



UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA



MASTER INTERUNIVERSITARIO EN MEJORA GENÉTICA  
ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

**Comparación De Diferentes Métodos De  
Evaluación De La Funcionalidad Del Cuerpo  
Lúteo En Vacas Frisonas (*Bos Taurus*) Con  
Luteólisis Inducida: Ecografía Modo B y Color**

Tesis de Master  
Valencia, Julio 2013

**Antonio Vinicio Murillo Ríos**

Director:  
Luis Ángel Quintela Arias





**Departamento de Patoloxía Animal**

Facultade de Veterinaria  
Campus Universitario, s/n  
27002 LUGO (España)  
Tel. centraliña: 982285900  
Tel. directo: 982252350(+extensión)  
Fax: 982252195

D. Luis Ángel Quintela Arias, Profesor Titular del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela

INFORMA:

Qué el trabajo de fin de Máster titulado “**Comparación De Diferentes Métodos De Evaluación De La Funcionalidad Del Cuerpo Lúteo En Vacas Frisonas (*Bos Taurus*) Con Luteólisis Inducida: Ecografía Modo B y Color**”, del que es autor el Licenciado en Veterinaria D. **Antonio Vinicio Murillo Ríos**, ha sido realizado bajo mi tutela en el Departamento de Patología Animal de la Universidad de Santiago de Compostela y, en mi opinión, reúne todas las condiciones necesarias para optar al título de Máster.

Y para que conste y a los efectos oportunos, firmo el presente informe en Lugo a 26 de junio de 2013.

Fdo.: Luis A. Quintela Arias

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres y hermana por ser mi fuente de inspiración y admiración, por todos los ánimos y cariño que hicieron de la distancia una palabra inexistente.

Al tutor de este trabajo Dr. Luis A. Quintela, por permitirme ser parte de su trabajo profesional, por la confianza, la paciencia, opiniones y consejos, que me sirvieron para dar los primeros pasos en la carrera de investigación.

A los profesores de la unidad de obstetricia y reproducción Mónica, Juan, Ana y Pedro por el gran apoyo brindado desde el primer día, por la cordialidad y por permitirme ser parte de sus prácticas en las cuales aprendí y disfrute mucho.

Agradezco a todas las entidades y personas implicadas en la organización del máster interuniversitario en Mejora Genética Animal y Biotecnología de la Reproducción en especial al Profesor Agustín Blasco, Profesor Armand Sánchez y Dr. José Vicente por la genialidad y dedicación al arte de enseñar.

Al Gobierno de la República del Ecuador a través de la Secretaria Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación, por el acertado desarrollo de los programas de becas, sin lugar a dudas la inversión en talento humano es el camino a seguir en pro de un mejor país.

Al Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca del Ecuador, por permitirme conocer la realidad ganadera y trabajar para su desarrollo.

A mis compañeros del máster quienes hicieron que esta etapa de la vida fuera realmente amena y con quienes compartimos experiencias inolvidables.

A todos mis amigos y amigas, quienes cerca o lejos siempre estuvieron en los buenos y malos momentos de mi vida, por su gran afecto y apoyo constante.

---

**ÍNDICE DE CONTENIDOS**

<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Principios de la ecografía</b> .....	<b>3</b>
1.1.1. Ecografía Modo B tiempo real.....	3
1.1.2. Ecografía Doppler Color.....	6
1.1.3. Ecografía Doppler Potencia.....	8
<b>1.2. Ecografía y control reproductivo</b> .....	<b>9</b>
<b>1.2.1. Ecografía modo B</b> .....	<b>9</b>
1.2.1.1. Folículos.....	9
1.2.1.2. Cuerpo Lúteo.....	9
<b>1.2.2. Ecografía Doppler color</b> .....	<b>10</b>
1.2.2.1. Folículos.....	10
1.2.2.2. Cuerpo Lúteo.....	11
<b>1.3. Fases del ciclo estral en la vaca</b> .....	<b>11</b>
<b>1.3.1. Fase Folicular</b> .....	<b>12</b>
1.3.1.1. Proestro.....	12
1.3.1.2. Estro.....	13
<b>1.3.2. Ovulación</b> .....	<b>13</b>
<b>1.3.3. Fase Lútea</b> .....	<b>13</b>
1.3.3.1. Metaestro.....	14
1.3.3.2. Diestro.....	15
<b>1.4. Regresión Lútea</b> .....	<b>15</b>
<b>1.5. Prostaglandinas</b> .....	<b>17</b>
<b>2. Objetivo</b> .....	<b>19</b>
<b>3. Material y métodos</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1. Animales</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2. Diseño del estudio</b> .....	<b>22</b>
<b>3.3. Ecografía y análisis de imagen</b> .....	<b>23</b>
<b>3.4. Muestras Sanguíneas</b> .....	<b>24</b>
<b>3.5. Diseño estadístico</b> .....	<b>25</b>
<b>4. Resultados</b> .....	<b>26</b>
<b>4.1. Animales</b> .....	<b>27</b>
<b>4.2. Evolución de Progesterona, tamaño (diámetro mayor y superficie) y flujo vascular (objetivo y subjetivo) del cuerpo lúteo durante luteólisis inducida</b> .....	<b>27</b>
<b>4.3. Comparación entre los diferentes métodos de evaluación de la funcionalidad del cuerpo lúteo</b> .....	<b>32</b>
<b>5. Discusión</b> .....	<b>35</b>
<b>5.1. Variación en el tiempo</b> .....	<b>36</b>
<b>5.2. Comparación entre métodos utilizando P<sub>4</sub> como referencia de funcionalidad</b> .....	<b>37</b>
<b>6. Conclusiones</b> .....	<b>40</b>
<b>7. Referencias Bibliográficas</b> .....	<b>42</b>

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Evolución de las diferentes medidas de funcionalidad del cuerpo lúteo en las 72 horas posteriores a la inducción de la luteólisis.....	<b>28</b>
Tabla 2.- Porcentaje de cambio de las diferentes medidas de funcionalidad del cuerpo lúteo en las 72 horas posteriores a la inducción de la luteólisis.....	<b>29</b>
Tabla 3.- Correlación entre los diferentes métodos de evaluación de la funcionalidad del cuerpo lúteo.....	<b>34</b>

**INDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Efecto de compresión y rarefacción en las ondas ecográficas.....	4
Figura 2. Emisión y recepción de haces de ultrasonido con un transductor piezoeléctrico lineal (1), Amplificador (2), Monitor (3).....	5
Figura 3. Efecto Doppler. A. ondas emitidas y reflejadas hacia y desde hematíes en los vasos sanguíneos. B. Angulo de inclinación y su resultado en la medición doppler.....	6
Figura 4. Diseño de estudio.....	22
Figura 5. Medidas del tamaño del cuerpo lúteo: diámetro mayor y superficie.....	23
Figura 6. Escala de valoración subjetiva del flujo vascular en el cuerpo lúteo.....	24
Figura 7. Análisis objetivo del flujo vascular en el CL mediante el programa ImageJ.....	24
Figura 8. Secuencia de imágenes ecográficas en la vaca nº 23. Modo Doppler-Potencia del flujo vascular en el CL tras la inducción de luteólisis con PGF <sub>2</sub> α.....	38
Figura 9. Secuencia de imágenes ecográficas Modo-B en la vaca nº 23. Medición de diámetro mayor y superficie del CL tras la inducción de luteólisis con PGF <sub>2</sub> α.....	38

**INDICE DE GRAFICAS**

Gráfica 1.- Comparación entre el cambio en la concentración de progesterona y la superficie del cuerpo lúteo en las 72 horas posteriores a la administración de la prostaglandina. ....	30
Gráfica 2.- Comparación entre el cambio en la concentración de progesterona y el diámetro mayor del cuerpo lúteo en las 72 horas posteriores a la administración de la prostaglandina. ....	30
Gráfica 3.- Comparación entre el cambio en la concentración de progesterona y el flujo vascular objetivo del cuerpo lúteo en las 72 horas posteriores a la administración de la prostaglandina. ....	31
Gráfica 4.- Comparación entre el cambio en la concentración de progesterona y el flujo vascular subjetivo del cuerpo lúteo en las 72 horas posteriores a la administración de la prostaglandina. ....	31
Gráfica 5.- Porcentaje de cambio, respecto a la hora 0, de las diferentes medidas a lo largo del tiempo. ....	32
Gráfica 6.- Comparación entre las dos medidas de tamaño del cuerpo lúteo en las 72 horas posteriores a la administración de la prostaglandina.....	33
Gráfica 7.- Comparación entre los dos métodos de evaluar el flujo vascular del cuerpo lúteo en las 72 horas posteriores a la administración de la prostaglandina.....	33
Gráfica 8.- Comparación entre la superficie y el flujo vascular subjetivo del cuerpo lúteo en las 72 horas posteriores a la administración de la prostaglandina. ....	34

## ABREVIATURAS

CL: Cuerpo lúteo

FVL: flujo vascular luteal

FV: flujo vascular

FVO: flujo vascular objetivo

FVS: flujo vascular subjetivo

GnRH: hormona liberadora de gonadotropina.

LH: hormona luteinizante

FSH: hormona folículo estimulante

DMaCL: diámetro mayor de cuerpo lúteo

SCL: superficie de cuerpo lúteo

P<sub>4</sub>: progesterona

E<sub>2</sub>: estrógenos

PG: prostaglandina

PGs: prostaglandinas

PGE: prostaglandina E

PGF<sub>2</sub>α: prostaglandina F<sub>2</sub> alfa

PGDH: prostaglandina deshidrogenasa

NO: óxido nítrico

COX: ciclooxigenasa (1, 2)

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

GLM: modelo lineal general

ANOVA: análisis de varianza

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar diferentes métodos para valorar la funcionalidad del CL de la vaca durante la regresión inducida con prostaglandinas. Los métodos utilizados fueron la medida del tamaño luteal (diámetro mayor y superficie de cuerpo lúteo) evaluados mediante ecografía modo B tiempo real y el flujo vascular objetivo y subjetivo mediante ecografía Doppler Potencia. La medida de referencia utilizada fue la Progesterona sérica. Para llevar a cabo este trabajo se utilizaron 30 vacas Frisonas no lactantes, en diestro (CL >1,85 y presencia de FV) a las cuales se les administro una dosis de un análogo de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  (150  $\mu$ g Cloprostenol, Dalmazin®, Fatro Ibérica, Barcelona, España).

Desde ese momento y a las 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas se realizaron exploraciones ecográficas del CL, midiendo el diámetro mayor, la superficie y determinando el flujo vascular de forma objetiva (porcentaje de la superficie del CL coloreada) y subjetiva. A las mismas horas se tomaron muestras de sangre de la vena coccígea para la determinación de la progesterona sérica que fue analizada mediante análisis de ELISA. Los datos obtenidos fueron analizados mediante un Modelo Lineal General de medidas repetidas, tanto los valores absolutos como los relativos (porcentaje de cambio respecto a la hora 0).

El 90% de las vacas respondieron al tratamiento con  $PGF_{2\alpha}$  iniciando la luteólisis. El tamaño del CL, ya sea midiendo la superficie o el diámetro mayor, se redujo en las horas posteriores a la administración de la PG, más rápido en el caso de la superficie. El FV, sin embargo, se incrementó en las primeras horas para descender posteriormente, sin diferencias entre la valoración subjetiva y objetiva ( $p < 0.05$ ). La medida que mostro más semejanza con la evolución de la P4 fue la SCL ( $p > 0.05$ ).

En conclusión, la medida que más se relaciona con la funcionalidad del CL, determinada en base a los niveles séricos de P4, fue la superficie del CL. El FV determinado por Doppler-Potencia, muestra un aumento inicial y proporciona información adicional acerca de la función lútea.

**ABSTRACT**

The aim of this study was to evaluate different methods to assess the functionality of the corpus luteum in the cow during regression induced with prostaglandins. The methods used were the measure of size (largest diameter and corpus luteum surface) evaluated by B-mode real-time ultrasound and blood flow (objective and subjective) by Power Doppler ultrasound. The reference measure used was the serum progesterone ( $P_4$ ). To carry out this study 30 non-lactating Friesian cows in diestrus stage ( $CL > 1.85$  and presence of PV) were used, at which a dose of an analogue of prostaglandin  $PGF_{2\alpha}$  (150 ug cloprostenol, Dalmazin ®, Fatro Iberia, Barcelona, Spain) was administered.

From then on, the CL at 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 and 72 hours was examined by ultrasound, measuring largest diameter, surface and determining blood flow objectively (percentage of colored CL surface) and subjectively. At the same time blood samples were collected from coccygeal vein to determine the serum progesterone by an ELISA assays (DRG Progesterone ELISA, EIA-1561, Germany). The data were analyzed using a General Linear Model repeated measures, both absolute and relative values (percentage change from the time 0).

The 90% of the cows responded to treatment with  $PGF_{2\alpha}$  initiating luteolysis. CL size either by measuring the surface or the largest diameter was reduced in the hours after the administration of PG, faster in the case of the surface. The FV, however, increased in the first hours to descend later, with no difference between subjective and objective assessment ( $p < .05$ ). The measure showed more resemblance to the evolution of the  $P_4$  was the SCL ( $p > .05$ ).

In conclusion, the most related measure to the functionality of the CL, determined based on serum  $P_4$  was the CL surface. FV determined by Power Doppler ultrasound, shows an initial increase and provides additional information about luteal function.

# ***1. Introducción***

La disminución significativa de la fertilidad observada en el ganado lechero durante las últimas décadas y la creciente necesidad de incrementar la rentabilidad económica de las explotaciones por parte de los ganaderos han hecho que el control regular de la reproducción sea indispensable para identificar y resolver con urgencia los problemas potenciales que afectan la eficiencia reproductiva en las granjas.

Dentro de este contexto, la posibilidad de determinar el estado exacto en el que se encuentra el cuerpo lúteo, puede ofrecer información relevante dentro de ese control reproductivo de cara a aplicar tratamientos de inducción y sincronización del celo, diagnosticar mortalidades embrionarias en proceso o determinar el momento del ciclo en que se encuentra la vaca.

El uso de la ecografía en reproducción bovina se incrementa cada día por el veterinario clínico y el especialista en biotecnología de la reproducción, ya que su aplicación confirma o desestima la valoración realizada por palpación rectal, constituyendo un medio diagnóstico de certeza en la dinámica de las ondas foliculares, desarrollo del CL la determinación del estado de gestación precoz, determinación del sexo fetal y la evaluación de los procesos patológicos del sistema reproductor, entre otros usos (Quintela et al. 2012).

El actual desarrollo de la ecografía transrectal Doppler color ha permitido la evaluación del FVL en las vacas, siendo esto de gran importancia, ya que una adecuada angiogénesis del CL juega un papel decisivo en su funcionalidad. Los estudios de FVL pueden proveer valiosa información acerca de la fisiología y fisiopatología del CL y en vacas cíclicas han demostrado que las concentraciones de progesterona en el plasma sanguíneo pueden ser más fiables al ser predecidas por FVL que por tamaño luteal DMA<sub>CL</sub>, especialmente durante la fase de regresión del CL (Bollwein, Luttgenau et al. 2012).

El desarrollo de la capacidad del CL para producir y secretar P<sub>4</sub> es dependiente de un proceso de angiogénesis activo que ocurre durante los primeros días después de la ovulación (Reynolds L et al. 2000). Como resultado de este proceso, el CL se convierte en uno de los órganos más altamente vascularizados y recibe la mayor tasa de flujo sanguíneo por unidad de tejido que cualquier otro órgano en el cuerpo. El sistema vascular luteal sirve como una ruta de distribución para las sustancias biológicas y proporciona nutrientes a las células lúteas, sustratos hormonales y hormonas circulantes que son indispensables para apoyar la secreción de P<sub>4</sub> (Acosta, Yoshizawa et al. 2002).

Acosta, Yoshizawa et al. (2002), Miyamoto, Shirasuna et al. (2005), Herzog, Brockhan-Ludemann et al. (2010) en sus trabajos sobre función luteal presentan diseños experimentales con pocos animales y en algunos casos utilizan sedantes para facilidad de manejo ecográfico Doppler color (Shrestha and Ginther 2011), sin que esto afecte los resultados de su investigación, pero que no representan un esquema adaptable para el uso clínico reproductivo en las explotaciones ganaderas.

La tecnología Doppler color se encuentra cada vez más disponible en varios equipos de ultrasonido portátiles, de poco peso, de fácil uso y que proveen nueva e interesante información reproductiva en las vacas, por lo que puede ser interesante evaluar sus capacidades de cara a su uso en la clínica diaria.

## **1.1. Principios del Ultrasonido**

### **1.1.1. Ecografía modo B en tiempo real**

La aplicación del ultrasonido en tiempo real en el estudio de la reproducción animal, ha representado un progreso tecnológico que revolucionó su aprendizaje. La nueva información generada a través de las imágenes por ultrasonido ha aclarado la naturaleza del complejo proceso de reproducción animal, incluyendo la dinámica folicular del ovario, la función del cuerpo lúteo y el desarrollo fetal (Mohamed S. et al. 2010).

La ecografía tradicional se basa en la emisión de ondas sonoras de alta frecuencia (>20.000Hz) que se originan en cristales de características piezoeléctricas y que son activados por una descarga eléctrica. Como resultado de esto los cristales se expanden y contraen, emitiendo así las ondas de ultrasonido (Dudwiesus et al. 1993). Estas ondas de ultrasonido penetran en el cuerpo y son reflejadas por varias superficies de tejidos dependiendo de su impedancia acústica, cuando las ondas de ultrasonido impactan en superficies estáticas, la frecuencia de los ecos reflejados corresponde a las ondas emitidas (K. Herzog et al. 2007).

Cada cristal piezoeléctrico del transductor es activado por la polaridad alterna de una carga eléctrica y la resultante expansión y contracción, envía ondas mecánicas de compresión en el tejido. La expansión del cristal causa la compresión entre las partículas de tejido vecino y la contracción causa descompresión. La amplitud de onda es la distancia abarcada por un área de compresión y descompresión representada como una onda sinusoidal y su unidad de medida es el decibel (dB). La frecuencia hace referencia al número de vibraciones de los cristales por segundo (figura 1).

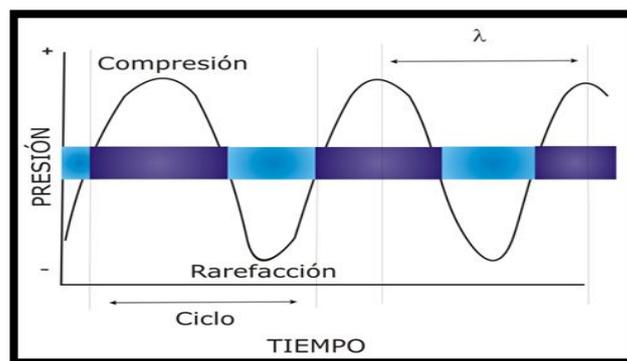


Figura 1. Efecto de compresión y rarefacción en las ondas ecográficas.

Los cristales son activados por una pequeña descarga que produce un pulso de ondas, el disparo de grupos secuenciales de cristales produce haces secuenciales o líneas de exploración a lo largo de la anchura del campo de visión y un pequeño periodo de inactividad entre los pulsos permite la recepción de los ecos de retorno, los patrones de ecos desde cada haz son captados en fracciones de milisegundos.

La proporción de ondas de sonido que son reflejadas, son recibidas por el transductor, convertidas en impulsos eléctricos y presentadas como un eco en la pantalla del ultrasonido. Cada pixel sobre el eco presentado en la pantalla corresponde a una localización del tejido, la distancia desde la parte superior de la imagen al pixel representa la distancia del transductor al tejido. El brillo de un pixel se corresponde a la amplitud del eco (Ginther 2007).

El haz de ultrasonido emitido por el transductor penetra en los tejidos del cuerpo donde se somete a numerosas reflexiones. Las ondas reflejadas, o ecos, son recibidas de nuevo por el transductor, convertidas en impulsos eléctricos y enviadas a un monitor que muestra una imagen "en vivo" a escala de grises. Cada pixel presentado en la pantalla corresponde a una localización del tejido reflectado, la distancia desde la parte superior de la imagen al pixel representa la

distancia del transductor al tejido reflectado. El brillo de un pixel se corresponde a la amplitud del eco (Figura 2). (Abdullahi et al. 1999).

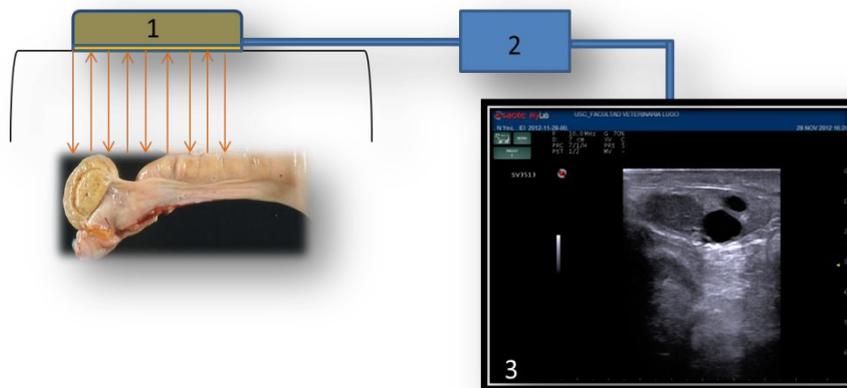


Figura 2. Emisión y recepción de haces de ultrasonido con un Transductor piezoeléctrico lineal (1), Amplificador (2), Monitor (3).

Las primeras generaciones de estos aparatos, requerían un barrido manual. La información de las distintas posiciones del transductor se iba acumulando para producir una sola imagen. La mejora en el procesamiento de la información permitió el desarrollo de ecógrafos que muestran la imagen a tiempo real. Esto fue posible a partir del momento en que se logran procesar más de 15 imágenes por segundo. Así la imagen en modo B nos muestra la localización espacial de cada punto, así como una representación en escala de grises de la ecogenicidad del reflector. Si bien para que el ojo humano pueda apreciar las imágenes en forma de movimiento se requiere un rango de 20 a 40 imágenes por segundo, los equipos actuales en el mercado son capaces de procesar hasta más de 100 imágenes por segundo (Peter et al. 1992).

En este modo se pueden producir imágenes de secciones de tejidos que son similares a las secciones histológicas del plano escaneado por los haces de ultrasonido. Con un moviendo suave de la sonda sobre el área de interés, se puede crear una imagen mental y espacial de la información. Esta colección de imágenes seccionadas da como resultado una imagen mental tridimensional que se asume de real importancia, por ejemplo en la determinación del sexo fetal (DesCoteaux, et al. 2010).

### 1.1.2. Ecografía modo Doppler Color.

En contraste con la ecografía tradicional modo B (escala de grises) cuando las ondas golpean estructuras en movimiento, como por ejemplo glóbulos rojos, la frecuencia de las ondas reflejadas cambian desde que son emitidas dando como resultado el desplazamiento doppler. Precisamente la ecografía doppler color se fundamenta en ese cambio de frecuencias. Este desplazamiento es positivo, por ejemplo cuando la frecuencia de las ondas reflectadas es más elevada que la frecuencia de las ondas emitidas con los glóbulos rojos moviéndose hacia el transductor. Cuando los glóbulos rojos se mueven alejándose del transductor, la frecuencia de las ondas reflectadas es menor que las ondas emitidas y entonces el desplazamiento doppler se vuelve negativo (figura 3).

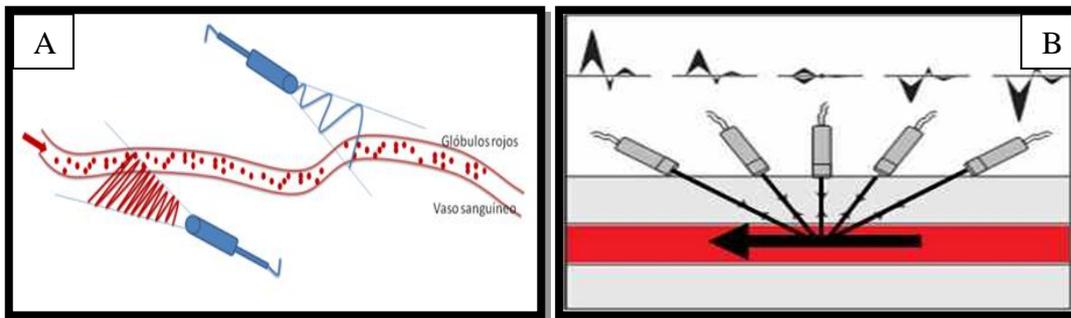


Figura 3. Efecto Doppler. A. Ondas emitidas y reflejadas hacia y desde los hematíes en los vasos sanguíneos. B. Angulo de inclinación y su resultado en la medición doppler.

La desviación doppler  $\Delta f$  puede ser calculada usando la siguiente formula:

$$\Delta f = 2 * f_0 * v * \cos \alpha / c$$

Donde  $f_0$  es la frecuencia de las ondas de ultrasonido emitidas,  $v$  es la velocidad del reflector en relación con el transductor,  $\alpha$  es el ángulo entre el haz de ultrasonido y la dirección de movimiento del reflector y  $c$  es la velocidad con la cual las ondas de ultrasonido son dispersadas dentro de los tejidos. Debido a que la velocidad de las ondas de ultrasonido en los tejidos es relativamente constante en 1540 m/s y la frecuencia de las ondas emitidas por el transductor es conocida, la velocidad de flujo vascular en un ángulo constante  $\alpha$  puede ser calculado.

Las células sanguíneas dentro de los vasos no tienen una velocidad uniforme, sino más bien, viajan a diferentes velocidades, un espectro de frecuencias es obtenido en lugar de una sola frecuencia cuando el flujo vascular es fotografiado usando el Doppler flujo-color (Kremkau 1992).

En las máquinas de ultrasonido con capacidad Doppler color, los desplazamientos Doppler son codificados en colores sobre la pantalla. Los desplazamientos positivos (flujo sanguíneo hacia el transductor) son usualmente indicados en rojo y los desplazamientos negativos (flujo sanguíneo alejándose del transductor) en azul. El brillo de los pixeles de colores indican la amplitud de la frecuencia de desplazamiento: frecuencias de desplazamiento más altas tienen los pixeles más brillantes.

La frecuencia de desplazamiento Doppler esta típicamente entre 100Hz y 11kHz, para que pueda ser escuchado por el oído humano. En consecuencia, los desplazamientos Doppler pueden ser expresados acústicamente: a medida que aumenta el tono, también lo hace la frecuencia de desplazamiento y viceversa. (Ginther 2007)

Existen dos tipos de sistemas Doppler que se usan comúnmente, el Doppler de onda continua y el Doppler de onda pulsada.

El Doppler de onda continua incorpora dos cristales piezoeléctricos separados: un cristal continuamente emite ondas y el otro continuamente recibe las ondas reflectadas. La ventaja de este sistema es que hace posible la medida de velocidades muy altas de flujo sanguíneo. La desventaja es que no permite la selección de profundidad ni los cambios de frecuencia, por lo tanto, todo el flujo sanguíneo en todos los vasos dentro del rango del haz del ultrasonido forma la imagen.

Por otro lado con el sistema Doppler de onda pulsada, uno puede seleccionar la profundidad con la que el desplazamiento Doppler es recibido y se puede evaluar el flujo sanguíneo en diferentes vasos selectivamente. En este sistema, los mismos cristales piezoeléctricos emiten y reciben las ondas de ultrasonido alternativamente. La onda Doppler consiste solo en simples segmentos debido al modelo de alternancia de emisión y recepción de las ondas. Para reconstruir con precisión la forma de onda de los impulsos individuales, la frecuencia del pulso debe ser el doble de la frecuencia Doppler, lo que limita la velocidad máxima detectable (Herzog et al. 2007).

### 1.1.3. Ecografía modo Doppler Potencia

Es el más reciente y avanzado método de formación de imágenes de flujo sanguíneo. En el Doppler Potencia la señal se codifica en relación a la amplitud de la señal Doppler (al contrario del Doppler Color que está basado en el cambio de frecuencia). En contraste con los métodos convencionales que miden la velocidad del flujo sanguíneo, esta técnica mide la intensidad del flujo sanguíneo, por ejemplo, el número de glóbulos rojos moviéndose a través de un vaso por unidad de tiempo. Las células sanguíneas son vistas como focos de color proyectados sobre la imagen en modo B. Comparado con las técnicas convencionales de Doppler color, este método es superior para flujos sanguíneos demasiado bajos (Ginther et al. 2004).

El beneficio más importante del modo Doppler potencia es que mejora la sensibilidad del flujo, el ruido es mucho menos preocupante que en Doppler color. Los grandes cambios de frecuencia se relacionan con el ruido, y como resultado se pueden observar manchas de color engañosas de flujo que degradan seriamente la imagen convencional Doppler color. En el sistema Doppler de potencia, el ruido es siempre de baja amplitud y el flujo se diferencia fácilmente del ruido en la imagen generada.

Las imágenes Doppler de potencia pueden ser amplificadas 10 a 15 dB (decibeles) más que las imágenes Doppler de color antes de que el ruido se convierta en intrusivo. Por consiguiente, se puede escanear tejidos con ajustes de ganancia más altos sin destruir la imagen con artefactos, logrando de 3 a 5 veces mejor sensibilidad que la ecografía Doppler color.

Otra característica del modo Doppler de potencia es que las exploraciones actuales de flujo incluyen la ausencia de información direccional y la velocidad, generando una imagen de flujo vascular mejor que el modo Doppler color, con ángulos de exploración más cerca de 90 grados o perpendicular al flujo (Mendiguren 2010).

En desventaja del modo Doppler de potencia no proporciona información sobre la velocidad del flujo o la dirección del flujo. Aunque la detección de flujo es claramente el uso clínico más importante, la velocidad y la información direccional son a menudo diagnósticamente importantes. Por lo tanto, el Doppler color convencional es preferible al Doppler de potencia, cuando no se requiere la máxima sensibilidad, mientras que, el Doppler de potencia es más útil en situaciones donde se requiere una sensibilidad óptima, o cuando se desea una imagen de flujo más robusto (flujo sanguíneo luteal) independiente del ángulo de exploración.

## **1.2. Ecografía y control de reproductivo**

### **1.2.1. Ecografía modo B en tiempo real**

#### **1.2.1.1. Folículos**

En la exploración de ovarios normales, la ventaja del Ultrasonido comparado con la palpación rectal es que se elimina la subjetividad inherente en la estimación del tamaño y el contenido, ya que el líquido folicular puede ser visualizado y el diámetro puede ser medido. Esto hace posible la detección de folículos en crecimiento, dominantes o preovulatorios (Quíntela et al. 2012).

En el examen ecográfico de los ovarios, los folículos se muestran a través de imágenes anecogénicas de color negro en forma redondeada o en estructuras irregulares debido a la compresión de los folículos adyacentes, al cuerpo lúteo y a la compresión de los folículos por el estroma ovárico. Las medidas que obtenemos de los folículos corresponden a las dimensiones del antro folicular y no incluye el diámetro de la pared. Los folículos preovulatorios se muestran como estructuras redondeadas anecogénicas de 1,5 a 2,5 cm; tamaño con el cual se produce la ovulación en la vaca, según los resultados de diferentes autores, los cuales han corroborado sus datos con la posterior formación del cuerpo lúteo (Hanzen et al. 2000).

La determinación de la dinámica de las ondas foliculares mediante ecografía es uno de los resultados de mayor impacto en la biotecnología de la reproducción bovina.

#### **1.2.1.2. Cuerpo Lúteo**

El cuerpo lúteo se muestra evidente en imágenes ecográficas alrededor de los 2 - 3 días posteriores a la ovulación. Esta estructura es hipocogénica en la vaca, algo oscura y redondeada con 1,5 a 3,5 cm de diámetro en correspondencia con los estados del CL hemorrágico, CL maduro o CL en regresión. En investigaciones realizadas, entre el 25.2% y 78% de los CL durante el diestro presentan cavidad central de 2 a 20 mm de diámetro con una zona anecogénica oscura (Kahn 2010, Pérez 2009), probablemente conformada por el líquido folicular del folículo que originó al CL, y rodeada por tejido luteal; resultando en estos casos cuerpos lúteos totalmente fisiológicos (Veronesi et al. 2002).

En hembras superovuladas también podemos evaluar la presencia de cuerpos lúteos, pero cuando la respuesta es superior a 10 ovulaciones por ovario es difícil precisar el número de ellos. Sin embargo, la ecografía nos permite hacer una valoración más precisa de la respuesta

superovulatoria, determinar la presencia de folículos anovulatorios y descubrir estados patológicos, cuya información es fundamental para decidir si se efectúa, o no, la recolección de ovocitos/embriones. (DesCoteaux et al. 2010).

## **1.2.2. Ecografía Doppler color**

### **1.2.2.1. Folículos**

El ultrasonido doppler color puede ser usado para obtener una mayor precisión en la información del estatus fisiológico de los ovarios, el flujo sanguíneo local puede ser observado en los folículos ováricos y en el cuerpo lúteo (Herzog and Bollwein, 2007).

Es una técnica útil para la evaluación de la función vascular ovárica, permitiendo una observación visual del flujo sanguíneo en una delimitada área de la pared de los folículos preovulatorios (Brannstrom et al., 1998) o del cuerpo lúteo (Miyasaki et al., 1998; Acosta et al. 2002). El flujo sanguíneo en los folículos y cuerpos lúteos tienen una estrecha relación con el crecimiento, atresia y ovulación del folículo y con la funcionalidad del cuerpo lúteo.

Crecimiento Folicular: (Acosta et al., 2005) encontró un alto porcentaje de folículos pequeños con elevado flujo sanguíneo antes de su desviación y deriva en folículos grandes secundarios o en el folículo más grande, y después de la desviación, el flujo sanguíneo se redujo en los folículos secundarios grandes y se incrementó en el folículo más grande. Antes de la desviación, los dos tipos de folículos tenían un diámetro similar, pero esto fue claramente diferente después de la desviación. El folículo atrésico fue caracterizado por una ausencia detectable de flujo sanguíneo y un progresivo decrecimiento en el diámetro.

Estos datos sugieren que el crecimiento folicular, selección y atresia están íntimamente asociados con los cambios en el suministro sanguíneo a un folículo individual.

Ovulación: Acosta et al. (2003) describe cambios del flujo sanguíneo local en la capa externa de la teca de folículos maduros. También el área de flujo sanguíneo detectable en la pared del folículo y el tiempo promedio de máxima velocidad fueron pequeños bajo el pico de LH, cuando se incrementaron se mantuvieron elevados hasta la ovulación. Existe, por lo tanto, una estrecha relación entre el flujo sanguíneo local en la pared folicular y los cambios estructurales y funcionales que ocurren durante el proceso de ovulación.

### 1.2.2.2. Cuerpo Lúteo

La ecografía ofrece grandes oportunidades en ginecología bovina para un diagnóstico más fiable CL. La ecografía en modo B permite la evaluación del tamaño del CL, sin embargo, se sabe que el tamaño luteal no es el parámetro más adecuado para evaluar el estado funcional de un CL (Veronesi 2002).

El cuerpo lúteo es uno de los órganos más vascularizados y que recibe el mayor flujo sanguíneo por unidad de tejido comparado con el resto de órganos en el cuerpo (Wiltbank et al. 1988). Durante su desarrollo inicial (48-120h), hay un incremento gradual en el flujo sanguíneo alrededor del cuerpo lúteo similar con un incremento en su volumen y en las concentraciones séricas de progesterona (Acosta et al. 2003), esto sugiere que el flujo sanguíneo local en el cuerpo lúteo está relacionado con su potencial para producir y liberar progesterona.

Durante la fase de regresión, el tamaño del CL disminuye a un ritmo más bajo que los niveles de progesterona (Tom et al. 1998).

Los niveles de  $P_4$  dependen principalmente del flujo sanguíneo luteal, que puede ser cuantificado de manera confiable mediante la ecografía transrectal doppler potencia. Una estrecha relación entre el flujo sanguíneo luteal y  $P_4$  también se ha encontrado en equinos durante todo el ciclo estral. Estudios realizados en vacas (Herzog et al. 2010), sugieren que la evaluación del flujo vascular luteal es más informativo que la evaluación del tamaño luteal durante el ciclo estral.

Según Shirasuna et al. (2008); Miyamoto et al. (2005); Shirasuna (2010), en el proceso espontáneo de luteólisis, el flujo sanguíneo del cuerpo lúteo se incrementó durante los días 16-17 del ciclo estral, concomitante con un incremento en los niveles plasmáticos de 14-dihydro-15-keto-prostaglandin  $F_{2\alpha}$  (PGFM) y fue seguido por un descenso en la concentración plasmática de progesterona, 1 día después.

### 1.3. FASES DEL CICLO ESTRAL

El ciclo estral de la vaca está controlado por la secreción de hormonas del hipotálamo, hipófisis, ovario y útero. Estas hormonas son la GnRH del hipotálamo, FSH y LH de la hipófisis, estrógenos, progesterona e inhibina de los ovarios y la prostaglandina del útero. El desarrollo ovárico se caracteriza por la presencia de ondas de crecimiento folicular. Una onda abarca el

desarrollo sincrónico de un gran número de folículos, seguidos por la selección y crecimiento de un folículo dominante y la supresión de los folículos subordinados. Durante el ciclo estral se produce el crecimiento de uno o dos folículos dominantes anovulatorios previo a la maduración final del folículo ovulatorio (Noseir 2003).

El crecimiento y maduración del folículo preovulatorio provoca un incremento en la secreción de estradiol, el cual causa cambios estrogénicos en el oviducto y útero, comportamiento de celo, y la liberación preovulatoria de LH y FSH. El pico preovulatorio de LH provoca el reinicio de la meiosis en el ovocito y la ovulación y posterior luteinización del folículo para formar el cuerpo hemorrágico. El cuerpo hemorrágico se transforma en cuerpo lúteo provocando cambios en oviducto y útero debido a la secreción de progesterona que permitirán el desarrollo embrionario y el establecimiento de la preñez. Si la preñez no ocurre, se destruirá el cuerpo lúteo y comenzará un nuevo ciclo estral (Sheldon et al. 2006).

### **1.3.1. Fase Folicular**

La fase folicular es un periodo relativamente corto del ciclo estral en la vaca (aproximadamente 20%), marcado desde la regresión del cuerpo lúteo hasta la ovulación, lo que incluye el proestro y el estro. En general, la fase folicular se caracteriza por la aparición de la conducta de celo y un cambio hormonal en la dominancia de progesterona a una dominancia de estrógenos, principalmente como resultado de la regresión estructural y funcional de un cuerpo lúteo maduro (disminución de la P<sub>4</sub>) y al desarrollo de un folículo preovulatorio (aumento de E<sub>2</sub>).

#### **1.3.1.1. Proestro**

El Proestro (antes del estro) es la parte de la fase folicular que inicia con la regresión funcional y estructural del cuerpo lúteo y finaliza con la presencia del estro. Como resultado de la regresión del cuerpo lúteo hay una disminución de progesterona circulante y un incremento de estradiol, que juega un papel importante en el aumento del tono uterino y la descarga de flujo mucoso limpio y acuoso por la vulva. La dinámica folicular durante el proestro implica la continua regresión del folículo dominante de la onda anovulatoria anterior que se superpone con el crecimiento del folículo dominante de la onda ovulatoria.

### **1.3.1.2. Estro**

Es la última parte de la fase folicular que termina con la ovulación del folículo dominante. Las concentraciones circulantes de estradiol alcanzan concentraciones máximas en asociación con el inicio de la receptividad sexual, tal como se indica por el comportamiento estral y la descarga de hebras cohesivas de mucosidad de la vulva. El crecimiento y la maduración final del folículo preovulatorio se produce en asociación con una disminución en las concentraciones de estradiol y un aumento de la GnRH que afecta principalmente a la LH y en un menor grado a la FSH, que precede a la ovulación en aproximadamente 29h (Senger 2003).

La detección del comportamiento de monta asociado con el estro se muestra en aproximadamente un 90% de las vacas (Roelofs 2005) y es esencial para la determinación del inicio del estro, que está estrechamente relacionado con la sincronización de la ovulación (por ejemplo, aproximadamente 29 h después del estro).

Los signos secundarios de estro pueden ser indicativos de que se está acercando a la receptividad sexual, sin embargo, pueden ocurrir antes, durante, o después del estro. No siempre se evidencian los signos de estro, lo cual se denomina celo silencioso, una condición que ha sido en su mayoría asociada con ovulaciones posparto en vacas lactantes (Isobe et al. 2004).

### **1.3.2. Ovulación**

La ovulación es el evento terminal del estro, se caracteriza por la ruptura de un folículo dominante, la evacuación del líquido folicular, células de la granulosa y los ovocitos y principios de desarrollo o formación de un cuerpo lúteo en el sitio de la ovulación.

Aunque a los bovinos se los considera una especie monótopica que ovulan normalmente un solo folículo dominante, hay un cierto grado de múltiples ovulaciones espontáneas que parece ser influenciado por una variedad de factores, por ejemplo, raza, lactación, nutrición, y estado reproductivo (Sartori et al. 2004).

### **1.3.3. Fase Lútea**

La fase lútea es el período más largo del ciclo estral, que comprende aproximadamente el 80% del ciclo, va desde la ovulación a la regresión del cuerpo lúteo implicando el metaestro y diestro.

En general, la fase lútea se caracteriza por un cambio de la dominancia de los estrógenos a la dominancia de progesterona (Wettemann et al. 1972) después de la ovulación (disminución de estradiol) y la maduración estructural y funcional de un cuerpo lúteo (aumento de la progesterona). Además con la aparición periódica de las ondas foliculares y la correspondiente FSH, también hay fluctuaciones de bajo nivel de las concentraciones sistémicas de estradiol asociadas a las ondas de desarrollo folicular a lo largo de la fase lútea.

#### **1.3.3.1. Metaestro**

El metaestro es el tiempo inmediato después del estro o la porción inicial de la fase lútea que comienza en la ovulación y termina en el diestro. En este sentido, la palabra metaestro se refiere a veces como la etapa temprana de diestro, que se extiende a aproximadamente 5 días después de la ovulación. A nivel de ovarios, implica la luteinización de las células del folículo que ha ovulado.

La luteinización es un proceso complejo que implica la remodelación de tejido estromal y vascular además de la transformación celular y bioquímica del folículo con andrógenos de la teca y estrógenos de la granulosa (Niswender et al. 2000).

En el ganado vacuno, la formación temprana de la glándula lútea se asocia a menudo con la formación de una cavidad llena de sangre intra-lútea transitoria, similar a un coágulo de sangre; esta estructura se denomina “cuerpo hemorrágico” (Senger et al. 2003).

A partir de entonces, como la glándula lútea bovina completa su transformación estructural y funcional hacia el final del metaestro, se convierte morfológicamente en homogénea con o sin cavidad.

En cuanto a estos últimos, las cavidades dentro de la fase lútea en el ganado puede persistir como cavidades llenas de líquido después de las etapas iniciales de la formación de cuerpo hemorrágico y varían en tamaño, desde pequeñas (por ejemplo, <2 mm) hasta grandes (por ejemplo, > 10 mm), de modo que cuanto mayor sea la cavidad, más fácil se observará después de la ovulación (Peter et al. 2009). Sin embargo, estas cavidades no tienen ningún tipo de repercusión en la funcionalidad del cuerpo lúteo (Pérez 2009).

### **1.3.3.2. Diestro**

El diestro comienza después del metaestro y termina con el principio de la regresión del cuerpo lúteo. El fin del metaestro se caracteriza por el cese de la hemorragia metaestral, la supresión del comportamiento estral y un cuerpo lúteo relativamente maduro, con el aumento de las concentraciones sistémicas de progesterona. A lo largo del diestro, un cuerpo lúteo maduro mantiene concentraciones máximas de progesterona durante la aparición de la segunda y tercera oleada de crecimiento folicular.

En ausencia de gestación, la regresión estructural y funcional del cuerpo lúteo ocurre espontáneamente principalmente en respuesta a la  $PGF_{2\alpha}$  uterina durante el diestro tardío, dando lugar a un cuerpo albicans (Bowen et al. 2003). Históricamente, el término "luteólisis" se ha utilizado comúnmente para describir la regresión o lisis de la glándula lútea. Sin embargo, parece que tiene un significado muy limitado, que no describe adecuadamente la compleja secuencia de eventos moleculares sincronizados que ahora se sabe están asociados con la desaparición del cuerpo lúteo. Actualmente, por lo tanto, la "regresión lútea" es la terminología preferida, que puede ir precedida de los términos "funcional" y/o "estructural" para aclarar el contexto en el que se presenta la regresión del cuerpo lúteo (es decir, endocrinológicamente o morfológicamente).

## **1.4. REGRESIÓN LÚTEA**

En las especies mamíferas, los ovarios juegan un papel esencial, al ser una glándula endocrina y al ser el centro natural de producción de oocitos. En el ovario, el CL se forma a partir de la ovulación de un folículo y es la única glándula de regulación hormonal, reproductiva transitoria, que produce y secreta  $P_4$ . En vacas y en otras especies, la función principal del CL es la de producir  $P_4$ , que es un prerrequisito para la implantación y mantenimiento de la gestación.

El CL en el bovino se desarrolla rápidamente entre 2 y 3 días después de la ovulación, apoyado por una gran angiogénesis y vascularización activa y siendo funcional hasta los días 17-18 en vacas que no quedan gestantes. Si la gestación no ocurre satisfactoriamente, el CL debe regresar en unos pocos días para permitir que se de una nueva ovulación. En vacas no gestantes, el fenómeno de luteólisis es causado por pulsos de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) la cual es secretada por el endometrio alrededor de los días 17-19 del ciclo estral. La  $PGF_{2\alpha}$  induce una

disminución en la liberación de  $P_4$  en el cuerpo lúteo, así como una disminución en el volumen y flujo sanguíneo luteal. (Acosta et al. 2002).

El CL está compuesto por tipos heterogéneos de células que consisten, no solo en células esteroideogénicas (pequeñas y grandes células luteales) sino también células no esteroideogénicas (células endoteliales, células musculares lisas, fibrocitos y células inmunológicas (Penny, 2000).

Las células esteroideogénicas, son particularmente células luteales grandes, que producen y secretan una gran cantidad de  $P_4$  durante el ciclo estral en la vaca. Las células endoteliales vasculares representan más del 50% del número total de células en el CL y secretan varias sustancias vasoactivas, como por ejemplo NO, EDN1, Ang II y PGs, que regulan directamente la secreción de  $P_4$  dentro del CL (Miyamoto et al. 2009). Esto indica que los vasos sanguíneos y las células endoteliales dentro del CL tienen un papel esencial en la función luteal de la vaca y su sistema regulador local de la regresión lútea.

El flujo vascular tiene un rol crucial en la fisiología de los órganos reproductivos, se ha propuesto que una disminución rápida en el flujo vascular es uno de los impactos esenciales de la  $PGF_{2\alpha}$  exógena y endógena (útero). En general la administración de  $PGF_{2\alpha}$  durante la fase luteal media (Días 8-12 del ciclo estral; CL maduro) reduce drásticamente las concentraciones plasmáticas de  $P_4$  y el volumen del CL. Sin embargo, la  $PGF_{2\alpha}$  no induce regresión lútea durante la fase luteal temprana es decir hasta el Día 5 del ciclo estral (Henricks et al. 1974). Un estudio realizado por Cuervo et al. (2011) sugiere que el tratamiento con una alta dosis de  $PGF_{2\alpha}$  (50mg) a los 3.5 días post ovulación induce algún grado de luteólisis en todas las vacas tratadas, un 22% presentó una luteólisis completa y un 78% presentó una luteólisis parcial, concluyendo que no se recomienda su uso en la clínica diaria.

Estudios previos han reportado que el tratamiento en el CL maduro (Día 10 del ciclo estral), pero no en el CL temprano, con una dosis luteolítica de  $PGF_{2\alpha}$  induce un incremento agudo (de 30min a 2h) en el flujo sanguíneo periférico del CL, el cual es seguido por una disminución gradual de flujo sanguíneo (Acosta *et al.*, 2002). Además, durante la regresión espontánea del CL en la vaca, un incremento en el flujo sanguíneo luteal periférico sobre el Día 17-18 fue asociado a niveles plasmáticos máximos de 13,14-dihidro-15-keto- $PGF_{2\alpha}$  (PGFM; un producto del metabolismo de la  $PGF_{2\alpha}$ ), justo antes de la disminución en la secreción luteal de  $P_4$  (Shirasuna et al., 2008). Un reporte de (Ginther *et al.* 2007) proporciona pruebas adicionales que muestran

que el flujo sanguíneo luteal se incrementa con cada pulso de PGFM durante la luteólisis espontánea en novillas. Así, se ha demostrado que la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  induce incrementos en el flujo vascular siendo uno de los eventos fisiológicos más tempranos que se observan en la cascada luteolítica en la vaca).

## 1.5. PROSTAGLANDINAS

Una PG es cualquier miembro de un grupo de compuestos lipídicos derivados enzimáticamente de ácidos grasos y que tienen importantes funciones en el organismo. Cada prostaglandina contiene 20 átomos de carbono, incluyendo un anillo ciclopentano. Son mediadores, y tienen diversos efectos fisiológicos muy potentes.

Las PGs, junto con los tromboxanos y las prostaciclina, forman la clase prostanoide de los derivados de ácidos grasos. La clase prostanoide es una subclase de los eicosanoides (Lamond et al. 1973).

Las prostaglandinas se encuentran en prácticamente todos los tejidos y órganos. Son lípidos mediadores autocrinos y paracrinos que actúan sobre las plaquetas, el endotelio, las células uterinas y los mastocitos, entre otros. Son sintetizadas en las células a partir de los ácidos grasos esenciales y juegan un rol importante en muchos procesos fisiológicos (Smith et al., 1996).

La fosfolipasa- $A_2$  crea un intermediario, que pasa a la ruta de la ciclooxigenasa o la lipoxigenasa para formar cualquiera de las prostaglandinas y tromboxanos o leucotrienos. La ruta de la ciclooxigenasa produce tromboxano, prostaciclina y prostaglandinas D, E y F. La ruta de la lipoxigenasa está activa en los leucocitos y en los macrófagos, y sintetiza leucotrienos.

Se sabe muy bien que los pulsos de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  liberados desde el útero sobre los días 17-18 del ciclo estral son un factor luteolítico primario en la vaca (Wolfenson et al., 1985).

Adicionalmente a la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  uterina, el CL funcional de la vaca produce y secreta notablemente, al menos tres tipos de PGs:  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGE}_2$  y 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ , el metabolito estable inactivo de prostaciclina. Muchos estudios han concluido que la PG metaboliza enzimas, como por ejemplo la COX-1, COX-2, PGF sintetasa, PGE sintetasa, PG deshidrogenasa (PGDH) y receptores para  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y  $\text{PGE}_2$  son expresados y regulados en el CL durante el ciclo estral. De hecho, niveles de ARNm para COX-2 dentro del CL se elevan en respuesta a la inyección de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  sobre el Día

10 del ciclo estral (PGF<sub>2α</sub>-sensible). Sin embargo, sobre el Día 4 del ciclo estral (PGF<sub>2α</sub>-resistente), la PGF<sub>2α</sub> no estimula COX-2 ARNm en el CL (Miyamoto et al. 2009).

Es posible que la PGF<sub>2α</sub> intraluteal tenga un papel clave en el mecanismo de resistencia a PGF<sub>2α</sub>. Durante la regresión lútea espontánea en la vaca, la secreción intraluteal de PGF<sub>2α</sub> se incrementó ligeramente después del comienzo de la regresión y tuvo un incremento drástico a partir de las 24 horas de iniciado el proceso (Shirasuna et al. 2004).

El aumento agudo del flujo vascular luteal es una de las primeras señales fisiológicas para la cascada luteolítica y el NO del CL puede tener un factor crucial en el inicio de la regresión lútea en la vaca. Además, el CL bovino es un órgano endócrino grande y heterogéneo, en el que la PGF<sub>2α</sub> tiene un sitio de acción-restringido dependiendo no sólo de la fase lútea, sino también de la región dentro del CL. Una estructura vascular en tres dimensiones en el CL maduro y las interacciones entre varias células de diferentes tipos parecen ser necesarios para obtener una respuesta máxima a PGF<sub>2α</sub> y lograr una regresión luteal rápida en la vaca. (Miyamoto 2009).

## **2. *Objetivo***

El objetivo de este estudio fue determinar el mejor método para evaluar la regresión del cuerpo lúteo tras la luteólisis inducida mediante la administración exógena de un análogo sintético de la prostaglandina  $F_{2\alpha}$ . Los métodos de evaluación comparados fueron la ecografía en modo B, mediante la determinación del diámetro mayor y la superficie del cuerpo lúteo, y la ecografía Doppler color, mediante la determinación objetiva y subjetiva del flujo vascular del cuerpo lúteo. Como método de referencia se utilizó la concentración sérica de progesterona.

### ***3. Material y Métodos***

### 3.1. Animales

Para este estudio se utilizaron 30 vacas adultas de raza frisona (*Bos taurus*), clínica y ginecológicamente sanas, no gestantes y no lactantes, ubicadas en las instalaciones del Hospital Veterinario Rof Codina de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Santiago de Compostela, campus Lugo. Los animales en estabulación, recibían una ración total mezclada ad libitum (1,57 Mega Calorías de energía neta de lactación por kilogramo de materia seca, 14.9% proteína cruda) y acceso libre al agua.

### 3.2. Diseño de estudio

Los animales fueron escogidos tras realizar una exploración ecográfica del aparato genital, tomando como criterio de selección la presencia de un cuerpo lúteo de diámetro superior a 1,8 cm (valor intermedio entre los propuestos por Quintela et al. en 2008 y Bicalho et al. en 2008) y un flujo vascular subjetivo mayor o igual que 2.

Los animales seleccionados recibieron 150 µg de un análogo sintético de la PGF<sub>2α</sub> (Cloprostenol, Dalmazin®, Fatro Ibérica, Barcelona, España). En el momento de la administración de la PG y a las 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas, se realizó una exploración ecográfica detallada de los ovarios, así como la extracción de una muestra de sangre para la determinación de progesterona (Figura. 4), método que se utilizó como referencia (Bollwein et al. 2013).

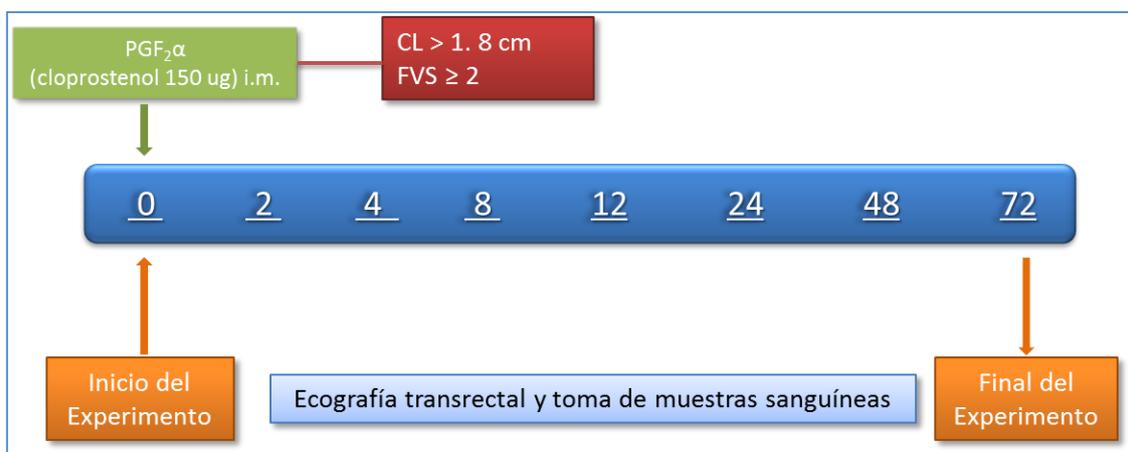


Figura 4. Diseño de estudio

### 3.3. Ecografía y análisis de imagen

El examen ecográfico del CL fue realizado mediante un ecógrafo (Easote, MyLab One, Génova, Italia) equipado con una sonda lineal transrectal multifrecuencia (2-10 MHz) y Doppler. Inicialmente la exploración se llevó a cabo en modo B, realizando un barrido completo del CL. Toda la operación fue grabada en vídeo para realizar un procesamiento posterior de las imágenes. A continuación, utilizando la función de Doppler Potencia, se realizó la misma operación, grabando un nuevo video que se almacenó con el anterior.

Posteriormente, los videos fueron visualizados en el programa MyLab Desk® (Easote, MyLab™, Génova, Italia) y procesados. Con las imágenes en modo B se determinó el diámetro mayor y la superficie del CL, utilizando las funciones correspondientes del ecógrafo (figura 5).



Figura 5.- Medidas del tamaño del cuerpo lúteo: diámetro mayor y superficie. MyLab Desk®

Con las imágenes de flujo sanguíneo en color se realizó una valoración subjetiva y otra objetiva. La evaluación subjetiva se diseñó en base a los hallazgos de Araujo y Ginter en 2009, quienes comprobaron la eficacia de la valoración subjetiva utilizando dos imágenes del CL. Para ello, esta estimación fue realizada siempre por el mismo técnico y se efectuó directamente sobre el vídeo, estableciendo una escala de 1 a 4, en donde el 1 es la ausencia total de color y 4 el nivel máximo (figura 6).

Por su parte, la valoración objetiva fue realizada sobre un fotograma extraído del video, procedente de un corte de la parte intermedia del CL. Este fotograma fue analizado mediante el programa ImageJ (versión 1.46r; Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA.) que permite calcular el porcentaje de la superficie del CL, que se encontraba coloreada (figura 7).

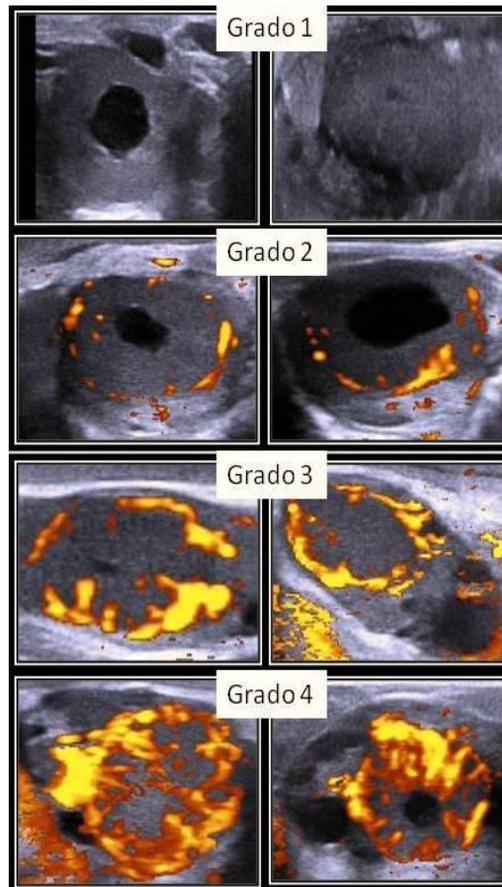


Figura 6.- Escala de valoración subjetiva del flujo vascular del cuerpo lúteo.

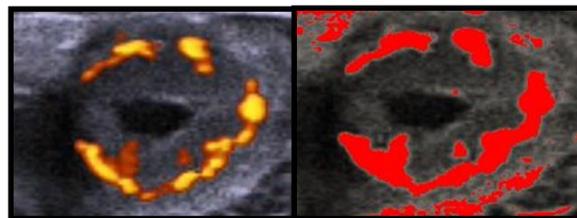


Figura 7. Análisis objetivo del flujo vascular en el CL mediante el programa ImageJ.

### 3.4. Muestras y Análisis de sangre

Las muestras sanguíneas fueron obtenidas de la vena coccígea, justo antes del examen ecográfico y, en el caso de la primera muestra, antes de la administración de la prostaglandina.

Tras su recogida, las muestras se mantuvieron 8 horas en refrigeración para, a continuación, centrifugarlas a 1500 g durante 15 minutos. El suero así obtenido se dividió en alícuotas de 0,5 ml. que fueron congelaron a  $-20^{\circ}$  C hasta su posterior análisis.

La determinación de progesterona en suero se realizó mediante un kit ELISA comercial de progesterona (DRG 17- $\alpha$ -OH Progesterone ELISA, DRG Instruments GmbH, Alemania), basado en el principio de competición, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las densidades ópticas se midieron en un lector de microplacas (Bio-Rad modelo 550, Laboratorios Bio-Rad S.A., Madrid). El rango del test se marcaba entre 0,034 – 20 ng/ml. con una sensibilidad analítica de 0,034 ng/ml.

### 3.5.- Diseño Estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa estadístico SPSS 19.0 (SPSS, Chicago, IL). Inicialmente se calcularon estadísticos descriptivos (media, desviación típica e intervalo de confianza del 95%) y correlaciones entre los diferentes métodos.

A continuación los datos se analizaron mediante un GLM de medidas repetidas, realizando la prueba de contrastes simples para determinar diferencias estadísticas entre los valores obtenidos a las diferentes horas y el de la hora 0.

Posteriormente, dado que las unidades de medida eran diferentes para cada método de evaluación y eso dificultaba la comparación entre ellos, se calculó el porcentaje de cambio respecto a la hora 0, según la fórmula:

$$\frac{\text{Valor en la hora } X_i - \text{Valor en la hora } X_0}{\text{Valor en la hora } X_0} \times 100$$

De esta forma, las unidades de medida se igualaron permitiendo la comparación entre los diferentes métodos. Dicha comparación se llevó a cabo mediante un GLM de medidas repetidas y una prueba de contrastes simples para comparar globalmente los diferentes métodos con la P4 y un ANOVA para comparar el porcentaje de cambio entre métodos en cada hora.

## ***4. Resultados***

#### **4.1. Animales**

De los 30 animales seleccionados inicialmente, 27 respondieron a la administración de prostaglandina iniciándose la regresión del cuerpo lúteo, lo que corresponde al 90% de los animales.

#### **4.2. Evolución de progesterona, tamaño (diámetro mayor y superficie) y flujo vascular (objetivo y subjetivo) del cuerpo lúteo durante la luteólisis inducida.**

Los datos obtenidos (tabla 1) nos muestran que la  $P_4$  y el tamaño del cuerpo lúteo descienden tras la administración de la prostaglandina (graficas 1 y 2), mientras que el FV se incrementa en las primeras horas para descender a continuación (gráficas 3 y 4).

En este estudio hemos observado que la progesterona disminuye de forma significativa ( $p < 0,05$ ) a las 12 horas tras la administración de la PG. Sin embargo, ecográficamente ya se puede apreciar una disminución en el tamaño del cuerpo lúteo a las 4 horas, pero no es hasta las 24 horas post-administración cuando se aprecia un descenso significativo en el FV (gráficas 1 a 4).

No obstante, a pesar de que desde muy pronto se produce un cambio significativo en el tamaño, a las 12 horas post-administración de la PG esta modificación es inferior al 12%, si consideramos la superficie total del cuerpo lúteo y sólo del 7%, en el caso del diámetro mayor, lo que supone 0,5 cm<sup>2</sup> y 0,18 cm (gráfica, tabla 2).

El cambio significativo y relevante se observa a partir de las 24 horas, sobre todo si consideramos la superficie del cuerpo lúteo, con una reducción de algo más de la cuarta parte de su tamaño (26%). Sin embargo, para obtener un porcentaje de reducción similar, en el caso del diámetro mayor, debemos esperar hasta las 48 horas (reducción del 29%).

En el caso del FV, es a las 24 horas post-administración de PG cuando se comienzan a observar diferencias estadísticamente significativas con la hora 0. En ese momento (24h) el porcentaje de descenso es del 19% y 24% para el FVO y FVS respectivamente. Debemos tener en cuenta en este caso que el FV aumenta significativamente inmediatamente después de la administración de prostaglandina (68% y 26% para el FVO y FVS respectivamente, a las 2 horas) lo que hace que el descenso se retrase (gráfica 5, tabla 2).

Tabla 1.- Evolución de las diferentes medidas de funcionalidad del cuerpo lúteo en las 72 horas posteriores a la inducción de la luteólisis.

Hora	n	DMaCL, cm			SCL, cm <sup>2</sup>			FVO, %			FVS (escala 1-4)			P <sub>4</sub> , ng/ml		
		μ	±SD	I.C. 95%	μ	±SD	I.C. 95%	μ	±SD	I.C. 95%	μ	±SD	I.C. 95%	μ	±SD	I.C. 95%
0	27	2.58	±0.33	2.43 - 2.73	3.65	±0.77	3.43 - 4.08	23.43	±12.42	17.30-29.50	2.76	±0.67	2.48-3.05	8.13	±5.62	6,12 - 11,49
2	27	2.53	±0.37	2.36 - 2.70	3.63	±0.78	3.37 - 4.06	32.72	±13.13**	26.48 - 38.17	3.47	±0.67**	3.16-3.78	7.29	±8.24	3.85 - 7.38
4	27	2.28	±0.33**	2.12 - 2.43	3.31	±0.87*	2.94 - 3.79	26.10	±12.18	23.46 - 32.79	3.33	±0.57*	3.07-3.59	6.83	±8.36	3.46 - 8.32
8	27	2.28	±0.35**	2.12 - 2.44	3.16	±0.70**	2.86 - 3.55	23.83	±11.11	18.66 - 29.99	3.05	±0.74	2.71-3.38	5.33	±6.39	2.81 - 7.03
12	27	2.40	±0.31*	2.25 - 2.54	3.15	±0.59**	2.92 - 3.49	23.26	±12.87	17.18 - 30.36	2.66	±0.96	2.22-3.10	3.95	±3.86**	2.06 - 6.05
24	27	2.19	±0.36**	2.02 - 2.35	2.61	±0.81**	2.25 - 3.04	15.61	±7.00**	12.25 - 18.28	1.95	±0.66**	1.65-2.26	1.64	±1.59**	0.99 - 1.49
48	27	1.81	±0.27**	1.69 - 1.94	1.81	±0.53**	1.60 - 2.10	7.33	±4.14**	5.21 - 9.24	1.24	±0.43**	1.04-1.44	1.75	±1.69**	0.84 - 2.18
72	27	1.53	±0.31**	1.39 - 1.67	1.38	±0.53**	1.17 - 1.71	2.74	±2.42**	1.64 - 4.12	1.04	±0.21**	0.94-1.14	1.58	±1.91**	0.76 - 1.81

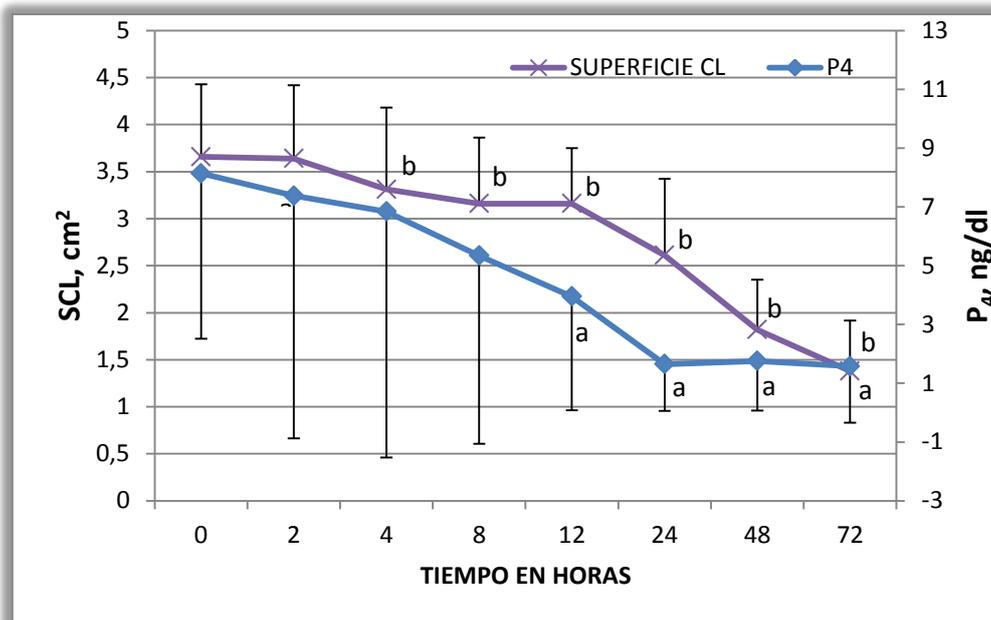
\*Diferencia significativa  $p < 0.05$  con hora 0. \*\*Diferencia significativa  $p < 0.01$  con hora 0.

Tabla 2.- Porcentaje de cambio de las diferentes medidas de funcionalidad del cuerpo lúteo en las 72 horas posteriores a la inducción de la luteólisis.

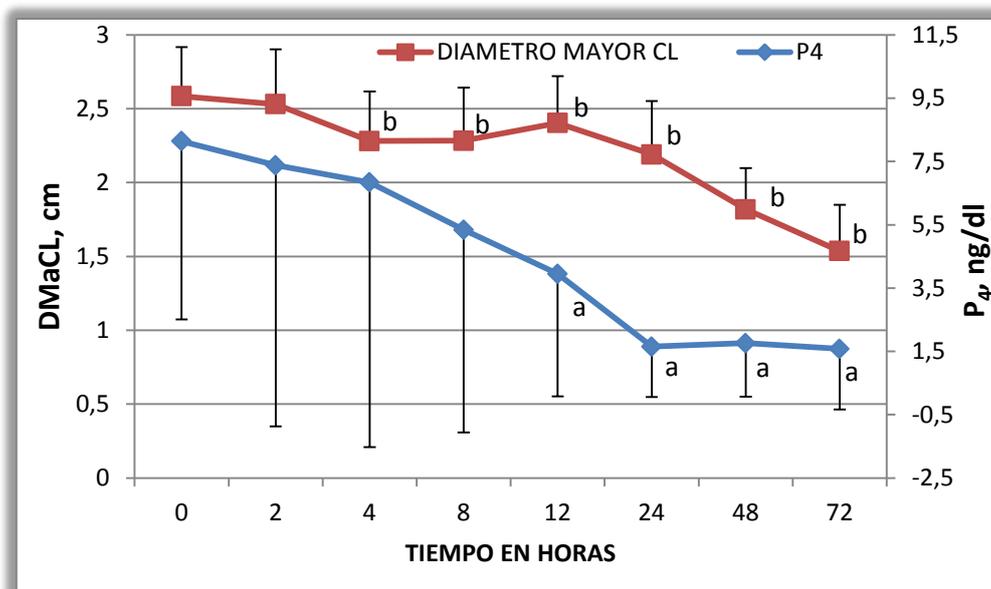
Hora	n	DMaCL <sup>B</sup> , %			SCL <sup>A</sup> , %			FVO <sup>B</sup> , %			FVS <sup>B</sup> %			P4 <sup>A</sup> , %		
		μ	±SD	I.C. 95%	μ	±SD	I.C. 95%	μ	±SD	I.C. 95%	μ	±SD	I.C. 95%	μ	±SD	I.C. 95%
0	27	0.00	±0.00	0.00	0.00	±0.00	0.00	0.00	±0.00	0.00	0.00	±0.00	0.00	±0.00	0.00	
2	27	-1.96 <sup>b</sup>	±7.09	(-5.19) – (-1.25)	0.48 <sup>b</sup>	±14.37	(-5.19) – (6.17)	68.48 <sup>a</sup>	±95.44	(30.72) – (106.23)	26.54 <sup>ab</sup>	±30.75	(14.37 – 38.70)	12.66 <sup>ab</sup>	±146.84	(-70.75) – (-45.42)
4	27	-11.46 <sup>b</sup>	±9.05	(-15.58) – (-7.34)	-8.67 <sup>b</sup>	±17.94	(-15.77) – (-1.57)	52.83 <sup>a</sup>	±116.5 0	(6.74) – (98.92)	23.76 <sup>ab</sup>	±36.88	(9.17) – (38.35)	-8.97 <sup>b</sup>	±106.63	(-33.20) – (-51.15)
8	27	-11.08 <sup>a</sup>	±0.35	(-16.85) – (-5.32)	-11.16 <sup>a</sup>	±0.70	(-19.11) – (-3.21)	20.45 <sup>a</sup>	±11.11	(-3.54) – (44.46)	13.27 <sup>a</sup>	±0.74	(1.41) – (25.13)	-17.41 <sup>a</sup>	±6.39	(-22.14) – (-56.97)
12	27	-6.33 <sup>ab</sup>	±0.31	(-11.72) – (-0.93)	-11.49 <sup>ab</sup>	±0.59	(-17.95) – (-5.03)	11.81 <sup>a</sup>	±12.87	(-11.87) – (35.49)	-1.12 <sup>ab</sup>	±0.96	(-14.87) – (12.62)	-34.82 <sup>b</sup>	±3.86	(7.03) – (62.62)
24	27	-14.65 <sup>b</sup>	±0.36	(-20.62) – (-8.68)	-26.08 <sup>b</sup>	±0.81	(-35.52) – (-16.63)	-18.87 <sup>b</sup>	±7.00	(-38.62) – (0.87)	-24.69 <sup>b</sup>	±0.66	(-37.70) – (-11.67)	-69.45 <sup>a</sup>	±1.59	(56.41) – (82.49)
48	27	-29.14 <sup>c</sup>	±0.27	(-33.83) – (-24.45)	-49.61 <sup>b</sup>	±0.53	(-54.43) – (-44.79)	-60.90 <sup>ab</sup>	±4.14	(-72.22) – (-49.59)	-52.77 <sup>ab</sup>	±0.43	(-61.40) – (-44.15)	-69.74 <sup>a</sup>	±1.69	(57.90) – (81.58)
72	27	-40.31 <sup>b</sup>	±0.31	(-44.81) – (-35.80)	-60.81 <sup>a</sup>	±0.53	(-67.34) – (-54.27)	-82.32 <sup>abc</sup>	±2.42	(-94.51) – (-70.14)	-59.82 <sup>a</sup>	±0.21	(-65.60) – (-54.05)	-74.39 <sup>ac</sup>	±1.91	(62.56) – (86.22)

<sup>AB</sup> Diferente letra indica diferencias significativas entre métodos  $p < 0.05$

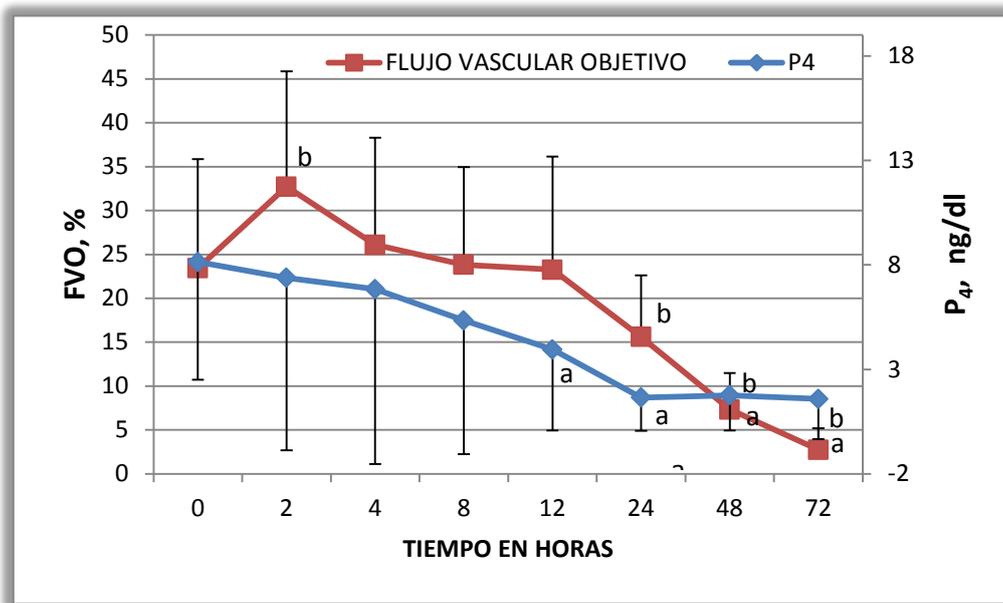
<sup>abc</sup> Diferente letra indica diferencias significativas entre valores de la misma fila  $p < 0.05$



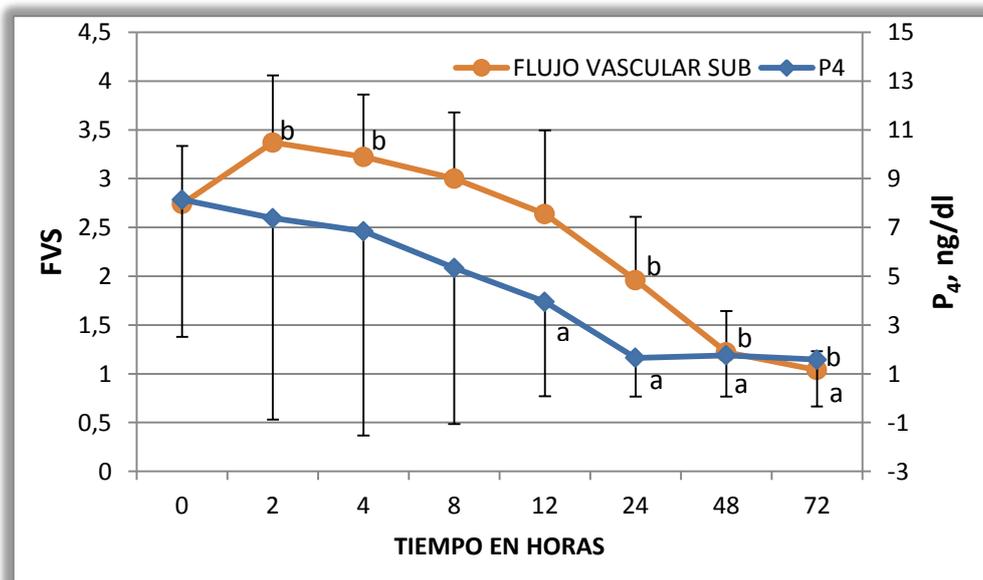
Gráfica 1.- Comparación entre el cambio en la concentración de progesterona y la superficie del cuerpo lúteo en las 72 horas posteriores a la administración de la prostaglandina. Los valores son medias  $\pm$  SD de 27 vacas. Valores con letras(a, b) son estadísticamente diferentes de la hora 0 ( $p < 0.05$ ).



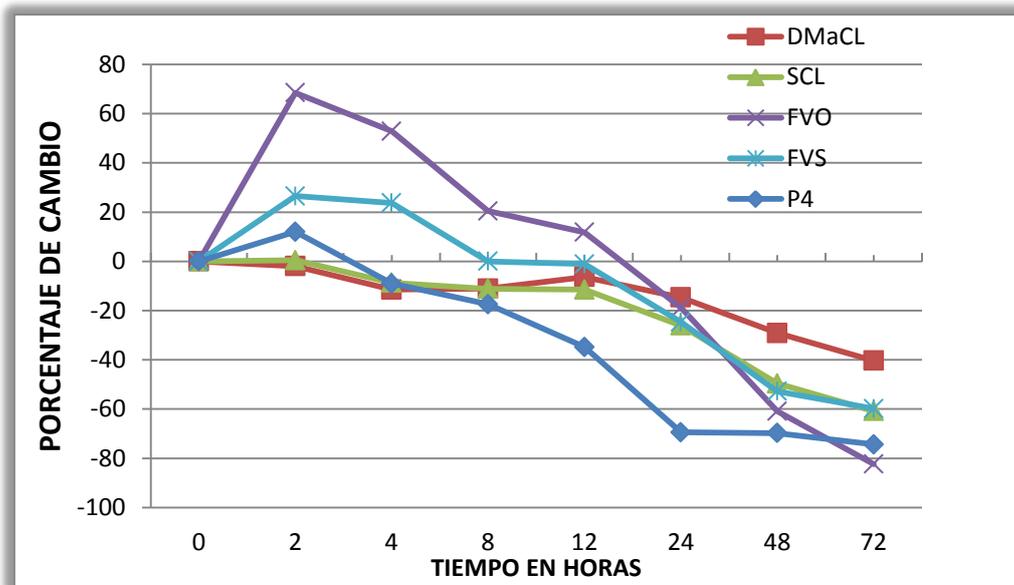
Gráfica 2.- Comparación entre el cambio en la concentración de progesterona y el diámetro mayor del cuerpo lúteo en las 72 horas posteriores a la administración de la prostaglandina. Los valores son medias  $\pm$  SD de 27 vacas. Valores con letras(a, b) son estadísticamente diferentes de la hora 0 ( $p < 0.05$ ).



Gráfica 3.- Comparación entre el cambio en la concentración de progesterona y el flujo vascular objetivo del cuerpo lúteo en las 72 horas posteriores a la administración de la prostaglandina. Los valores son medias  $\pm$  SD de 27 vacas. Valores con letras(a, b) son estadísticamente diferentes de la hora 0 ( $p < 0.05$ ).



Gráfica 4.- Comparación entre el cambio en la concentración de progesterona y el flujo vascular subjetivo del cuerpo lúteo en las 72 horas posteriores a la administración de la prostaglandina. Los valores son medias  $\pm$  SD de 27 vacas. Valores con letras(a, b) son estadísticamente diferentes de la hora 0 ( $p < 0.05$ ).



Gráfica 5.- Porcentaje de cambio, respecto a la hora 0, de las diferentes medidas a lo largo del tiempo.

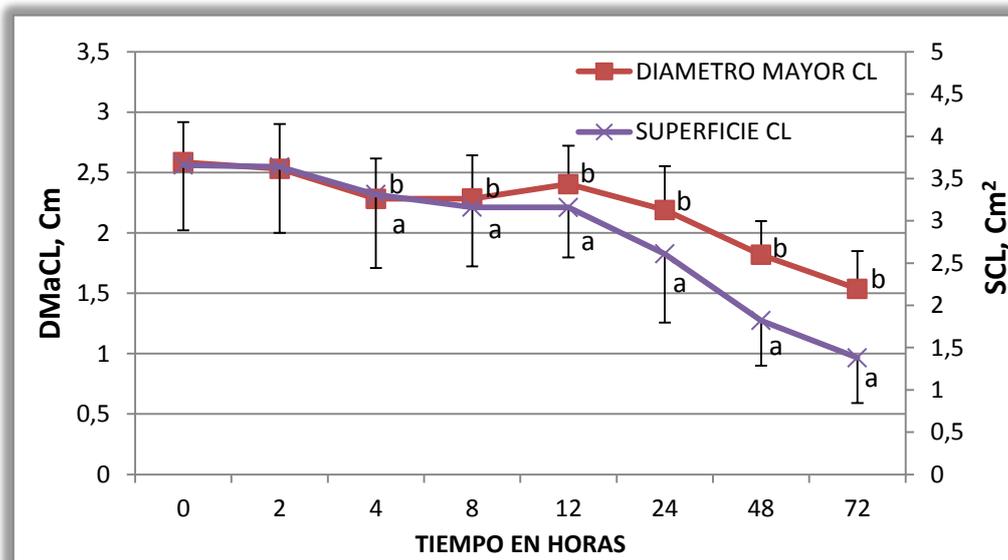
#### 4.3. Comparación entre los diferentes métodos de evaluación de la funcionalidad del cuerpo lúteo.

En la tabla 3 se muestran las correlaciones entre los diferentes métodos, en esta tabla se puede ver como la correlación es mayor entre el tamaño del cuerpo lúteo y la P<sub>4</sub> que entre el FV y la P<sub>4</sub>, si bien la diferencia es pequeña y en todos los casos estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ). Sin embargo, cuando lo que comparamos es el porcentaje de cambio en el tiempo (tabla 2, gráfica 4), el DMaCL, el FVO y FVS son estadísticamente diferente de la P<sub>4</sub> ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.01$  respectivamente), mientras que SCL no lo es ( $p > 0.05$ ).

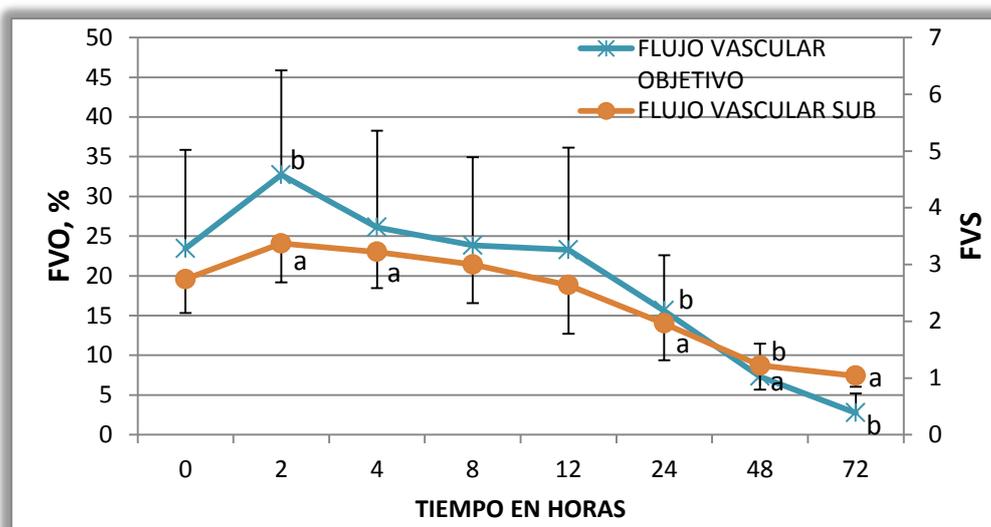
La correlación entre los dos métodos que determinan el tamaño del CL y los que determinan su FV es muy alta y estadísticamente significativa (0,92 y 0,88 respectivamente,  $p < 0.01$ ), lo que se refleja en la tabla 2 y gráficas 6 y 7 en las que las dos curvas son muy similares. Existen, sin embargo, pequeñas diferencias:

En el caso del tamaño, el porcentaje de cambio a partir de las 12 horas es superior en la superficie que en el diámetro mayor del CL (gráfica 4, tabla 2). Esta diferencia es estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). En el FV, el cambio es mayor en la valoración objetiva al principio y al final, siendo similar en los controles intermedios (gráfica 4, tabla 2), sin embargo, en este caso, la diferencia no es estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ).

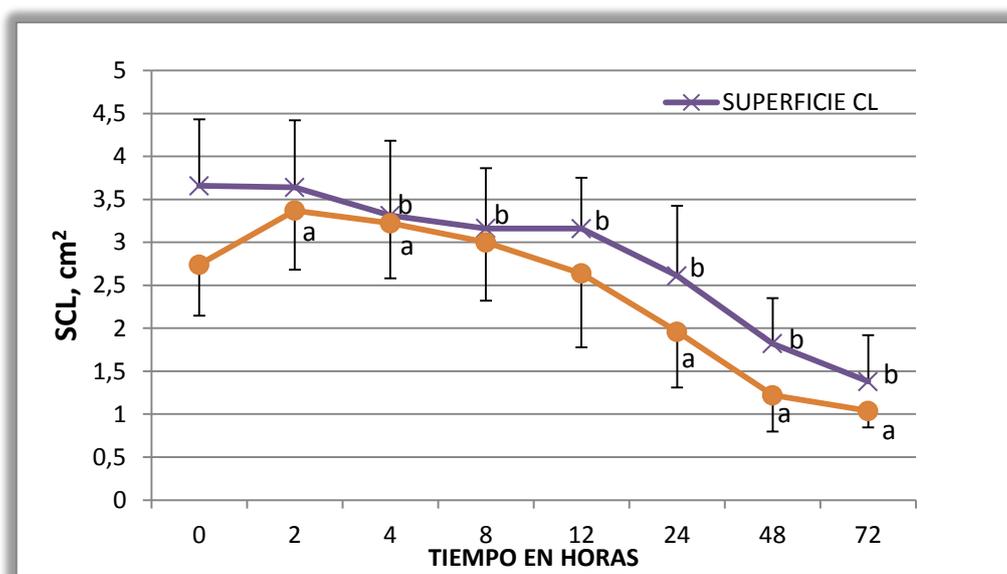
Al comparar los cambios en el tamaño del CL con el FV la curva es muy similar a partir de las 24 horas (gráfica 8), con porcentajes de cambio muy similares entre la superficie y el FVS del CL (gráfica 4, tabla 2). La correlación entre ambos métodos es de 0,64 ( $p < 0.01$ ) pero existen diferencias significativas en el porcentaje de cambio entre las dos curvas ( $p < 0.01$ ).



Gráfica 6.- Comparación entre las dos medidas de tamaño del cuerpo lúteo en las 72 horas posteriores a la administración de la prostaglandina. Los valores son medias  $\pm$  SD de 27 vacas. Valores con letras (a, b) son estadísticamente diferentes de la hora 0 ( $p < 0.05$ ).



Gráfica 7.- Comparación entre los dos métodos de evaluar el flujo vascular del cuerpo lúteo en las 72 horas posteriores a la administración de la prostaglandina. Los valores son medias  $\pm$  SD de 27 vacas. Valores con letras (a, b) son estadísticamente diferentes de la hora 0 ( $p < 0.05$ ).



Gráfica 8.- Comparación entre la superficie y el flujo vascular subjetivo del cuerpo lúteo en las 72 horas posteriores a la administración de la prostaglandina. Los valores son medias  $\pm$  SD de 27 vacas. Valores con letras(a, b) son estadísticamente diferentes de la hora 0 ( $p < 0.05$ ).

Tabla 3.- Correlación entre los diferentes métodos de evaluación de la funcionalidad del cuerpo lúteo.

	DMaCL	SCL	FVO	FVS	P4
DMaCL	-	0,917**	0,501**	0,581**	0,359**
SCL	0,917**	-	0,564**	0,638**	0,367**
FVO	0,501**	0,564**	-	0,876**	0,296**
FVS	0,581**	0,638**	0,876**	-	0,301**
P4	0,359**	0,367**	0,296**	0,301**	-

\*\* Correlación significativa  $< 0,01$  (bilateral).

## **5. *Discusión***

Debemos comenzar indicando que el hecho de que se haya producido un 90% de respuesta a la administración de la PGF<sub>2α</sub> en el día cero, indica que el criterio elegido para seleccionar los animales fue el adecuado (diámetro del CL ≥ 1,8 cm y presencia de flujo vascular). Es bien conocido que, en la vaca, las PG sólo inducen la luteólisis a partir del día 5 postovulación (Acosta et al., 2002), debido a la falta de sensibilidad hasta ese momento de los receptores para la PGF<sub>2α</sub> de las células luteales (Wiltbank et al., 1995). Por lo tanto, existen dos formas de asegurarse que el CL se encuentra en el período receptivo: o bien conociendo el momento en que se produjo la ovulación, que no fue posible en las vacas del estudio, o buscando indicadores de la funcionalidad del CL como pueden ser el tamaño y el FV, como indica Herzog et al. en su trabajo del 2010

### **5.1. Variación en el tiempo**

Diferentes estudios realizados en ganado vacuno señalan el descenso progresivo y paralelo de los niveles de progesterona y el tamaño del CL tras la luteólisis (Acosta et al., 2002; Herzog et al., 2010; Gaja et al., 2013), así como la existencia de una relación entre el tamaño del cuerpo lúteo y la producción de P<sub>4</sub> (Fernandez et al., 2008).

Nuestras observaciones coinciden con estas afirmaciones, ya que el descenso en la SCL y en la concentración sanguínea de P<sub>4</sub> ha sido muy similar. No ocurrió lo mismo al considerar el DMaCL, en este caso aunque se producía una disminución, ésta era mucho menor. Algo similar fue apuntado en el trabajo de Fernández et al. (2008) quienes indicaban la existencia de una correlación significativa con el área pero no con el DMaCL. La explicación a esta diferencia puede estar en que el CL se reduce en sus dos diámetros, mayor y menor, y la suma de estas dos reducciones es la que vemos en el área, siendo por lo tanto más apreciable.

El FV está directamente relacionado con la regresión lútea, de forma que la PG, ya sea endógena o exógena, induce una vasoconstricción en el CL y en consecuencia una hipoxia que provoca la muerte de las células luteínicas (Miyamoto y Shirasuna, 2009; Salles y Araujo, 2010). Por lo tanto, cabría esperar un descenso del FV y del tamaño del CL paralelo al de la P<sub>4</sub>, sin embargo, los resultados muestran un incremento inicial del FV para posteriormente descender, coincidiendo con la mayoría de los artículos sobre el tema (Acosta et al., 2002; Miyamoto y Shirasuna, 2009). Esto se produce como consecuencia de que la PGF<sub>2α</sub>, antes de que produzca la vasoconstricción, produce un incremento en la circulación periférica del CL (Acosta et al., 2002; Ginter et al., 2007). Este incremento de FV inmediatamente después de la administración

de la  $PGF_{2\alpha}$  es, en realidad, el principio de la cascada de la luteólisis (Miyamoto y Shirasuna, 2009). Sin embargo, no todas las especies se comportan de la misma forma, ya que este incremento no se ha observado en yeguas (Ginter et al., 2006). Este incremento se produce en las horas posteriores al tratamiento (4h u 8h dependiendo de si la medida del FV es objetiva o subjetiva). Este hecho, podría explicar por qué en algunos trabajos, donde se realizaban exploraciones con intervalos de tiempo mayores (12-24h), no se observaba este incremento (Miyamoto et al., 2005) y sin embargo, se puede apreciar cuando se realizan exploraciones ecográficas a intervalos muy cortos (Ginter et al., 2007).

## **5.2. Comparación entre métodos utilizando $P_4$ como referencia de funcionalidad**

Las cuatro medidas de funcionalidad del CL utilizadas (dos de tamaño y dos de flujo vascular) están correlacionadas significativamente con los valores de progesterona plasmática, aunque esta correlación no es muy alta (de 0,30 en el caso de FVO a 0,37 en la SCL). Sin embargo, cuando comparamos globalmente los porcentajes de cambio de los diferentes métodos, el único que no mostró diferencias significativas con la  $P_4$  fue la superficie del cuerpo lúteo (SCL). Esto indica que la SCL y la  $P_4$  evolucionan durante el estudio de forma similar, postulando este método, a priori, como el más eficaz para determinar la funcionalidad del CL. Sin embargo, trabajos relativamente recientes indican que el tamaño del CL no es el método más adecuado para evaluar su funcionalidad (Tom et al. 1998; Veronesi 2002). Concretamente, en el trabajo de Tom et al. (1998) se indica que el tamaño del CL se reduce más lentamente que la  $P_4$ , lo que coincide con nuestros resultados, sin embargo la SCL es el único parámetro cuyo porcentaje de cambio no es estadísticamente diferente de la  $P_4$ .

La otra medida de tamaño empleada, el diámetro mayor del cuerpo lúteo (DMaCL), aunque evoluciona de forma similar, su porcentaje de cambio es menor y por eso es estadísticamente diferente de la  $P_4$  e incluso de la SCL. Por lo que resulta menos eficaz que la medida anterior.

Las dos medidas de flujo analizadas son estadísticamente diferentes de la  $P_4$  y la SCL, pero esto es debido al incremento inicial. Sin embargo, salvando la elevación de las primeras horas, a partir de las 48h la evolución es muy similar.

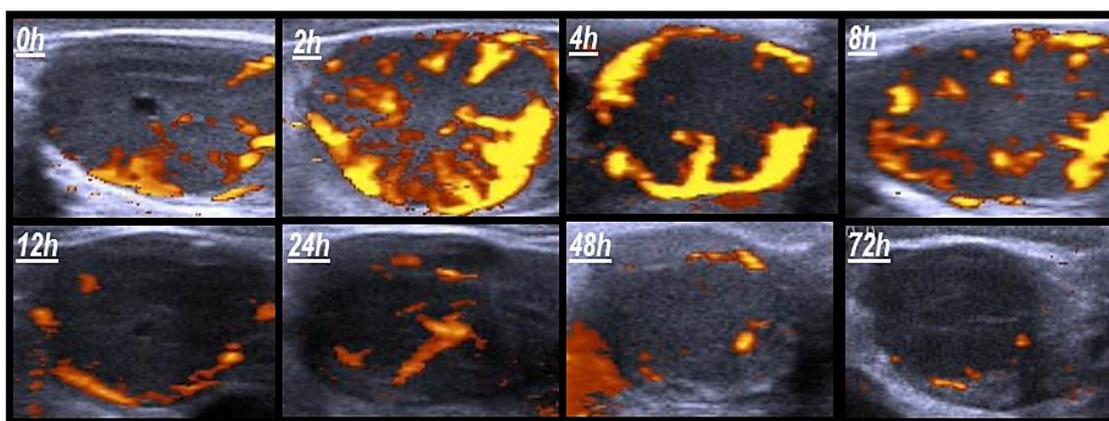


Figura 8. Secuencia de imágenes ecográficas en la vaca nº 23. Modo Doppler-Potencia del flujo vascular en el CL tras la inducción de luteólisis con  $PGF_{2\alpha}$

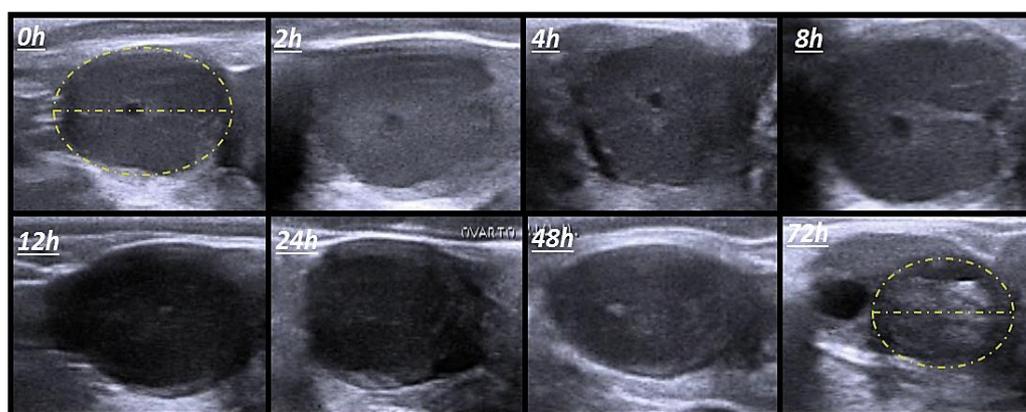


Figura 9. Secuencia de imágenes ecográficas Modo-B en la vaca nº 23. Medición de diámetro mayor y superficie del CL tras la inducción de luteólisis con  $PGF_{2\alpha}$

Entre la medida del FVO y FVS no existen diferencias significativas, si bien, las desviaciones son mayores en el caso del FVO. Parece una incongruencia que la medida objetiva presente desviaciones mayores que la subjetiva, pero tiene una sencilla explicación. Como se detalla en el material y métodos, la medida objetiva del FV se realiza en una única imagen procedente de una sección transversal del centro del CL. Pero hay que tener en cuenta que el FV del CL no es homogéneo, siendo mucho mayor en la periferia, en donde se localizan vasos más grandes, que en el centro, en el que se encuentran microcapilares (Shirasuna, 2010). Por el contrario, la medida subjetiva se realiza sobre las imágenes obtenidas de un barrido completo del CL, obteniendo de esta forma una imagen más real del FV. Sin duda, una solución a este problema

sería extraer varias imágenes de cada CL, calcular el FV en cada una y luego hacer la media de todas para dar el valor final tal como indican otros autores (Thijssen et al. 2011).

Desde un punto de vista práctico, a nivel de campo, debemos dar un diagnóstico al momento, lo que invalida el uso de la determinación del FVO, ya que, bien como se ha llevado a cabo en este trabajo o bien como proponen otros autores, las imágenes tienen que ser procesadas a posteriori, por lo que pasará un tiempo hasta poder emitir un juicio. No ocurre lo mismo con el FVS, ya que se puede evaluar al mismo tiempo que se explora la vaca. Respecto a las medidas de tamaño, el DMaCL, como ya hemos mencionado, varía muy poco, mientras que la SCL varía en mayor grado lo que lo hace más adecuado. En determinados ecógrafos, la medida de la SCL se pueden realizar rápidamente durante o tras la exploración, pero en otros (que, además, muy probablemente no tengan la función Doppler) solo podremos medir los diámetros del CL y tendremos que calcular la superficie mediante una fórmula o realizar una valoración subjetiva.

## **6. Conclusiones**

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la determinación del cambio en la superficie del cuerpo lúteo es probablemente el método que mejor nos permite evaluar su funcionalidad.

La determinación del flujo vascular permite detectar cuerpos lúteos en regresión un poco más tarde que la evaluación del tamaño (a partir de las 48 horas), pero llegado ese momento es tan efectiva como el método anterior.

Entre la determinación objetiva y subjetiva del flujo vascular no existen prácticamente diferencia, con lo que se puede utilizar sin problema la valoración subjetiva, mucho más rápida y sencilla.

En definitiva, si disponemos de un ecógrafo con ambas funciones (modo B y color), probablemente la mayor eficacia la consigamos combinando ambos métodos.

En un futuro, sería interesante determinar los puntos de corte de la superficie y del porcentaje de flujo que nos permitieran identificar con una sola exploración si estamos ante un cuerpo lúteo funcional o en regresión.

## ***7. Referencias Bibliográficas***

- Abdullahi Y.R and Toshihiko N.** (1999) "Bovine Reproductive Ultrasonography: A Review" Journal of Reproduction and Development **45**(1): 13.
- Acosta T. J., Yoshizawa N., Ohtani M. and Miyamoto A.** (2002) "Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F(2 alpha) injection in the cow." Biology Reproduction **66**(3): 651-658.
- Acosta T.J., Hayashi K.G., Ohtani M. and Miyamoto A.** (2003). "Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows" Reproduction **125**: 759–767.
- Acosta T.J., Hayashi K.G., Matsui M., Miyamoto A.** (2005) "Changes in follicular vascularity during the first follicular wave in lactating cows." Journal of Reproduction and Development **51**: 273–280.
- Araujo R.R. & Ginther O.J.** (2009) "Vascular perfusion of reproductive organs in pony mares and heifers during sedation with detomidine or xylazine." American Journal Veterinary Research **70**: 141–148.
- Bicalho R.C., Galva K.N., Guard .C.L., Santos J.E.P.** (2008) "Optimizing the accuracy of detecting a functional corpus luteum in dairy cows" Theriogenology **70**:199–207.
- Bollwein H., Luttgenau J. and Herzog K.** (2012) "Bovine luteal blood flow: basic mechanism and clinical relevance." Journal of Reproduction Fertility and Development **25**(1): 71-79.
- Bowen-Shauver J.M, Telleria C.M.** (2003) "Luteal regression: a redefinition of the terms." Reproductive Biology and Endocrinology **24**: 1-28.
- Brannstrom M., Zackrisson U., Hagstrom H., Josefsson B., Hellberg P., Granberg S., Collins W., Bourne T.** (1998) "Preovulatory changes of blood flow in different regions of the human follicle." Fertility and Sterility **69**: 435–442.
- Cuervo A.J., García R.E., García M.A., Valdecabres T.X., Martínez R.P., González B.A.** (2011) "The effect of a single high dose of PGF2alpha administered to dairy cattle 3.5 days after ovulation on luteal function, morphology, and follicular dynamics." Theriogenology **76**(9): 1736-1743.
- DesCoteaux L., Colloton J. and Gnemmi G.** (2010) "Practical atlas of ruminant and camelid reproductive ultrasonography." Blackwell Publishing, Iowa, USA.
- Dudwiesus H., Krieg R., Schmidt K.J.** (1993) "Physikalische Grundlagen und Technik". In: Sohn C, Stolz W, Bastert G (eds), Dopplersonographie in der Gyna kologie und Geburtshilfe. Thieme, Stuttgart, New York.
- Fernandez M., Veiga L.D., Ariznavarreta A., Tresguerres C., Encinas J.A.F., Gonzalez B.T.** (2008) "Preovulatory follicle development in goats following oestrous synchronization with progestagens or prostaglandins." Reproduction in Domestic Animals **43**: 9-14.

- Gaja A., Al-Dahash S., Raju G.S., & Kubota C.** (2013) "Ultrasonic assessment of corpora lutea and plasma progesterone levels in early pregnant and non-pregnant cows." Journal of Advanced Biomedical & Pathobiology Research **3**(1).
- Ginther O.J., Utt M.D.,** (2004) "Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques and potential." Journal of Equine Veterinary Science **24**, 516–526.
- Ginther O.J., Gastal E.L., Gastal M.O. & Beg M.A.** (2006) "Conversion of a viable preovulatory follicle into a hemorrhagic anovulatory follicle in mares." Animal Reproduction **3**, 29-40.
- Ginther O.J.** (2007) "Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color-Doppler Ultrasonography." Equiservices Publishing, Cross Plains, Wisconsin, USA.
- Ginther O.J., Silva L.A., Araujo R.R., Beg M.A.** (2007) "Temporal associations among pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF<sub>2a</sub>, luteal blood flow, and luteolysis in cattle." Biology of Reproduction **76**:506–13.
- Hanzen Ch., Pieterse M., Scenczi O., and Drost M.** (2000) "Relative Accuracy of the Identification of Ovarian Structures in the Cow by Ultrasonography and Palpation Per Rectum" The Veterinary Journal **159**, 161–170.
- Henricks D.M., Long J.T., Hill J.R., Dickey J.F.** (1974) "The effect of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha during various stages of the oestrous cycle of beef heifers." Journal of Reproduction and Fertility **41**:113–20.
- Bollwein H., Lüttgenau J. and Herzog K.** (2013) "Bovine luteal blood flow: basic mechanism and clinical relevance." Reproduction Fertility and Development **25**: 71-79.
- Herzog K. and Bollwein H.** (2007) "Application of Doppler ultrasonography in cattle reproduction." Reproduction in Domestic Animals **42**: 51-58.
- Herzog K., Brockhan M., Kaske M., Beindorff N., Paul V., Niemann H. and 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.
- Isobe N., Yoshimura T., Yoshida C., Nakao T.** (2004) "Incidence of silent ovulation in dairy cows during postpartum period" Dtsch Tierarztl Wochenschr **111**:35–8.
- Kahn C.M.** (2010) "Cystic ovary disease." In: Scott Line (ed.), *The Merck Veterinary Manual*, 10<sup>th</sup> edn. Whitehouse Station, NJ: Merck, pp. 1233-1247.
- Kremkau F.W.** (1992) "Doppler Color Imaging: Principles and Instrumentation." Clinical Diagnostic Ultrasound **27**:7-60.
- Lamond D.R., Tomlinson R.V., Drost M., Henricks D.M., Jolche W.** (1973) "Studies of prostaglandin F<sub>2α</sub> in the cow." Prostaglandins **4**:269–284.

**Miyamoto A., Shirasuna K., Wijayagunawardane M.P., Watanabe S., Hayashi M., Yamamoto D., Matsui M. and Acosta T.J.** (2005) "Blood flow: a key regulatory component of corpus luteum function in the cow." Domestic Animals Endocrinology **29**(2): 329-339.

**Miyamoto A., Shirasuna K., Hayashi K.G., Kamada D., Kawashima C., Kaneko E. and Acosta T.J.** (2006) "A potential use of color ultrasound as a tool for reproductive management: new observations using color ultrasound scanning that were not possible with imaging only black and white." Journal of Reproduction and Development **Vol 52**(1): 153-160.

**Miyamoto A. and Shirasuna K.** (2009) "Luteolysis in the cow: a novel concept of vasoactive molecules." Animal Reproduction Science **6**(1): 47-59.

**Miyazaki T., Tanaka M., Miyakoshi K., Minegishi K., Kasai K., Yoshimura Y.** (1998) "Power and color Doppler ultrasonography for the evaluation of the vasculature of the human corpus luteum." Human Reproduction **13**: 2836–2841.

**Mohamed S., Medana A., AbdEl-Atyba M.** (2010) "Advances in ultrasonography and its applications in domestic ruminants and other farm animals reproduction." Journal of Animal Reproduction **1**: 123–128.

**Niswender G.D., Juengel J.L., Silva P.J., Rollyson M.K., McIntush E.W.** (2000) "Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum" Physiological Reviews **80**:1–29.

**Noseir W.M.** (2003) "Ovarian follicular activity and hormonal profile during estrous cycle in cows: the development of 2 versus 3 waves." Reproductive Biology and Endocrinology **1**:50.

**Penny LA.**(2000) "Monocyte chemoattractant protein 1 in luteolysis." Reviews of Reproduction **5**:63–6.

**Perez M.** (2009) "Formation of corpora lutea and central lutea cavities and their relationship with plasma progesterone levels and other metabolic parameters in dairy cattle" Reproduction in Domestic Animals **44**, 384-389.

**Peter A.T., Jakovljevic S., Pierson R.A.** (1992) "Use of real time ultrasonography in bovine and equine reproduction." Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian **14**: 1116–1124.

**Peter A.T., Levine H., Drost M., Bergfelt D.R.** (2009) "Review: Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle." Theriogenology **71**: 1343–1357.

**Quintela L.A., Barrio M., Pena A.I., Becerra J.J., Cainzos J., Herradon P.G. and Diaz C.** (2012) "Use of ultrasound in the reproductive management of dairy cattle." Reproduction in Domestic Animals **47**(3): 34-44.

**Quintela L.A., Díaz C., Becerra J.J., Alonso G., Gracia S. and Herradón P.G.** (2008) "Papel del  $\beta$ -caroteno y la vitamina A en la reproducción en el ganado vacuno: revisión." Información Técnica Económica Agraria **104**(3):399-410.

**Reynolds L., Grazul B.A., Redmer D.** (2000) "Angiogenesis in the corpus luteum." Endocrine **12**:1–9.

**Roelofs J.B, Van-Eerdenburg F.J., Soede N.M., Kemp B.** (2005) "Various behavioral signs of estrous and their relationship with time of ovulation in dairy cattle" Theriogenology **63**:1366–77.

**Mendiguren S.R, García L.A., Viteri R.G., Arias F.J., Simón Y.I., Bondía J.M.** (2010) "Conceptos básicos de ecografía Doppler." Servicio de Radiología- Clínica Universidad de Navarra. 28-31 mayo 2010, 30 Congreso Nacional, seram.

**Salles M.G.F. & Araujo A.A.** (2010) "Corpo lúteo cíclico e gestacional: revisão." Revista brasileira de reprodução animal **34**: 185-194.

**Sartori R., Haughian J.M., Shaver R.D., Rosa G.J.M., Wiltbank M.C.** (2004) "Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows." Journal of Dairy Science **87**:905–20.

**Senger P.L.** (2005) "Pathways to pregnancy and parturition." Pullman, WA : Current Conceptions© 2nd rev. ed.

**Sheldon I.M., Wathes D.C., Dobson H.** (2006) "The management of bovine reproduction in elite herds" Vet J **171**:70–8.

**Shrestha H.K. and Ginther O.J.** (2011) "Increase in progesterone and luteal blood flow without a luteolytic response after prostaglandin F2alpha treatment in early luteal-phase heifers." Animal Reproduction Science **124** (1-2): 7-11.

**Shirasuna K., Yamamoto D., Morota K., Shimizu T., Matsui M., Miyamoto A.** (2008) "Prostaglandin F 2 alpha stimulates endothelial nitric oxide synthase depending on the existence of bovine granulosa cells: analysis by co-culture system of endothelial cells, smooth muscle cells and granulosa cells." Reproduction in Domestic Animals **43**: 592– 8.

**Shirasuna K., Sasahara K., Matsui M., Shimizu T., Miyamoto A.** (2010) "Prostaglandin F2alpha differentially affects mRNA expression relating to angiogenesis, vasoactivation and prostaglandins in the early and mid-corpus luteum in the cow." Journal of Reproduction and Development **56**: 428 –36.

**Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL.** (1996) "Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2." Journal of Biological Chemistry **271**: 33157-33160.

**Thijssen J.M., Herzog K., Weijers G., Brockhan L.M., Starke A., Niemann H., Bollwein H., Korte C.** (2011) "Ultrasound image analysis offers the opportunity to predict plasma progesterone concentrations in the estrous cycle in cows: A feasibility study" Animal Reproduction Science **127**: 7–15.

**Tom J.W, Pierson R.A, Adams G.P** (1998) "Quantitative echotexture analysis of bovine corpora lutea" Theriogenology **49**: 1345–52.

**Veronesi M.C., Gabai G., Battocchio M., Mollo A., Soldano F., Bono G., Cairoli F.** (2002) "Ultrasographic appearance of tissue is a better indicator of CL function than CL diameter measurement in dairy cows." Theriogenology **58**: 61-68.

**Wettemann R.P, Hafs H.D, Edgerton L.A, Swanson L.V** (1972) "Estradiol and progesterone in blood serum during the bovine estrous cycle" Journal of Animal Science **34**:1020-4.

**Wolfenson D., Thatcher W.W., Drost M., Caton D., Foster D.B., LeBlanc M.M.** (1985) "Characteristics of prostaglandin F measurements in the ovarian circulation during the oestrous cycle and early pregnancy in the cow." Journal of Reproduction and Fertility **75**:491-499.

**Wiltbank M.C, Shiao T.F, Bergfelt D.R and Ginther O.J** (1995) "Prostaglandin F2 alpha receptors in the early bovine corpus luteum." Biology of Reproduction **52**(1): 74-78.