



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
MAESTRIA EN CIENCIAS VETERINARIAS  
MENCIÓN: SALUD ANIMAL

**EFFECTO DE LA DURACIÓN DEL PROESTRO Y EL TAMAÑO  
FOLICULAR SOBRE EL AMBIENTE ENDOMETRIAL EN VACAS  
PARA CARNE SOMETIDAS A DIFERENTES PROTOCOLOS DE  
SINCRONIZACIÓN DE LA OVULACIÓN**

AUTOR: M.V. Francisco Tomás Trucco

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN  
CIENCIAS VETERINARIAS

Esperanza - Santa Fe

2023

---



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
MAESTRIA EN CIENCIAS VETERINARIAS  
MENCIÓN: SALUD ANIMAL

**EFFECTO DE LA DURACION DEL PROESTRO Y EL TAMAÑO  
FOLICULAR SOBRE EL AMBIENTE ENDOMETRIAL EN VACAS  
PARA CARNE SOMETIDAS A DIFERENTES PROTOCOLOS DE  
SINCRONIZACIÓN DE LA OVULACIÓN**

AUTOR: M.V. Francisco Tomás Trucco

DIRECTOR: Dr. Pablo Uriel Díaz

CODIRECTOR: Dr. Hugo Héctor Ortega

Miembros del tribunal evaluador:

Dr. Pablo Roberto Marini

M.Sc. Martin Guillermo Maciel

M.Sc. Gustavo Natalio Rosatti

## DEDICATORIA

A mi querido papá. Gracias por recibirme siempre con una sonrisa, inocente, integra y pura.

Por los recuerdos de trabajo, dedicación y ejemplo que me acompañaron, acompañan y acompañaran en cada nuevo camino.

A Francisca que me enseña y me sorprende en cada paso. Por su amor inconmensurable, sincero y sentido.

*Que diferente sería el mundo si el hombre cumpliera lo que prometió de niño.*

*(Ernesto Sábato)*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar esta oportunidad para expresarle al Dr. Hugo Ortega mi sentido agradecimiento por haberme dado la posibilidad de realizar esta tesis en el distinguido Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), de la Universidad Nacional del Litoral y el CONICET. Su guía y apoyo han sido fundamentales en todo este proceso.

Un especial agradecimiento a la empresa La Nueva Trinidad SA de la familia Nazar Anchorena por haber permitido la realización de los ensayos de campo en su establecimiento de Gdor. Mansilla, Entre Ríos. La colaboración y la disponibilidad que mostraron durante todo el proceso de investigación fueron fundamentales para la obtención de resultados confiables y precisos. Además, me gustaría destacar la calidad humana y el trato amable que recibimos de todos los miembros de la empresa, quienes siempre estuvieron dispuestos a brindar su apoyo y colaboración en todo momento, especial mención para personal de campo: Mario Milesi, Darío Leiva y Maxi Berón, que sin su ayuda hubiera sido imposible llevar a cabo los ensayos a campo entre vientos y tormentas.

A los integrantes del laboratorio Dra. Natalia Salvetti, Dr. Matías Belotti, Med. Vet. Cristian Leiva, Dr. Ulises Notaro y Dr. Emmanuel Angeli por su colaboración y asistencia en diferentes y vitales etapas de mi trabajo de investigación.

A todos los compañeros con quienes compartimos la cursada de la Maestría en Ciencias Veterinarias por las charlas, mates y momentos compartidos; en especial al colega Héctor Schreyer.

A mi querida Facultad de Ciencias Veterinarias, por brindarme el marco académico para el desarrollo de la presente tesis.

A mi grandes amigos y colegas que siempre me alentaron a continuar por la huella. Martin Ahibe que se subió al camino cuando literalmente nos tapaba el agua y a caballo llego hasta el campo a colaborar con las evaluaciones reproductivas por ecografía. A Javier Nasimbera con quien trabajamos y me permitió el tiempo necesario para culminar mis trabajos de investigación en el laboratorio. En ellos resumo la importancia de la amistad, legado fundamental de nuestro entrañable paso por la querida FAVE.

Por último, pero no menor, a mi director de tesis Dr. Pablo Diaz mi más profundo agradecimiento por todo el apoyo y compromiso que me ha brindado a lo largo de mi proceso de investigación y redacción de mi tesis. Su dedicación y empeño en la educación pública son verdaderamente encomiables y me siento honrado de haber tenido la oportunidad de trabajar bajo su guía. Quiero destacar su cariño y pasión por la investigación, lo cual se hace palpable en cada una de sus acciones y contagia a quienes lo rodean. Su ejemplo de trabajo constante y responsable es realmente admirable y me ha inspirado a ser más disciplinado en mi trabajo académico. Además, su compromiso con el prójimo y el bien común de todos es un verdadero modelo a seguir y refleja su gran calidad humana. Gracias a su ayuda y orientación, he podido alcanzar un nivel de excelencia en mi tesis que no habría sido posible sin su colaboración

*Ningún viento es favorable para quien no sabe hacia  
dónde va.*

**Séneca**

## ABREVIATURAS

<b>CC</b>	Condición corporal
<b>CEEP</b>	Células endometriales epiteliales
<b>CEES</b>	Células endometriales estromales
<b>CL</b>	Cuerpo lúteo
<b>CPE</b>	Cipionato de estradiol
<b>DIV</b>	Dispositivo intravaginal
<b>DFM</b>	Diámetro folicular máximo
<b>ER</b>	Eficiencia reproductiva
<b>ESR1</b>	Receptor de estrógenos alfa
<b>ESR2</b>	Receptor de estrógenos beta
<b>E<sub>2</sub></b>	Estradiol
<b>FSH</b>	Hormona folículoestimulante
<b>GH</b>	Hormona de crecimiento
<b>GnRH</b>	Hormona liberadora de gonadotrofinas
<b>IA</b>	Inseminación artificial
<b>IATF</b>	Inseminación artificial a tiempo fijo
<b>IFN-t</b>	Interferón tau
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>MS</b>	Materia seca
<b>P<sub>4</sub></b>	Progesterona
<b>PGF-2<math>\alpha</math></b>	Prostaglandina – F2 $\alpha$
<b>RE</b>	Receptor de estrógenos
<b>RO</b>	Receptor de oxitocina
<b>RP</b>	Receptor de progesterona

## ÍNDICE GENERAL

<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>III</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABREVIATURAS UTILIZADAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>INDICE GENERAL</b> .....	<b>VIII</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>X</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	<b>XII</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>XIII</b>
<b>I. INTRODUCCION</b> .....	<b>1</b>
1.1. Reseña del problema .....	2
1.2. Hipótesis.....	3
1.3. Objetivos establecidos.....	4
1.3.1. General .....	4
1.3.2. Específicos .....	4
<b>II. REVISION BIBLIOGRAFICA</b> .....	<b>5</b>
2.1. Ciclos reproductivos.....	6
2.1.1. Proestro.....	11
2.2. Histofisiología uterina .....	12
2.2.1. Útero.....	11
2.2.2. Endometrio.....	11
2.2.3. Glándulas endometriales .....	12
2.3. Establecimiento y mantención de la preñez. ....	13
2.3.1. Reconocimiento de la gestación en bovinos.....	13
2.3.2. Interferón tau.....	15
2.3.3. Implantación y pérdidas embrionarias tempranas .....	15
2.4. Hormonas ováricas esteroides y su relación con el ambiente uterino .....	18
2.4.1. Estrógeno.....	19
2.4.2. Progesterona.....	20
2.5. Receptores endometriales.....	24
2.5.1. Receptores de estrógenos .....	30
2.5.2. Receptor de progesterona.....	27
2.6. Protocolos de sincronización de la ovulación.....	32
<b>III. MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>29</b>
3.1. Lugar de realización y animales empleados en los estudios.....	30
3.2. Tratamientos hormonales de sincronización de la ovulación .....	31

3.2.1. Grupo I: Proestro prolongado (72 horas). Cosynch de 5 días.....	31
3.2.2. Grupo II: Proestro corto (48 horas). Ovsynch de 7 días.....	32
3.2.3. Grupo III: Proestro corto (48 horas). Protocolo comercial con cipionato.....	32
3.3. Ultrasonografía ovárica.....	33
3.4. Toma y procesamiento de las muestras.....	35
3.4.1 Biopsias uterinas.....	35
3.4.2 Obtención de muestras de sangre.....	35
3.4.2 Obtención de muestras de sangre.....	35
3.5. Técnica de Inmunohistoquímica (IHQ).....	38
3.5.1. Procesamiento de las muestras para técnicas histológicas.....	38
3.5.2. Detección y expresión de receptores de hormonas esteroideas endometriales.....	39
3.5.3. Análisis digital y cuantificación de los receptores endometriales.....	41
3.6. Cuantificación de hormonas esteroideas.....	42
3.7. Análisis estadístico.....	42
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
4.1. Evaluación ultrasonográfica del diámetro del folículo preovulatorio y del cuerpo lúteo.....	45
4.1.1. Dinámica folicular.....	45
4.1.2. Dinámica lútea.....	46
4.2. Cuantificación sanguínea de hormonas esteroideas.....	47
4.2.1. Estrógenos.....	47
4.2.2. Progesterona.....	48
4.3. Análisis de la expresión proteica de receptores endometriales de hormonas esteroideas mediante inmunohistoquímica.....	49
4.3.1. Inmunomarcación de receptores estrógenos alfa.....	50
4.3.2. Inmunomarcación de receptores estrógenos beta.....	52
4.3.4. Inmunomarcación de receptores de progesterona.....	55
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>59</b>
5.1. Efecto del tiempo de proestro sobre la dinámica y comportamiento endocrino del ovario.....	60
5.2. Efecto del tiempo de proestro sobre el ambiente endometrial.....	66
<b>VI. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>67</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>67</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Corte histológico útero bovino. Tinción hematoxilina eosina.....	12
<b>Figura 2.</b> Eventos de desarrollo embrionarios .....	14
<b>Figura 3.</b> Placenta cotiledonaria en bovinos .....	16
<b>Figura 4.</b> Rodeo de vacas que ingresaron al ensayo .....	31
<b>Figura 5.</b> Tratamientos hormonales de sincronización de la ovulación.....	31
<b>Figura 6.</b> Obtencion y acondicionamiento de las biopsias de útero.....	37
<b>Figura 7.</b> Momentos de muestreos .....	38
<b>Figura 8.</b> Diámetro del folículo preovulatorio durante el proestro .....	44
<b>Figura 9.</b> Seguimiento ecográfico del diámetro del cuerpo lúteo.....	46
<b>Figura 10.</b> Concentración sérica de estradiol determinados durante la fase folicular y lúteal del ciclo reproductivo.....	48
<b>Figura 11.</b> Concentración de sérica de progesterona determinados durante la fase folicular y lúteal del ciclo reproductivo .....	49
<b>Figura 12.</b> Porcentaje de área inmunomarcada para ESR1 en el epitelio endometrial.	50
<b>Figura 13.</b> Porcentaje de área inmunomarcada para ESR en las células luminales de las glándulas del estroma uterino superficial.....	51
<b>Figura 14.</b> Porcentaje de área inmunomarcada para ESR1 en las células luminales de las glándulas del estroma uterino profundo. ....	51
<b>Figura 15.</b> Porcentaje de área inmunomarcada para ESR2 en las células epiteliales del endometrio uterino .....	52
<b>Figura 16.</b> Porcentaje de área inmunomarcada para ESR2 en las células luminales de las glándulas del estroma uterino superficial. ....	53

<b>Figura 17.</b> Porcentaje de área inmunomarcada para ESR2 en las células luminales de las glándulas del estroma uterino profundo. ....	53
<b>Figura 18.</b> Porcentaje de inmunomarcación de las diferentes isoformas del RE ( $\alpha$ y $\beta$ ) en células del epitelio endometrial, glándulas superficiales y profundas para todos los grupos en estudio.. ....	54
<b>Figura 19.</b> Imágenes histológicas endometriales inmunomarcadas para los ESR1, ESR2 y RP en el día 15 posovulació.....	56
<b>Figura 20.</b> Imágenes histológicas representativas del epitelio endometrial inmunomarcadas para los ESR1 y ESR2 en los tres grupos en estudio.....	57
<b>Figura 21.</b> Imágenes histológicas representativas de las glándulas superficiales del estroma endometrial inmunomarcadas para los ESR1 y ESR2 en los tres grupos en estudio.....	57
<b>Figura 22.</b> Imágenes histológicas representativas de las glándulas profundas del estroma endometrial inmunomarcadas para los ESR1 y ESR2 en los tres grupos en estudio.....	58

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Detalle de los anticuerpos primarios utilizados y las condiciones de uso en la técnica de inmunohistoquímica.....	39
---	----

## RESUMEN

La coordinación del ciclo reproductivo, incluyendo la adecuada duración del proestro es un proceso decisivo en la fertilidad, sin embargo, su extensión es reducida en la mayoría de los protocolos de IATF. El objetivo del presente trabajo fue comparar el efecto de tres protocolos de sincronización de la ovulación, dos con proestro corto y uno con proestro extendido, sobre el diámetro máximo del folículo dominante (DFM), el diámetro del cuerpo lúteo, las concentraciones séricas de hormonas esteroideas ( $E_2$  y  $P_4$ ) y la expresión proteica de diferentes receptores de hormonas esteroideas (ESR1, ESR2 y RP) determinada por inmunohistoquímica indirecta a nivel endometrial. Los protocolos hormonales se llevaron a cabo en 30 vacas Aberdeen Angus sin cría al pie, con un postparto mayor a 90 días y una condición corporal promedio  $\geq 3.5$  (escala de 1 a 5) que fueron asignadas en forma aleatoria a cada uno de los protocolos de IATF en estudio. Se obtuvieron muestras de sangre al inicio y final del proestro y durante la fase lútea. Se determinó la concentración sérica de estrógenos y progesterona. Se detectaron diferencias significativas en la concentración de  $P_4$  durante el diestro entre los grupos estudiados, siendo mayores las concentraciones halladas en el grupo I ( $4,44 \pm 0,79$  ng/ml) de proestro extendido en relación a los grupos II ( $1,59 \pm 0,79$  ng/ml) y grupo III ( $3,25 \pm 1,10$  ng/ml) con tiempos de proestro corto ( $p < 0.05$ ). No se encontraron diferencias ( $p < 0.05$ ) en las concentraciones de  $E_2$  durante la fase folicular en los grupos I de proestro extendido ( $13,46 \pm 3,57$  pg/ml), II de proestro corto ( $8,99 \pm 1,54$  pg/ml) y en el grupo III que recibió cipionato de estradiol ( $14,08 \pm 2,18$  pg/ml).

Por otra parte, tampoco se observaron diferencias entre los grupos en estudio con respecto al diámetro del CL ( $p > 0.05$ ). En la detección inmunohistoquímica de receptores

de hormonas esteroides (ESR1, ESR2 y RP) no hubo diferencias estadísticas en la inmunomarcación entre los 3 protocolos analizados.

Nuestro trabajo permitió evaluar el efecto de diferentes programas de IATF sobre parámetros de importancia para la biología reproductiva de los bovinos, como son el estatus endocrino, las características ecográficas del ovario en la fase folicular y lútea, y la expresión de los receptores endometriales de las hormonas esteroides sexuales.

En base a los resultados obtenidos se podría inferir que el uso de protocolos que prolongan el tiempo de proestro podrían estar asociado a mayores concentraciones séricas de P<sub>4</sub>, sin embargo, no se encontraron diferencias en el ambiente endometrial en relación a la expresión proteica de los receptores de hormonas esteroides en el período preimplantacional.

**Palabras Claves:** IATF, endometrio, proestro, folículo

## SUMMMARY

The coordination of the reproductive cycle, including an adequate duration of proestrus, is a decisive process in fertility; however, its extent is reduced in most FTAI protocols. The objective of the present work was to compare the effect of three ovulation synchronization protocols, two with short proestrus and one with extended proestrus, on the maximum diameter of the dominant follicle (DFM), the diameter of the corpus luteum, the serum concentrations of hormones steroid hormones ( $E_2$  and  $P_4$ ) and the protein expression of different steroid hormone receptors (ESR1, ESR2 and RP) determined by indirect immunohistochemistry in the endometrium. The hormonal protocols were carried out in non-suckling Angus cows 30 Aberdeen Angus cows, with a postpartum period greater than 90 days and an average body condition  $\geq 3.5$  (scale of 1 to 5) that were randomly assigned to each of the protocols of FTAI under study. Samples were obtained at the beginning and the end of the proestrus and every 72 hours during the luteal phase. The serum concentration of estrogens and progesterone were determined. Significant differences were detected in the concentration of  $P_4$  during diestrus between the groups studied, with the highest concentrations were found in group I ( $4.44 \pm 0.79$  ng/ml) of extended proestrus in relation to groups II ( $1.59 \pm 0.79$  ng/ml) and group III ( $3.25 \pm 1.10$  ng/ml) with short proestrus period ( $p < 0.05$ ). No differences ( $p > 0.05$ ) were found in  $E_2$  concentrations during the follicular phase in group I extended proestrus ( $13.46 \pm 3.57$  pg/ml), group II short proestrus ( $8.99 \pm 1.54$  pg/ml) and in group III that received estradiol cypionate ( $14.08 \pm 2.18$  pg./ml).

On the other hand, no differences were observed between the study groups with respect to CL diameter ( $p > 0.05$ ). In the immunohistochemical detection of steroid hormone

receptors (ESR1, ESR2 and PR) there were no statistical differences in immunostaining between the 3 protocols analyzed.

Our work allowed us to evaluate the effect of different FTAI programs on parameters of great importance for the reproductive biology of bovines, such as endocrine status, ultrasound characteristics of the ovary in the follicular and luteal phase, and the expression of endometrial receptors of sex steroid hormones.

Based on the results obtained, it could be inferred that the use of protocols that prolong the time of proestrus could be associated with higher serum concentrations of P4; however, no differences were found in the endometrial environment in relation to the protein expression of the steroid hormones receptors in the preimplantation period.

**Keywords:** FTAI, endometrium, proestrus, follicles

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Reseña del problema

En los últimos años, los avances en el área de la fisiología reproductiva bovina han jugado un papel fundamental en el mejoramiento de la producción pecuaria. Las biotecnologías reproductivas que permiten sincronizar el celo y la ovulación en el ganado han maximizado el empleo de la inseminación artificial (IA) en los bovinos y su incorporación produjo un avance genético y productivo en los sistemas ganaderos. La capacidad de sincronizar con éxito una onda folicular y la ovulación se ha hecho más eficiente, y en consecuencia, las tasas de preñez mediante inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) se aproximan a las tasa de IA después del estro espontáneo (Dickinson y col., 2016).

La duración del proestro es un proceso fisiológico reproductivo decisivo para la fertilidad, y en la vaca el tiempo normal de duración es de 72 a 96 horas (Binelli, 2014). Sin embargo, su duración se reduce en la mayoría de los protocolos de IATF debido a la administración de un agente inductor de la ovulación al momento o después del retiro del dispositivo intravaginal de progesterona (DIV). Por lo tanto, muchos protocolos de IATF disponen de un intervalo de proestro reducido que podría disminuir la fertilidad (Dadarwal y col., 2013).

Trabajos previos (Bo y col., 2018; Bridge y col., 2012; Whittier y col., 2013) han demostrado que la prolongación del tiempo de proestro incrementa la proporción de hembras preñadas a la IATF y reduce la mortalidad embrionaria temprana. Estos efectos pueden ser debidos tanto a los efectos preovulatorios de los estrógenos como postovulatorios de la progesterona ( $P_4$ ) (Binelli y col., 2014).

Las concentraciones séricas de estradiol ( $E_2$ ) durante el proestro y de  $P_4$  durante el diestro siguiente no sólo regulan, sino que también afectan la receptividad y la fertilidad del endometrio (Pugliesi y col., 2014). En la actualidad el ambiente uterino ha sido definido como fundamental para asegurar una adecuada interacción cito-molecular hasta el periodo preimplantacional

proporcionando así un correcto reconocimiento y mantenimiento de la gestación (Mesquita y col., 2014).

Los mecanismos fisiológicos que intervienen en la disminución de la fertilidad están condicionados por el efecto del ambiente hormonal del folículo dominante en el proestro anterior de la IATF, el cual ejerce su influencia tanto sobre la competencia de los ovocitos, como así también a nivel del entorno uterino materno (Bridges y col., 2021).

En consecuencia, la modificación del tiempo de proestro puede influenciar la fertilidad a través de numerosos mecanismos bioquímicos (Binelli y col., 2014), resaltando la importancia del entorno endocrino durante el crecimiento y la maduración del folículo ovulatorio (Dadarwal y col., 2013). Los ovocitos deben tener la oportunidad de completar su maduración celular durante las etapas finales del desarrollo que ocurren dentro del folículo preovulatorio (Dickinson y col., 2016). Sumado a esto, después de la ovulación, la formación y establecimiento de un cuerpo lúteo (CL) funcional con capacidad de sintetizar cantidades adecuadas de  $P_4$  es esencial para el establecimiento de la futura preñez (Dickinson y col., 2016). Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares a través de los cuales la fertilidad es afectada en respuesta a la manipulación de la duración del tiempo de proestro aún no están entendidos en su totalidad (Binelli y col., 2014).

Por esta razón el estado fisiológico del folículo preovulatorio, antes de la IATF, afecta en gran medida los conceptos enumerados anteriormente y tiene un impacto importante en el establecimiento y el mantenimiento de la preñez en los bovinos (Dickinson y col., 2016).

## **1.2. Hipótesis**

Como hipótesis proponemos que la prolongación del período de proestro influye de manera positiva sobre el ambiente endometrial generando un medio uterino más propicio para la supervivencia del embrión a través de una correcta nutrición histotrófica, la expresión de proteínas

y receptores que facilitan una adecuada comunicación celular entre el entorno embrión-endometrio y que esto se traduce en mejoras sustanciales en las tasas de fertilidad obtenida a través de la implementación de protocolos hormonales de sincronización de la ovulación.

A partir de los hallazgos obtenidos, determinaremos de qué manera los distintos programas de IATF comerciales evaluados podrían contribuir a la obtención de una mayor tasa de preñez por favorecer un entorno endocrino más propicio para la sobrevivencia del concepto bovino.

### **1.3. Objetivos establecidos**

#### **1.3.1. General:**

Estudiar el efecto de la duración temporal del proestro, tamaño folicular y concentraciones de hormonas esteroideas sobre la expresión de receptores de progesterona (RP) y estrógeno (RE) a nivel endometrial en el periodo preimplantacional (día 15 posovulación) en vacas para carne incluidas en tres programas comerciales de IATF.

#### **1.3.2. Específicos:**

- a.** Evaluar la dinámica ovárica por ultrasonografía trans-rectal durante el periodo de proestro, estrus y fase lútea en respuesta a tres programas de IATF.
- b.** Analizar las concentraciones séricas de hormonas esteroideas durante el proestro y luego de la ovulación en diferentes protocolos de inseminación artificial.
- c.** Investigar la influencia de las concentraciones séricas de las hormonas ováricas sobre la expresión endometrial de ESR1, ESR2 y RP en vacas para carnes.
- d.** Determinar las correlaciones posibles entre los niveles hormonales de E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub>, diámetro folicular, diámetro del CL y la expresión de los ESR1, ESR2 y RP evaluados a nivel endometrial.

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## 2.1. Ciclos reproductivos

En el ciclo reproductivo, las gónadas cumplen un doble papel, ya que sintetizan las hormonas esteroides sexuales y producen las gametas. Las hormonas esteroides sexuales cumplen un rol fundamental sobre las funciones de todo el organismo en general, y en particular en la regulación de la gametogénesis, en la función de los órganos reproductores y en la expresión de los caracteres sexuales secundarios. Su regulación endocrina depende de las gonadotropinas hipofisarias (García Sacristán, 2018). Los bovinos presentan un ciclo estral con una duración media de 21 días, que es dirigido por los estrógenos foliculares y la P<sub>4</sub> sintetizada por las células del CL. Los cambios en los perfiles hormonales durante el ciclo estral permiten el desarrollo folicular y la ovulación, la receptividad de la hembra para el apareamiento (estro) y la preparación del útero para la gestación. En el útero, la comunicación intercelular requiere de la integración de señales hormonales de los ovarios y del embrión, que a su vez depende de la expresión específica de los receptores de esteroides en las células y tejidos (Kimmins y Maclaren, 2001).

La dinámica folicular durante el ciclo estral acontece en ondas de crecimiento folicular que se superponen entre ellas. En cada una de estas ondas se desarrolla un folículo dominante que limita el crecimiento de los demás folículos y que, según el perfil hormonal imperante y la cantidad días del ciclo estral, será el que alcance la ovulación (García Sacristán, 2018).

La onda folicular incluye tres procesos:

- a) Reclutamiento: de todos los folículos que se encuentran en el ovario, un grupo comienza a crecer bajo la acción de la FSH.
- b) Selección: de ese grupo de folículos que comenzó a crecer, sólo uno logra continuar su crecimiento adquiriendo receptores para LH.

c) Dominancia: el folículo seleccionado secreta estrógenos en mayor cantidad, originando el feedback positivo para la liberación del pico de LH; además, secreta inhibina, que por retroalimentación negativa sobre la hipófisis disminuye la liberación de FSH. De esta manera, el resto de los folículos que habían comenzado a crecer se atresian, como consecuencia de la falta de FSH (Adams y col, 2008)).

En cada ciclo estral, los bovinos tienen 2 o 3 ondas foliculares, que consisten en un grupo de folículos antrales en crecimiento  $\geq 4$  mm de diámetro de los cuales se selecciona un folículo dominante, mientras que los folículos restantes se vuelven subordinados y sufren atresia. En los ciclos estrales de 2 y 3 ondas, la aparición de la primera onda folicular ocurre el día de la ovulación, mientras que la segunda onda emerge el día 9 o 10 en los ciclos de 2 ondas, y el día 8 o 9 en ciclos de 3 ondas, con una tercera onda emergiendo el día 15 o 16. La duración del ciclo estral es de aproximadamente 20 días en ciclos de 2 ondas y 23 días en ciclos de 3 ondas (Colazo y col., 2014).

#### 2.1.1. Tiempo de Proestro

El proestro se define como el período del ciclo estral comprendido desde la luteólisis del ciclo anterior, hasta la aparición del estro y se caracteriza por una alta concentración sanguínea de  $E_2$ , mayor secreción pulsátil de LH, cambios anatomo-fisiológicos en el tracto reproductivo y crecimiento del folículo preovulatorio (Dickinson y col., 2016). Los niveles de  $E_2$  comienzan a disminuir antes del pico preovulatorio de LH. Luego de ocurrida la ovulación comienza el periodo de metaestro, durante el cual se desarrolla un nuevo CL funcional. Esta fase se caracteriza por presentar niveles circulantes bajos tanto de  $P_4$  como de  $E_2$  en sangre periférica y el edema de la mucosa y la contractilidad de la musculatura lisa uterina desaparece. Durante el diestro, hay altos niveles de  $P_4$  y niveles bajos de  $E_2$ , las células epiteliales endometriales son planas pero las

glándulas uterinas se encuentran altamente activas secretando leche uterina o histotrofo (Mitko y col., 2008).

Los estudios de Bridges y col. (2010) pusieron en evidencia un efecto importante del tiempo del proestro en la fisiología reproductiva de la vaca; explicaron la relación entre las concentraciones preovulatorias de  $E_2$  y la regresión prematura del CL. Describieron que un 80% de las vacas que tenían concentraciones preovulatorias de  $E_2$  menores de 10 pg/ml presentaron CL de vida media más corta y tuvieron pérdidas embrionarias tempranas. Además, este autor en un trabajo posterior (Bridge y col., 2012) estableció que las concentraciones preovulatorias reducidas de  $E_2$  en vacas con un proestro corto son la causa del aumento de la incidencia de fases lúteas cortas.

En otro estudio, Mann y Lamming (2000) demostraron en vacas para carne que los animales con concentraciones menores de  $E_2$  durante el proestro y al momento del estro son más propensos a experimentar una luteólisis prematura durante la fase lútea posterior. Por lo tanto, la falta de manifestación del estro, que se ha asociado con las concentraciones bajas de  $E_2$  durante el proestro, podría haber influido en la fertilidad de las vacas al alterar la motilidad de los espermatozoides o precipitado la aparición de luteólisis tempranas en el diestro subsiguiente.

Las vacas que se presentan en celo el día de la IATF generalmente tienen una mejor sincronización del tiempo de ovulación, lo que favorece la preñez. Filho y col. (2011) observaron que los animales que exhibieron celo al momento de la IA también tenían folículos más grandes, y que el efecto del celo sobre la tasa de preñez a la IA está relacionado con el aumento del diámetro del folículo dominante y la sincronización del momento de la ovulación. Es probable que mayores concentraciones de  $E_2$  endógeno en los animales que manifestaron celo, podrían haber influido en el ambiente uterino y en la fase lútea subsiguiente (Filho y col., 2011).

Los primeros reportes de protocolos hormonales con tiempo extendido de proestro fueron publicados por Bridge y col. (2008). Estos nuevos protocolos hormonales de IATF que incluyen una prolongación en el tiempo de duración del proestro afectan en forma positiva la fertilidad. Específicamente, actúan estimulando el crecimiento del folículo preovulatorio, extendiendo el tiempo de exposición de los ovarios y el útero a los E<sub>2</sub> después de la regresión de CL (Binelli y col., 2014).

Estos nuevos protocolos se caracterizan por un periodo de permanencia del DIV de P<sub>4</sub> más corto (5 días versus 7 días) y un proestro más largo (48 hs. versus 72 hs) los cuales estimulan el crecimiento y la función endocrina del folículo preovulatorio. Las consecuencias son periodos más largos en ausencia de P<sub>4</sub> lútea, periodos más largos en presencia de E<sub>2</sub> folicular, concentraciones de E<sub>2</sub> preovulatorias más altas y una mayor proporción de vacas que presentan celo al momento de la IA. Además, la ovulación de folículos más grandes conduce a la formación de CL más grandes y funcionales, capaces de producir mayores cantidades de P<sub>4</sub> durante el diestro (Forde y col., 2009). Los estrógenos coordinan una serie de procesos fisiológicos que son esenciales para el establecimiento de la gestación en el ganado (Jinks y col., 2013)

Perry y col. (2005) menciona que la manifestación del celo en la vaca puede servir como un biomarcador de concentraciones adecuadas de E<sub>2</sub> que se asocian a una mejor fertilidad. Por lo tanto, las vacas que manifiestan celo pueden haber alcanzado las concentraciones de E<sub>2</sub> necesarias para preparar adecuadamente las células foliculares para su proceso de luteinización independientemente del tamaño folicular, generando un ambiente uterino más propicio para la sobrevivencia del embrión en el periodo de nutrición histotrófica anterior a la implantación (Perry y col., 2005). El microambiente de un folículo preovulatorio es único en relación con otros folículos y una característica distintiva es la secreción alta de E<sub>2</sub> (Forde y col., 2009). Por otro lado, mayores

concentraciones plasmáticas de E<sub>2</sub> el día de la IA aumentan la probabilidad de preñez el día 29 tal como lo demuestra el trabajo de López y col. (2007).

La tasa de preñez en los bovinos para carne por IATF se asocia positivamente con la duración del proestro y el aumento de las concentraciones séricas de E<sub>2</sub> al momento de la IATF. Los protocolos de sincronización de la ovulación que aumentan la duración del proestro influyen en el ambiente folicular y uterino al aumentar las concentraciones séricas de E<sub>2</sub> en el estro y de P<sub>4</sub> durante la siguiente fase lútea (Dickinson y col., 2016).

La modificación del tiempo y concentración de esteroides ováricos durante el proestro y el diestro temprano pueden afectar el endometrio. Este tejido expresa receptores para E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>, y estas hormonas cambian la función endometrial al apoyar el crecimiento del concepto y el mantenimiento de la gestación. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares específicos a través de los cuales la fertilidad se ve afectada mediante manipulaciones del proestro no se conocen totalmente (Binelli y col., 2014). Davoodi (2016) investigó la asociación entre la expresión de celo en el momento de la IA con expresión de genes críticos en el endometrio durante el período de preimplantación. Las vacas que expresaron celo cerca de la IA tuvieron una mejora significativa en el perfil de expresión de genes relacionados con la supresión del sistema inmunológico materno local y la adhesión entre las células epiteliales endometriales y el embrión, además de inhibir parcialmente la maquinaria de ARNm para la síntesis de PGF<sub>2</sub>α.

El E<sub>2</sub> tiene además un papel directo en la regulación de la fisiología uterina. También se ha planteado la hipótesis de que el aumento del E<sub>2</sub> sérico mejora el éxito de la fertilización a través de un aumento en el transporte de gametas masculinas al sitio de fertilización y que mejora la regulación de los cambios en el pH uterino alrededor del inicio del estro (Larimore y col., 2015). Las altas concentraciones de E<sub>2</sub> y la exposición prolongada al E<sub>2</sub> durante el proestro y el estro dan como resultado la expresión de glicoproteínas dependientes de estrógenos del oviducto, que han

sido implicadas en cambios en el transporte de espermatozoides, el ambiente uterino y la fertilización de los ovocitos tal como los menciona Buhi (2002). Esta exposición previa a los E<sub>2</sub> pueden ser importante para inducir la expresión de los RP a nivel endometrial y reducir la síntesis de receptores de oxitocina (RO) para evitar luteólisis prematuras que generan ciclos sexuales más cortos (Mann y Lamming, 2000)

## **2.2. Histofisiología uterina**

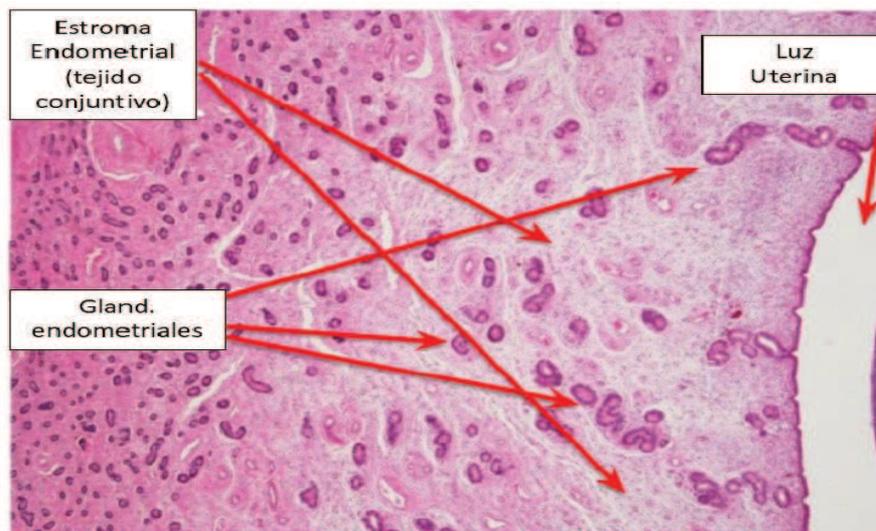
### **2.2.1. Útero**

El útero es un órgano muscular hueco constituido por tres partes: los cuernos uterinos, el cuerpo y el cérvix. Embriológicamente se desarrolla partir de los conductos de Müller y está constituido por tres capas histológicas: (a) la mucosa-submucosa o endometrio, (b) la capa muscular o miometrio, y (c) la serosa o perimetrio (Dellman, 2006). El útero es la estructura dentro de la cual se implanta el embrión para desarrollarse durante la gestación (García Sacristán, 2018).

### **2.2.2. Endometrio**

El endometrio de los rumiantes tiene un recubrimiento celular de tipo columnar simple (figura 1). Presenta la particularidad de que sus capas mucosa y submucosa son continuas, sin un límite preciso entre ambas porque la lámina muscular (que separa estas túnicas en otros órganos tubulares) está ausente en este tejido (Dellman, 2006). El endometrio bovino es un tejido constituido por dos biotipos celulares, las células endometriales epiteliales y las células estromales, que tienen características morfofisiológicas distintas (Lenis Sanín y col., 2010).

El endometrio bovino es un tejido endocrino complejo altamente especializado, donde las células endometriales epiteliales y estromales contribuyen a la regulación del ciclo estral bovino (Lenis Sanín y col., 2010). El epitelio endometrial consta tanto de células ciliadas como de células secretoras, las cuales producen el moco estral (Mítko y col., 2008).



**Figura 1.** Corte histológico de útero bovino. Tinción hematoxilina eosina.

Foto cedida por Dr. Matías Belotti, LBCMA, ICiVet-Litoral (UNL-CONICET)

### 2.2.3. Glándulas endometriales

Las glándulas endometriales son estructuras tubulares ramificadas, revestidas de un epitelio cilíndrico, que desembocan en la superficie del endometrio con excepción de las áreas carunculares (Hafez, 2002). Las glándulas del endometrio alcanzan su máximo desarrollo y actividad secretora durante la fase lútea bajo influencia de los altos niveles sistémicos de  $P_4$ , para luego sufrir regresión durante el periodo de dominancia folicular o proestro (Bacha y col., 2000). Durante las primeras dos semanas de gestación, el concepto depende exclusivamente del medio intrauterino creado por las secreciones endometriales y/o las moléculas transportadas hacia la luz uterina; ya que no tiene acceso al suministro de sangre materna (Spencer y col., 2008). Por lo tanto, su crecimiento depende de una composición óptima del líquido uterino provistas por las secreciones de las glándulas uterinas (Bridges y col., 2013).

El líquido uterino o histotrofo está constituido principalmente por proteínas séricas y pequeñas cantidades de proteínas específicas del útero (Hafez y Hafez, 2002). Su volumen y composición bioquímica presentan variaciones que se ajustan al ciclo estral en especial durante la

fase lútea donde las glándulas se encuentran altamente activas secretando histotrofo (Mitko y col., 2008). Por lo tanto, el endometrio uterino juega un papel central en el contexto de la comunicación materno-embriónica temprana necesarias para el correcto establecimiento de la preñez (Dorniak y col., 2013).

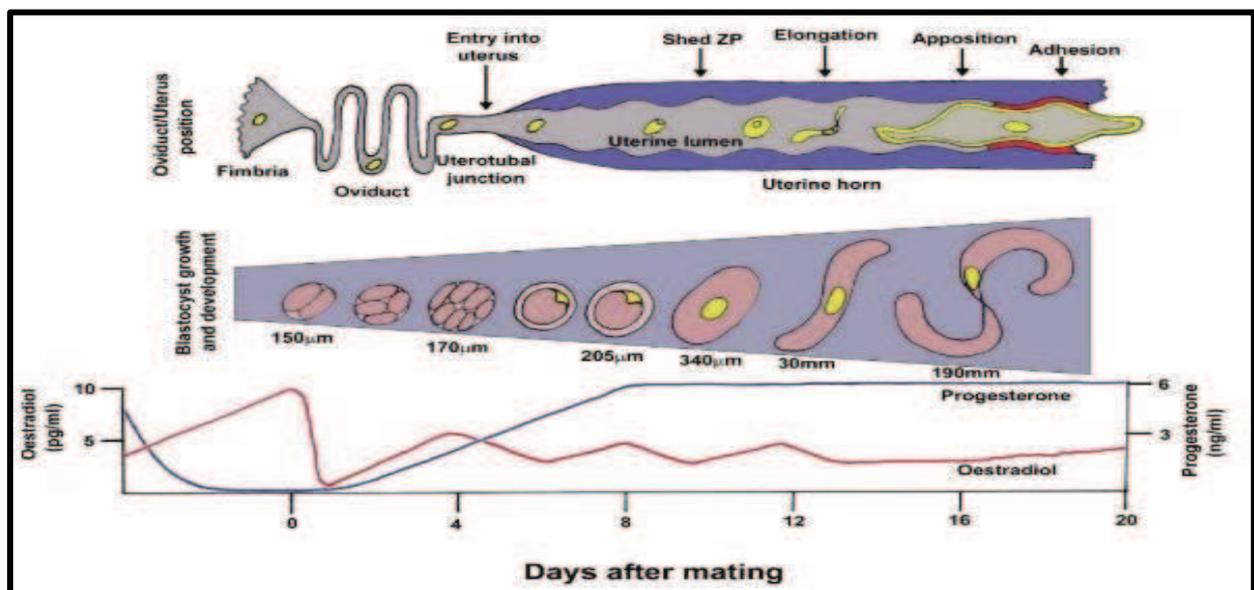
### **2.3. Establecimiento y mantención de la preñez.**

La supervivencia embrionaria es un factor importante que afecta la producción y la eficiencia económica en los sistemas de producción de leche y de carne. En vaquillonas, vacas para carne y vacas de leche de baja a media producción, la tasa de fertilización es alta, y la media se encuentra entre el 90% y el 100% (Diskin y col., 2008). Las interacciones entre el concepto y el útero en los rumiantes son complejas e involucran una serie delicada de cambios moleculares que deben ser orquestados en forma espacial y temporal (Dorniak y col., 2013). Pequeñas modificaciones de este delicado balance pueden conducir a pérdidas embrionarias, la gran mayoría de las mismas ocurren durante las primeras 3 semanas postconcepción, particularmente durante el período preimplantacional (Dickinson y col., 2016).

#### **2.3.1. Reconocimiento de la gestación en bovinos**

El establecimiento de la gestación en los rumiantes domésticos (ovejas, vacas, cabras) comienza en la etapa de concepción e incluye el reconocimiento materno de la gestación, la implantación y la placentación (figura 2). En las hembras bovinas, el cigoto alcanza el útero a los 3-5 días, en el estadio de mórula (16 células). Es muy importante para la supervivencia del cigoto que este periodo no varíe, ya que el útero tiene que estar bajo la influencia de la P<sub>4</sub> producida por el CL, para acondicionar y preparar la llegada del cigoto (Dorniak y col., 2013). La mórula ingresa al útero y forma un blastocito que contiene una masa celular interna y un blastocele o cavidad

central rodeada por una monocapa de trofoectodermo. Después de la eclosión de la zona pelúcida (días 8 a 10), el blastocito crece lentamente en forma tubular u ovoide y pasa a denominarse concepto (embrión/feto y membranas extraembrionarias asociadas) (Dellman, 2006). En los bovinos la implantación del embrión comienza a producirse alrededor de la tercera semana de gestación. Y a diferencia de los primates y roedores, la implantación en esta especie es tardía y es necesaria que la elongación de las capas trofoblásticas del concepto ocupen todo el cuerno gestante (Bauersachs y col., 2006). El proceso de elongación es vital en el desarrollo embrionario para expandir la superficie de contacto del concepto con los tejidos maternos y así asegurar un intercambio vascular correcto después de la implantación (Forde y col., 2011). La incapacidad del embrión para alargarse de manera óptima indudablemente da como resultado la pérdida embrionaria y se cree que contribuye significativamente a la falla reproductiva en el ganado (Sánchez y Lonergan, 2019) (figura 2).



**Figura 2.** Eventos del desarrollo embrionarios en la oveja. Este esquema resume los cambios relativos en el desarrollo del embrión / blastocito después de la fertilización en relación con la ubicación en el tracto reproductivo y los niveles circulantes de hormonas esteroides ováricas. *Tomado de Spencer, 2004.*

### 2.3.2. Interferón tau

El reconocimiento materno de la gestación es el proceso fisiológico en el cual el embrión, mediante señales moleculares como la secreción de interferón tau (IFN-t), anuncia su presencia en el tracto reproductivo materno, con el fin de evitar que se desencadene el mecanismo luteolítico ejercido por la prostaglandina- $F2\alpha$  ( $PGF-2\alpha$ ) sobre el CL, prolongando la vida de éste y garantizando la producción de  $P_4$  necesaria para el correcto mantenimiento de la preñez (López y col., 2008).

El IFN-t ha sido identificado como la mayor señal proteica de origen embrionario de reconocimiento de la gestación que previene la iniciación de la luteólisis (Hafez, 2000). La máxima producción de IFN-t ocurre el día 17 y coincide con el reconocimiento materno de la gestación (Bauersachs y col., 2006). El IFN-t actúa como una citoquina paracrina en el endometrio luminal y en el endometrio glandular para suprimir la transcripción de los genes del receptor de estrógenos alfa (ESR1) y del receptor de oxitocina (RO), anulando así el desarrollo del mecanismo luteolítico endometrial (Spencer y col., 2004).

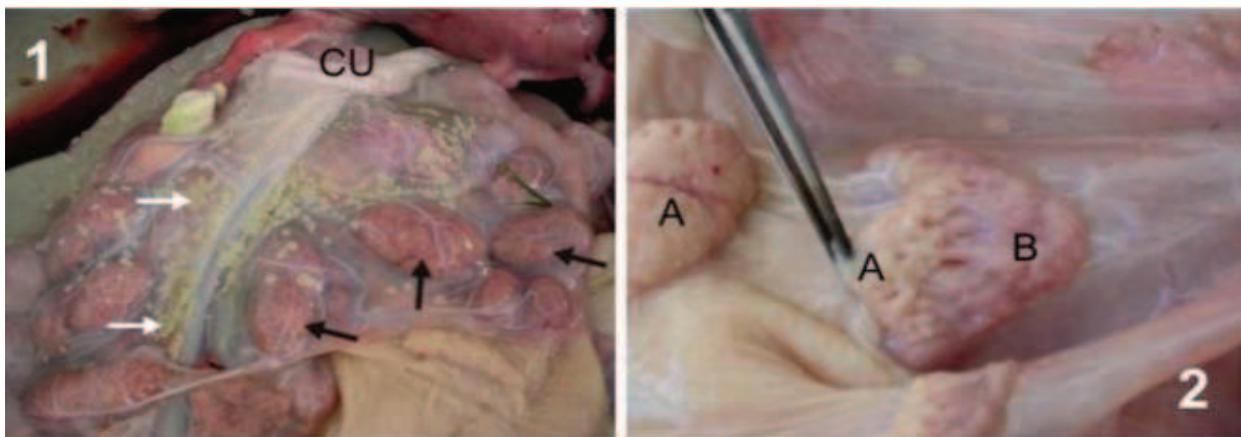
### 2.3.3. Implantación y pérdidas embrionarias tempranas

La implantación del embrión tiene lugar después de la segunda semana de gestación a través de la formación de una placenta sinepiteliocorial mediante un proceso de placentación relativamente no invasivo que ocurre una vez que el embrión ha sufrido el proceso de elongación y llena todo el cuerno uterino grávido (Bauersachs y col., 2006).

En los mamíferos el crecimiento y la supervivencia del feto depende exclusivamente de la placenta, conformada por tejidos maternos y fetales. (Roa y col., 2012). La placenta es un órgano transitorio que permite intercambios fisiológicos y minimiza las posibilidades de rechazo del

embrión por el sistema inmune materno, de esta manera permite alcanzar el adecuado desarrollo y crecimiento del embrión en las primeras etapas de su ontogenia (Galosi y Barbeito, 2010).

Los rumiantes poseen una placenta cotiledonaria (figura 3), en la cual las vellosidades coriónicas forman estructuras discretas denominadas cotiledones. El cotiledón es un conjunto de vellosidades con abundantes vasos sanguíneos y tejido conectivo que se unen a áreas avasculares del endometrio, denominadas carúnculas, y en conjunto forman los placentomas (Galosi y Barbeito, 2010).



**Figura 3.** Placenta cotiledonaria en bovinos. 1. Las flechas negras señalan placentomas. Las flechas blancas señalan placas amnióticas. CU: Cordón umbilical. 2. Placentomas de bovino. A: Carúncula, B: Cotiledón. Tomado de Galosi y Barbeito, 2010.

Las primeras semanas de gestación constituyen un periodo crítico, siendo este cuando se producen la mayoría de las pérdidas embrionarias (García Sacristán, 2018). Una vez realizada la implantación, se desarrolla plenamente la placenta sinepiteliocorial. Alrededor del día 21 los aportes nutritivos comienzan a realizarse por vía sanguínea, nutrición hemotrófica, reemplazando a la histotrófica inicial de las glándulas uterinas (García Sacristán, 2018).

La tasa de fertilización en bovinos para carne y leche es elevada cuando la inseminación ocurre en el momento apropiado en relación con la ovulación, por lo cual su fracaso parece

representar sólo una proporción menor de las pérdidas reproductivas (Bridges y col., 2013). Estas pueden deberse tanto a fallas en la correcta fecundación del ovocito como así también pérdidas embrionarias que ocurren durante la gestación. Las pérdidas embrionarias tempranas y tardías se producen durante las primeras semanas de gestación, principalmente entre los días 8 y 21 después de la fertilización (Bridges y col., 2012). La caracterización de los mecanismos moleculares de fijación e implantación del embrión bovino son muy importantes para la identificación de posibles causas de mortalidad embrionaria temprana durante el periodo de implantación (Bauersachs y col., 2006).

El establecimiento de la preñez en los bovinos depende de una correcta respuesta inmunitaria materna para permitir eliminar los agentes patógenos en caso de infección, y al mismo tiempo proporcionar un entorno adecuado para el desarrollo embrionario (Oliveira y col., 2013).

Las causas potenciales de estas pérdidas gestacionales están relacionadas con 3 sucesos biológicos propios de la fisiología reproductiva de los bovinos y que fueron descritos por Bridges y col. (2013). Este autor las clasifica en 3 causas básicas que a saber son:

- A. Función oviductal
- B. Maduración del ovocito
- C. Deficiencias uterinas. Dentro de este grupo se citan las siguientes
  - a) Falla de los esteroides ováricos para provocar la regulación secuencial adecuada de los procesos celulares en el endometrio uterino.
  - b) Alteraciones en las poblaciones de receptores de esteroides y la correcta regulación progresiva de los genes endometriales responsables de nutrir al embrión y preparar el endometrio para que sea receptivo.
  - c) La incapacidad del útero para responder a las señales embrionarias relacionadas con el reconocimiento materno de la gestación en el momento apropiado.

#### **2.4. Hormonas ováricas esteroideas y su relación con el ambiente uterino**

El ciclo sexual representa el patrón cíclico de actividad ovárica que facilita que las hembras pasen de un período de no receptividad a un periodo reproductivo activo que permita el apareamiento y el posterior establecimiento de la gestación (Forde y col., 2011).

Los bovinos son animales poliéstricos y presentan conducta de celo aproximadamente cada 21 días. El ciclo estral está regulado por las hormonas del hipotálamo (hormona liberadora de gonadotropinas; GnRH), la pituitaria anterior (hormona folículo estimulante; FSH y hormona luteinizante; LH), los ovarios ( $P_4$ , estrógenos e inhibina) y el útero ( $PGF2_\alpha$ ) (Forde y col., 2011). Además, las hormonas ováricas tienen una importante función en la regulación del metabolismo uterino. El endometrio tiene una intensa actividad bioquímica metabolizando carbohidratos, lípidos y proteínas para satisfacer los requerimientos de nutrición celular, proliferación endometrial y nutrición del embrión (Hafez, 2002).

Las características histológicas del endometrio varían en cada etapa del ciclo estral; estas variaciones dependen principalmente de los niveles circulante de  $E_2$  y  $P_4$ . Los estrógenos provocan la proliferación de la mucosa durante la fase folicular y la síntesis de receptores de  $P_4$ , de esta manera los estrógenos preparan el útero para la etapa secretora dominada por la  $P_4$  (Espejel y Medrano, 2017).

Para facilitar la progresión de los eventos necesarios para la correcta supervivencia y crecimiento del concepto, se requiere una estrecha coordinación y comunicación entre los esteroides ováricos,  $E_2$  y  $P_4$ , el endometrio y el embrión (Bridges y col., 2013). Los cambios en las concentraciones séricas de las hormonas esteroideas son crítico durante este periodo ya que afectan la capacidad del endometrio para recibir y mantener el concepto (Davoodi y col., 2016). Las modificaciones en la morfología celular del endometrio bovino ocurren durante el ciclo estral y al comienzo de la preñez (Wang y Mann, 2002). Estos cambios comprenden una fase proliferativa,

que acontece durante el proestro y estro, y una fase secretoria que coincide con el período de actividad lútea, metaestro y diestro, bajo influencia de la P<sub>4</sub> (Espejel y Medrano 2017).

La *fase proliferativa*, que acompaña el desarrollo de un folículo dominante, se caracteriza por un aumento progresivo del grosor del endometrio. Estos cambios son debidos a un aumento de la vascularización y a un notable incremento de la tasa de mitosis que sufren las células endometriales. A nivel luminal las células epiteliales se vuelven más ciliadas y en el estroma ocurre un aumento en la ramificación de las glándulas uterinas (Wang y Mann, 2007). Al final de esta etapa, el estroma se vuelve denso, las glándulas son más grandes, alargadas y presentan un trayecto sinuoso y el epitelio es de tipo pseudoestratificado (Espejel y Medrano 2017).

La *fase secretora* es el período en el que el CL es funcional y secreta P<sub>4</sub>; el endometrio alcanza su máximo espesor, los vasos sanguíneos se agrandan notablemente, y las glándulas adquieren capacidad secretora (Espejel y Medrano, 2017). Durante el inicio de la fase secretora, el citoplasma basal de las células que recubren el epitelio de las glándulas estromales se vacuolizan con la acumulación del material secretor. Posteriormente a medida que avanza la fase secretora, estas son excretadas y llenan el lumen de las glándulas del estroma (Wang y Mann, 2002).

#### 2.4.1. Estrógenos

El estro se define como el período en el que la hembra es sexualmente receptiva y se debe al aumento de las concentraciones circulantes de E<sub>2</sub> en un momento en que las concentraciones de P<sub>4</sub> son bajas. El comportamiento del estro está modulado por la acción directa de los estrógenos en el hipotálamo y la concentración de E<sub>2</sub> está directamente relacionada con el diámetro del folículo ovulatorio (Perry y col., 2007) Además, se ha sugerido que la progresión de los eventos requeridos para el crecimiento, la elongación, supervivencia y nidación del embrión están influenciados por la coordinación de los procesos endocrinos que conducen a una disminución en

las concentraciones de P<sub>4</sub> y un aumento en las concentraciones de E<sub>2</sub> antes del inicio del estro (Bó y Cedeño, 2018).

Las alteraciones del entorno molecular a nivel uterino en animales que presentan concentraciones séricas reducidas de E<sub>2</sub> antes de la ovulación pueden manifestarse en etapas posteriores, como durante las fases iniciales del reconocimiento materno de la gestación, afectando la capacidad para mantener la preñez. Estos cambios pueden indicar alteraciones en la función endometrial que serían responsables de las alta tasa de pérdidas embrionarias tempranas que han sido mencionadas previamente (Bridges y col., 2012).

Las posibles causas fisiológicas de la reducción de la fertilidad en los animales con menores concentraciones sanguíneas de esteroides podrían afectar la calidad de los ovocitos y/o un ambiente uterino que no reúna las características bioquímicas adecuadas que aseguren el correcto desarrollo embrionario (Bridges y col., 2012).

Las bajas concentraciones séricas preovulatorias de E<sub>2</sub> pueden afectar el establecimiento y el mantenimiento de la preñez de una manera que es independiente de la competencia del ovocito; y se relacionan con la receptividad uterina. Por ejemplo, una mayor secreción folicular de E<sub>2</sub> puede aumentar las tasas de preñez a través de la modulación del pH uterino, alterando el transporte y la longevidad del espermatozoide, induciendo secreciones oviductales, modulando la acción de la P<sub>4</sub> mediante la expresión del RP en el útero y/o aumentando la secreción de P<sub>4</sub> por el CL (Dickinson y col., 2016). Ferraz y col. (2017) encontraron en vacas para carne *Bos indicus* la asociación existente entre la intensidad de la expresión del estro al momento de la IA con la tasa de preñez lograda por IATF. Estos autores además encontraron que la intensidad en la expresión del celo se correlacionó con el tamaño del FD y las concentraciones séricas de E<sub>2</sub>, donde el grupo que presentó una alta intensidad en la expresión de estro tuvo un diámetro folicular mayor que el resto de los grupos.

Cooke y Cerri (2019) demostraron en un estudio reciente que la expresión de celo al momento de la IA en vacas incluidas en protocolos hormonales de sincronización de la ovulación aumenta la tasa de preñez al mejorar los eventos biológicos relacionados con el establecimiento de la preñez, favoreciendo el desarrollo del embrión y una mayor expresión génica relacionada con la síntesis de IFN-t en embriones de 15 días. Este dato es muy importante al indicar que la manifestación de celo no sólo condiciona una mayor respuesta esteroidogénica por parte de las células lúteales, sino que pone en manifiesto una mayor respuesta celular por parte del embrión al encontrarse en un ambiente propicio para su correcto desarrollo.

Binelli y col (2014), estudiaron los mecanismos que relacionan los perfiles endocrinos periovulatorios con la receptividad uterina medida en forma indirecta a través de modificaciones relacionadas con la correcta modulación de las vías de señalización celular en el endometrio y las características bioquímicas del histotrofo hasta el día 7 posovulación. França y Binelli (2015) investigaron la expresión endometrial de las proteínas transportadoras de glucosa y la concentración de glucosa a nivel del líquido uterino. Sus datos revelan que el tamaño del folículo preovulatorio y concentraciones posteriores de P<sub>4</sub>, no afectan las vías de transporte celular de la glucosa a nivel endometrial como así tampoco sus concentraciones en el líquido uterino durante el diestro temprano en vacas con alta concentración de E<sub>2</sub> en comparación con los de baja concentración de E<sub>2</sub> al momento de la IA.

Ramos y Binelli (2015) compararon la función del sistema redox a nivel de útero bovino en respuesta a dos concentraciones diferentes de E<sub>2</sub> (alta versus baja). En este trabajo cuantificaron a nivel endometrial enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), las cuales desempeñan funciones celulares importantes en el metabolismo oxidativo celular, y demostraron que el histotrofo tiene componentes reguladores del sistema redox que pueden ser críticos durante el desarrollo embrionario temprano. El ambiente

redox encontrado en el grupo con folículos ovulatorios más pequeños (bajo E<sub>2</sub>) podría ser una de las causas de reducción de la fertilidad debido a un entorno de mayor estrés oxidativo y menos propicio para el correcto desarrollo del embrión.

França y Binelli (2017) en un segundo ensayo cuantificaron la presencia de aminoácidos en la luz uterina en los días 4 y 7 posovulación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) no encontrando diferencias significativas en el perfil aminoacídico presente en la luz uterina en vacas con alta concentración de E<sub>2</sub> en comparación con los de baja concentración de E<sub>2</sub> al momento de la IA.

#### 2.4.2. Progesterona

Es una hormona esteroide que desempeña un papel clave en los eventos reproductivos asociados con el establecimiento y mantenimiento de la preñez. El crecimiento y desarrollo del embrión requieren la acción de la P<sub>4</sub> en el útero para regular la función endometrial, incluida la interacción feto-maternal, el reconocimiento de la gestación y la receptividad uterina a la implantación (Lonergan y col., 2013).

El CL es la principal fuente de P<sub>4</sub> y tanto su morfología como la concentración plasmática de P<sub>4</sub> son indicadores de su función endocrina. Durante los primeros 5-6 días después de la ovulación ocurre una intensa angiogénesis y proliferación de las células a nivel de la capa de la granulosa y teca de la pared del folículo que ovuló que conlleva a su luteinización, esto da lugar a un aumento progresivo de la concentración plasmática de P<sub>4</sub>, que pasa de niveles sub-lúteales (<1 ng/ml) antes de la ovulación a aproximadamente 3 ng/ml a los 6 días de ocurrida la misma (Adams y col., 2008). La concentración plasmática de P<sub>4</sub> alcanza su punto máximo entre los 10 y 14 días después de la ovulación (> 4 ng/ml), seguida de concentraciones decrecientes después del día 16

debido a la luteólisis inducida por PGF2 $\alpha$  del endometrio de la vaca no gestante (Adams y col., 2008).

Herzog y col. (2010) describen el comportamiento lúteo a través de la evaluación por ecografía Doppler y establecieron tres fases bien definidas que se correlacionan hormonal y ecográficamente. El autor las identifica como fases secuenciales de *crecimiento*, *estática* y *regresión*. Durante la *fase de crecimiento* el CL duplica su tamaño, y pasa de 2,1 cm<sup>2</sup> (día 4) a 4,5 cm<sup>2</sup> (día 7), luego en la *fase estática*, donde el tamaño del CL no se modifica significativamente, y finalmente disminuye progresivamente en la *fase de regresión* cuando sus valores son comparables con los del día de ovulación.

Después de la ovulación, la luteinización del folículo ovulatorio en un CL funcional es esencial para secretar cantidades adecuadas de P<sub>4</sub> que aseguren el correcto establecimiento de la preñez. En respuesta a las crecientes concentraciones de P<sub>4</sub> durante la fase posovulatoria del ciclo estral, se produce en el útero una profunda remodelación estructural y bioquímica para crear un entorno propicio para el crecimiento del embrión (Diskin y col., 2008).

Pequeños cambios en la concentración de P<sub>4</sub> sistémica durante la fase posovulatoria temprana son determinantes de la tasa de supervivencia embrionaria y es probable que la P<sub>4</sub> medie la supervivencia del embrión por mecanismos que incluyen la regulación de genes uterinos (McNeill y col., 2006). Por otra parte, las bajas concentraciones de P<sub>4</sub> en el ciclo anterior al estro tienen efectos sobre la tasa de supervivencia posterior del embrión, provocando una maduración precoz de los ovocitos, que compromete la capacidad normal del embrión para continuar su desarrollo (Diskin y Morris, 2008).

Como hemos mencionado, el establecimiento de la preñez en los bovinos implica una serie de interacciones altamente coordinadas entre el ovario, el endometrio y el embrión, siendo crítico el momento de estas interacciones (Robinson y col., 2008). En particular, el aumento posovulatorio

de P<sub>4</sub> determina el correcto transporte oviductal del embrión como la estimulación de las secreciones endometriales apropiadas necesarias para su rápido desarrollo. Cualquier insuficiencia posovulatoria de P<sub>4</sub> conduce a un retraso en el desarrollo del embrión y a la mortalidad del embrión (Stevenson y Lamb, 2016).

El mecanismo de acción mediante el cual la P<sub>4</sub> estimula el desarrollo del embrión no ha sido dilucidado en su totalidad, pero la evidencia disponible indica que los cambios inducidos por la P<sub>4</sub> en la expresión génica endometrial conducen a modificaciones en la composición bioquímica del histotrofo que se requieren para la supervivencia y crecimiento embrionario (Forde y col., 2009). La P<sub>4</sub> afecta también el desarrollo del embrión, al alterar la expresión de genes claves relacionados con la regulación de la cascada bioquímica que prepara el endometrio para la implantación (Spencer y col., 2004) y la regulación negativa del RP que permite la expresión de genes y la secreción de sus productos proteicos, así como el transporte activo de otras moléculas requeridas para el adecuado crecimiento del embrión (Okumu, y col., 2010). El resultado de los cambios inducidos por acción de la P<sub>4</sub> sobre el entorno uterino favorece al medio endometrial para el crecimiento del embrión a través de un aumento en la secreción de aminoácidos, glucosa, citoquinas y factores de crecimiento, que aseguran una correcta nutrición histotrófica durante las etapas iniciales de su desarrollo (Brooks y col., 2014).

## **2.5. Receptores endometriales**

El endometrio bovino es un tejido endocrino complejo altamente especializado, donde las células endometriales contribuyen a la regulación del ciclo estral bovino mediante diferentes mecanismos de señalización (Lenis Sanín y col., 2010). Las células del epitelio endometrial expresan receptores tanto para los estrógenos como para la P<sub>4</sub>, los cuales inducen cambios en la

función uterina que favorecen el crecimiento del concepto y el mantenimiento de la preñez (Binelli y col., 2014).

Los cambios cíclicos en el tracto genital femenino están regulados por hormonas esteroides ováricas y factores de crecimiento endógenos secretados por el endometrio y por el estroma uterino. Estos factores de crecimiento, se activan a través de sus receptores y desempeñan un papel importante en la fisiología del útero (Sağsöz y col., 2012). Durante el ciclo estral, el endometrio bovino exhibe una serie de cambios morfológicos y funcionales característicos, que son principalmente inducidos por la P<sub>4</sub>, los estrógenos y la oxitocina. Los dos biotipos celulares del endometrio, *las células endometriales epiteliales y estromales*, poseen características metabólicas particulares expresando diferentes cantidades y tipos de receptores en su membrana celular, citoplasma y núcleo, lo cual les confiere diferente capacidad y especificidad de respuesta dependiendo del tipo de ligando (Lenis Sanín y col., 2010).

La inducción de los genes que responden a las hormonas esteroides en el útero es regulada principalmente por la interacción de los E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> con sus respectivos receptores (McNeill y col., 2006). Estos cambios establecen un microambiente a nivel uterino y son esenciales para la maduración final de los gametos, la capacitación de los espermatozoides, el transporte de gametos y embriones, la fertilización y el desarrollo embrionario en la etapa de escisión temprana. (Buhi y col., 2002).

Forde y col. (2009) describen cambios temporales en el perfil transcripcional del endometrio bovino desde el día 5 hasta el día 16 de la gestación temprana y revelan como los genes endometriales están regulados por los niveles circulantes de P<sub>4</sub>. La suplementación con P<sub>4</sub> promueve la expresión de genes uterinos, en particular aquellos asociados con fuentes de energía (glucosa) o que están involucrados en la composición bioquímica del histotrofo y pueden contribuir al desarrollo del embrión.

En los mamíferos, los estrógenos influyen el crecimiento, diferenciación y funciones del aparato reproductor femenino, a través de sus receptores ESR1 y ESR2 (Schams y Berisha, 2002). La inducción de genes que responden a los esteroides en el útero es regulada principalmente por la interacción entre los E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> con sus respectivos receptores. Está ampliamente aceptado que los estrógenos estimulan la expresión de su propio receptor (RE) y el RP, mientras que la P<sub>4</sub> inhibe la expresión de los RE y en concentraciones elevadas regula negativamente su receptor (McNeill y col., 2006).

Los patrones de expresión del RO, ESR1 y del RP en el endometrio bovino mostraron que la localización de los tres receptores está influenciada tanto por las diferentes etapas del ciclo estral como así también por la preñez (Robinson y col., 2001).

### 2.5.1. Receptores de estrógenos

Los estrógenos se unen a receptores asociados con la membrana plasmática de las células pituitarias y uterinas para promover la transducción de señales moleculares y una respuesta celular rápida. La activación de estas vías bioquímicas por la acción no genómica de los estrógenos endógenos puede ser importante para mantener las funciones fisiológicas esenciales para la reproducción exitosa de los animales (Bishop y Stormshak, 2008).

Los receptores de estrógeno (RE) son proteínas a las que se unen los estrógenos y regulan la expresión génica en los tejidos diana. Los RE en mamíferos son expresados como dos subtipos estructuralmente relacionados. El receptor de estrógenos  $\alpha$  (ESR1) y el receptor de estrógenos  $\beta$  (ESR2), los cuales están codificados por dos genes distintos (Kuiper y col., 1996). Aunque el ESR2 comparte muchas características funcionales con el ESR1, los mecanismos moleculares que regulan su actividad transcripcional y su localización tisular son diferentes para cada subtipo (Kuiper y col., 1997).

El splicing alternativo es un proceso mediante el cual se generan diferentes variantes de ARNm a partir de un gen y puede dar lugar a la producción de isoformas de RE con funciones distintas. Según Martin y col. (2008) la importancia funcional de la presencia de estos dos subtipos en el órgano reproductor sigue sin estar claro. La existencia de dos subtipos podría parcialmente explicar la acción selectiva de los estrógenos en diferentes tejidos blanco y en el mismo tejido en estados fisiológicos distintos (Wang y col., 2000).

#### 2.5.2. Receptor de progesterona

El RP se expresa mediante isoformas distintas a partir de un solo gen, siendo las más importantes RP-A y RP-B (Bramley y col., 2003) La expresión de ambos isotipos es conservada en diferentes especies y la relación entre ambas en los distintos tejidos del aparato reproductor de la hembra varía como consecuencia del desarrollo y estado hormonal (Akison y Robker, 2012). El RP tiene al menos tres isoformas (RP-A, B y C), todas originadas a partir del mismo gen (Wei y col., 1990). Las diferencias en la actividad transcripcional y las interacciones entre RP-A y RP-B observadas *in vitro* predicen que estas proteínas pueden mediar respuestas fisiológicas diferentes en respuesta a P<sub>4</sub> (Conneely y col., 2002). Además, la capacidad selectiva de RP-A para inhibir la respuesta transcripcional inducida por RP-B y los RE sugiere que el RP-A tiene la capacidad de disminuir la respuesta a la P<sub>4</sub> en ciertos tejidos, así como contribuir a la actividad antiestrogénica de la P<sub>4</sub> (Akison y Robker, 2012).

La manipulación del tiempo de proestro y los consecuentes cambios producidos en las concentraciones séricas de las hormonas esteroides sexuales durante el mismo y en el diestro temprano, pueden ejercer su efecto a través de blancos específicos a nivel del tejido endometrial. En este sentido las hormonas esteroides, a través de sus receptores nucleares, regulan importantes eventos transcripcionales asociados a la reproducción (Beato y Klug, 2000).

## 2.6. Protocolos de sincronización de la ovulación

Para poder realizar la inseminación artificial de un grupo de animales en un tiempo determinado sin necesidad de detectar celo, es imprescindible sincronizar la función ovárica, es decir, el crecimiento de los folículos presentes en los ovarios, la regresión del CL y la ovulación. Los tratamientos que se utilizan comúnmente para sincronizar la función ovárica se basan en el uso de sales de  $E_2$  o de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), en ambos casos generalmente acompañado de un dispositivo intravaginal (DIV) de  $P_4$  (Sanz y col., 2019).

Los protocolos con sales (benzoato y/o cipionato) de  $E_2$  y  $P_4$  se han utilizado ampliamente durante los últimos años en los programas de sincronización de la ovulación en bovinos y son el tratamiento de elección para realizar programas reproductivos de IATF en ganado para carne en América del Sur (Bo y Baruselli, 2013). Los tratamientos consisten en la inserción de un DIV y la administración de benzoato de estradiol el día 0 para sincronizar la emergencia de la onda folicular, la aplicación de una dosis de  $PGF2_\alpha$  en el momento de la extracción del dispositivo los días 7, 8 o 9 para inducir la luteólisis y la aplicación de una dosis más baja de  $E_2$  24 h después o GnRH / LH 48 a 54 h después para sincronizar la ovulación (Martínez y col., 2002).

Los protocolos hormonales de IATF tienen como objetivo programar el desarrollo folicular para permitir la ovulación de un folículo portador de un ovocito sano en un momento determinado para que pueda ser fertilizado por un espermatozoide. La parte final de la mayoría de los protocolos intentan simular una fase similar al proestro, en la que se induce la disminución de las concentraciones de  $P_4$  para permitir el crecimiento final del folículo preovulatorio y la ovulación. Investigaciones recientes se han centrado en variables asociadas con el período de duración del proestro en estos protocolos anteriormente mencionados. Esto se debe a que modificaciones del tiempo de duración del proestro aumentan la fertilidad lograda mediante la aplicación de estos programas de IATF (Binelli y col., 2014).

## **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3.1. Lugar de realización y animales empleados en los estudios

Todos los procedimientos efectuados con animales fueron realizados de acuerdo a la normativa vigente: *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching* (2010) y fueron aprobados por el comité de Ética y Seguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral bajo el número de protocolo 447/18.

El estudio se desarrolló en el establecimiento La Nueva Trinidad SA (Latitud: 32°31'00.5"S, Longitud: 59°25'40.8"W) distrito Gobernador Mansilla en el departamento de Rosario del Tala, provincia de Entre Ríos.

Se utilizaron para el ensayo vacas de raza Aberdeen Angus (figura 4) de un rodeo comercial (n=30), multíparas (entre 2 a 4 partos), con un período mayor a 6 meses al último parto y sin cría al pie. Todos los animales al inicio de la aplicación del protocolo hormonal tenían una condición corporal media de 3,25, escala de 1 a 5 (Frasinelli, 2004), con una edad de 48 a 60 meses y un peso comprendido entre un rango de 420 y 445 kg. Los animales se encontraban al momento de la realización del estudio sobre una pastura consociada de base alfalfa y festuca con pastoreo rotativo directo, y recibían una suplementación de silaje de maíz de 2,5 kg de MS por animal/día. Al inicio del estudio se realizó una evaluación ginecológica para corroborar la normalidad del aparato reproductor y la etapa de su ciclo estral. Fueron seleccionados sólo aquellos animales que al inicio de la aplicación del protocolo hormonal se encontraban clínicamente sanos y que por ultrasonografía transrectal presentaron un CL con un diámetro  $\geq$  a 16 mm y a la palpación rectal tenían un tono uterino leve.



**Figura 4.** Rodeo de vacas que ingresaron al ensayo

### **3.2. Tratamientos hormonales de sincronización de la ovulación**

Se utilizaron tres grupos experimentales con diferentes tratamientos hormonales de sincronización de la ovulación y en cada uno se incluyeron 10 vacas distribuidas al azar. Cada grupo fue denominado utilizando números romanos (grupo I, II y III). Ningún animal recibió IA.

El protocolo de proestro extendido que corresponde con el grupo I se inició 24 horas después que los protocolos hormonales de los grupos II y III, de manera tal de hacer coincidir los momentos de muestreos con los tratamientos que fueron evaluados, ya que el mismo presentan un periodo de permanencia del DIV de 5 días en lugar de 7 día como en el resto de los dos grupos en estudio.

#### **3.2.1. Grupo I: Proestro prolongado Cosynch (72 horas).**

Este grupo recibió un protocolo Cosynch de 5 días descrito por Bridges y col (2008). Los animales recibieron el día 0 un dispositivo intravaginal de P<sub>4</sub> (Diprogest® 0,6 gr, Zoovet, Argentina) y 0,02 mg de acetato de buserelina (Buserelina®, Zoovet, Argentina) vía IM, el día 5 se retiró el DIV de P<sub>4</sub> y se administró 2 inyecciones vía IM de 150 µg de D-cloprostenol (Prostal®,

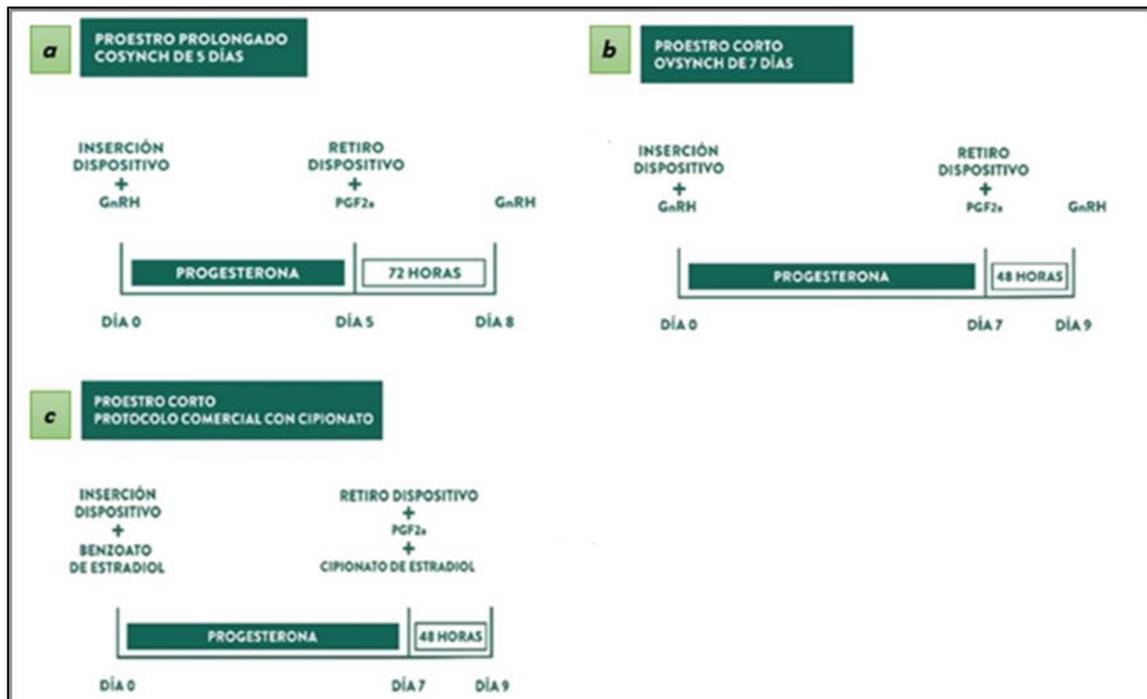
Over, Argentina) con un intervalo de 12 horas entre ambas. El día 9 se les administró 0,02 mg de acetato de buserelina (Buserelina®, Zoovet, Argentina) vía IM (figura 5 a).

### 3.2.2. Grupo II: Proestro corto Ovsynch (48 horas).

Este grupo recibió un tratamiento Ovsynch de 7 días (Martínez y col., 2002). Los animales recibieron el día 0 un DIV de P<sub>4</sub> (Diprogest® 0,6 gr, Zoovet, Argentina) y 0,02 mg de acetato de buserelina (Buserelina®, Zoovet, Argentina) vía IM, el día 7 se retiró el DIV de P<sub>4</sub> y se le administró una inyección de 150 µg de D-cloprostenol (Prostal®, Over, Argentina) vía IM y el día 9 se administró 0,02 mg de acetato de buserelina (Buserelina®, Zoovet, Argentina) (figura 5 b).

### 3.2.3. Grupo III: Proestro corto convencional (48 horas).

Las vacas de este grupo recibieron el día 0 0,2 mg de benzoato de estradiol (Estradiol®, Over, Argentina) vía IM y un DIV de P<sub>4</sub> (Diprogest® 0,6 gr, Zoovet, Argentina), en el día 7 se retiró el dispositivo y se administró 150 µg de D-cloprostenol (Prostal®, Over, Argentina) vía IM y 1 mg de cipionato de estradiol (Cipionato®, Zoovet, Argentina), (Colazo y col., 2003; Bo, y col., 2018) (figura 5 c).



**Figura 5.** Tratamientos hormonales de sincronización de la ovulación. a: proestro prolongado Cosynch. b: proestro corto Ovsynch. C: Proestro corto convencional con cipionato. GnRH: acetato de buserelina. PGF2α: D-cloprostenol. Dispositivo: dispositivo intravaginal de P<sub>4</sub>

### 3.3. Ultrasonografía ovárica

Se realizaron exámenes mediante tacto rectal y ecográfica reproductiva (Sirois y Fortune, 1988) en todos los grupos experimentales para seleccionar los animales a incluir en el protocolo, monitorear la eficacia de los tratamientos hormonales y tomar registros de los cambios morfo fisiológicos ocurridos a nivel ovárico durante los periodos de proestro, estro, metaestro y diestro. Para tal fin se empleó un equipo de ultrasonido Mindray DP10 (Mindray, China) equipado con una sonda lineal multifrecuencia de 5 a 7,5 MHz. (50L60EAV, Mindray).

La determinación del diámetro del folículo preovulatorio fue realizada mediante un estudio ecográfico efectuado cada 24 horas durante la fase folicular, con excepción del día 6 en grupo I de proestro prolongado. Se tomó como referencia el comienzo del proestro, en coincidencia con el momento del retiro de los DIV y la administración parenteral del agente luteolítico PGF2α (inicio

de la luteólisis) hasta el Día 0 del protocolo experimental. El día 0 es considerado el inicio del momento teórico de la IA en los protocolos comerciales de IATF.

Para evaluar el crecimiento del folículo preovulatorio se determinó el diámetro del mismo durante el periodo de proestro, para ello se utilizó la herramienta de medición del equipo de ultrasonido.

A partir del análisis de los datos recabados durante la etapa de dominancia folicular se pudo determinar el crecimiento folicular diario y el diámetro folicular máximo alcanzado el día 0 por cada uno de los animales. La ovulación se corroboró ecográficamente por la desaparición del folículo preovulatoria el día + 2 tomando como referencia el folículo preovulatorio presente al día 0. Ningún animal fue inseminado.

Durante la fase lútea se efectuaron determinaciones del diámetro del CL cada 72 horas a través de la realización de ecografías ováricas efectuadas los días 6, 9, 12 y 15 postovulación (figura 8). La misma se determinó mediante la medición ecográfica del diámetro transversal máximo del CL (Herzog y col., 2010). Las primeras determinaciones se lograron determinar el día 6 postovulación, debido a la imposibilidad ecográfica de visualizar correctamente el CL durante el metaestro y continuaron hasta el Día 15 del ensayo.

### **3.4. Toma y procesamiento de las muestras**

#### **3.4.1 Obtención de muestras de sangre**

Se obtuvieron muestras de sangre por punción de la vena yugular, al inicio del proestro y en el día 0 (figura 7). Durante la fase lútea las muestras fueron obtenidas los días 9, 12 y 15 posovulación. Las mismas fueron conservadas a temperatura ambiente (22-25 °C) por 30 min, luego colocadas a 4-8 °C por 1 hora y finalmente centrifugadas a 1500 rpm por 20 min. El suero fue almacenado a -20 °C hasta su posterior análisis en el laboratorio. El suero fue utilizado para determinación de las hormonas esteroides: E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> (Ortega y col., 2008; Rey y col., 2010)

#### **3.4.2 Biopsias uterinas**

La biopsia endometrial en los bovinos ofrece un gran potencial para lograr una mejor comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que ocurren durante el ciclo estral y que regulan la respuesta fisiológica de las células endometriales a las variaciones de las concentraciones de las hormonas ováricas (Chapwanya y col., 2010).

La realización de las biopsias uterinas fue efectuada según la técnica descrita por Chapwanya y col. (2010). Se obtuvieron muestras de tejido uterino el día 15 postovulación (figura 6). Se eligió este día del ciclo estral para evaluar la función uterina ya que este tiempo representa las etapas iniciales del reconocimiento materno de la gestación en el bovino (Bridges y col., 2012; Farin y col., 2010). Para llevar a cabo la técnica de manera segura, aportar analgesia y evitar movimientos bruscos, la obtención de las biopsias fue realizada con la ayuda de una sedación leve combinada con una anestesia epidural baja. La sedación fue realizada mediante la administración intravenosa de 20 mg totales de clorhidrato de xilacina (Xilacina 2%®, Over, Argentina), además se efectuó una anestesia epidural baja con 100 mg totales de clorhidrato de lidocaína (Lidocaína 2%®, Over) (Garnero y Perusia, 2002). Una vez alcanzada la analgesia del área urogenital se

introdujo la pinza para biopsias a través de la vagina y se la guio por palpación transrectal hasta contactar con el cérvix. Luego, mediante la técnica recto-vaginal de enhebrado cérvico-uterino se atravesó el cérvix y se deslizó la pinza hacia uno de los cuernos del útero donde se obtuvo la muestra de tejido uterino. Las biopsias se obtuvieron de los cuernos ipsilaterales al folículo preovulatorio. Se obtuvo una muestra por animal. Las muestras fueron acondicionadas a campo e identificadas para su posterior procesamiento (figura 6 *c, d, e y f*). Las porciones de tejido uterino fueron fijadas en formaldehído bufferado (4%) durante no más de 8 horas a temperatura ambiente y se procesaron siguiendo protocolos de rutina para su inclusión en parafina. Estas muestras fueron destinadas a la realización de exámenes histológicos y de determinación de las proteínas de interés.

### 3.4.3 Cuantificación de hormonas esteroides

Sobre las muestras de suero se realizó la determinación de las concentraciones de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>. Se obtuvieron muestras de sangre al inicio y al final del período de proestro y en los días 6, 9, 12 y 15 posovulación durante el diestro en correspondencia con los tiempos de evaluación ultrasonográfica del ovario (figura 8 y 9). Las cuantificaciones se efectuaron en el Laboratorio de Diagnósticos Alkemy, Santa Fe, Argentina, mediante la técnica de electroquimioluminiscencia inmunoensayo (ECLIA) validada para su uso en bovinos (Díaz y col., 2015), utilizando kits (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) en un sistema COBAS e411 (Roche Diagnostics), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.



**Figura 6.** Secuencia de la obtención y acondicionamiento de las biopsias de útero.

El procesado posterior se realizó en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Esperanza, Santa Fe, Argentina.



**Figura 7.** Momentos de obtención de muestras sanguíneas y obtención de las biopsias de útero. Día 0 es el momento donde se realizaría la IA en los protocolos comerciales utilizados en esta tesis.

### 3.5. Técnica de Inmunohistoquímica (IHQ)

#### 3.5.1. Procesamiento de las muestras para técnicas histológicas

Una vez fijadas las muestras fueron lavadas en buffer fosfato salino (PBS) y procesadas siguiendo protocolos histológicos de rutina para efectuar la inclusión en parafina (Salveti y col., 2010). Se realizaron cortes seriados de 4  $\mu\text{m}$  de espesor con un micrótopo rotativo Mod. RM2245 (Leica, Alemania), las que se montaron en portaobjetos previamente tratados con 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma, USA), que luego se secaron en estufa a 37 °C durante 24 horas.

Para realizar una caracterización inicial y evidenciar la morfología general se utilizó la coloración de hematoxilina-eosina. Esta caracterización se realizó en los tres grupos en estudio y se determinó la presencia de células epiteliales luminales y glandulares, células del estroma endometrial y la presencia de glándulas superficiales y profundas. Luego mediante IHQ indirecta

se evaluaron los marcadores de interés empleando anticuerpos específicos para la detección de cada uno de ellos (Díaz y col., 2016).

### 3.5.2. Detección y expresión de receptores de hormonas esteroideas endometriales

Para la determinación de los marcadores sobre el tejido endometrial se realizó la técnica de IHQ indirecta (Ortega y col, 2008; Díaz y col., 2018). Se evaluaron células epiteliales luminales del endometrio y células epiteliales de glándulas endometriales superficiales y profundas. Sobre las secciones de pared uterina provenientes de los diferentes grupos se identificaron *in situ* la expresión del ESR1, ESR2 y RP. Para ello se emplearon anticuerpos específicos disponibles comercialmente detallados en la tabla 1.

Anticuerpo primario	Clon	Proveedor comercial	Dilución	Recuperación antigénica
PR130	Policlonal	LETH	1:50	Si
ESR1	Monoclonal (1D5)	Dako	1:50	Si
ESR2	Policlonal	BioGenex	1:100	Si

**Tabla 1.** Detalle de los anticuerpos primarios utilizados y las condiciones de uso en la técnica de inmunohistoquímica. PR130: receptor de progesterona ESR1: receptor de estrógeno  $\alpha$ . ESR2: receptor de estrógeno  $\beta$

Las inmunodetecciones se realizaron siguiendo el protocolo descrito previamente por Díaz y col. (2018), según se detalla a continuación:

- I. Desparafinación en xilol mediante dos pasajes consecutivos de 15 minutos cada uno.

- II. Hidratación en una serie de alcoholes de graduación decreciente, a partir de alcohol etílico absoluto (dos pasajes de 3 minutos cada uno), alcohol etílico 96° (dos pasajes de 3 minutos cada uno) y finalmente alcohol etílico 70° (un pasaje de 3 minutos).
- III. Hidratación en PBS pH 7,2 durante 5 minutos.
- IV. Tratamiento de recuperación antigénica. Se realizó en un horno de microondas de uso doméstico (potencia máxima 800W). Como solución de recuperación se usó buffer citrato 0,01 M pH 6,0. Los cortes fueron colocados en vasos coplin a baño maría, y fueron sometidos a la siguiente secuencia de recuperación: 3 minutos a 100% de potencia, 6 minutos al 40%, recarga del coplin con agua destilada, 6 minutos al 40 % y 20 minutos dentro del microondas apagado. Este tratamiento se utilizó para todos los anticuerpos según se detalla en la tabla 1.
- V. Bloqueo de la actividad endógena de la enzima peroxidasa, sumergiendo las muestras durante 10 minutos en una solución al 3% de peróxido de hidrógeno en metanol absoluto, agregando nuevamente el mismo volumen de peróxido de hidrógeno a los 10 minutos.
- VI. Tres lavados en PBS durante 5 minutos.
- VII. Incubación con anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C (en heladera): se usaron anticuerpos de interés en las diluciones adecuadas según la proteína a detectar (tabla 1). Para los controles de especificidad se sustituyó el anticuerpo primario por PBS-BSA.
- VIII. Después de la incubación con el anticuerpo primario la cámara se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- IX. Dos lavados consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno.
- X. Incubación con el anticuerpo secundario biotilado universal del kit Cytoscan HRP Detection System (Cell Marque, USA), durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- XI. Dos lavados consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno.

XII. Incubación con complejo streptavidina-peroxidasa (Cytoscan HRP Detection System Cell Marque), durante 30 minutos a temperatura ambiente.

XIII. Cinco lavados consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno.

XIII. Revelado de la reacción con diaminobencidina (DAB), utilizando la solución comercial (Dako, USA). Los cortes se observaron al microscopio para controlar el tiempo óptimo en cada prueba y de ese modo estandarizarlo.

XIV. Lavados con agua destilada, 2 de 5 minutos cada uno. Luego se realizó la coloración de contraste con hematoxilina activada (Biopur, Argentina), deshidratación y montaje con Bálsamo natural de Canadá (Canadax, Biopur) y cubreobjetos apropiados.

La inmunomarcación fue visualizada en el núcleo para ESR1, ESR2 y PR (Ortega y col., 2008; Salvetti y col., 2010).

Para la evaluación de la expresión de las proteínas de interés en los tres grupos en estudio, se digitalizaron imágenes de las células epiteliales luminales y glandulares, células del estroma endometrial y de glándulas superficiales y profundas. Los ESR1 y ESR2 fueron analizados en los núcleos del epitelio endometrial y en las células epiteliales de las glándulas superficiales y profundas del endometrio en todos los grupos evaluados (figuras 21).

### 3.5.3. Análisis digital y cuantificación de los receptores endometriales

La evaluación de las técnicas de IHQ se realizaron por análisis digital de imágenes, utilizando el sistema Image-Pro Plus 3.0.1 (Media Cybernetic, USA), siguiendo métodos ya descritos (Díaz y col., 2016; 2018). Las imágenes que se analizaron, fueron previamente obtenidas usando una cámara digital DS-Fi2 (Nikon, Japón), acoplada a un microscopio óptico Eclipse Ni

(Nikon) utilizando un objetivo de 40X de aumento. La resolución de las imágenes fue establecida en 1200 x 1600 píxeles.

El área nuclear inmunohistoquímicamente marcada se calculó a través de la segmentación de colores seleccionando los objetos con reacción marrón moderado/intenso dada por la reactividad del cromógeno utilizado como rango positivo. Posteriormente fue aplicada una máscara para la separación permanente de los colores y se realizó un histograma para determinar el porcentaje del área marcada sobre el área total evaluada, tal como fue descrito en trabajos previos (Salveti y col., 2009; Díaz y col., 2018).

### **3.7. Análisis estadístico**

Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados con el programa SPSS 23 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Antes de iniciar el análisis estadístico se comprobó la normalidad de la población de datos evaluados (prueba Kolmogórov-Smirnov) y homogeneidad de la varianza (prueba de Levene). Las concentraciones séricas de E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> y los diámetros de los folículos dominantes y cuerpos lúteos fueron analizadas mediante modelos lineales generalizados para medidas repetidas. Se determinaron los efectos del tiempo y su interacción. El nivel de significancia utilizado para estas pruebas fue de  $p < 0,05$ . Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM).

Para evaluar la expresión proteica mediante inmunohistoquímica, se realizó un análisis de la varianza de los datos (ANOVA), y como análisis posterior se aplicó el test de Duncan. Se analizó por separado la inmunomarcación de los receptores obtenida en células epiteliales luminales y en células de las glándulas superficiales y profundas entre cada grupo en estudio. Además, se comparó dentro de cada grupo la expresión de los receptores en las células epiteliales luminales y en células

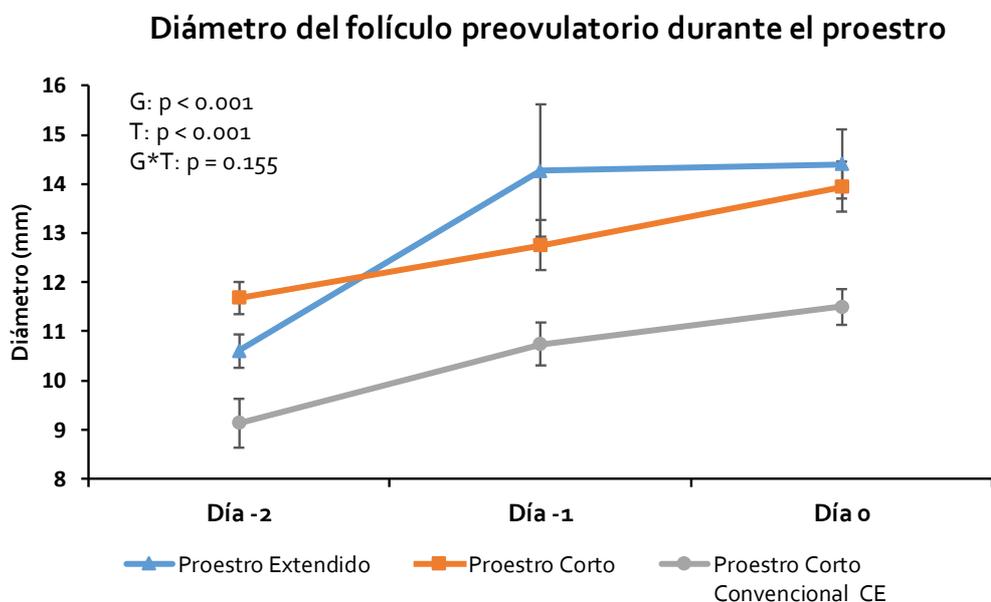
de las glándulas superficiales y profundas. El nivel de significancia utilizado para ANOVA fue  $p < 0,05$ . Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM).

## **IV. RESULTADOS**

#### 4.1. Evaluación ultrasonográfica del diámetro del folículo preovulatorio y del cuerpo lúteo

##### 4.1.1. Evolución del diámetro del folículo preovulatorio durante el proestro

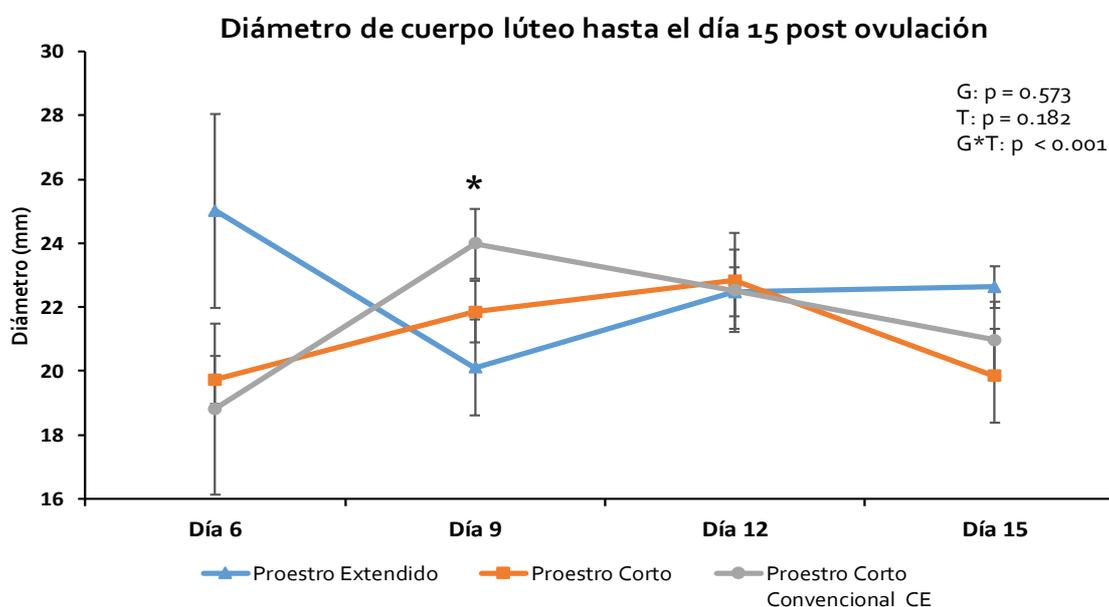
Mediante la comparación del diámetro de los folículos preovulatorios entre los diferentes grupos en estudio pudimos evidenciar un efecto del tiempo sobre el diámetro folicular, el cual aumentó en los tres grupos a medida que el tiempo de proestro avanza ( $p < 0,001$ ). Además, se observó que los animales incluidos en los grupos I y II ( $13,09 \text{ mm} \pm 0,65 \text{ mm}$ ;  $12,79 \text{ mm} \pm 0,39 \text{ mm}$ ) presentaron un mayor diámetro del folículo preovulatorio que los animales del grupo III ( $10,45 \text{ mm} \pm 0,37 \text{ mm}$ ) ( $p < 0,001$ ). No se observó efecto de la interacción entre los tratamientos y el tiempo de proestro ( $p > 0,05$ ). Estos resultados se representan en la Figura 8. La tasa de crecimiento folicular diaria mostró una tendencia ( $p = 0,057$ ) para el grupo I ( $1,26 \text{ mm} \pm 0,68 \text{ mm}$ ) con respecto al grupo III ( $0,65 \text{ mm} \pm 0,53 \text{ mm}$ ), siendo el grupo II ( $0,75 \text{ mm} \pm 0,30 \text{ mm}$ ) igual al grupo I y grupo III.



**Figura 8.** Diámetro del folículo preovulatorio durante el proestro de los grupos: I- Proestro Extendido (línea azul), II- Proestro Corto (línea naranja) y III- Proestro Corto Convencional CE (línea gris). Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado como significativo. G: efecto del tratamiento. T: efecto del tiempo. G\*T: efecto del tratamiento por el tiempo.

#### 4.1.2. Evolución del diámetro del cuerpo lúteo (CL) durante la fase lútea.

El diámetro del CL hasta el día 15 del diestro evaluado cada 72 horas, no evidenció diferencias entre los grupos evaluados ( $p > 0,05$ ). Tampoco se observó un efecto del tiempo de tratamiento sobre el diámetro del CL ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, se observó un efecto de la interacción del tratamiento por el tiempo, específicamente el diámetro del CL hallado en el día 9 fue mayor en los animales del grupo III que en el grupo I ( $p < 0,05$ ). Estos resultados se representan en la Figura 9.

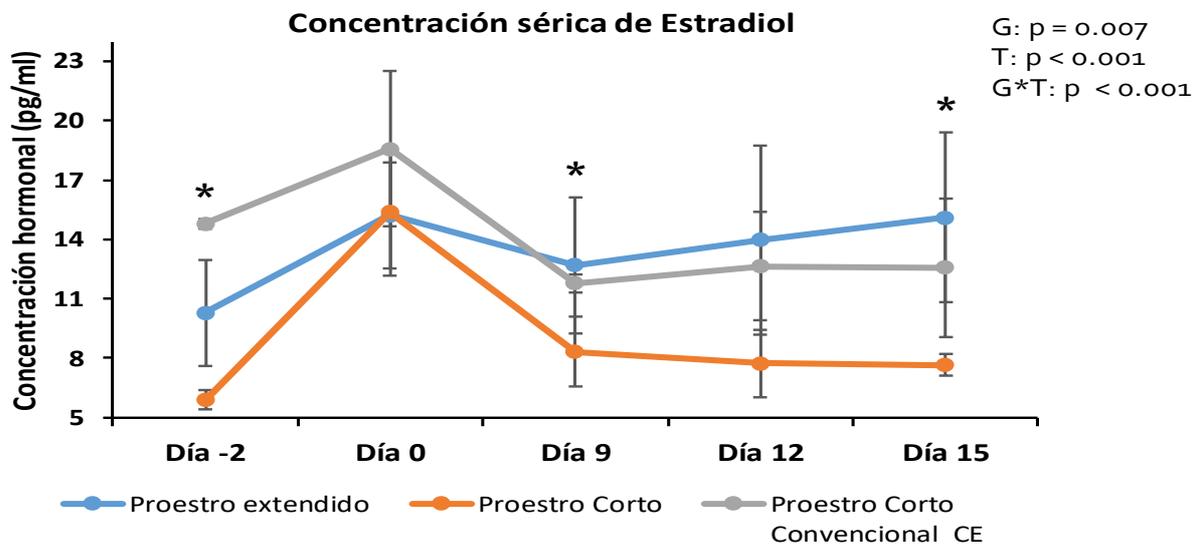


**Figura 9.** Diámetro del CL determinado cada 72 hs hasta el día 15 post ovulación durante la fase lútea en los grupos: I- Proestro Extendido (línea azul), II- Proestro Corto (línea naranja) y III- Proestro Corto Convencional CE (línea gris). Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado como significativo. El efecto de la interacción entre el tratamiento y el tiempo se indica con \* para cada día de muestreo (las diferencias entre grupo se explican en el texto). G: efecto del tratamiento. T: efecto del tiempo. G\*T: efecto del tratamiento por el tiempo.

## **4.2. Efecto de los tratamientos sobre sobre la concentración sérica de hormonas esteroideas.**

### **4.2.1. Estradiol**

La concentración sérica de E<sub>2</sub> fue mayor en el grupo III con CE en relación a la hallada en el grupo II ( $p < 0,05$ ) el día 0. Por otro lado, las concentraciones observadas en el grupo I no presentaron diferencias con los demás grupos ( $p > 0,05$ ). Además, se observó un efecto del tiempo de muestreo sobre la concentración de E<sub>2</sub>, donde fue evidente un aumento en las concentraciones de la hormona desde el retiro del DIV ( $p < 0,05$ ). Al analizar la interacción entre tratamientos y tiempo, pudimos observar que al inicio del proestro (día -2) el grupo III presentó mayores concentraciones que los grupos I y II ( $p < 0,05$ ) y el grupo I presentó mayores concentraciones que el grupo II ( $p < 0,05$ ). Durante el diestro se observó que en el día 9 de estudio el grupo III mostró mayores concentraciones de E<sub>2</sub> que el grupo I y II. Finalmente, en el día 15 el grupo I presentó mayores concentraciones de E<sub>2</sub> que el grupo II ( $p < 0,05$ ). Estos resultados se representan en la figura 10.

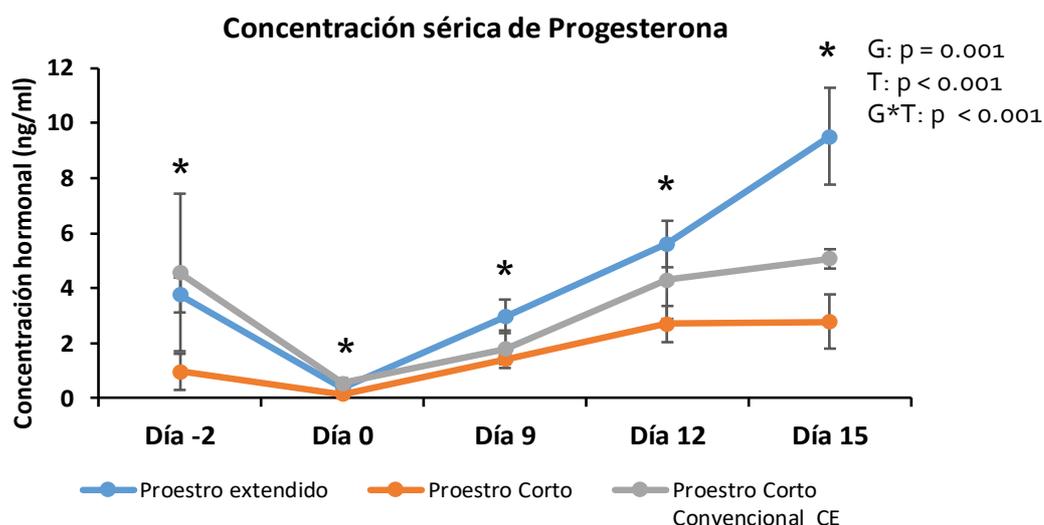


**Figura 10.** Concentración de sérica de estradiol determinada durante la fase folicular y lútea del ciclo reproductivo hasta el día 15 post ovulación en los grupos: I- Proestro Extendido (línea azul), II- Proestro Corto (línea naranja) y III- Proestro Corto Convencional CE (línea gris). Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado como significativo. El efecto de la interacción entre el tratamiento y el tiempo se indica con \* para cada día de muestreo (las diferencias entre grupo se explican en el texto). G: efecto del tratamiento. T: efecto del tiempo. G\*T: efecto del tratamiento por el tiempo.

#### 4.2.2. Progesterona

Las concentraciones de  $P_4$  se comportaron según lo esperado para las fases foliculares y lúteales del ciclo estral bovino. Sin embargo, se observaron diferencias entre los grupos estudiados. Los grupos I y III presentaron mayores concentraciones que el grupo II durante la fase lútea ( $p < 0,05$ ). Además, se observó un efecto del tiempo de tratamiento donde en el día 0 se observó en los tres grupos una caída de la  $P_4$  a niveles basales, seguido de un aumento progresivo hasta el día 15; este comportamiento de la hormona estuvo en correspondencia con lo esperado para las etapas del ciclo estral evaluadas. Al analizar la interacción entre tratamientos y tiempo, pudimos observar que el grupo I mostró una mayor concentración de  $P_4$  en todos los tiempos evaluados en relación al Grupo II ( $p < 0,05$ ). Además, el grupo I presentó mayores concentraciones al final del periodo de estudio (día 15) que la hallada en los grupos II y III ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, el grupo III

presentó mayores concentraciones de progesterona que el grupo II en los días 0 y 15 de estudio ( $p < 0,05$ ).



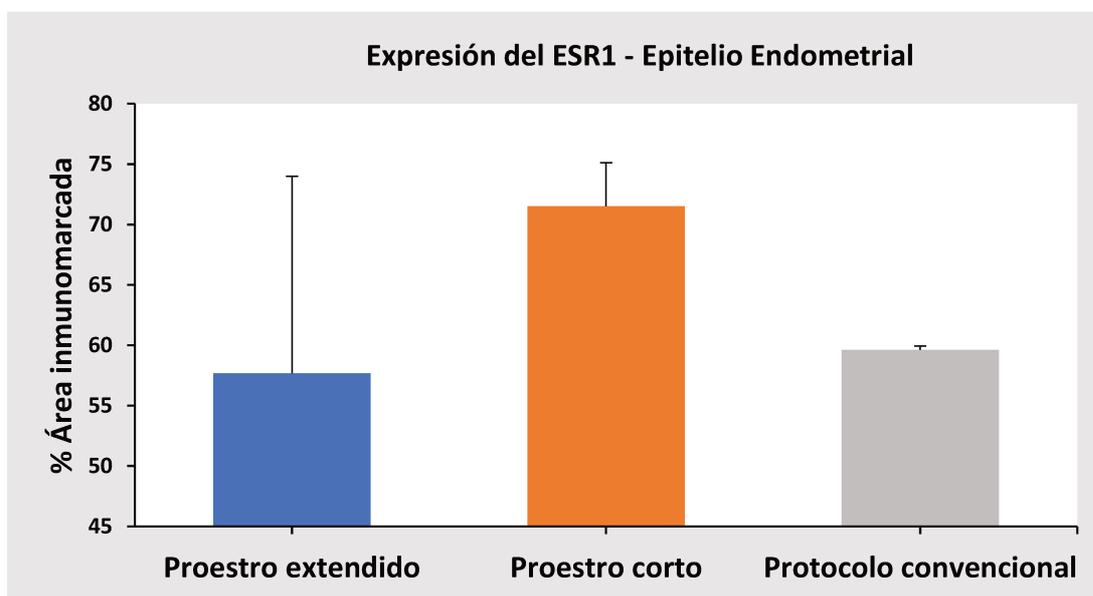
**Figura 11.** Concentración de sérica de progesterona determinada durante la fase folicular y lútea del ciclo reproductivo hasta el día 15 post ovulación en los grupos: I- Proestro Extendido (línea azul), II- Proestro Corto (línea naranja) y III- Proestro Corto Convencional CE (línea gris). Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado como significativo. El efecto de la interacción entre el tratamiento y el tiempo se indica con \* para cada día de muestreo (las diferencias entre grupo se explican en el texto). G: efecto del tratamiento. T: efecto del tiempo. G\*T: efecto del tratamiento por el tiempo.

#### 4.3. Análisis de la expresión proteica de receptores endometriales de hormonas esteroideas mediante inmunohistoquímica.

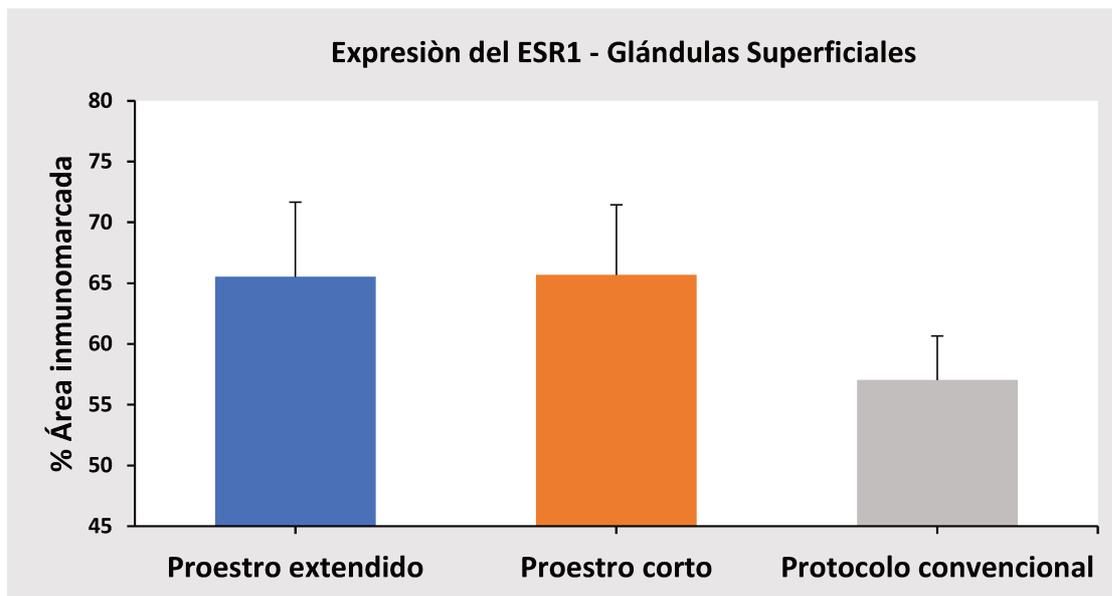
La detección inmunohistoquímica de los diferentes receptores de hormonas esteroideas (ESR1, ESR2 y RP) fue llevada a cabo en forma conjunta con controles positivos y negativos sobre los preparados de tejidos uterinos provenientes de las muestras obtenidas a campo (figura 19). Mediante estos ensayos se evaluó la expresión de dichas proteínas a nivel endometrial el día 15 posovulación. Para cada receptor se determinó el porcentaje del área inmunomarcada en las células epiteliales luminales del endometrio y en las células epiteliales de las glándulas endometriales superficiales y profundas.

#### 4.3.1. Inmunomarcación del receptor de estrógenos alfa en los Grupos I, II y III.

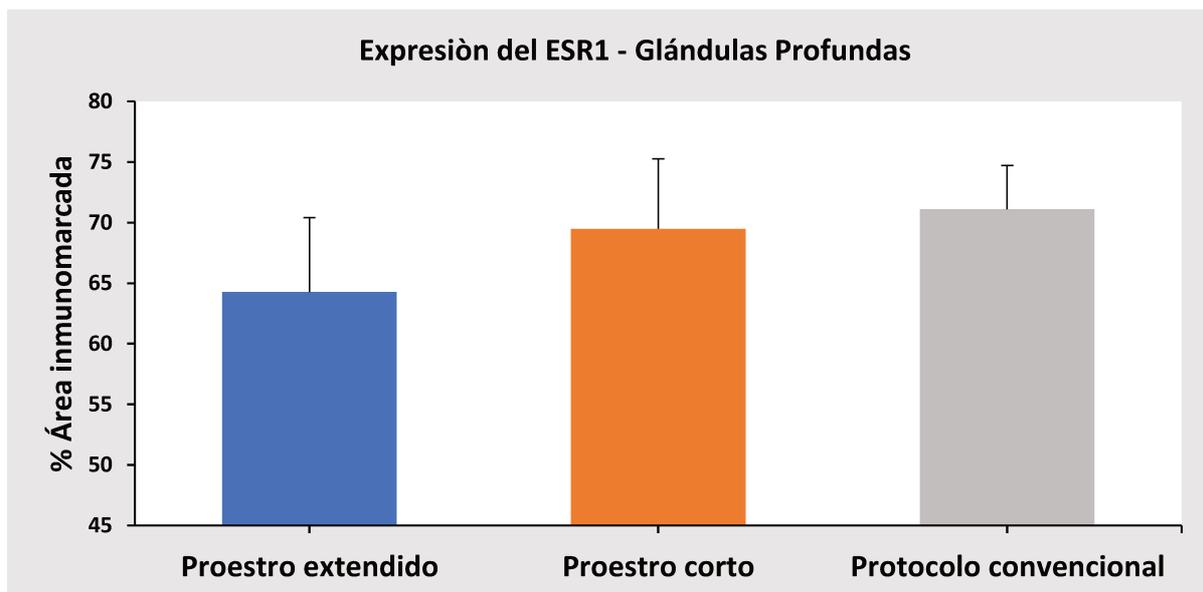
Si bien se observó una expresión nuclear de ESR1 similar entre los grupos y tipos celulares evaluados, no se hallaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) al comparar la expresión nuclear del receptor en epitelio endometrial (figura 12), epitelio de glándulas superficiales (figura 13) y epitelio de glándulas profundas (figura 14) entre los tres grupos en estudio.



**Figura 12.** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de ESR1 en el epitelio endometrial el día 15 post ovulación para los grupos: I- Proestro Extendido (azul), II- Proestro Corto (naranja) y III- Proestro Corto Convencional CE (gris). Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado como significativo. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos estudiados.



**Figura 13.** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de ESR1 en las glándulas superficiales el día 15 post ovulación para los grupos: I- Proestro Extendido (azul), II- Proestro Corto (naranja) y III- Proestro Corto Convencional CE (gris). Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado como significativo. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos estudiados.



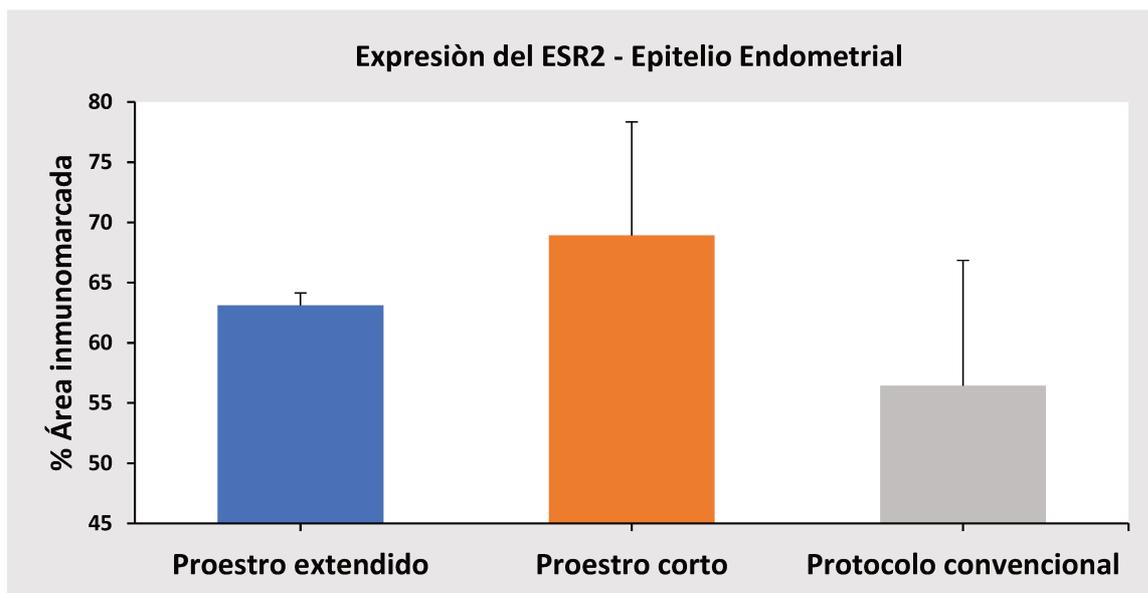
**Figura 14.** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de ESR1 en las glándulas profundas el día 15 post ovulación para los grupos: I- Proestro Extendido (azul), II- Proestro Corto (naranja) y III- Proestro Corto Convencional CE (gris). Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado como significativo. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos estudiados.

#### 4.3.2. Inmunomarcación del receptor estrógenos beta en los grupos I, II y III.

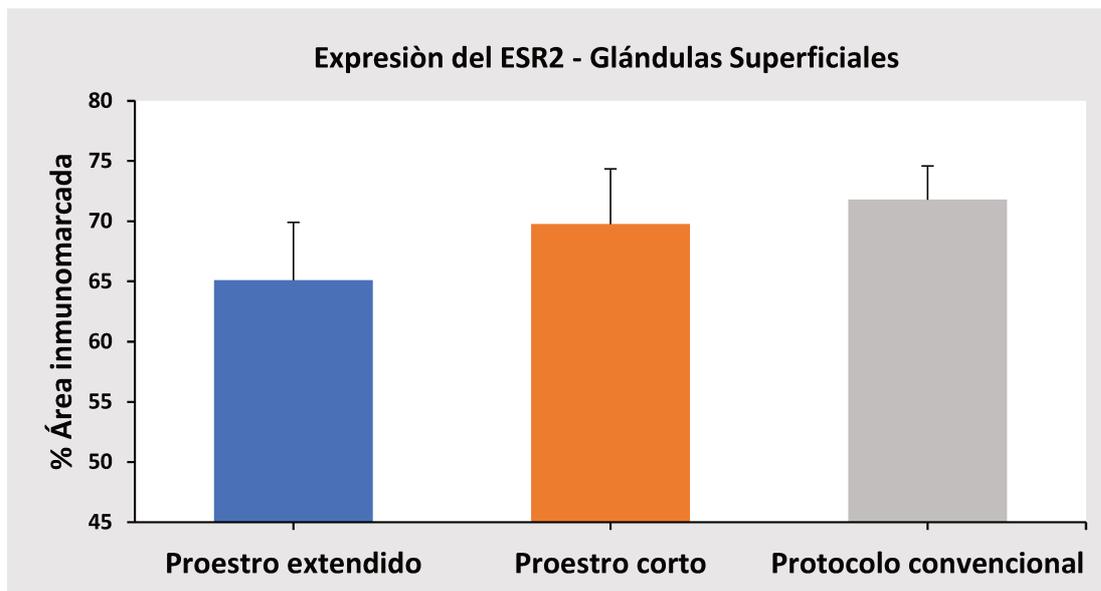
ESR2 fue localizado en los núcleos del epitelio endometrial y en las células epiteliales de las glándulas superficiales y profundas del endometrio en todos los grupos evaluados (figuras 19).

Al igual que para el ESR1, la expresión nuclear del ESR2 fue similar en todos los grupos y tipos celulares evaluados.

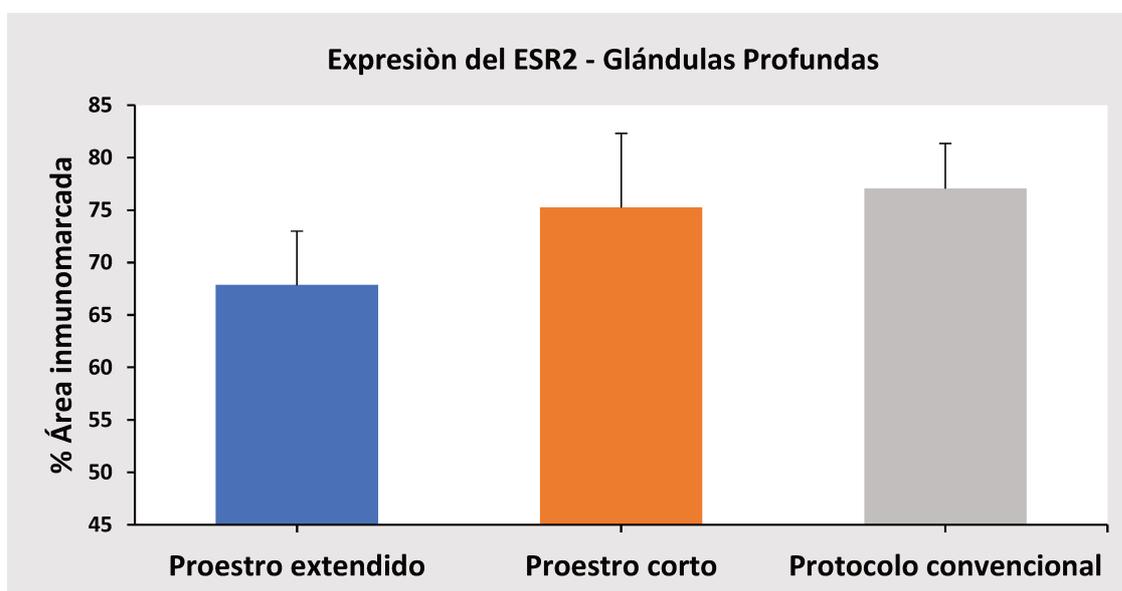
No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) al comparar la expresión nuclear del receptor en el epitelio endometrial (figura 15), en el epitelio de glándulas superficiales (figura 16) y en el epitelio de glándulas profundas (figura 17) entre los tres grupos estudiados.



**Figura 15.** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de ESR2 en el epitelio endometrial el día 15 post ovulación para los grupos: I- Proestro Extendido (azul), II- Proestro Corto (naranja) y III- Proestro Corto Convencional CE (gris). Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado como significativo. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos estudiados.



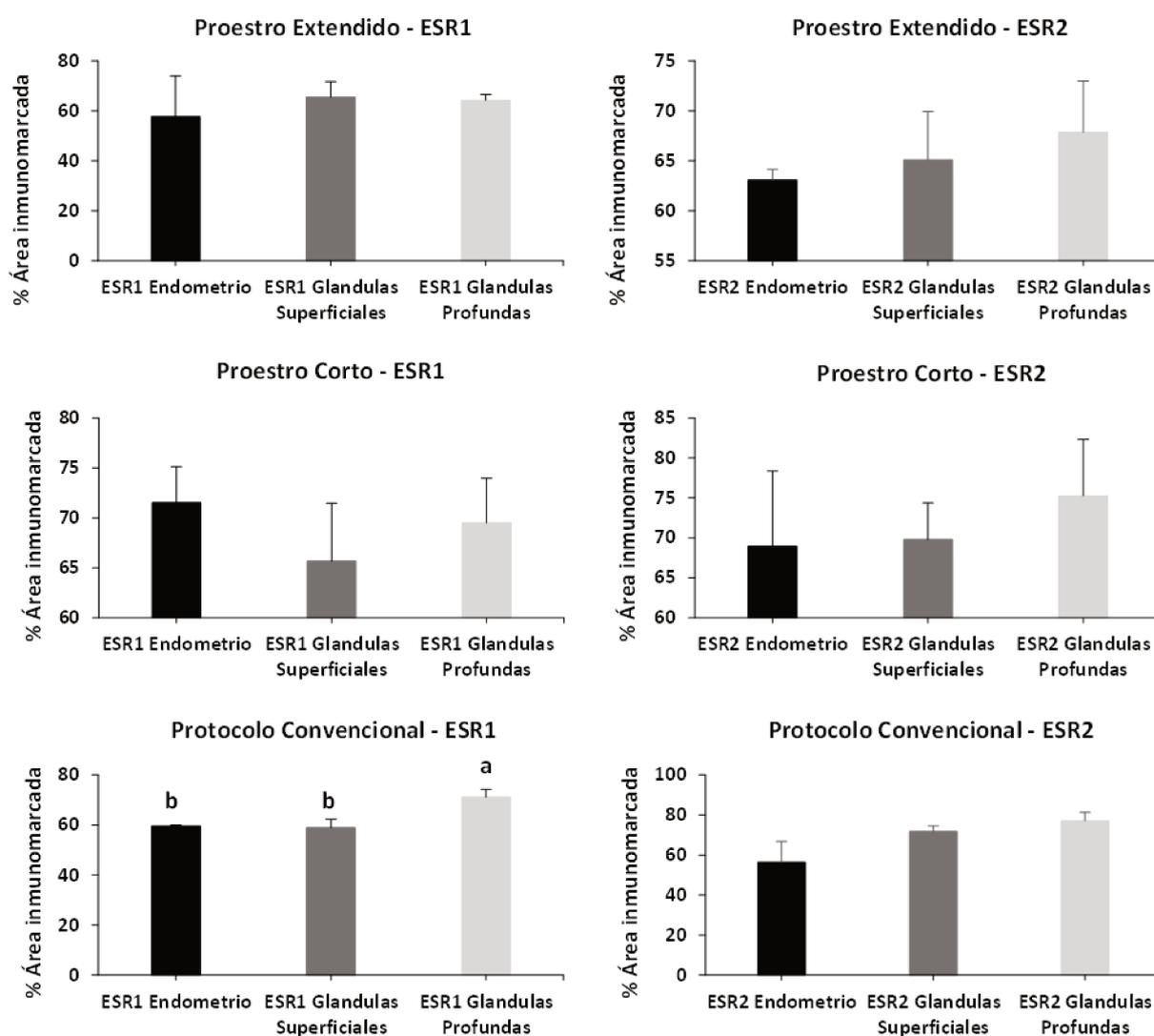
**Figura 16.** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de ESR2 en las glándulas superficiales el día 15 post ovulación para los grupos: I- Proestro Extendido (azul), II- Proestro Corto (naranja) y III- Proestro Corto Convencional CE (gris). Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado como significativo. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos estudiados.



**Figura 17.** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de ESR2 en las glándulas profundas el día 15 post ovulación para los grupos: I- Proestro Extendido (azul), II- Proestro Corto (naranja) y III- Proestro Corto Convencional CE (gris). Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado como significativo. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos estudiados.

4.3.3. Expresión de ESR1 y ESR2 en células del epitelio endometrial y glandular dentro de cada grupo.

Tanto el ESR1 como el ESR2 presentaron expresión proteica nuclear en todas las poblaciones celulares dentro de cada grupo evaluado (Figura 18 y 19).



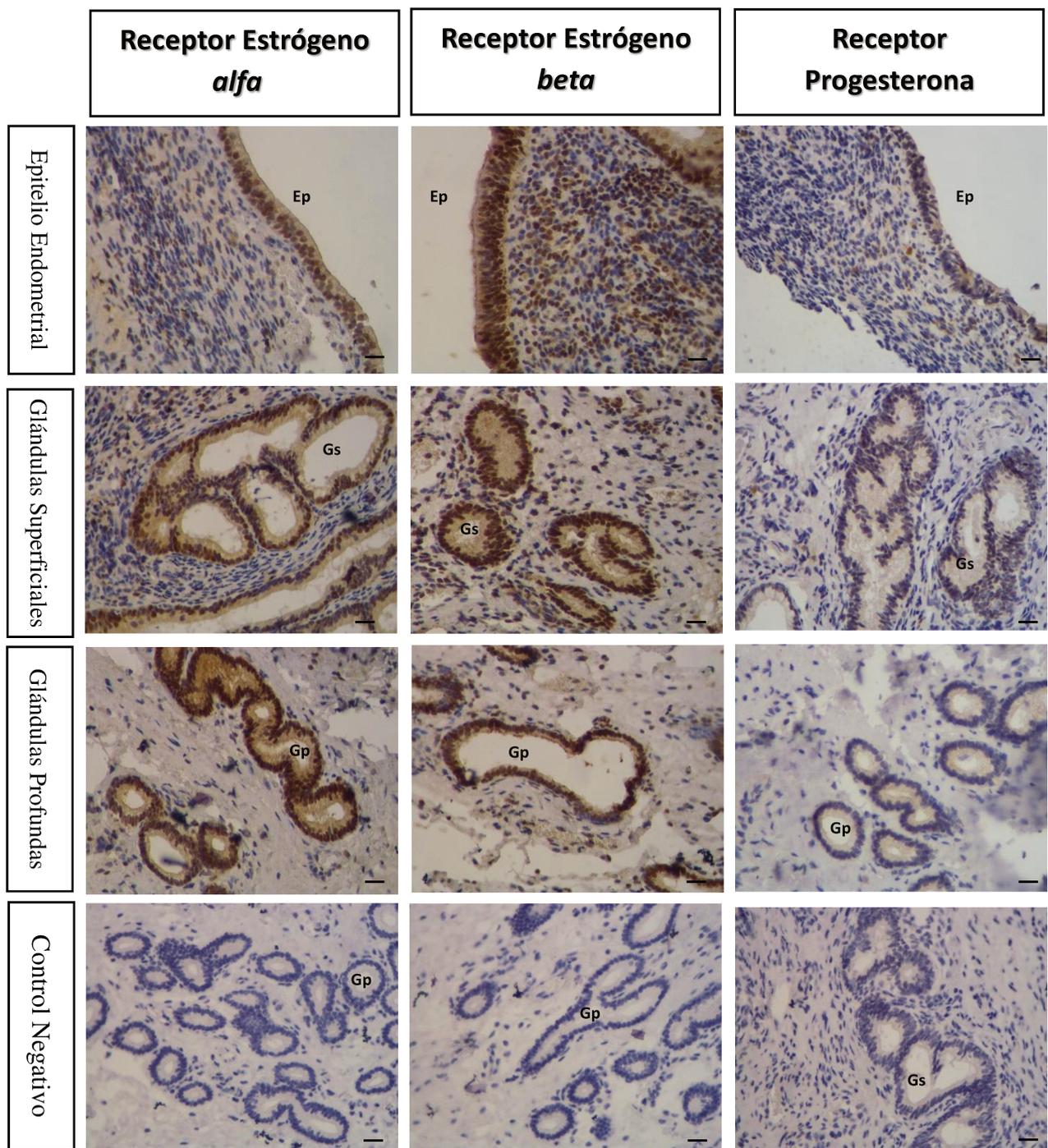
**Figura 18.** Porcentaje de inmunomarcación de las diferentes isoformas del RE ( $\alpha$  y  $\beta$ ) en células del epitelio endometrial (negro), glándulas superficiales (gris oscuro) y profundas (gris claro) para todos los grupos en estudio. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). Las barras con diferentes letras son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Tal como se observa en las figuras 18 los exámenes realizados en los grupos I y II, no revelaron diferencias estadísticas en relación al porcentaje de área inmunomarcada para la expresión proteica de los receptores nucleares ESR1 y ESR2 entre los diferentes tipos celulares estudiados ( $p > 0,05$ ).

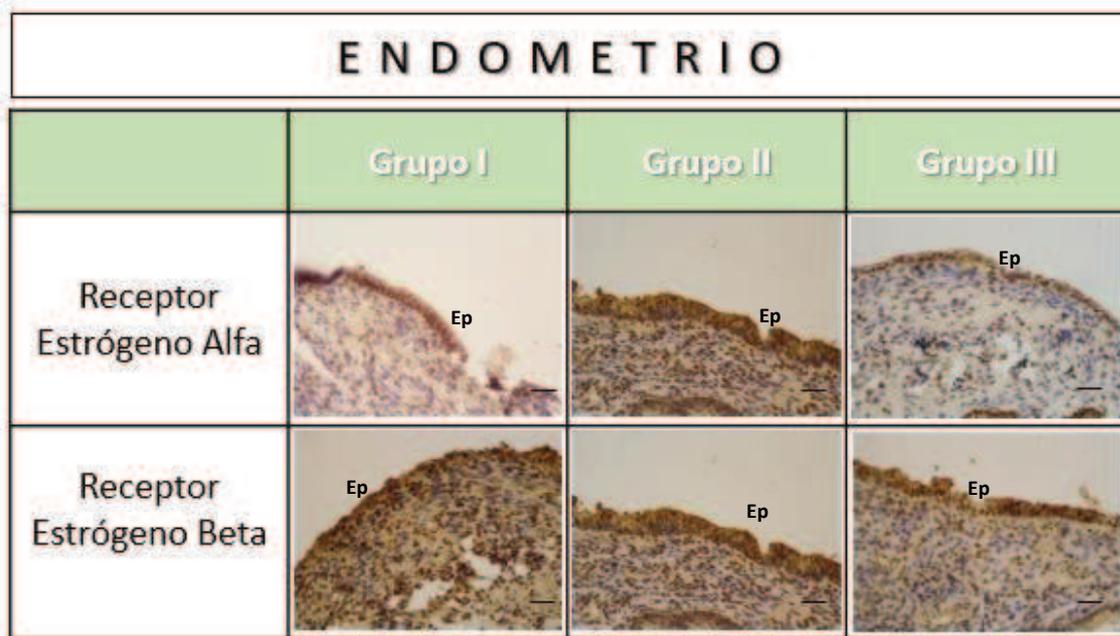
En el grupo III, existieron diferencias significativas con respecto a la expresión nuclear del ESR1. Hemos podido observar que éste receptor presentó una expresión mayor en las glándulas profundas que la observada en el epitelio endometrial y en las glándulas superficiales ( $p < 0,05$ ). Por su parte, la expresión nuclear del ESR2 no evidenció diferencias entre epitelio endometrial y glándulas superficiales y profundas ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.4. Inmunomarcación del receptor de progesterona en los Grupos I, II y III.

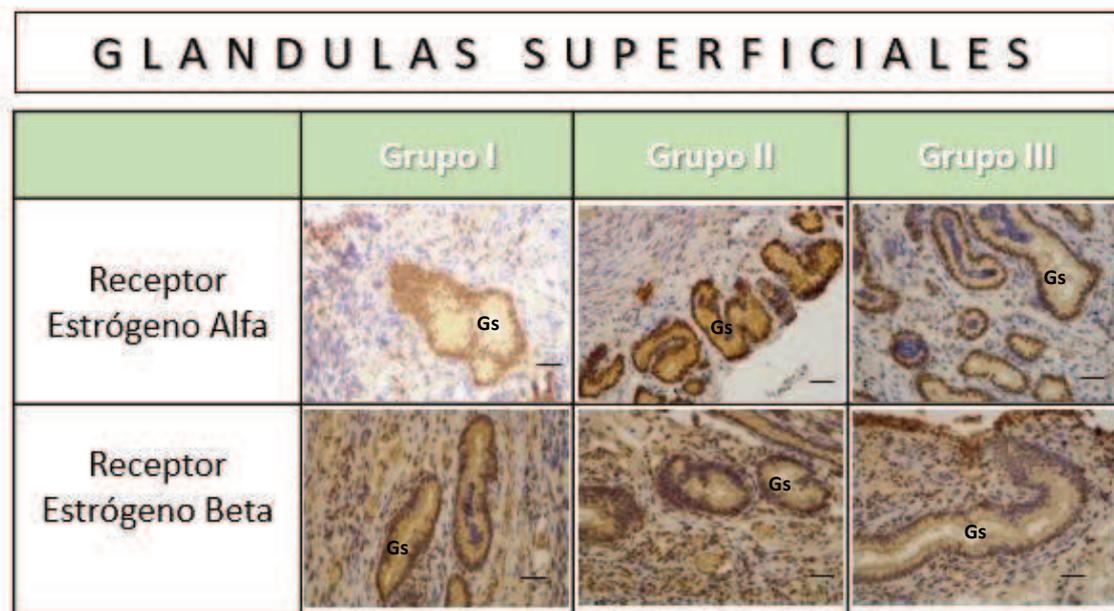
En todos los cortes analizados no se observó expresión de receptores de  $P_4$  en las células endometriales epiteliales y células de las glándulas superficiales y profundas del endometrio al día 15 posovulación (figura 19).



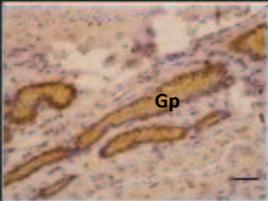
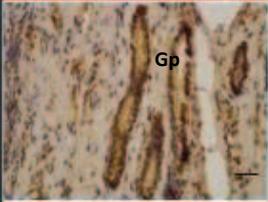
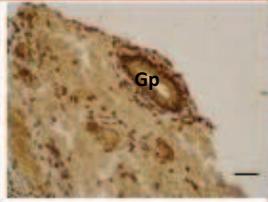
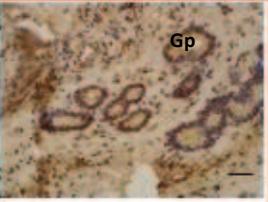
**Figura 19.** Imágenes histológicas representativas de estructuras endometriales inmunomarcadas para los RE- $\alpha$ , RE- $\beta$  y RP en el día 15 posovulación. Ep: epitelio endometrial luminal. Gs: glándulas superficiales. Gp: Glándulas profundas. Barras = 20  $\mu$ m. El área inmunohistoquímicamente marcada se observa con reacción marrón moderado/intenso (dada por la reactividad del cromógeno DAB utilizado como rango positivo).



**Figura 20.** Imágenes histológicas representativas del epitelio luminal inmunomarcada para los ESR1 y ESR2 en los tres grupos en estudios en el día 15 posovulación. Ep: epitelio endometrial luminal. Barras = 20  $\mu$ m



**Figura 21.** Imágenes histológicas representativas de las glándulas superficiales del estroma endometrial inmunomarcadas para los ESR1 y ESR2 en los tres grupos en estudio en el día 15 posovulación. Gs: glándulas superficiales. Barras = 20  $\mu$ m.

GLANDULAS PROFUNDAS			
	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Receptor Estrógeno Alfa			
Receptor Estrógeno Beta			

**Figura 22.** Imágenes histológicas representativas de las glándulas profundas del estroma endometrial inmunomarcadas para los ESR1 y ESR2 en los tres grupos en estudio en el día 15 posovulación. Gp: Glándulas profundas. Barras = 20  $\mu$ m.

## **V. DISCUSIÓN**

Los protocolos de IATF que presentan periodos prolongados de proestro han tenido un gran impacto en la última década a partir de los trabajos iniciales presentados por Day y col. (2008). Muchas investigaciones han sido publicadas sobre la importancia fisiológica que presenta el proestro en la fertilidad de la hembra bovina, logrando una mejora en la tasa de concepción a la IA cuando extendemos su duración de 48 a 72 horas (Filho y col., 2011; Bridges y col., 2012; Colazo y col., 2014; Wiltbank y Pursley, 2014; Bo y col., 2018; Perry y col., 2020). Sin embargo, son pocos los ensayos que han evaluado posibles diferencias en los perfiles endocrinos generados a nivel ovárico por distintos tratamientos farmacológicos disponibles comercialmente, al igual que las respuestas del útero en la expresión de receptores que modifiquen la receptividad endometrial generando un ambiente uterino más favorable para el embrión en las etapas iniciales de su desarrollo.

El presente trabajo fue llevado a cabo para estudiar el efecto entre el tiempo de proestro, las concentraciones séricas de las hormonas ováricas,  $E_2$  y  $P_4$ , y la regulación de la expresión de sus receptores (RP, ESR1 y ESR2) a nivel endometrial en el periodo preimplantacional (día +15, ovulación= día 0).

### **5.1. Efecto del tiempo de proestro sobre la dinámica folicular, lútea y concentraciones séricas de hormonas esteroideas.**

Los cambios morfométricos que ocurrieron en el FD durante el periodo de proestro y estro fueron determinados en los tres grupos a través de estudios ecográficos realizados en forma diaria desde el inicio del proestro hasta el día 0. En coincidencia con trabajos previamente publicados donde el tamaño del FD se correlaciona en forma positiva con la duración del proestro (Bridges y col., 2012; De La Mata y Bo, 2018) nosotros también encontramos diferencias en la evolución del tamaño del FD durante el proestro. Observamos respuestas diferenciales en el diámetro del folículo

preovulatorio, el cual aumentó en los tres grupos a medida que avanzó el tiempo de proestro. Además, los animales del grupo I y II, cuyos protocolos incluyen la administración de una dosis de GnRH al momento de la inserción del DIV presentaron mayores diámetros de FD al momento de la ovulación con respecto al grupo III de proestro corto que emplea benzoato de estradiol. Esta diferencia en el diámetro del FD tanto al comienzo del proestro como al momento de la IA puede ser atribuida a que los agonistas sintéticos de la GnRH (acetato de buserelina) inyectados al inicio del protocolo inducen la ovulación y generan una nueva onda de crecimiento folicular dentro de las 48 horas de su administración (Day y col., 2015), en comparación cuando se utiliza benzoato de estradiol más P<sub>4</sub> los cuales producen la regresión folicular y generación de una nueva onda de crecimiento a las 96 horas (Bo, y col., 2018). Estudios publicados por el grupo de investigación de Bridge y col. (2008; 2010 y 2012) demostraron que el diámetro y la edad del folículo ovulatorio no parecen ser predictores precisos de la fertilidad, pero si encontraron una relación positiva directa con el tiempo de proestro y la tasa de preñez, enfatizando que la duración del proestro influye más en la fertilidad que en el tamaño del folículo o en la edad del mismo. Por lo tanto, es más importante la madurez del FD en términos de tiempo que el tamaño del FD para el establecimiento y mantenimiento de la preñez; tal como lo demuestra un trabajo reciente de Ciernia y col. (2021).

Los trabajos publicados sobre dinámica ovárica mediante la evaluación con ultrasonografía Doppler indican que tanto el tamaño del FD como su flujo sanguíneo se incrementan a medida que se extiende la duración de la fase de dominancia folicular. La vascularización del FD aumenta en paralelo con el aumento de las concentraciones de E<sub>2</sub> y permanece alta hasta el momento de la ovulación, lo que sugiere que la angiogénesis juega un papel importante en la maduración folicular (Bollwein y col., 2010). Estos datos refuerzan nuestra hipótesis inicial donde no sólo las concentraciones séricas de E<sub>2</sub> logradas a través de los diferentes protocolos comerciales que

prolongan el tiempo de proestro son importantes, sino también que el tiempo adicional de duración del proestro permite un mayor desarrollo del FD (Bollwein y col., 2010).

Un dato de relevancia es que no encontramos diferencias significativas en relación al diámetro de los CL entre los diferentes grupos en estudio durante los primeros 15 días de diestro. Este resultado tiene una gran importancia y coincide con un estudio recientemente publicado por Mc Lean y Perry (2022) donde no encontraron asociación entre las concentraciones preovulatorias de E<sub>2</sub> y la función lútea en vacas para carne. Los autores demostraron que altas concentraciones de E<sub>2</sub> antes de la ovulación no eran requisito necesario para preparar las células de la granulosa para su luteinización y/o su posterior síntesis lútea de P<sub>4</sub>, pero hallaron una tendencia a afectar negativamente la vida útil del CL. Estos resultados están de acuerdo con los trabajos originales de Bridges y col. (2008) que demostraron que la manipulación del tiempo de duración del proestro tuvo un efecto mucho más marcado sobre la tasa de concepción que las concentraciones séricas de E<sub>2</sub> alcanzadas al momento de la IATF. Un trabajo similar publicado por McNeill y col. (2006) indica que la extensión del tiempo de proestro da lugar a la formación de un CL con mayor capacidad de síntesis endocrina. Estos datos son reforzados por la fuerte asociación entre la concentración de P<sub>4</sub> sistémica durante la fase lútea temprana y la tasa de supervivencia del embrión en las vacas de este estudio. También encontramos que la capacidad endocrina de las células lúteales no se asoció con un mayor diámetro del CL, reforzando el concepto de la importancia del tiempo de proestro más que de las concentraciones séricas de E<sub>2</sub> preovulatorias a las que son expuestas las células del FD para lograr una mayor capacidad de esteroidogénica del CL durante el diestro subsiguiente (Binelli y col., 2009; Cooke y col., 2019). Dadas las múltiples funciones de los esteroides ováricos en los procesos biológicos que conducen a la gestación, es posible que estos cambios endocrinos contribuyan a la mayor fertilidad alcanzada mediante el uso de los protocolos de proestro prolongados (Bridges y col., 2010).

Un hallazgo importante de este trabajo de tesis fue la respuesta endocrina diferencial de los CL en los grupos de vacas que fueron incluidas a periodos de proestro de mayor duración (72 h) con respecto al grupo de vacas con periodos cortos (48 h), resultando en mayores concentraciones circulantes de P<sub>4</sub> durante la fase lútea en el grupo I de proestro extendido.

Los mecanismos celulares y moleculares mediante los cuales las modificaciones del tiempo de proestro afectan la fertilidad son pocos comprendidos aún (Pohler y col. 2012). Larimore y col. (2015) expresan que los estrógenos no solo regulan la ovulación, sino que desempeñan un papel central en la reproducción, participando en procesos tales como: la maduración final de los ovocitos, el transporte de gametas, regulación del pH uterino, producción de histotrofo, la expresión de los receptores endometriales de P<sub>4</sub> y preparan a las células foliculares para su posterior luteinización y síntesis de P<sub>4</sub> (Ciernía y col, 2021; Perry y col., 2008).

Los cambios durante el proestro podrían inducir modificaciones en procesos biológicos vitales modulando la función uterina y cualquier cambio en las concentraciones séricas del E<sub>2</sub> puede alterar la calidad del embrión durante sus críticos primeros 15 días de desarrollo (Bridge y col., 2013). Estos resultados coinciden con nuestros hallazgos de una función endocrina diferencial del CL en aquellas vacas que fueron incluidas en un protocolo con tiempo de proestro de 72 horas. Por lo tanto, un ambiente endometrial más favorable para el desarrollo del embrión podría ser el resultado de la mayor tasa de preñez reportada en estos animales tal como lo menciona Binelli y col. (2012).

Con respecto a la evaluación en las concentraciones séricas de E<sub>2</sub> se observó un efecto del tiempo sobre la concentración de E<sub>2</sub>, donde fue evidente un aumento en las concentraciones de la hormona al día 0 del protocolo en coincidencia con el estro de los animales. El grupo III cuyo tratamiento farmacológico incluyó la administración de una sal exógena de E<sub>2</sub> (1 mg de CPE) al momento del retiro del DIV, presentó las concentraciones de E<sub>2</sub> más elevados al momento de la

IA. Además, resulta relevante que ambos tienen un tratamiento farmacológico similar con la diferencia del tiempo extendido de proestro en el grupo I (72 horas) versus el grupo II (48 horas), sin embargo, ambos grupos no presentaron diferencias en las concentraciones de E<sub>2</sub>.

Nuestros datos coinciden con los publicados previamente por Larimore y col. (2015) donde en vacas para carne la extensión del tiempo de proestro da como resultado un período más prolongado de crecimiento del FD, pero a diferencia de este autor nosotros no encontramos diferencias en la actividad esteroideogénica del FD y en las concentraciones séricas de E<sub>2</sub> alcanzadas entre ambos protocolos con igual manejo hormonal pero diferentes tiempos de proestro. Estos datos contrastan parte de nuestra hipótesis de que la extensión del proestro da como resultado un período más prolongado de crecimiento del folículo preovulatorio que mejora la actividad esteroideogénica del folículo y las concentraciones séricas de E<sub>2</sub> pero reafirman nuestra idea inicial de que favorecen la síntesis de P<sub>4</sub> por parte de las células lúteales. Oosthuizen y Lamb (2020) publican un estudio reciente que coincide con nuestros hallazgos en donde los investigadores demostraron que vacas que tuvieron mayor diámetro del FD al momento de la IA, presentaron además un mayor volumen del CL, una mayor concentración plasmática de P<sub>4</sub> 7 días post IATF y un mayor porcentaje de preñez con respecto a las que tenían menor tamaño de FD al momento de la IA.

De acuerdo al trabajo de Farin y col. (1986) las células de la capa granulosa del FD se diferencian en las células lúteas grandes, las cuales son encargadas de sintetizar aproximadamente el 80% de la P<sub>4</sub> producida por el CL en la oveja. Además, el número de células lúteas grandes no se modifica durante la fase lútea y es proporcional a la densidad celular de la estructura precedente que le da origen. En consecuencia, la menor concentración sérica de P<sub>4</sub> después de la ovulación no se debería en un principio al resultado de provenir de un FD de menor diámetro que presenta menor número de células de la granulosa antes de la ovulación que resulta en menos células lúteas

grandes en el CL tal como menciona Perry y col. (2005); podría ser en cambio una consecuencia de una capacidad endocrina diferencial por parte de estas células lúteales.

Han sido postuladas posibles rutas bioquímicas para intentar explicar la mayor concentración sérica de P<sub>4</sub> encontrada en el grupo de animales con periodo prolongado de proestro. La vía esteroidogénica para la producción de E<sub>2</sub> ha sido bien definida en la especie bovina (Larimore, y col., 2016). Este último autor encontró cambios en la función ovárica asociados con concentraciones circulantes de E<sub>2</sub> al momento de la IA. Las enzimas involucradas en las vías esteroidogénicas del folículo y la expresión de receptores de gonadotrofinas necesarias para la producción de E<sub>2</sub> estaban regulados positivamente dentro de todos los folículos antrales en las vacas con alta concentración de E<sub>2</sub> en comparación con las vacas con baja concentración de E<sub>2</sub>.

En este trabajo no encontramos diferencias en la morfometría lútea de los diferentes grupos en estudio. Por el contrario, sí hemos hallado concentraciones de P<sub>4</sub> mayores en las vacas con tiempos prolongados de proestro. Este hallazgo podría ser explicado a partir de una mayor tasa esteroidogénica en las células lúteales previamente expuestas a niveles circulantes de E<sub>2</sub> por un periodo mayor de tiempo. Sin embargo, nuestros datos no coinciden con el trabajo de Pugliesi y col. (2014) que sugiere que el aumento de la secreción de P<sub>4</sub> por parte del ovario de las vacas que ovulan folículos más grandes probablemente se deba al aumento del tamaño del CL más que al aumento de la expresión lútea de genes involucrados en la esteroidogénesis.

En sintonía con lo expuesto, los trabajos de Bollwein (2010) evaluaron los efectos de la duración de la fase preovulatoria sobre el flujo sanguíneo genital determinado por ecografía Doppler antes y después de la ovulación en vacas con diferentes tiempos de proestro; encontrando un efecto marcado sobre el flujo sanguíneo del CL; ya que las vacas que tuvieron un periodo de proestro corto presentaron una disminución de la perfusión lútea durante el diestro siguiente. Esto sugiere que diferencias encontradas cuando se comparan protocolos de IATF similares, pero con

diferentes tiempos de proestro podrían estar relacionadas con una irrigación y angiogénesis lútea menor en aquellos CL que derivan de FD con periodos cortos de proestro, sumado al hecho de luteólisis prematuras mencionado en párrafos anteriores de tesis.

Perry y col. (2005) encontró que vacas para carne que ovularon de folículos  $\leq 13,2$  mm presentaron concentraciones menores de  $P_4$  y un aumento más lento en la curva sérica de  $P_4$  en comparación con las vacas que ovularon folículos más grandes. Este dato fue también relevante en nuestro trabajo ya que los grupos de vacas con tiempo de proestro extendido que presentaron FD mayores al momento de la IA tuvieron una curva de ascenso mayor en las concentraciones séricas de  $P_4$  lo cual también podría explicar las diferencias reportadas en la tasa de gestación obtenidas por IATF cuando se emplean protocolos de sincronización de la ovulación que prolongan el periodo de proestro. Ramos y Binelli (2015) observaron condiciones bioquímicas diferenciales en el medio uterino en vacas que ovularon a partir de folículos más pequeños. Los autores concluyeron que las vacas que ovularon un folículo más pequeño tenían capacidad redox disminuida y consecuentemente aumentaron la peroxidación lipídica en el endometrio generando un ambiente menos favorable para el crecimiento del embrión.

## **5.2. Efecto del tiempo de proestro sobre el ambiente endometrial**

Durante el ciclo estral, el endometrio experimenta cambios en la composición y el estado de diferenciación celular. Estos cambios están regulados principalmente por el  $E_2$ , la  $P_4$ , la oxitocina, y la expresión de los receptores de esteroides. Por lo tanto, el entorno uterino cambia dinámicamente durante el ciclo estral, jugando un papel vital en el reconocimiento materno de la gestación, la elongación y la implantación del embrión, a través de la secreción de nutrientes, factores de crecimiento, agentes inmunosupresores, enzimas e iones que son necesarios para el correcto crecimiento y desarrollo embrionario (Perry y col., 2020).

El presente estudio no encontró diferencias de los tratamientos de IATF en cuanto a la expresión proteica de los receptores de las hormonas esteroideas a nivel uterino en el periodo preimplantacional (día 15). Tampoco se hallaron respuestas diferenciales entre tratamientos en la inmunotinción para los receptores ESR1 y ESR2 a nivel luminal como así tampoco a nivel de las glándulas superficiales y profundas del estroma endometrial.

Nuestros hallazgos coinciden con el trabajo publicado por Perry y col. (2020) en donde las concentraciones de estradiol en el día 0 no influyeron en la expresión génica de los RP, ESR1, ESR2 en el día 16 posovulación. Además, estos autores sugieren que hay muy poca evidencia para indicar que los cambios en la transcripción de los ESR1 o ESR2 podrían ser responsables de la mayor tasa de fertilidad encontrada en aquellos vientres que manifiestan celo versus los que no lo manifiestan al momento de IA.

Martin y col. (2008) realizaron un estudio sobre la detección inmunohistoquímica de RE y RP en glándulas endometriales y estromales durante el ciclo estral en vacas Nelore. Estos autores encontraron que la intensidad de inmunotinción para estos receptores en el epitelio glandular tuvo una variación temporal a lo largo del ciclo estral, siendo su intensidad máxima al momento del estro y durante la fase lútea inicial, siendo mínima la expresión en el día 19 del ciclo estral. Estos datos son similares a los encontrados en nuestros estudios en vacas *Bos taurus* y con los patrones de expresión proteica por inmunotinción reportados por Kimmins y col. (2001) en donde demuestran que la expresión proteica de ER y PR es más alta en el estro y más baja durante la fase lútea final que se corresponde con el periodo de preimplantación. Esto coincide con un trabajo más reciente publicado de Rodríguez y col. (2018) que fue realizado en ganado *Bos indicus*, donde demuestran que la expresión endometrial de RP a nivel endometrial es mínima al final del diestro.

Estos datos refuerzan los publicados previamente por Meikle y col. (2001) cuyos resultados mostraron los efectos positivos de los estrógenos estimulando la expresión endometrial de los

receptores de esteroides ováricos, así como también la acción inhibitoria de las concentraciones plasmáticas de  $P_4$  sobre la expresión de los RP que coinciden con nuestros hallazgos en los cuales no observamos expresión de los receptores de  $P_4$  en las células endometriales epiteliales y células de las glándulas superficiales y profundas del endometrio al día 15 posovulación.

El trabajo de Robinson y col. (2001) aporta información acerca de la regulación de la expresión del ESR1 y del receptor de oxitocina (RO) al comienzo de la preñez en la vaca. Nuestro estudio relacionó el tiempo de proestro sobre la expresión proteica a nivel endometrial de los receptores esteroides sexuales al día 15, pero tal como lo demuestran estos investigadores, la presencia de un embrión no tuvo ningún efecto sobre la expresión del ESR1 en los días 12-14 a nivel del epitelio luminal, glándulas superficiales o el estroma subepitelial, lo cual coincide con el tiempo que realizamos las muestras por biopsias endometriales. Sin embargo, los días 16-18, la expresión e inmunomarcación de los ESR1 aumentaron en el epitelio luminal de las vacas no gestantes, mientras que disminuyeron durante este período en las vacas gestantes, volviéndose indetectables el día 18 ya que el IFN-t suprime la expresión tanto del RO como del ESR1.

Bridges y col. (2012) realizaron un estudio para determinar el efecto de las concentraciones preovulatorias de  $E_2$  sobre las concentraciones de  $P_4$ , el desarrollo embrionario, la síntesis de IFN-t y la expresión génica de receptores de hormonas sexuales durante diferentes momentos del diestro a nivel uterino. Estos autores observaron que la expresión del ARNm del ESR1 en el endometrio uterino fue mayor al día 15 posovulación en aquellas vaquillonas que habían presentado concentraciones mayores de  $E_2$  al momento del estro, estos hallazgos indican que los niveles de  $E_2$  preovulatorio puede tener efectos prolongados sobre la expresión de los RE, que se ha demostrado que regulan la función uterina durante el período de pre implantación del embrión. Estos trabajos podrían explicar las diferencias encontradas por nosotros con el porcentaje de inmunomarcación de las diferentes isoformas del RE ( $\alpha$  y  $\beta$ ) en células del epitelio endometrial,

glándulas superficiales y profundas para el grupo III, que incluyo la administración exógena de sales de estradiol, protocolo convencional. En cambio, en los grupos I y II que presentaron concentraciones de E<sub>2</sub> menores al momento de la ovulación, no se observaron diferencias en la expresión de los ESR1 y ESR2 entre las glándulas y epitelio endometrial.

## **VI. CONCLUSIÓN**

Esta tesis aporta datos comparativos de importancia acerca del efecto del tiempo de proestro sobre la funcionalidad endocrina del ovario y la receptividad uterina durante el periodo preimplantacional en el ganado para carne. Esta información nos permite tener una mejor comprensión de los mecanismos fisiológicos que intervienen en sincronización de la ovulación por parte de los tres protocolos comerciales más empleados en el mundo para inseminar vacas.

Nuestros resultados más relevantes están asociados con las diferencias encontradas con respecto a las concentraciones circulantes de la hormona P<sub>4</sub>. Esta implicancia biológica podría explicar las mayores tasas de preñez reportada en trabajos previos que comparan diferentes protocolos de IATF en bovinos para carne.

La información presentada refuerza el concepto preexistente de que los cambios más relevantes que determinan una mayor fertilidad en los tratamientos hormonales de sincronización de la ovulación con tiempos de proestro extendido ocurren a nivel ovárico.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

- Adams, G. P., Jaiswal, R., Singh, J., & Malhi, P. (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, *69*(1), 72-80.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.026>
- Akison, L. K., & Robker, R. L. (2012). The critical roles of progesterone receptor (PGR) in ovulation, oocyte developmental competence and oviductal transport in mammalian reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*, *47*(SUPPL.4), 288-296.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02088.x>
- Bacha, William, J., Bacha, Linda, M. (2000). *Veterinary Histology* (Lippincott Williams & Wilkins (ed.); 2nd ed.).
- Bauersachs, S., Ulbirsch, S. E., Gross, K., Schmidt, S. E. M., Meyer, H. H. D., Wenigerkind, H., Vermehren, M., Sinowatz, F., Blum, H., & Wolf, E. (2006). Embryo-induced transcriptome changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity. *Reproduction*, *132*(2), 319-331. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00996>
- Beato, M., & Klug, J. (2000). Steroid hormone receptors: An update. *Human Reproduction Update*, *6*(3), 225-236. <https://doi.org/10.1093/humupd/6.3.225>
- Binelli, M., Machado, R., Bergamaschi, M. a C. M., & Bertan, C. M. (2009). Manipulation of ovarian and uterine function to increase conception rates in cattle. *Animal Reproduction*, *6*(1), 125-134.
- Binelli, M., Pugliesi, G., Hoeck, V. V., Sponchiado, M., Ramos, R. S., Oliveira, M. L., França, M. R., D'Alexandri, F. L., Mesquita, F. S., & Membrive, C. M. B. (2014). The role of proestrus on fertility and postovulatory uterine function in the cow. *Animal Reproduction*, *11*(3), 246-253.
- Bishop, C. V., & Stormshak, F. (2008). Non-genomic actions of progesterone and estrogens in

- regulating reproductive events in domestic animals. *Veterinary Journal*, 176(3), 270-280.  
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.05.014>
- Bo, Gabriel; Baruselli, Pietro; Mapletoft, R. (2013). Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. *Animal Reproduction*, 10(3), 137-142.
- Bó, G. A., & Cedeño, A. (2018). Expression of estrus as a relevant factor in fixed-time embryo transfer programs using estradiol/progesterone-based protocols in cattle. *Animal Reproduction*, 15(3), 224-230. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0060>
- Bó, G. A., Huguenine, E., de la Mata, J. J., Núñez-Olivera, R., Baruselli, P. S., & Menchaca, A. (2018). Programs for fixed-time artificial insemination in South American beef cattle. *Animal Reproduction*, 15(Irrs), 952-962. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0025>
- Bollwein, H., Prost, D., Ulbrich, S. E., Niemann, H., & Honnens, A. (2010). Effects of a shortened preovulatory follicular phase on genital blood flow and endometrial hormone receptor concentrations in Holstein-Friesian cows. *Theriogenology*, 73, 242-249.
- Bramley, T. (2003). Non-genomic progesterone receptors in the mammalian ovary: Some unresolved issues. *Reproduction*, 125(1), 3-15. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1250003>
- Bridges, G. A., Day, M. L., Geary, T. W., & Cruppe, L. H. (2013). Triennial Reproduction Symposium : Deficiencies in the uterine environment and failure to support embryonic development 1. *Journal of Animal Science*, 91(7), 3002-3013.  
<https://doi.org/10.2527/jas2013-5882>
- Bridges, G. A., Helser, L. A., Grum, D. E., Mussard, M. L., Gasser, C. L., & Day, M. L. (2008). Decreasing the interval between GnRH and PGF2 $\alpha$  from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology*, 69(7), 843-851.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.12.011>

Bridges, G. A., Mussard, M. L., Burke, C. R., & Day, M. L. (2010). Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. *Animal Reproduction Science*, 117(3-4), 208-215. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.05.002>

Bridges, G. A., Mussard, M. L., Pate, J. L., Ott, T. L., Hansen, T. R., & Day, M. L. (2012). Impact of preovulatory estradiol concentrations on conceptus development and uterine gene expression. *Animal Reproduction Science*, 133(1-2), 16-26.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.06.013>

Brooks, K., Burns, G., & Spencer, T. E. (2014). Conceptus elongation in ruminants: Roles of progesterone, prostaglandin, interferon tau and cortisol. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 5(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-5-53>

Buhi, W. C. (2002). Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. En *Reproduction* (Vol. 123, Número 3, pp. 355-362).

<https://doi.org/10.1530/rep.0.1230355>

Ciernia, L. A., Perry, G. A., Smith, M. F., Rich, J. J., Northrop, E. J., Perkins, S. D., Green, J. A., Zezeski, A. L., & Geary, T. W. (2021). Effect of estradiol preceding and progesterone subsequent to ovulation on proportion of postpartum beef cows pregnant. *Animal Reproduction Science*, 227(August 2020), 106723.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106723>

Colazo, Marcos G, & Mapletoft, R. J. (2014). A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle. *Canadian Veterinary Journal*, 55(8), 772-780.

Colazo, Marcos Germán, Kastelic, J. P., & Mapletoft, R. J. (2003). Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based,

- fixed-time AI programs in beef heifers. *Theriogenology*, 60(5), 855-865.  
[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00091-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00091-8)
- Conneely, O. M.-J. B. D. F., & Lydon, J. (2002). Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent progress in hormone research*, 339-356.
- Cooke, R. F., Pohler, K. G., Vasconcelos, J. L. M., & Cerri, R. L. A. (2019). Estrous expression during a fixed-time artificial insemination protocol enhances development and interferon-tau messenger RNA expression in conceptuses from *Bos indicus* beef cows. *Animal*, 13(11), 2569-2575. <https://doi.org/10.1017/S1751731119000636>
- Dadarwal, D., Mapletoft, R. J., Adams, G. P., Pfeifer, L. F. M., Creelman, C., & Singh, J. (2013). Effect of progesterone concentration and duration of proestrus on fertility in beef cattle after fixed-time artificial insemination. *Theriogenology*, 79(5), 859-866.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.01.003>
- Davoodi, S., Cooke, R. F., Fernandes, A. C. C., Cappellozza, B. I., Vasconcelos, J. L. M., & Cerri, R. L. A. (2016). Expression of estrus modifies the gene expression profile in reproductive tissues on Day 19 of gestation in beef cows. *Theriogenology*, 85(4), 645-655.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.002>
- Day, M. L. (2015). State of the art of GnRH-based timed AI in beef cattle. *Anim. Reprod*, v, 12(3), 473-478.
- De La Mata, J. J., Núñez-Olivera, R., Cuadro, F., Bosolasco, D., De Brun, V., Meikle, A., Bó, G. A., & Menchaca, A. (2018). Effects of extending the length of pro-oestrus in an oestradiol- and progesterone-based oestrus synchronisation program on ovarian function, uterine environment and pregnancy establishment in beef heifers. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(11), 1541-1552. <https://doi.org/10.1071/RD17473>

- Díaz, P. U., Rey, F., Gareis, N. C., Notaro, U. S., Matiller, V., Belotti, E. M., Stassi, A. F., Salvetti, N. R., & Ortega, H. H. (2018). Altered Expression of Anti-Müllerian Hormone during the Early Stage of Bovine Persistent Ovarian Follicles. *Journal of Comparative Pathology*, 158, 22-31. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2017.10.175>
- Díaz, Pablo U., Stangaferro, M. L., Gareis, N. C., Silvia, W. J., Matiller, V., Salvetti, N. R., Rey, F., Barberis, F., Cattaneo, L., & Ortega, H. H. (2015). Characterization of persistent follicles induced by prolonged treatment with progesterone in dairy cows: An experimental model for the study of ovarian follicular cysts. *Theriogenology*, 84(7), 1149-1160. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.06.015>
- Dickinson, S. E., Geary, T. W., Monnig, J. M., Pohler, K. G., Green, J. A., & Smith, M. F. (2016). Effect of preovulatory follicle maturity on pregnancy establishment in cattle: the role of oocyte competence and the maternal environment. *Animal Reproduction*, 13(3), 209-216. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR879>
- Diskin, M. G., & Morris, D. G. (2008). Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(SUPPL.2), 260-267. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01171.x>
- Dorniak, P., Bazer, F. W., & Spencer, T. E. (2013). Physiology and endocrinology symposium: Biological role of interferon tau in endometrial function and conceptus elongation. *Journal of Animal Science*, 91(4), 1627-1638. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5845>
- Espejel, M.; Medrano, A. (2017). Histological Cyclic Endometrial Changes in Dairy Cows: An Overview. *Journal of Dairy & Veterinary Sciences*, 2(1), 10-12. <https://doi.org/10.19080/jdvs.2017.02.555577>

- Farin CE, Moeller CL, Sawyer HR, Gamboni F, Niswender GD. Morphometric analysis of cell types in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. *Biol Reprod.* 1986 Dec;35(5):1299-308. doi: 10.1095/biolreprod35.5.1299. PMID: 3828439.
- Ferraz, P. A., Loiola, M. V. G., Rodrigues, A. S., Lima, M. C. C., de Bittencourt, T. C. B. dos S. C., & Ribeiro Filho, A. de L. (2017). The effect of the intensity of estrus expression on the follicular diameter and fertility of nellore cows managed under a ftai program. *Ciencia Animal Brasileira*, 18(1), 1-9. <https://doi.org/10.1590/1089-6891v18e-37643>
- Filant, J., & Spencer, T. E. (2014). Uterine glands: Biological roles in conceptus implantation, uterine receptivity and decidualization. En *International Journal of Developmental Biology* (Vol. 58, Números 2-4, pp. 107-116). <https://doi.org/10.1387/ijdb.130344ts>
- Filho, M. F. S., Santos, J. E. P., Ferreira, R. M., Sales, J. N. S., & Baruselli, P. S. (2011). Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol / progesterone-based timed insemination protocols. *THE*, 76(3), 455-463. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.022>
- Forde, N., Beltman, M. E., Lonergan, P., Diskin, M., Roche, J. F., & Crowe, M. A. (2011). Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 124(3-4), 163-169. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.025>
- Forde, N., Carter, F., Fair, T., Crowe, M. A., Evans, A. C. O., Spencer, T. E., Bazer, F. W., McBride, R., Boland, M. P., O'Gaora, P., Lonergan, P., & Roche, J. F. (2009). Progesterone-Regulated Changes in Endometrial Gene Expression Contribute to Advanced Conceptus Development in Cattle<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, 81(4), 784-794. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.074336>
- Forde, Niamh, & Lonergan, P. (2012). Transcriptomic analysis of the bovine endometrium:

What is required to establish uterine receptivity to implantation in cattle? En *Journal of Reproduction and Development* (Vol. 58, Número 2, pp. 189-195).

<https://doi.org/10.1262/jrd.2011-021>

Frasinelli, C.A.; Casagrande, H.J. y Veneciano, J.H. La condición corporal como herramienta de manejo en rodeos de cría bovina. EEA San Luis, 2004. 17 p. (Información Técnica n° 168)

França, M. R., Mesquita, F. S., Lopes, E., Pugliesi, G., Van Hoeck, V., Chiaratti, M. R., Membrive, C. B., Papa, P. C., & Binelli, M. (2015). Modulation of periovulatory endocrine profiles in beef cows: Consequences for endometrial glucose transporters and uterine fluid glucose levels. *Domestic Animal Endocrinology*, 50, 83-90.

<https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2014.09.005>

França, Moana Rodrigues, da Silva, M. I. S., Pugliesi, G., Van Hoeck, V., & Binelli, M. (2017). Evidence of endometrial amino acid metabolism and transport modulation by peri-ovulatory endocrine profiles driving uterine receptivity. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0185-1>

Galosi, C., Monteavar, C., Portiansky, E., Zanuzzi, C., Eöry, M., Fuentealba, N., Woudwyk, M., Andrés, P., Ocampos, G., Flamini, M., & Gimeno, E. (2010). *Patología placentaria: conocimientos generados por estudios experimentales*. April, 87-116.

Garcia, Sacristan. (2018). *Fisiología veterinaria*. Editorial Tebar Flores.

Hafez, E. S. E. and B. H. (2000). Reproducción e Inseminación Artificial en animales. En *Séptima Edición. McGraw-Hill* (7°). McGraw-Hill Interamericana.

Herzog, K., Brockhan-Lüdemann, M., Kaske, M., Beindorff, N., Paul, V., Niemann, H., & Bollwein, H. (2010). Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. *Theriogenology*, 73(5), 691-697.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.016>

Jinks, E. M., Smith, M. F., Atkins, J. A., Pohler, K. G., Perry, G. A., MacNeil, M. D., Roberts, A. J., Waterman, R. C., Alexander, L. J., & Geary, T. W. (2013). Preovulatory estradiol and the establishment and maintenance of pregnancy in suckled beef cows. *Journal of Animal Science*, *91*(3), 1176-1185. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5611>

Kimmins, S., & Maclaren, L. A. (2001). Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta*, *22*(8-9), 742-748. <https://doi.org/10.1053/plac.2001.0708>

Kuiper, G. G. J. M., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Häggblad, J., Nilsson, S., & Gustafsson, J. Å. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors and  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology*, *138*(3), 863-870. <https://doi.org/10.1210/endo.138.3.4979>

Kuiper, G. G. J. M., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., & Gustafsson, J. Å. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(12), 5925-5930. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.5925>

Larimore, E. L., Amundson, O. L., Bird, S. L., Funnell, B. J., Kruse, S. G., Bridges, G. A., & Perry, G. A. (2015). Influence of estrus at fixed-time artificial insemination on early embryonic development in beef cattle. *Journal of Animal Science*, *93*(6), 2806-2812. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-8892>

Larimore, E. L., Amundson, O. L., Bridges, G. A., McNeel, A. K., Cushman, R. A., & Perry, G. A. (2016). Changes in ovarian function associated with circulating concentrations of estradiol before a GnRH-induced ovulation in beef cows. *Domestic Animal Endocrinology*,

57(June), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2016.06.001>

Lenis Y, Olivera M, Tarazona A. Señales moleculares que afectan la síntesis de PGF2  $\alpha$  y PGE2 en el endometrio bovino. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2010; 23:377-389

Loneragan, P., O'Hara, L., & Forde, N. (2013). Role of diestrus progesterone on endometrial function and conceptus development in cattle. *Animal Reproduction*, 10(3), 223-227.

López, A., Gómez, L., Ruiz Cortés, Z., Olivera, M., & Giraldo, C. (2008). Reconocimiento materno de la preñez e implantación del embrión bovino: modelo bovino. *Analecta Veterinaria*, 28(1), 42-47.

Mann, G. E., & Lamming, G. E. (2000). The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrous cycle in the cow. *Animal Reproduction Science*, 64(3-4), 171-180. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00205-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00205-0)

Martin, I.; Torres Neto, R.; Oba, E.; Buratini, J.; Binelli, M.; Laufer-Amorim, R.; Ferreira, J.C.P. Immunohistochemical Detection of Receptors for Oestrogen and Progesterone in Endometrial Glands and Stroma during the Oestrous Cycle in Nelore (*Bos taurus indicus*) Cows. *Reprod. Domest. Anim.* 2008, 43, 415–421

Martínez, M. F., Kastelic, J. P., Adams, G. P., Cook, B., Olson, W. O., & Mapletoft, R. J. (2002). The use of progestins in regimens for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Theriogenology*, 57(3), 1049-1059. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00682-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00682-3)

McNeill, R. E., Sreenan, J. M., Diskin, M. G., Cairns, M. T., Fitzpatrick, R., Smith, T. J., & Morris, D. G. (2006a). Effect of systemic progesterone concentration on the expression of progesterone-responsive genes in the bovine endometrium during the early luteal phase. *Reproduction, Fertility and Development*, 18(5), 573-583. <https://doi.org/10.1071/RD05100>

- Meikle, A., Sahlin, L., Ferraris, A., Masironi, B., Blanc, J. E., Rodríguez-Irazoqui, M., Rodríguez-Piñón, M., Kindahl, H., & Forsberg, M. (2001). Endometrial mRNA expression of oestrogen receptor  $\alpha$ , progesterone receptor and insulin-like growth factor-I (IGF-I) throughout the bovine oestrous cycle. *Animal Reproduction Science*, *68*(1-2), 45-56.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00143-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00143-9)
- Mesquita F. S., Pugliesi G., Scolari S. C., França M. R., Ramos R. S., Oliveira M., et al. (2014). Manipulation of the Perioovulatory Sex Steroidal Milieu Affects Endometrial But Not Luteal Gene Expression in Early Diestrus Nelore Cows. *Theriogenology* *81*, 861–869.  
doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.12.022
- Mitko, K., Ulbrich, S. E., Wenigerkind, H., Sinowatz, F., Blum, H., Wolf, E., & Bauersachs, S. (2008). Dynamic changes in messenger RNA profiles of bovine endometrium during the oestrous cycle. *Reproduction*, *135*(2), 225-240. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0415>
- Nogueira, E., Silva, M. R., Silva, J. C. B., Abreu, U. P. G., Anache, N. A., Silva, K. C., Cardoso, C. J. T., Sutovsky, P., & Rodrigues, W. B. (2019). Timed artificial insemination plus heat I: Effect of estrus expression scores on pregnancy of cows subjected to progesterone-estradiol-based protocols. *Animal*, *13*(10), 2305-2312.  
<https://doi.org/10.1017/S1751731119000442>
- Okumu, L. A., Forde, N., Fahey, A. G., Fitzpatrick, E., Roche, J. F., Crowe, M. A., & Lonergan, P. (2010). The effect of elevated progesterone and pregnancy status on mRNA expression and localisation of progesterone and oestrogen receptors in the bovine uterus. *Reproduction*, *140*(1), 143-153. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0113>
- Oliveira, L. J., Mansourri-Attia, N., Fahey, A. G., Browne, J., Forde, N., Roche, J. F., Lonergan, P., & Fair, T. (2013). Characterization of the Th Profile of the Bovine Endometrium during the Oestrous Cycle and Early Pregnancy. *PLoS ONE*, *8*(10), 1-13.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075571>

- Oosthuizen, N., Cooke, R. F., Schubach, K. M., Fontes, P. L. P., Brandão, A. P., Oliveira Filho, R. V., Colombo, E. A., Franco, G. A., Reese, S., Pohler, K. G., & Lamb, G. C. (2020). Effects of estrous expression and intensity of behavioral estrous symptoms on variables associated with fertility in beef cows treated for fixed-time artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, 214(February). <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106308>
- Ortega, H. H., Palomar, M. M., Acosta, J. C., Salvetti, N. R., Dallard, B. E., Lorente, J. A., Barbeito, C. G., & Gimeno, E. J. (2008). Insulin-like growth factor I in sera, ovarian follicles and follicular fluid of cows with spontaneous or induced cystic ovarian disease. *Research in Veterinary Science*, 84(3), 419-427. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.05.010>
- Pereira, M. H. C., Wiltbank, M. C., & Vasconcelos, J. L. M. (2016). Expression of estrus improves fertility and decreases pregnancy losses in lactating dairy cows that receive artificial insemination or embryo transfer. *Journal of Dairy Science*, 99(3), 2237-2247. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9903>
- Perry, G. A., Smith, M. F., Roberts, A. J., MacNeil, M. D., & Geary, T. W. (2007). Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *Journal of Animal Science*, 85(3), 684-689. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-519>
- Perry, G. A., Swanson, O. L., Larimore, E. L., Perry, B. L., Djira, G. D., & Cushman, R. A. (2014). Relationship of follicle size and concentrations of estradiol among cows exhibiting or not exhibiting estrus during a fixed-time AI protocol. *Domestic Animal Endocrinology*, 48(1), 15-20. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2014.02.001>
- Perry, George A., Cushman, R. A., Perry, B. L., Schiefelbein, A. K., Northrop, E. J., Rich, J. J., & Perkins, S. D. (2020). Role of preovulatory concentrations of estradiol on timing of

- conception and regulation of the uterine environment in beef cattle. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 66(1), 12-25. <https://doi.org/10.1080/19396368.2019.1695979>
- Perry, George A., Smith, M. F., Lucy, M. C., Green, J. A., Parks, T. E., MacNeil, M. D., Roberts, A. J., & Geary, T. W. (2005). Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(14), 5268-5273. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501700102>
- Pohler KG, Geary TW, Atkins JA, Perry GA, Jinks EM, Smith MF. Follicular determinants of pregnancy establishment and maintenance. *Cell Tissue Res*. 2012 Sep;349(3):649-64. doi: 10.1007/s00441-012-1386-8.
- Pugliesi, G., Oliveira, M., Papa, P. C., Meirelles, F. V., & Binelli, M. (2014). Manipulation of the periovulatory sex steroidal milieu affects endometrial but not luteal gene expression in early diestrus Nelore cows. *Theriogenology*, 81(6), 861-869. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.12.022>
- Ramos, R. S., Oliveira, M. L., Izaguirry, A. P., Vargas, L. M., Soares, M. B., Mesquita, F. S., Santos, F. W., & Binelli, M. (2015). The periovulatory endocrine milieu affects the uterine redox environment in beef cows. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0036-x>
- Rey, F., Rodríguez, F. M., Salvetti, N. R., Palomar, M. M., Barbeito, C. G., Alfaro, N. S., & Ortega, H. H. (2010). Insulin-like growth factor-ii and insulin-like growth factor-binding proteins in bovine cystic ovarian disease. *Journal of Comparative Pathology*, 142(2-3), 193-204. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2009.11.002>
- Roa, I., Smok, S. C., & Prieto, G. R. (2012). Placenta: Anatomía e histología comparada. *International Journal of Morphology*, 30(4), 1490-1496. <https://doi.org/10.4067/S0717->

95022012000400036

- Robinson, R. S., Hammond, A. J., Wathes, D. C., Hunter, M. G., & Mann, G. E. (2008). Corpus Luteum-Endometrium-Embryo Interactions in the Dairy Cow: Underlying Mechanisms and Clinical Relevance. *Reproduction in Domestic Animals*, *43*(SUPPL.2), 104-112.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01149.x>
- Robinson, R. S., Mann, G. E., Lamming, G. E., & Wathes, D. C. (2001). Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction*, *122*(6), 965-979.  
<https://doi.org/10.1530/rep.0.1220965>
- Rodrigues, A. D., Cooke, R. F., Cipriano, R. S., Silva, L. G. T., Cerri, R. L. A., Cruppe, L. H., Meneghetti, M., Pohler, K. G., & Vasconcelos, J. L. M. (2018). Impacts of estrus expression and intensity during a timed-ai protocol on variables associated with fertility and pregnancy success in bos indicus-influenced beef cows<sup>1</sup>. *Journal of Animal Science*, *96*(1), 236-249. <https://doi.org/10.1093/jas/skx043>
- Sağsöz, H., Ketani, M. A., & Saruhan, B. G. (2012). Expression of the erbB/HER receptor family in the bovine uterus during the sexual cycle and the relation of this family to serum sex steroids. *Biotechnic and Histochemistry*, *87*(2), 105-116.  
<https://doi.org/10.3109/10520295.2011.556666>
- Salvetti, N. R., Baravalle, C., Mira, G. A., Gimeno, E. J., Dallard, B. E., Rey, F., & Ortega, H. H. (2009). Heat shock protein 70 and sex steroid receptors in the follicular structures of induced ovarian cysts. *Reproduction in Domestic Animals*, *44*(5), 805-814.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01086.x>
- Salvetti, Natalia R., Stangaferro, M. L., Palomar, M. M., Alfaro, N. S., Rey, F., Gimeno, E. J., &

- Ortega, H. H. (2010). Cell proliferation and survival mechanisms underlying the abnormal persistence of follicular cysts in bovines with cystic ovarian disease induced by ACTH. *Animal Reproduction Science*, 122(1-2), 98-110.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.003>
- Sánchez, J. M., Simintiras, C. A., & Lonergan, P. (2019). Aspects of embryo-maternal communication in establishment of pregnancy in cattle. *Animal Reproduction*, 16(3), 376-385. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0075>
- Sanz, A., Macmillan, K., & Colazo, M. G. (2019). A review of the ovarian synchronization programs based on the use of gonadotrophin releasing hormone and prostaglandin F2 $\alpha$  for dairy and beef heifers. *ITEA Informacion Tecnica Economica Agraria*, 115(4), 326-341.  
<https://doi.org/10.12706/itea.2019.002>
- Schams D, Berisha B. 2002. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol*. 23: 53-65.
- Simintiras, C. A., Sánchez, J. M., McDonald, M., & Lonergan, P. (2019). The influence of progesterone on bovine uterine fluid energy, nucleotide, vitamin, cofactor, peptide, and xenobiotic composition during the conceptus elongation-initiation window. *Scientific Reports*, 9(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44040-6>
- Spencer, T. E., Johnson, G. A., Burghardt, R. C., & Bazer, F. W. (2004). *Progesterone and Placental Hormone Actions on the Uterus : Insights from Domestic Animals*. 10(February), 2-10. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.024133>
- Spencer, T. E., Sandra, O., & Wolf, E. (2008). Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: Insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction*, 135(2), 165-179. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0327>

- Stevenson, J. S., & Lamb, G. C. (2016). Contrasting effects of progesterone on fertility of dairy and beef cows 1 , 2. *Journal of Dairy Science*, 1-14. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10130>
- Wang, C. K., Robinson, R. S., Flint, A. P. F., & Mann, G. E. (2002). *Quantitative analysis of changes in endometrial gland morphology during the bovine oestrous cycle and their association with progesterone levels*. <https://doi.org/10.1530/REP-06-0133>
- Wang, C. K., Robinson, R. S., Flint, A. P. F., & Mann, G. E. (2007). Quantitative analysis of changes in endometrial gland morphology during the bovine oestrous cycle and their association with progesterone levels. *Reproduction*, 134(2), 365-371. <https://doi.org/10.1530/REP-06-0133>
- Whittier, W. D., Currin, J. F., Schramm, H., Holland, S., & Kasimanickam, R. K. (2013). Fertility in Angus cross beef cows following 5-day CO-Synch + CIDR or 7-day CO-Synch + CIDR estrus synchronization and timed artificial insemination. *Theriogenology*, 80(9), 963-969. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.019>
- Wiltbank, M. C., & Pursley, J. R. (2014). Theriogenology The cow as an induced ovulator : Timed AI after synchronization of ovulation. *Theriogenology*, 81(1), 170-185. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.017>
- Zar JH. (1984). Biostatistical analysis. Prentice-Hall International Editions, New Jersey.

