - 5 ng / ml de suero. Las bajas concentraciones de P_4 tienen como resultado un aumento en la concentración de E_2 que estimula el desarrollo de receptores de OT y la producción de prostaglandinas, estimulando el mecanismo luteolítico temprano (Lamming y Mann, 1995; Beard y Lamming, 1994). Adicionalmente, se ha encontrado que existe una gran correlación entre la producción embrionaria de bIFN - τ y la concentración de P_4 entre vientres gestantes. En animales que presentan elevadas concentraciones de P_4 plasmática la producción embrionaria de bIFN - τ es mayor (Kerbler et al., 1997).

3.0 MATERIALES Y METODOS .

3.1 Localización.

El trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del Campo Experimental de Zootécnia de la Facultad de Agronomía de la UANL, ubicado en el Km. 17 de la carretera Gral. Zuazua - Marín, en el municipio de Marín, N. L., México. El campo experimental se localiza a 375 metros sobre el nivel del mar y a 25° 53' de latitud Norte y 100° 02' de longitud Oeste (Orozco, 1996).

El clima de la región es semiárido con una temperatura media anual de 23°C y temperaturas extremas de -3 °C en invierno y 41.5 °C en verano (Orozco, 1996). La precipitación anual es de 500 mm con lluvias distribuidas en dos periodos, de Mayo a Junio y de Agosto a Octubre. El resto de los meses corresponden a periodo seco. La humedad relativa media anual de esta zona es del 72 % (Orozco, 1996).

La comunidad vegetal corresponde a un matorral mediano subperenifolio caracterizado por especies arbustivas con espinas laterales con altura entre 1 y 3 m La vegetación dominante la forman el chaparro prieto (*Acacia rigidula*), chaparro amargoso (*Acacia texana*), granjeno (*Celtis pallida*), palo verde (*Cercidium macrum*), uña de gato (*Acacia greggi*), guayacán (*Porlieria*

angustifolia), calderona (*Krameris ramossisima*), crucito (*Condolia lycioidos*) y mezquite (*Prosopis spp*). Los zacates presentes en ésta zona son el zacate buffel (*Cenchrus ciliaris*), zacate mezquite (*Hilaria berlandieri*), pajita tempranera (*Setaria macrostachya*), zacate halli (*Panicum hallii*), navajita roja (*Bouteloua trifida*) y tridente esbelto (*Tridens multicus*) (Orozco, 1996).

3.2 Experimento I en vientres inseminados artificialmente.

3.2.1 Animales.

Se utilizaron 66 vientres de raza Charolais 100 % francés, de diferentes edades y estados reproductivos (55 vacas y 11 vaquillas) divididos en dos temporadas de empadre (1997 y 1998). Durante el primer empadre se utilizaron 36 vientres (30 vacas y 6 vaquillas), mientras que en el segundo empadre se utilizaron 30 vientres(25 vacas y 5 vaquillas).

3.2.2 Manejo de los animales.

Los vientres se mantienen en pastoreo durante todo el año. Rutinariamente se realiza un sólo manejo en forma mensual, en los corrales del campo experimental, en el cual se registra el peso y se desparasita externamente. La desparasitación interna, vacunación (triple bovina) y aplicación de vitaminas A, D y E se realizan cada 6 meses y 1 mes antes del parto. Durante los meses de invierno y periodos de sequía los animales son suplementados con alimento concentrado y forraje. La temporada de empadre in cia en Marzo y finaliza en Agosto Treinta días antes y durante el empadre se suplementó a los vientres

con 1.5 kg de concentrado por animal, con un contenido de 16.0 % de proteína y 2.5 MC/ Kg de energía metabolizable. Agua y minerales fueron proporcionados a libre acceso. Durante el desarrollo del trabajo los animales permanecieron en pastoreo en una pasta adyacente a los corrales de las instalaciones para facilitar su manejo.

3.2.3 Sincronización de estros.

La sincronización de estros en todos los animales se realizó aplicando implantes auriculares subcutáneos conteniendo 6 mg de Norgestomet (Syncro - mate - B ®, Rhone Merieux) durante 9 días mas una inyección IM (2 ml) conteniendo 3 mg de Norgestomet y 5 mg de valerato de estradiol en base oleosa. En el día 8 (1 día antes del retiro del implante) se aplicaron 25 mg de prostaglandinas Dinoprost IM (Lutalyse ®; Upjohn). Se practicó destete temporal por 48 horas al momento del retiro del implante.

3.2.4 Detección de estros.

La detección de estros se realizó por observación visual directa en forma continua por 36 horas desde el momento del retiro del implante hasta el momento del servicio de la última vaca. Después del servicio y aún cuando las vacas fueron diagnosticadas gestantes mediante ultrasonografía el día 33 postservicio, se observó a los animales tres veces al día para detectar celos hasta el día 65 postservicio. Los celos después de este período fueron monitoreados una vez al día.

3.2.5 Inseminación.

La inseminación se llevó a cabo 12 horas después de la detección de estros utilizando semen congelado de fertilidad certificada.

3.2.6 Diseño experimental y tratamientos.

Una vez inseminados los animales fueron asignados en bloques al azar a los diferentes tratamientos. Durante el empadre de 1997 los tratamientos fueron: Tratamiento 1(T1): (n = 9) Fueron tratados con meglumina de flunixin (Finadyne ®, Shering Plough) en dosis de 2.2 mg / kg de peso IM cada 12 horas durante 7 días (días 7 al 13 postservicio). Tratamiento 2 (T2): (n = 9) Se le colocó un dispositivo intravaginal de liberación de P₄ CIDR-B (EAZI - breed ©, InterAg) conteniendo 1.9 grs de P₄ natural durante 13 días (días 7 al 19 postservicio). Tratamiento 3 (T3): (n = 9) Recibieron meglumina de flunixin (2.2 mg / kg IM cada 12 horas) y el dispositivo CIDR - B postservicio durante 13 días (combinación de los tratamientos 1 y 2). Tratamiento 4 (T4): (n = 9) ningún tratamiento permaneciendo como grupo control.

Durante el empadre de 1998 se asignaron 30 animales a tres tratamientos en bloques al azar: Tratamiento 1 (T1): (n = 10) meglumina de flunixin (Finadyne ®, Shering Plough) 2.2 mg/ kg de peso IM cada 12 horas (días 7 al 13 postservicio). Tratamiento 2 (T2): (n = 10) dispositivo intravaginal CIDR-B (EAZI - breed ©, InterAg) conteniendo 1.9 grs de P₄ (días 7 a 19 postservicio) . Tratamiento 4 (T4): (n = 10) grupo control.

3.2.7 Obtención de muestras sanguíneas y análisis de laboratorio.

Con el fin de determinar los niveles de P_4 , antes, durante y después de los tratamientos se tomaron muestras sanguíneas mediante punción de la vena coccígea por medio de agujas y tubos de colección vacutainer sin aditivos. Las muestras de sangre fueron colectadas por la mañana (0700 h) de acuerdo al siguiente calendario :

Empadre 1997 - días 0 (día del servicio), 7 al 15, 21, 22 y 33 postservicio.

Empadre 1998 - días 0 (día del servicio), 3, 5, 7 al 15, 21, 22 y 33 postservicio.

En T1 y T3 las muestras fueron colectadas antes de la aplicación de la meglumina de flunixin. Después de ser colectadas todas las muestras fueron mantenidas en refrigeración mediante hielo y se permitió su coagulación. Posteriormente todas las muestras fueron centrifugadas (2000 rpm / 15 min) separando el suero y congelándolo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en tubos Eppendorf para las posteriores determinaciones hormonales. Estas determinaciones se realizaron mediante radioinmunoanálisis (RIA) de fase sólida, utilizando el kit Progesterone - ^{125}I ImmuChem™ (ICN Pharmaceuticals, Inc.) con tubos recubiertos. La sensibilidad del ensayo fue de 0.150 ng / ml. Los coeficientes de variación para la dosis baja fueron de 0.462 ± 0.038 (c.v. 8.40 %) y 0.422 ± 0.052 (c.v. 12.32 %) (intra e interensayo, respectivamente); los coeficientes de variación para la dosis alta fueron de 81.31 ± 0.678 (c.v. 0.83 %) y 79.50 ± 4.308 (c.v. 12.32 %) (intra e interensayo, respectivamente)

3.2.8 Diagnóstico de gestación .

Se practicaron dos diagnósticos de gestación. El primero se realizó mediante ultrasonografía transrectal el día 33 postservicio utilizando un aparato de ultrasonido B - mode real time con transductor lineal y 7.5 MHz de frecuencia (Concept / LC, Dynamic Imaging Ltd.); el segundo se practicó mediante palpación rectal a los 60 días postservicio.

3.2.9 Análisis estadístico.

El efecto de los tratamientos sobre el desempeño reproductivo fue analizado por el método de ji - cuadrada mediante tablas de contingencia (Olivares, 1998). Los parámetros reproductivos evaluados fueron: índices de no retorno a estro a los 33 (INR1) y 65 días postservicio (INR2), índices de concepción a los 33 (IC1) y 60 días postservicio (IC2), índices de pérdida de la gestación a los 60 días postservicio (IPG1) y después de los 60 días postservicio (IPG2) y los porcentajes de pérdida de la gestación a los 60 días postservicio (%GP1), después de los 60 días postservicio (%GP2) y total (% GP), índices de parición (IP), así como el intervalo entre el servicio y la presentación de estros. Los parámetros fueron calculados de la siguiente manera

El índice de no retorno (INR) se consideró como el número de vacas que no retornaron a estro a los 33 (INR1) y 65 (INR2) días después del servicio, expresado en porcentaje.

El índice de concepción (IC) se calculó como el número de vientres diagnosticados como gestantes 33 (IC1) y 60 (IC2) días después del servicio en relación con el número de vientres servidos.

El índice de parición (IP) se calculó como el número de vacas que parieron una cría en relación con el número de vacas servidas.

El índice de pérdida de la gestación (IPG) se estimó como la diferencia entre el índice de concepción a los 33 (IPG1) y 60 (IPG2) días postservicio y el índice de parición.

El porcentaje de parición (%P) se estimó como el número de vacas gestantes que parieron una cría expresado en porcentaje.

El porcentaje de gestaciones perdidas (% GP) se consideró como el porcentaje de vacas gestantes que perdieron la gestación en los periodos entre el primer y el segundo diagnóstico de gestación (días 33 a 60 postservicio; % GP1) y después del segundo diagnóstico a los 60 días (% GP2).

Los servicios por concepción (SPC) se estimaron como el número de servicios totales dividido entre el número de gestaciones obtenidas.

La fertilidad a primer servicio (FPS) se calculó dividiendo un valor de 100 entre el número de servicios por concepción para ser expresado en porcentaje.

El intervalo entre estros en las vacas se consideró como el intervalo de tiempo transcurrido entre el momento del servicio y la presentación de estro, tanto en vacas no gestantes después del servicio como en vacas repetidoras.

Los niveles de P₄ fueron evaluados mediante análisis de varianza (ANOVA) por medio del paquete estadístico SPSS (SPSS versión 6.0, 1993). Las diferencias entre tratamientos y dentro de tratamientos fueron analizadas mediante análisis de comparación de medias (t - Student para variables independientes) del mismo paquete estadístico. Valores de P < 0.05 se consideraron como estadísticamente significativos.

3.3 Experimento II en vaquillas nulíparas.

3.3.1 Animales.

Se utilizaron 16 vaquillas en edad reproductiva (> de 15 meses y > 350 kgs de peso) de la raza Holstein Friesian.

3.3.2 Sincronización.

La sincronización de estros en todos los animales se realizó de la misma forma que en los vientres inseminados (implantes auriculares subcutáneos conteniendo 6 mg de Norgestomet (Syncro - mate - B ®, Rhone Merieux) durante 9 días mas una inyección IM (2 ml) conteniendo 3 mg de Norgestomet y 5 mg de valerato de estradiol en base oleosa al momento del implante. Un día antes del retiro del implante se aplicaron 25 mg de prostaglandinas Dinoprost IM (Lutalyse ®; Upjohn).

3.3.3 Detección de estros.

Se realizó por observación visual directa en forma continua a partir del

momento del retiro del implante por 36 horas. Después de finalizar los tratamientos las vaquillas se observaron tres veces al día hasta el día 25 y posteriormente una vez al día hasta el día 30.

3.3.4 Diseño experimental y tratamientos.

Una vez detectados los estros, los animales fueron asignados al azar a cada uno de los cuatro tratamientos probados en los vientres inseminados: T1 (n= 4) meglumina de flunixin, T2 (n = 4) dispositivo intravaginal CIDR - B, T3 (n = 4) meglumina de flunixin y el dispositivo CIDR - B; combinación de los tratamientos 1 y 2, y T4 (n = 4) grupo control.

3.3.5 Obtención de muestras sanguíneas y análisis de laboratorio.

De cada vaquilla se obtuvo una muestra sanguínea diaria de 10 ml para un total de 15 muestras por vaquilla, a partir del día 7 posterior a la presentación de estros y hasta el día 21. Todas las muestras fueron colectadas por la mañana (0700 h) por punción de la vena coccigea mediante agujas y tubos de colección vacutainer sin aditivos. En T1 y T3 las muestras fueron colectadas antes de la aplicación de la meglumina de flunixin. Después de ser colectadas todas las muestras fueron mantenidas en refrigeración mediante hielo y se permitió su coagulación. Posteriormente todas las muestras fueron centrifugadas (2000 rpm / 15 min) separando el suero y congelándolo a -20 °C en tubos Eppendorf para las determinaciones hormonales mediante radioinmunoanálisis (RIA) de fase sólida utilizando el kit Progesterone - ¹²⁵I

ImmuChem™ (ICN Pharmaceuticals, Inc.) con tubos recubiertos. La sensibilidad del ensayo fue de 0.150 ng / ml. Los coeficientes de variación para la dosis baja fueron de 0.462 ± 0.038 (c.v. 8.40 %) y 0.422 ± 0.052 (c.v. 12.32 %) (intra e interensayo, respectivamente); para la dosis alta fueron de 81.31 ± 0.678 (c.v. 0.83 %) y 79.50 ± 4.308 (c.v. 12.32 %) (intra e interensayo, respectivamente).

3.3.6 Análisis estadístico.

Los niveles de P₄ fueron evaluados mediante análisis de varianza (ANOVA) por medio del paquete estadístico SPSS. Las diferencias entre tratamientos y dentro de tratamientos fueron analizadas mediante análisis de comparación de medias por t - Student para variables independientes. El intervalo entre estros, considerado como el intervalo entre el estro sincronizado y la presentación del siguiente estro, fue analizado mediante ji - cuadrada. Valores de $P < 0.05$ se consideraron como estadísticamente significativos.