



UNIVERSIDAD DE LEÓN

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA, CIRUGÍA Y ANATOMÍA VETERINARIA

“DIAGNÓSTICO ULTRAPRECOZ DE GESTACIÓN EN EL GANADO VACUNO MEDIANTE LA EXPLORACIÓN ECOGRÁFICA DEL CUERPO LÚTEO Y DETERMINACIÓN DEL SEXO DEL FETO MEDIANTE VALORACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA”.

Memoria que presenta para optar al grado de Doctora la Licenciada en Veterinaria

JUDITH TEJERO MARTÍNEZ

León, Enero de 2008



**INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)**

Los Drs. **J. Carlos Domínguez Fernández-Tejerina** y **Beatriz Alegre Gutiérrez** como Directores de la Tesis Doctoral titulada “**Diagnóstico ultraprecoz de gestación en el ganado vacuno mediante la exploración ecográfica del cuerpo lúteo y determinación del sexo del feto mediante valoración de los niveles plasmáticos de testosterona**” realizada por Dña. **Judith Tejero Martínez** en el Departamento de Medicina, Cirugía y Anatomía Veterinaria, informa favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a de
Enero de 2008.

Fdo.: Dr. J. Carlos Domínguez Fdez-Tejerina

Fdo.: Dra. Beatriz Alegre Gutierrez



Universidad de León

ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y
Norma 7ª de las Complementarias de la ULE)

El Departamento de **Medicina, Cirugía y Anatomía Veterinaria** en su reunión celebrada el día de Enero de 2008 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada **“Diagnóstico ultraprecoz de gestación en el ganado vacuno mediante la exploración ecográfica del cuerpo lúteo y determinación del sexo del feto mediante valoración de los niveles plasmáticos de testosterona”**, dirigida por el Dr. D. J. Carlos Domínguez Fernández-Tejerina y el Dra. Dña. Beatriz Alegre Gutiérrez, elaborada por Dña. Judith Tejero Martínez y cuyo título en inglés es el siguiente **“Gestation early diagnosis in cattle by means of ecographyc exploration of the corpus luteum and determination of the foetal sex by means valuation the plasmatic testosterone”**.

Lo que firmo, para dar
cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a de Enero de 2008.

Vº Bº
El Director del Departamento,

El Secretario,

Fdo.: Felipe Prieto Montaña

Fdo.: Juan H. Rejas López

“Un científico es un hombre tan endeble y humano como cualquiera, sin embargo, la búsqueda científica puede ennoblecerle, incluso en contra de su voluntad”

Isaac Asimov

A todos los que han creído en mí

AGRADECIMIENTOS.

A mis directores de Tesis Doctoral, D. J. Carlos Domínguez Fernández-Tejerina y Dña. Beatriz Alegre Gutierrez, por la confianza depositada en mí para la realización del presente trabajo, por su inestimable ayuda y apoyo incondicional a lo largo de estos años.

A mi familia y amigos, por su paciencia, ánimo y apoyo prestado incluso en los momentos más difíciles. Gracias a todos ellos por saber escucharme.

A D. Francisco Álvarez Baldor y D. Rubén Iglesias Álvarez, Veterinarios de la Cooperativa AFRIVEPA de Santa M^a del Páramo (León), por todo lo que me han enseñado y apoyado durante todos estos años. Sin ellos no hubiera sido posible la realización de esta Tesis Doctoral.

A los ganaderos de la Cooperativa AFRIVEPA, por su paciencia, su buen humor y su desinteresada ayuda.

A todos mis compañeros del Departamento de Reproducción y Obstetricia de la Universidad de León: D. Fernando Tejerina, D. José Carlos García, D. Raúl González, D. Sergio Bernal, Dña. Sonia Cárdenas, D. Javier Campos y D. Cristian Córdova.

A Julen Susperregui Lesaca, profesor titular del Departamento de Matemáticas de la Universidad de León, por su asesoramiento y paciencia demostrada conmigo.

A Pablo Argüello García, Veterinario del Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de León, por el interés demostrado en la realización de la parte analítica de este trabajo de investigación.

I. GLOSARIO Y ABREVIATURAS.

<h3><i>I.1. Glosario de términos ecográficos.</i></h3>
--

I.2. Abreviaturas.

Glosario**I.1. GLOSARIO DE TÉRMINOS ECOGRÁFICOS**

Anecógeno. Define un elemento en que los ultrasonidos no se reflejan, como por ejemplo, los líquidos puros: agua, bilis, algunos derrames y orina.

Artefacto. Alteración de la imagen ecográfica, producida artificialmente durante una exploración.

Atenuación de los ecos. Disminución de la energía de los ultrasonidos a medida que penetran en los tejidos; ello se traduce por una disminución de la ecogenicidad en profundidad.

Borde de abordaje. Borde por el cual los ultrasonidos penetran en un órgano.

Borde de fuga. Borde por el cual los ultrasonidos salen de un órgano.

Cola de cometa. Imagen hiperecogena que encontramos cuando el haz de ultrasonidos choca contra una miniburbuja de aire o una pequeña superficie mineralizada, aire contenido en las asas intestinales, calcificaciones erráticas, pequeños cálculos, etc. Es un fenómeno de reverberación que se traduce por la formación de una sucesión de pequeños trazos horizontales.

Corte ecográfico. Por analogía con el corte anatómico, es la imagen ecográfica que obtenemos a partir de un plano de corte determinado.

Corte longitudinal. Corte que atraviesa el órgano según su eje mayor.

Corte recurrente. Corte transversal oblicuo con inclinación craneal, ejecutado próximo al borde costal. Se utiliza para la exploración ecográfica del hígado.

Cristal pizoeléctrico. Cristal que posee la capacidad de transformar la energía eléctrica en ondas ultrasónicas. También convierte la energía de vibración transmitida por el retorno de las ondas ultrasónicas en energía eléctrica. Es el fenómeno de transducción. Cada sonda contiene uno o varios cristales. Cada cristal es definido por su frecuencia de emisión: 7'5, 5 y 3'5 MHz son las frecuencias más usadas en Medicina Veterinaria.

Difracción o refracción. Desviación que sufre la propagación de las ondas ultrasónicas, cuando encuentran un obstáculo.

Difusión. Orientación en todas direcciones. Las ondas ultrasónicas sufren difusión en el seno de los parénquimas.

Distal. Dícese de un tejido u órgano atravesado por los ultrasonidos tras otro tejido u órgano: por ejemplo, el colon se encuentra distal a la vejiga.

Ecógeno. Material que refleja los ultrasonidos; la imagen es más o menos blanquecina según la ecogenicidad del órgano o de la región estudiada.

Ecografía (sinónimo ultrasonografía). Exploración de un órgano o de una región del cuerpo mediante ultrasonidos. Un haz de ultrasonidos se dirige hacia la zona que se ha de estudiar, siguiendo breves impulsiones sucesivas, y los ecos devueltos por los diferentes elementos de esta zona son recogidos entre las impulsiones y proyectados sobre un osciloscopio.

Ecografía bidimensional, ecotomografía o ultrasonotomografía. Exploración ecográfica que permite obtener una imagen mediante un corte estático o dinámico del órgano explorado. Permite estudiarlo especialmente cuando estos cortes se repiten siguiendo varios planos paralelos, longitudinales y luego transversales. Estos cortes pueden estudiarse sobre una pantalla catódica, fotografías o cintas de vídeo.

Ecografía modo A (amplitud). La intensidad de los ultrasonidos reflejados se transcribe sobre la pantalla mediante una sucesión de picos. La altura de cada pico caracteriza el medio, y la distancia entre cada pico indica la distancia que separa dos medios.

Ecografía modo B (brillo). La mayor o menor intensidad de la reflexión de los ultrasonidos se traduce sobre la pantalla por un aspecto más o menos brillante de los pixels.

Efecto costilla. Imagen hiperecógena; artefacto provocado por un contacto directo entre la sonda y la costilla; se obtiene un eco de repetición que se caracteriza por la repetición de una línea recta hiperecógena de arriba abajo de la pantalla.

Efecto de margen. Artefacto en el cual una imagen ecógena se superpone a una imagen anecógena. Encontramos este artefacto sobretodo al ecografiar el hígado.

Efecto espejo. Artefacto que sugiere la presencia del hígado al otro lado del diafragma; las dos imágenes del parénquima hepático son simétricas respecto al diafragma.

Frecuencia de una sonda. Frecuencia a la cual el cristal pizeoeléctrico emite ondas ultrasónicas, entre los periodos de emisión, recibe las ondas reflejadas. Cuanto más elevada es la frecuencia de la sonda, mejor es la imagen sobre la pantalla, pero más débil es la penetración de las ondas ultrasónicas.

Ganancia. Ajuste que permite amplificar o atenuar los ecos reflejados ya sea de forma global en toda la profundidad de la imagen (ganancia total); ya sea de forma más selectiva, en algunas regiones de la imagen (curva de ganancia o TGC).

Hiperecógeno. Material que refleja los ultrasonidos de forma muy marcada; la imagen es muy blanquecina y más o menos brillante según la naturaleza de la región estudiada; es, por ejemplo, el caso del hueso, del aire, de los cálculos y de todas las estructuras mineralizadas.

Hipoecógeno. Material que refleja poco los ultrasonidos; la imagen es grisácea y más bien oscura.

Glosario

Imagen congelada. Imagen inmóvil; el cristal ya no vibra y la imagen queda fijada sobre la pantalla; el aparato ha grabado la última imagen.

Imagen dinámica. Imagen en movimiento que transcribe en directo los distintos cortes ecográficos efectuados por el cristal oscilante.

Impedancia acústica. Del latín “*impedire*”: impedir; inercia de un medio a la propagación de los ultrasonidos. Capacidad de determinados tejidos de frenar la transmisión de los ultrasonidos. La impedancia acústica es característica de la naturaleza del tejido y de la frecuencia de las ondas emitidas.

Isoecogénico. De la misma ecogenicidad.

Líquidos impuros. Líquidos en los cuales hallamos elementos en suspensión: células, fibrina, mucus, etc.

Líquidos puros. Líquidos sin elementos en suspensión; por ejemplo, agua, orina de carnívoros, bilis, trasudados, etc.

Plano de corte. Plano cuya orientación corresponde a la propagación de los ultrasonidos.

Plano de corte frontal ó coronal. Plano longitudinal, perpendicular al plano de simetría.

Plano de corte medial o sagital. Plano longitudinal, que pasa por el plano de simetría.

Plano de corte paramedial o parasagital. Plano longitudinal, paralelo a la columna vertebral y al plano de simetría.

Plano de corte transversal. Plano transversal, perpendicular a la columna vertebral y al plano medio.

Pixel. En una imagen digital, cada uno de los puntos o elementos pictóricos que la componen.

Posprocesado. Conjunto de ajustes que se efectúan sobre una imagen congelada.

Proximal. Dícese de un tejido u órgano atravesado por los ultrasonidos antes de que otro tejido u órgano: por ejemplo, el estómago está proximal al hígado siguiendo un corte recurrente.

Reflexión. El haz reflejado es aquel que regresa al primer medio sin atravesar la interfase que separa dos medios de impedancias acústicas distintas.

Refuerzo posterior. Imagen más ecogénica de lo normal, motivada por una amplificación de los ultrasonidos al pasar estos previamente por una estructura de baja atenuación.

Reverberación o eco de repetición. Imagen hiperecógica; artefacto provocado por la presencia del aire entre la sonda y la piel. Se observa una sucesión de curvas hiperecógicas en lo alto de la pantalla.

Sombra acústica. Imagen anecógica; artefacto provocado por la ausencia de ecos tras una estructura que refleja todos los ultrasonidos; esta última da lugar a una imagen hiperecógica, mientras que distalmente la imagen es anecógica.

Transductor. Pieza que es asiento de un efecto de transducción, es decir, transforma la energía eléctrica en energía mecánica y viceversa.

Ventana acústica. Órgano o región que transmite los ultrasonidos sin atenuarlos; por ejemplo, una vejiga llena es una buena ventana acústica para examinar los órganos dorsales a ella: próstata, útero.

Vía de abordaje. Punto de contacto entre la sonda y la piel que permite el estudio de un órgano o una región.

Glosario

GLOSARIO Y ABREVIATURAS.

I.1. Glosario de términos ecográficos.

I.2. Abreviaturas.

Abreviaturas

I.2. ABREVIATURAS

A Área

AFP Alfafetoproteína producida en el hígado y en el saco vitelino del feto

AgHBS Antígeno de superficie hepático

CA 125 Proteína que prevalece más en las células del cáncer ovárico que en otras células

CA 15.3 Antígeno asociado a los tumores de mama humanos

CA 19.9 Antígeno carbohidrato; ayuda a la diferenciación del cáncer de páncreas ó vías biliares

CEA Antígeno carcinoembrionario

CL Cuerpo lúteo

CLs Cuerpos lúteos

cm Centímetro

cm² Centímetro cuadrado

cm³ Centímetro cúbico

C° Grado centígrado

dB Decibelio

Dm Diámetro menor

DM Diámetro mayor

DG(+) Diagnóstico de gestación positivo

DG(-) Diagnóstico de gestación negativo

E₂ Estrógenos

[E₂] Concentración de estrógenos

€ Euro

FSH Hormona folículo estimulante

g Gramo

GH Somatotrofina u hormona del crecimiento

HDL Lipoproteína de alta densidad

Hz Hertzio

IA Inseminación artificial

ICSH Hormona estimulante de las células intersticiales

LDL Lipoproteína de baja densidad

LH Hormona luteinizante

MHz Megahertzio

m/seg Metros/segundo

mm Milímetro

mm² Milímetro cuadrado

mm³ Milímetro cúbico

mg Miligramo

ng/dl Nanogramo/decilitro

ng/ml Nanogramo/mililitro

nmol/L Nanomol/litro

n^o Número

n Número de observaciones

NP No preñada

OD Ovario derecho

OI Ovario izquierdo

P< Probabilidad

[P] Concentración de progesterona

PD Parámetros discriminativos de gestación

Abreviaturas

PA Número de parto ó lactación

P Preñada

$P(y=1)$ Probabilidad de macho

P Número de parto ó lactación

proBNP Propéptido natriurético cerebral N-terminal; es útil en el diagnóstico de insuficiencia cardiaca.

PSA Antígeno específico de la próstata (glicoproteína)

π Número pí (3,1416...)

r Correlación

S.O. Superovuladas

TSH Hormona estimulante del tiroides u hormona tirotrópica

T_4 Tirosina

T_3 Triyodotironina

μl Microlitro

μg Microgramo

V Volumen

% Porcentaje

$\pm st$ Error estándar

< Menor que

\leq Menor ó igual que

> Mayor que

\geq Mayor ó igual que

II. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

Introducción y objetivos**II.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.**

La utilización de los ultrasonidos en la reproducción bovina comienza a principios de los años 80 del pasado siglo. La primera aplicación de esta técnica fue el diagnóstico precoz de gestación realizada por Tainturier *et al.* (1983), utilizándose posteriormente con otros fines como el control de las estructuras ováricas, examen complementario del útero, sexaje fetal, etc. (citado por Mialot *et al.*, 1991 y Díaz *et al.*, 1995).

Sin embargo, su desarrollo y perfeccionamiento para el estudio de los eventos reproductivos se ha acelerado en la presente década (Tamayo, 2000).

La ecografía bidimensional es una técnica simple, rápida, de fácil aprendizaje. Es inofensiva para el manipulador, para el animal y para el feto (Chaffaux *et al.*, 1988).

En el caso del ganado vacuno, el procedimiento ideal es la ecografía lineal en modo-B, por la facilidad de interpretación de la imagen, ofrece una resolución lateral buena sobre toda la profundidad del campo examinado, y permite visualizar estructuras de gran dimensión (de varios centímetros), incluso cuando éstas se localizan en la superficie inmediata de la sonda, como ocurre con frecuencia en el examen genital bovino (Mialot *et al.*, 1991). Dadas las características de esta especie la vía ideal de acceso es siempre la transrectal y la frecuencia que más posibilidades ofrece es 5 MHz (Díaz *et al.*, 1995), aunque los ovarios, útero y gestaciones hasta los 40 días se ven mejor con las sondas de 7'5 MHz, para el sexado fetal y en hembras con el útero muy descendido, la sonda de 7'5 MHz tiene una penetración muy justa (Tamayo, 2000; Ruperez, 2004).

Las investigaciones actualmente se dirigen hacia la calidad de la imagen, la disponibilidad de los equipos portátiles, y la reducción de los costes para poder lograr una mayor aceptación por parte de la profesión Veterinaria (Rajamahendran *et al.*, 1994; Ruperez, 2004).

La técnica de ecografía en reproducción bovina se utiliza en la actualidad no sólo para el diagnóstico de gestación y sexaje fetal, sino también en otros muchos procesos reproductivos tales como la dinámica de ondas foliculares, desarrollo del CL y control de procesos patológicos del aparato reproductor (Tamayo, 2000; Fricke, 2004; De la Riera, 2004).

En resumen, podemos sintetizar que las ventajas de la ecografía aplicadas a la reproducción del ganado bovino son las siguientes:

- confirmación del estado de gestación y la viabilidad fetal.
- incremento de la eficacia en el diagnóstico de gestaciones gemelares hasta un 90%.
- Sexaje fetal entre los 55 y 90 días.
- Diagnóstico de problemas reproductivos.

Si bien estas cuatro posibilidades de aplicación de la ecografía son las más utilizadas hasta el momento, es necesario nuevas investigaciones que amplíen sus ventajas en el control reproductivo del ganado vacuno. En este sentido, hemos planteado el trabajo experimental de nuestra Tesis Doctoral, siendo nuestros objetivos los siguientes:

- Estudiar la evolución de las características ecográficas de las estructuras ováricas, con especial referencia a los CLs de: vacas cíclicas y vacas en el primer mes de la gestación.
- Analizar la dinámica de la evolución estructural y ecogénica de los CLs en los dos tipos de vacas mencionados
- Comprobar la eficacia del método de la ultrasonografía del CL como técnica de diagnóstico de gestación.

Finalmente, y ante las dificultades que se nos plantearon en la utilización de la ecografía para el sexado del feto, diseñamos una alternativa que constituye el último objetivo de esta Tesis Doctoral:

- Relacionar los niveles de testosterona en sangre periférica de la vaca entre los 90-100 días de gestación con el sexo fetal.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

<i>III. A. Ecografía.</i>

III. B. Niveles de testosterona en sangre materna y su relación con el sexo fetal.

Ecografía**III.A.- ECOGRAFÍA.****III.A.1.- Desarrollo histórico y perspectivas de la ecografía en la reproducción del ganado vacuno.**

Los inicios de la ecografía se remontan a finales del siglo XIX: Pierre Curie, en 1890, descubre la pizelectricidad. El efecto pizeoeléctrico es la capacidad de transformar, por una parte, la energía eléctrica en ondas ultrasónicas y, por otra, la energía de vibración transmitida por el rebote de las ondas ultrasónicas en energía eléctrica (Loriot *et al.*, 1997a).

La utilización de los ultrasonidos en medicina se inició en la primera mitad del siglo XX, gracias a los esfuerzos de Wood y Loouris en 1927. Ampliamente utilizados en los años 50, su aplicación disminuye muy rápidamente a causa de sus efectos biológicos nefastos, debido a que se utilizaban frecuencias muy elevadas (Loriot *et al.*, 1997a).

El primer sistema para inspeccionar el abdomen y las cavidades se basó en una técnica similar al sonar: un transductor de ultrasonidos se sumergía en agua. El paciente tenía que entrar en un tanque con agua y el transductor se movía en círculo alrededor de él. En la actualidad, los transductores que se utilizan son los denominados de contacto. Este modelo permite colocar el transductor directamente sobre el paciente, evitando el uso de agua para la transmisión de las ondas de ultrasonido (Pieterse, 1999).

Fue sólo en una segunda fase cuando se planteó utilizar esta técnica como método de investigación. Las frecuencias utilizadas eran mucho más bajas, lo cual les confería una total inocuidad. Tras la detección de los ventrículos cerebrales por el neurólogo austríaco Dissik, en 1942, hubo que esperar a las primeras comunicaciones de Iru Donald en Glasgow, en 1958. A partir de entonces, y muy rápidamente, primero en el hombre en la década de los 60 y luego en los animales, el desarrollo de la ecografía o ecotomografía fue explosivo, gracias a las mejoras aportadas permanentemente por los fabricantes, así como a los múltiples trabajos efectuados en todo el mundo.

El primer trabajo que existe sobre la aplicación de ultrasonidos en EEUU, para la evaluación de animales vivos, se sitúa en la Universidad del Estado de Colorado. Las imágenes del hígado de un felino, a inicios de la década de los cincuenta en el siglo pasado, fueron las vistas ultrasonográficas más primitivas que se tiene mención. (Freire, 2004). En todas las especies, la Reproducción y la Obstetricia experimentaron un auge espectacular con el desarrollo de la ecografía. En 1969, Stouffer utiliza esta técnica para el recuento de fetos en la oveja durante la segunda mitad de la gestación. Lindhal repitió estos estudios en 1976, en la misma especie. Posteriormente Flower y Wilkins se plantean el diagnóstico de gestación y recuento de fetos durante la primera mitad de la gestación.

Palaur *et al.*, en 1976 demuestran el interés de la ecotomografía para el diagnóstico de gestación y la localización de las estructuras ováricas en la yegua. A partir de este momento, rápidamente se reconoce el interés de esta técnica en todas las especies (Reeves *et al.*, 1984; Loriot *et al.*, 1997a).

La ecografía es una técnica de diagnóstico por imagen que se utiliza fundamentalmente para evaluar tejidos blandos. Se trata de un procedimiento seguro, y que no utiliza radiaciones ionizantes por lo que no produce efectos biológicos adversos. Las

imágenes ecográficas corresponden al aspecto macroscópico de cortes anatómicos, mostrando la arquitectura interna de los diferentes órganos. Con la suma de cortes se puede obtener una imagen tridimensional del tamaño, la forma y la estructura de los órganos. Permite también el estudio de las relaciones secuenciales dentro y entre las estructuras. La información obtenida a partir de las imágenes ecográficas puede complementar los resultados obtenidos mediante otros procedimientos diagnósticos como la radiología (Díez, 1992; Griffin *et al.*, 1992).

Sin embargo, actualmente su utilización se ve un poco frenada por:

- La fragilidad del equipo, que obliga a precauciones importantes de contención y manejo de los animales ralentizando el ritmo del trabajo.
- Su elevado precio.

La ventaja principal de la ecografía en el diagnóstico de gestación es la detección temprana de vacas vacías, para que puedan ser inseminadas en el menor tiempo posible y en el caso de estar gestantes poder racionalizar la alimentación desde las primeras etapas, programar partos y lograr un mejor aprovechamiento del personal laboral.

En las granjas donde no hay una buena detección de celos, los beneficios producidos por el diagnóstico del ciclo estral pueden ser grandes, ya que con los métodos actuales de sincronización y resincronización de los celos, la ventaja de conocer en que estado se encuentra el ovario nos facilita la elección del protocolo más adecuado para lograr la mayor fertilidad, racionalizando el uso de hormonas, con lo cual las utilizaremos en el momento más apropiado y esto produce un considerable ahorro y mayor relación costo/beneficio (Bellenda, 2003; De la Riera, 2004).

Apreciamos que la ventaja potencial que representa el examen ecográfico del aparato genital de las vacas cubiertas o inseminadas, es la posibilidad de hacer un diagnóstico precoz de gestación. Sin embargo, los estudios encaminados a relacionar la calidad ecogénica y estructural del CL con su capacidad funcional son muy escasos, lo que confirma el interés científico y práctico de los objetivos planteados en nuestro trabajo. (Alegre, 2000).

III.A.2.- Fundamentos de la ecografía.

Los ultrasonidos son ondas de muy alta frecuencia que rebasan los límites de la percepción auditiva humana, es decir, por encima de los 2000 Hertzios (Hz). Los más frecuentemente utilizados en la práctica clínica varían entre los dos y diez megahertzios (MHz), siendo 1MHz 1.000.000 de ondas de sonido por segundo. En contacto con el cuerpo animal son capaces de atravesarlo, avanzando por los diferentes tejidos y medios biológicos, cada uno de los cuales presenta una oposición distinta a ser atravesado por la onda sónica (impedancia acústica), e índices de reflexión y transmisión distintos. De esta forma, en la superficie limitante, la onda se refleja más o menos completamente según la diferencia de impedancias acústicas de ambos, formando un eco (Celorrio, 1994).

El ecógrafo consta a grandes rasgos de dos elementos: consola y transductor o sonda. En la consola se encuentran el monitor, los mandos y el teclado. Además, en su interior están los mecanismos necesarios que transforman las señales eléctricas provenientes del transductor en imágenes visualizables en la pantalla del monitor (Tamayo, 2000; Ruperez, 2004; Fricke, 2004).

Ecografía

Los ultrasonidos son generados por el transductor, el cuál contiene uno o más cristales con propiedades pizoeléctricas. Esto quiere decir que, al ser sometidos a una corriente eléctrica alterna, vibran y emiten ultrasonidos de una frecuencia característica, emiten ondas de baja intensidad y de alta frecuencia. Al aplicar el transductor sobre la superficie de un animal, las ondas de sonido viajan a través de los tejidos. A medida que avanzan, parte de ellas serán reflejadas en forma de ecos. La fuerza de las ondas que retornan comprimen y expanden los cristales, los cuales producen una señal eléctrica que será analizada y transformada en sonidos audibles y amplificados (efecto Doppler), en una imagen unidimensional de amplitudes de eco para varias profundidades por medio de diodos emisores de haces lumínicos (ecografía tipo A o ultrasonografía de amplitud profunda) o, por último, en imágenes bidimensionales o puntos en una pantalla (ecografía tipo B, o ultrasonografía de tiempo real o de imagen directa). Un sistema informático permite copiar las informaciones recogidas por la sonda en códigos binarios interpretados por un microprocesador. De la finura de la codificación va a depender la definición de la imagen digitalizada. A esta capacidad de los cristales de transformar energía eléctrica en mecánica y viceversa se le denomina efecto pizoeléctrico.

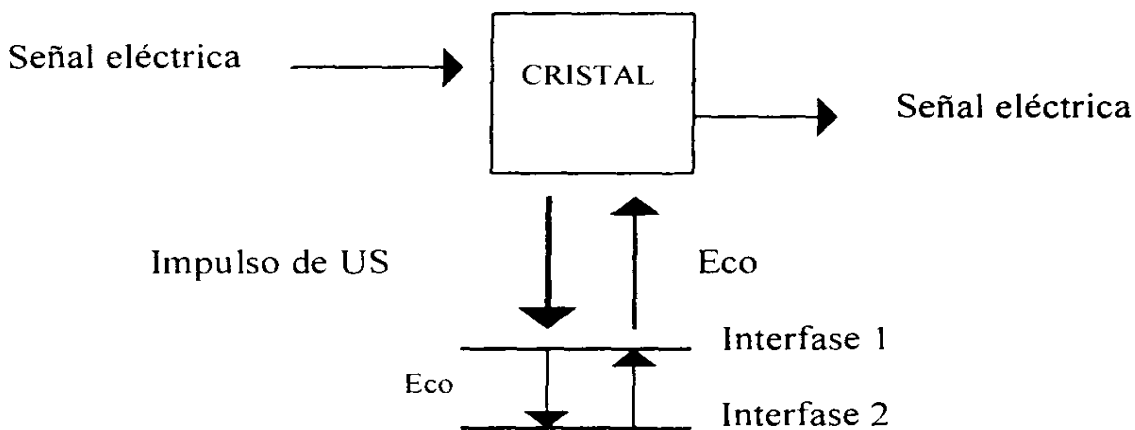


Figura n° 1. Efecto Pizoeléctrico: los cristales transforman la energía eléctrica en mecánica (ultrasonidos) y viceversa.

Los ultrasonidos no reflejados seguirán avanzando a través de los tejidos para seguir mandando información de zonas más profundas. Los cristales pizoeléctricos actúan por tanto como emisores y receptores de ultrasonidos (Diez, 1992; Peter *et al.*, 1992; Brad, 1994; Celorrio, 1994; Gardon *et al.*, 2005).

Cada impulsión explora una línea del tejido u órgano que se ha de estudiar, y la imagen completa se consigue mediante la yuxtaposición de un gran número de líneas de exploración. Ello es posible gracias a dos procedimientos:

- *Barrido sectorial mecánico.* El cristal se desplaza de derecha a izquierda siguiendo un arco de círculo y explorando sucesivamente las diferentes líneas del plano. Con este tipo de sonda, una pequeña superficie de contacto permite una gran superficie de exploración (Loriot *et al.*, 1997a).
- *Barrido electrónico.* Una multitud de cristales idénticos son yuxtapuestos en línea recta (sonda lineal, utilizada en la exploración del aparato genital de las hembras domésticas), sobre un arco de círculo (sonda lineal curva, similar a las

sondas sectoriales, pero con una mayor superficie de contacto) o en círculos concéntricos (sondas anulares). En este último caso, la frecuencia de emisión de los cristales de un círculo respecto a otro es diferente, lo cual permite obtener una imagen de muy buena definición sobre toda la profundidad de corte (Loriot *et al.*, 1997a).

III.A.3.- Parámetros que definen la onda acústica

Todos los sonidos, ya sean audibles o ultrasonidos, son ondas de precisión que se repiten a lo largo del tiempo. Estas ondas longitudinales presentan una serie de características (Diez, 1992):

- ✓ **Periodo:** tiempo que tarda en completarse un ciclo.
- ✓ **Amplitud:** altura de la onda. Se trata de la medición de la intensidad o "volumen" del sonido.
- ✓ **Velocidad de propagación:** rapidez con la cual se produce la transmisión del cambio de posición de equilibrio de una partícula a su vecina.

Las ondas de ultrasonidos viajan a través del cuerpo (aproximadamente a una velocidad de 1540 m/seg) hasta que alcanzan un tejido que las refleja. En el caso del aire la velocidad de propagación es de 331 m/seg (Pierson *et al.*, 1988a).

La velocidad de transmisión de una onda ultrasónica en un medio resulta ser independiente de la intensidad ó cantidad de energía transmitida. La velocidad de transmisión del sonido varía según el tipo de tejido (Freire, 2004).

Los tejidos animales tienen distintas densidades, caracterizadas por la diferencia de velocidad en la propagación de las ondas a través de ellos. Estas diferencias permiten el uso de ultrasonidos para caracterizarlos. Las velocidades en los diferentes tejidos son: (Gardon *et al.*, 2005).

- Sangre: 1549-1565m/seg.
 - Grasa: 1476m/seg.
 - Tejido conjuntivo: 1545m/seg.
 - Músculo: 1545-1592m/seg.
 - Hueso: 3400-4030m/seg.
- ✓ **Frecuencia de vibración:** intervalo de tiempo al cabo del cual la partícula del medio desplazada de su posición de equilibrio vuelve a la misma posición. Este intervalo de tiempo es un periodo y el número de periodos por unidad de tiempo es la frecuencia. Las altas frecuencias dan más detalles, mientras que las bajas frecuencias tienen mayor poder de penetración (Pierson *et al.*, 1988a).

Ecografía

Frecuencia: número de periodos o ciclos por segundo.

1 ciclo/seg = 1 Hertzio (Hz)

1 millón de ciclos/seg = 1 millón de Hertzios (1MHz)

- ✓ **Longitud de onda:** es la distancia que la onda recorre en un segundo, o sea, 0'3-1'5 mm en el caso de los ultrasonidos (Tamayo, 2000). Es la distancia entre dos puntos ubicados en la trayectoria de la onda que presentan igual vibración (o que vibran en igual fase) (Freire, 2004). Cuanto más corta sea la longitud de onda, mejor será la imagen ecográfica.

Los tejidos orgánicos representan un medio complejo y las ondas de ultrasonidos sufren una serie de modificaciones, que conducen a la atenuación del sonido. La atenuación en ecografía se define como la disminución de la intensidad de las ondas de ultrasonidos que se produce a medida que atraviesan los tejidos orgánicos. Esta atenuación se produce a razón de 1 dB/cm/MHz, (cantidad de energía -dB/cm-) perdida por una onda ultrasonora de 1 MHz de frecuencia en el curso de su propagación dentro de un grosor de 1 cm de material dado. A mayor frecuencia, menor penetración en los tejidos, de lo cual deducimos que cuanto mayor sea la frecuencia (más MHz), mayor será la atenuación, lo cual limita la profundidad de penetración de los ultrasonidos (Diez, 1992; Freire, 2004).

La propagación de las ondas ultrasónicas se efectúa en línea recta y sigue las mismas reglas que la onda óptica. Cada medio se caracteriza por una *impedancia acústica "Z"* es decir, por una tendencia mayor o menor a frenar la propagación de los ultrasonidos que los atraviesan. La superficie de separación entre dos medios de impedancias acústicas distintas se llama *interfase acústica* (Loriot *et al.*, 1997a).

III.A.4.- Fenómenos responsables de la pérdida de ultrasonidos

De los ultrasonidos emitidos inicialmente por el transductor, una parte importante se pierde por los fenómenos de reflexión, refracción, dispersión y absorción en el paso de un tejido orgánico a otro de diferentes características (Diez, 1992; Celorrio, 1994).

➤ REFLEXIÓN:

La reflexión de las ondas ultrasónicas se produce cuando éstas pasan de un tejido determinado a otro de diferente densidad. La superficie de contacto entre ambos se denomina interfase acústica. La diferencia de densidad que existe entre los tejidos a cada lado de la interfase determina la cantidad de ondas que son reflejadas (Diez, 1992).

Cuando una onda ultrasónica pasa de un medio a otro, una parte de la energía incidente es reflejada.

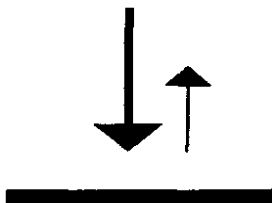


Figura nº 2. Esquema de la reflexión de los ultrasonidos.

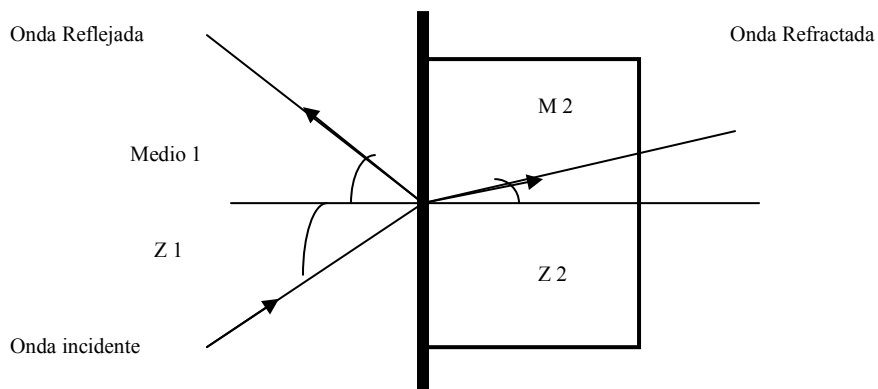


Figura nº 3. Trayectoria de la onda ultrasónica en su avance por distintos medios.

Las características de la reflexión en la interfase de dos medios dependen de la diferencia entre las impedancias acústicas de ambos. Por ejemplo, para una interfase grasa-músculo, sólo el 1,5% de la energía incidente es reflejada. Sin embargo, los ecos son de suficiente amplitud para ser detectados. La mayor parte de la energía es transmitida a través de la interfase y puede explorar estructuras más profundas. En cambio, el aire o el hueso, cuyas impedancias acústicas son muy diferentes de las de los tejidos blandos, se reflejan muy intensamente y representan obstáculos para la propagación de los ultrasonidos.

La máxima información se obtiene cuando la diferencia de densidad es del 1% o menos. En otros casos es tan grande que el paso de los ultrasonidos es bloqueado como ocurre con el gas y el hueso (Celorrio, 1994; Lorient *et al.*, 1997a).

<i>Interfase</i>	<i>Reflexión</i>
Tejido blando/Tejido blando	1%
Tejido blando/Hueso	46-70%
Tejido blando/Gas	99%

Tabla nº 1. Porcentaje de reflexión de diferentes interfases.

La impedancia “Z” de un medio se puede calcular como el producto de su densidad (p) por su velocidad de transmisión de las ondas sonoras (v) (Hospes y Seeh, 1999).

Ecografía

Para obtener una imagen de buena calidad, el haz incidente debe ser lo más perpendicular posible a la interfase, sin lo cual la onda reflejada no llega al transductor y se pierde.

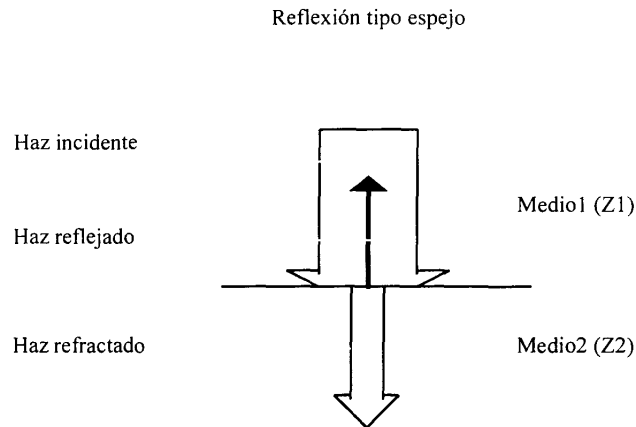


Figura n° 4. Posición perpendicular del haz incidente para obtener una buena imagen.

Esto explica que sea imposible examinar en un solo corte ecográfico los contornos exactos de un órgano o de una lesión (Loriot *et al.*, 1997a).

➤ **REFRACCIÓN:**

Cambio de dirección de las ondas ultrasónicas. Estas ondas se pierden al no volver al transductor, lo que contribuye a la atenuación (Diez, 1992; Celorrio, 1994).

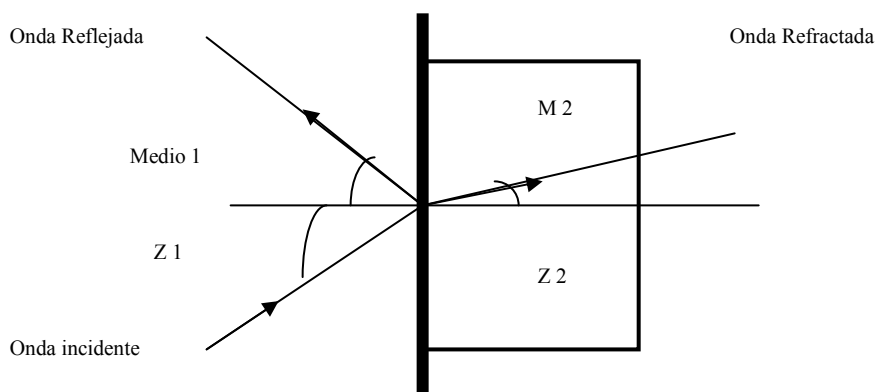


Figura n° 5. Trayectoria de la onda ultrasónica en su avance por distintos medios.

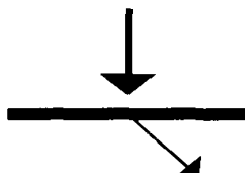


Figura n° 6. Esquema de la refracción del haz incidente.

➤ **DISPERSIÓN:**

Reflexión de los ecos en múltiples direcciones al chocar los ultrasonidos con una superficie pequeña e irregular (Diez, 1992; Celorrio, 1994).

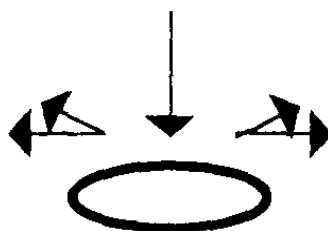


Figura n° 7. Dispersión de los ecos en múltiples direcciones.

➤ **ABSORCIÓN:**

La energía es absorbida por los tejidos y convertida en calor, produciéndose una pérdida constante de intensidad (Diez, 1992; Celorrio, 1994).

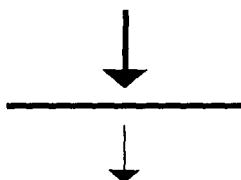


Figura n° 8. Absorción de la energía por los tejidos.

Además de estos fenómenos la onda incidente experimenta una atenuación de su energía debido a:

- ◆ *Distancia recorrida.*
- ◆ *La frecuencia de emisión de los ultrasonidos.*
- ◆ *El medio de propagación.*

- ◆ *Distancia recorrida.*

La intensidad de una onda decrece exponencialmente con la distancia recorrida; por ello, dos interfases idénticas, pero situadas a profundidades distintas, no generan ecos de igual amplitud, ya que los trayectos recorridos

Ecografía

por la onda son distintos. Este inconveniente se corrige mediante una amplificación de la señal en profundidad, modificando ya sea la ganancia total: modificación idéntica en toda la pantalla, ya sea la curva de ganancia: amplificando la señal de retorno con una ganancia que aumenta progresivamente a lo largo del tiempo, y así los ecos reflejados sobre las estructuras cercanas son poco ampliados, mientras que los ecos procedentes de reflejos alejados se amplifican con una ganancia elevada para compensar la atenuación.

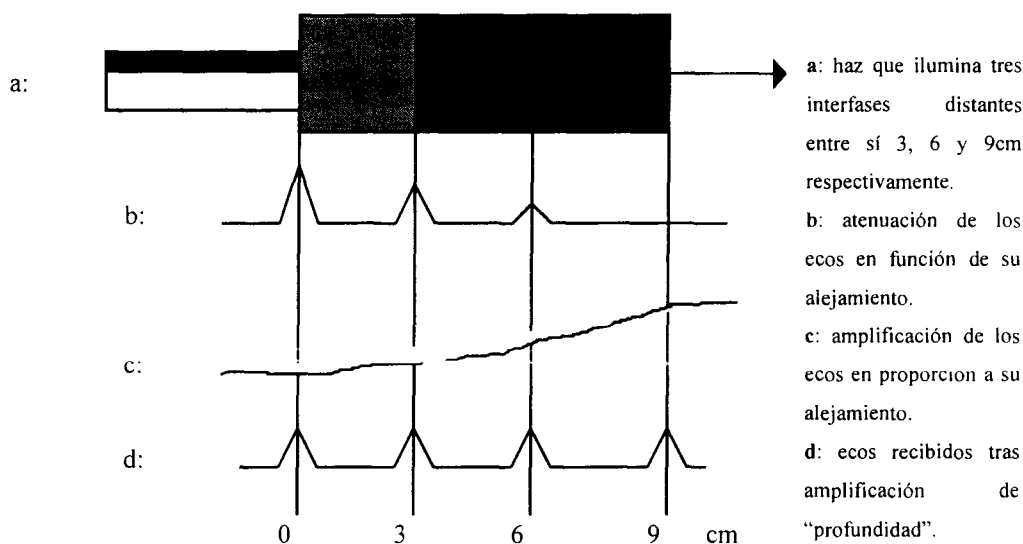


Figura nº 9. Atenuación, amplificación de señales.

La ganancia total debe ajustarse según el tipo de animal y del órgano estudiado. La curva de ganancia permite atenuar algunos artefactos y mejorar el ajuste sobre una zona interesante del corte que estamos estudiando (Loriot *et al.*, 1997a).

◆ *Frecuencia de emisión.*

La atenuación de la intensidad ultrasónica a lo largo del trayecto de la onda es tanto más importante cuanto más elevada es la frecuencia de la onda. Este fenómeno es, por lo tanto, un criterio importante en la selección del material. Si el órgano estudiado es profundo, hay que utilizar una sonda de baja frecuencia: 2'5, 3 o 5 MHz; si, en cambio, exploramos un órgano superficial, se utilizan frecuencias elevadas: 7'5 o 10 MHz (Loriot *et al.*, 1997a; Fricke, 2004).

La penetración con un transductor de 7'5 MHz es de sólo 4 o 5 cm, por lo tanto permite examinar con claridad estructuras muy cercanas (folículos, CLs, embriones). Los transductores de 5 MHz tienen una penetración de 8 a 10 cm, por lo que permiten visualizar ovarios, úteros con gestaciones tempranas. La penetración de los transductores de 3'5 MHz es de 12 a 18 cm; esta frecuencia puede ser usada en gestaciones más avanzadas y condiciones patológicas del

útero, tales como piómetra, momificación y maceración (Pieterse, 1999; Fricke, 2004).

◆ *Medio de propagación.*

Las características del medio de propagación influyen sobre la atenuación de la intensidad ultrasónica. La atenuación es mucho más importante en el hueso y en el aire que en los tejidos blandos. En cambio es muy débil en los líquidos; por ello se utilizan como ventanas acústicas que facilitan el estudio de tejidos más profundos (Loriot *et al.*, 1997a).

<i>Tejidos</i>	<i>Coefficiente de atenuación (dB/cm MHz)</i>
Agua	0,002
Sangre	0,18
Hígado	0,95
Riñón	1,0
Hueso	20,0
Pulmón	40,0

Tabla n° 2. Coeficientes de atenuación de diferentes tejidos.

En relación con la atenuación es importante conocer el concepto de TGC (Time Gain Compensation). Se trata de la capacidad del ecógrafo de compensar la atenuación amplificando los ecos procedentes de interfaces lejanas, para poder obtener así imágenes homogéneas. Esto resulta de particular importancia a la hora de valorar órganos voluminosos, como puede ser el hígado (Díez, 1992).

III.A.5.-Sondas

Un transductor o sonda tiene una hilera de cristales que, cuando son estimulados eléctricamente, producen ondas de sonido de alta frecuencia en una dirección lineal, convexa o sectorial (Brad, 1994).

Los transductores pueden ser clasificados en lineales, sectoriales y convexo-microconvex. Además los transductores pueden ser externos, transrectales, transvaginales e intraoperatorios, de acuerdo con la vía de abordaje que se utiliza (Ruperez, 2004).

□ **Sonda lineal (de barrido o multisonda).**

Los transductores lineales presentan cristales pizoeléctricos en línea que emiten haces paralelos de ultrasonidos, por lo que se obtiene una imagen rectangular. Presentan la ventaja de ofrecer una imagen amplia del campo cercano, pero la importante desventaja de necesitar una gran área de contacto. Una variante del transductor lineal es el convexo, que presenta también cristales en línea pero

Ecografía

curvada, siendo la superficie de contacto convexa, por lo que es mucho más sencilla de acoplar sobre la superficie del animal (Díez, 1992).

Las ondas se transmiten perpendicularmente al transductor, las ondas viajan paralelas a las vecinas y producen una imagen rectangular.

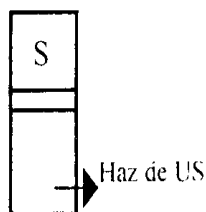


Figura n° 10. Esquema de una sonda (S) lineal.

Las imágenes de los tejidos cercanos aparecen en la zona superior de la imagen (Pierson *et al.*, 1988a).

Se caracteriza porque:

- ◆ Realiza un barrido constante bajo una longitud de 5 a 20 cm según el tipo de sonda.
- ◆ El número de cristales: entre 60 y 120. Normalmente tienen 64 separados entre sí 0'1 mm, que pueden vibrar independientemente.
- ◆ La imagen que producen es rectangular.
- ◆ La resolución lateral es buena y constante.

Para la práctica de ecografía en la reproducción de vacas y yeguas es conveniente una sonda lineal transrectal, esta misma sonda puede también ser aplicada para ecografía externa de reproducción en ovejas, cerdas y perras, así podemos decir, que es la sonda más versátil y amortizable económicamente (Tamayo, 2000; Ruperez, 2004).

□ **Sonda sectorial.**

Los transductores sectoriales emiten haces divergentes de ultrasonidos, obteniéndose una imagen en abanico o pirámide.

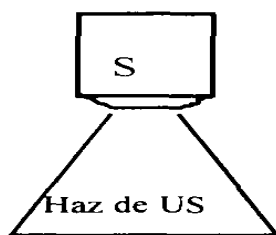


Figura n° 11. Esquema de una sonda (S) sectorial.

La ventaja es que la superficie de contacto es mínima, siendo de gran utilidad para dirigir los ultrasonidos por ejemplo a través de los espacios intercostales (Díez, 1992).

Las sondas sectoriales son de uso típico en exámenes de tendones y problemas de extremidades en équidos, así como para el estudio de estructuras abdominales y torácicas de pequeños animales (Pierson *et al.*, 1988a).

De este tipo de sonda se puede decir que:

- ◆ Tiene un sólo cristal con movimiento oscilatorio o varios con movimiento rotatorio (tres) (Ruperez, 2004).
- ◆ Ventaja: se reduce la superficie de contacto, siendo la calidad y la nitidez superiores y el área a visualizar es casi cinco veces mayor que el lineal, aunque hay que decir que pierde visión lateral (Celorrio, 1994).

□ **La sonda convexa.**

El convexo es una variante del lineal que presenta una superficie de contacto convexa, más fácil de aplicar sobre el animal (Celorrio, 1994).

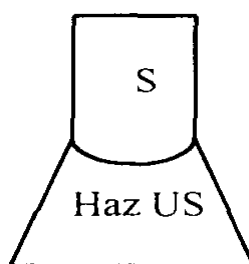


Figura nº 12. Esquema de una sonda (S) convexa.

Una ventaja es que tienen un amplio campo de visión en las zonas cercanas. La desventaja más patente es que incluso los modelos más modernos y compactos, requieren un área de contacto con el transductor relativamente grande (Barr, 1992).

Actualmente este tipo de sonda se viene utilizando en la tecnología de aspiración folicular y obtención de ovocitos para la fecundación *in vitro* (Tamayo, 2000; Bo y Caccia *et al.*, 2000; Gnemmi, 2004).

Existe otro tipo de sonda sectorial llamado MAP (Transductor Multi-Angular) de 5-7'5 MHz, utilizado también especialmente para la colecta de ovocitos con un adaptador vaginal (Bellenda, 2003, Fricke, 2004).

En principio se puede utilizar todo tipo de sondas (lineales, sectoriales, convexas) para realizar la ecografía transrectal. La primera condición es que se pueda manipular sin dañar la mucosa rectal (Kähn, 1994).

Ecografía

El tipo de transductor a emplear dependerá del tamaño del animal y del órgano a explorar. A mayor frecuencia, menor longitud de onda y mejor resolución o calidad de la imagen, pero disminuimos la capacidad de penetración (la atenuación es mayor); por tanto, para el estudio ecográfico de estructuras superficiales (arterias, tendones) o de animales de pequeño tamaño, sería conveniente una sonda de alta frecuencia (7,5 MHz), y de baja (3 MHz) para grandes animales o estructuras más profundas. La imposibilidad económica, en muchos casos, de disponer de varios transductores, obliga a la mayor parte de los usuarios a inclinarse por una intermedia de 5 MHz, útil en grandes animales por vía rectal y en pequeños por vía transabdominal (Celorrio, 1994).

III.A.6.-Elección de las frecuencias a utilizar

La elección de la frecuencia a utilizar esta determinada por la profundidad de la exploración (que dependerá de la capacidad de penetración de los ultrasonidos) y el poder de resolución deseado.

- **Penetración de los ultrasonidos (profundidad de exploración).**

El diagnóstico ecográfico busca dos tipos de información: la distancia que separa el transductor del objeto y su tamaño. Se pueden diferenciar dos zonas:

a) *Campo proximal o zona de Fresnel.*

Su diámetro es equivalente al de la superficie emisora. Su profundidad es función directa del cuadrado del radio de la sonda y función inversa de la longitud de la onda de ultrasonidos ($d = r^2/\lambda$).

b) *Campo lejano o zona de Fraunhofer.*

Resulta de la atenuación de la intensidad del haz ultrasonoro.

Cuanto mayor sea la frecuencia menor será la profundidad que alcancen los ultrasonidos (mayor atenuación), pero mayor será la resolución o definición de la imagen. Por tanto, los transductores de alta frecuencia se utilizan para el estudio de estructuras superficiales o de animales de pequeño tamaño, mientras que para poder valorar estructuras profundas habrá que emplear frecuencias más bajas, incluso a costa de una disminución de la resolución (Díez, 1992; Barr, 1992; Freire, 2004).

- **Poder de resolución.**

La resolución es la distancia mínima entre dos cuerpos ecogénicos que una sonda puede distinguir. Sería la capacidad del ecógrafo de distinguir dos interfases cercanas. Si un ecógrafo tiene una capacidad de resolución de 3mm, querrá decir que dos pequeñas interfases separadas por sólo 3 mm, aparecerán como dos ecos distintos en la imagen. Si están por ejemplo a 2 mm, aparecerán en la imagen como un sólo eco (Díez, 1992).

a) *Resolución axial.*

Los dos cuerpos se encuentran dentro del eje de propagación del haz ultrasonoro. Las ondas de alta frecuencia (y por lo tanto de baja longitud de onda) poseen una mejor resolución axial (Díez, 1992; Celorrio, 1994).

La resolución axial es una característica que depende directamente de la frecuencia (Freire, 2004).

Esta resolución axial viene determinada por la longitud de la onda sónica.

b) *Resolución lateral.*

Las interfases están situadas perpendicularmente a la dirección del haz de ultrasonidos. En este caso depende de la anchura del haz, es decir, del tamaño de los cristales presentes en el transductor. Cuanto menor sea la anchura del haz, mayor será la resolución. Si las dos interfases se localizan dentro de dicha anchura, aparecerán en la imagen como un solo eco (Díez, 1992; Celorrio, 1994; Freire, 2004).

En la medida que disminuye el ancho del haz aumenta la resolución; pero como al disminuir el ancho del haz también disminuye la cantidad de energía que se envía, el débil retorno podría hacer dificultosa la determinación de la imagen (Freire, 2004).

III.A.7.-Tipos de ecografía de acuerdo con el tipo de representación gráfica que se obtiene

Existen cinco formas distintas de representar la información recogida por el ecógrafo:

1. *Modo A (Amplitud).*

Se utiliza un solo haz de ultrasonidos y la información recogida es representada en gráficas. El eje vertical representa la distancia entre la sonda y la interfase ecógena y el eje horizontal la amplitud de los ecos. La imagen es puntual.

Esta ecografía Modo A ha sido utilizada por vía transabdominal, para establecer el diagnóstico de gestaciones en diversas especies, pero esta técnica no permite un diagnóstico precoz (Chaffaux *et al.*, 1988).

Ofrece poca información y prácticamente, no se utiliza (Chaffaux *et al.*, 1988; Díez, 1992; Celorrio, 1994).

2. *Modo B (Brillo).*

Es el formato más utilizado y conocido. Se utilizan múltiples haces emitidos secuencialmente y se obtienen imágenes bidimensionales en movimiento. El brillo del punto es proporcional a la amplitud del eco y la posición al tiempo de recepción. El

Ecografía

conjunto de los puntos reproduce un corte anatómico de la región examinada (Chaffaux *et al.*, 1988; Díez, 1992; Gardon *et al.*, 2005).

La imagen memorizada aparece instantáneamente desde la recepción de los ecos. Es dinámica porque los ecos son recibidos constantemente y copiados sobre la pantalla. La ecografía Modo B transforma el modo A: cada pico se transforma en un punto luminoso. A cada instante, una línea formada por puntos luminosos de intensidad diferente se inscribe sobre la pantalla, formándose una imagen cuando se desplaza la sonda emisora de un haz único (ecografía en tiempo diferente), o si la sonda está formada por la yuxtaposición de cristales emisores-receptores es la ecografía de tiempo real (Chaffaux *et al.*, 1988).

La imagen bidimensional que se ve sobre la pantalla es análoga a una sección histológica de los órganos, que permite al examinador visualizar las estructuras con detalle, el cual se acerca groseramente al corte histológico (Pierson *et al.*, 1988a).

Las unidades del modo tipo-B utilizan números de la escala de grises que van de 1 a 64 y la imagen final es generada por diferencias en sombras de gris según los tipos de tejidos del. Los tejidos densos dan un eco luminoso (pixel blanco), mientras que los tejidos de menor densidad se ven como pixel gris. (Gardon *et al.*, 2005).

3. *Modo M (Movimiento).*

Se trata de una variante del modo B en la que se utiliza un solo haz de ultrasonidos. Se obtienen imágenes unidimensionales en movimiento. A lo largo de la línea que representa el haz ultrasónico se observan los ecos como puntos de brillo de distinta intensidad, siendo la distancia también proporcional al tiempo que tardan en ser recibidos. Esta línea de puntos es presentada en el monitor de forma continua a lo largo del tiempo, avanzando la imagen hacia la derecha. Esto significa que puede seguir con precisión los movimientos a lo largo del tiempo, por lo que es muy utilizado en ecocardiografía (Díez, 1992; Celorrio, 1994).

4. *Ecografía tridimensional o 3D.*

Los primeros equipos de 3D aparecieron en 1991 y progresivamente fueron mejorando pero en rangos tan obsoletos que hacia 1998 se necesitaban 25 segundos para almacenar una imagen, y minutos u horas para reconstruirla en 3D. Actualmente, el mejoramiento del Software permite la captura de imágenes en sólo pocas décimas de segundo y reconstrucciones en el mismo tiempo, pudiendo obtener secuencias de hasta 6 imágenes/segundo, lo cual es casi disponer de un tiempo real en la apreciación del movimiento, constituyendo la modalidad de cuatro dimensiones (4D) ó volumen más tiempo. (Rivera *et al.*, 2005).

En 1997, se autoriza la incorporación de esta tecnología en la práctica médica, disparándose desde entonces el interés por su investigación y desarrollo, siendo cada vez mayor el número de trabajos y publicaciones en diferentes campos médicos, principalmente en el área de ginecología y obstetricia. (Rivera *et al.*, 2005).

La ecografía 3D emplea sondas específicas, que realizan el rastreo y la captura de la imagen, de manera rápida, consiguiendo la exploración en los tres planos del espacio

(largo, ancho y espesor), a partir de los que se elaboran la imagen tridimensional. Por lo tanto la ecografía 3D está basada en la obtención del volumen fetal (modo V), lo cual supone disponer de más información con respecto a la ecografía tradicional (2D) que reporta imágenes en dos planos.

La imagen 3D se adquiere mediante la obtención de un gran número de cortes paralelos o tomogramas a través del movimiento (barrido) de un transductor. A su vez, existen dos mecanismos diferentes para este barrido, uno que puede ser manual –el operador mueve manualmente el transductor a través del volumen de imagen que desea procesar- y otro que es mecánico, donde los planos paralelos son obtenidos automáticamente debido al movimiento del transductor, mejorando la calidad de la imagen obtenida. La serie de tomogramas obtenidos son ordenados en forma de un conjunto de elementos de volumen (voxels) y a cada uno de ellos se les asigna un valor de gris o de brillo. (Rivera *et al.*, 2005).

La utilidad y posibles aplicaciones de la 3D, surgen de los diferentes modos de captura y procesamiento de la imagen (Pérez-Cuadrado *et al.*, 2005; Rivera *et al.*, 2005):

➤ *Modo superficie*: es la forma más difundida de la ecografía 3D. Con ella podemos obtener con precisión la imagen y detalles superficiales de la estructura que queramos explorar. Su principal aplicación es el estudio superficial del feto. Sus condiciones necesarias para una buena imagen 3D son:

- Una posición adecuada de la superficie que queremos explorar respecto de la sonda. Si la superficie a explorar no queda frente al transductor, no se consigue buena imagen.
- Cantidad suficiente de líquido amniótico. Si no tenemos una buena capa de líquido entre la superficie a explorar y el transductor, la imagen que obtendremos no será de buena calidad, de ahí que en general en gestaciones avanzadas resulte complicado obtener buenas imágenes tridimensionales.

➤ *Modo esqueleto*: aunque el modo superficie permite localizar estructuras óseas, este modo está diseñado, específicamente, para una exploración ósea más precisa.

➤ *Modo reconstrucción multiplanar*: en el cual se despliegan los tres planos ortogonales bidimensionales en una misma altura del corte (se puede desplazar a lo largo de cualquiera de los ejes para ubicar un punto determinado dentro de un volumen o “navegar” dentro de él).

➤ *Modo de representación 3D en tiempo real o 4D*: mostrando imágenes tridimensionales en movimiento.

➤ Otra forma de manipulación de la información es el uso de *bisturí electrónico* para eliminar estructuras que interfieran con la imagen principal.

Ecografía5. *Ecografía en cuatro dimensiones o 4D.*

La ecografía 4D es la ecografía 3D en movimiento, lo que nos permite observar, casi en tiempo real, las estructuras en movimiento y por tanto los movimientos fetales. Para su obtención se emplea la sonda 3D.

Por lo tanto, la diferencia sustancial respecto de la ecografía tridimensional es que reconstruye la imagen en 4D y a tiempo real.

Consiste en la adquisición y presentación continua de volúmenes. La denominación de la técnica obedece a que hay cuatro dimensiones involucradas: tres espaciales (el volumen) y una temporal (el momento en que se obtuvo el volumen). En otras palabras, las cuatro dimensiones que muestra la ecografía son ancho, largo, espesor y tiempo.

Permite la proyección de hasta 25 imágenes por segundo en planos tridimensionales.

Mientras la tecnología 3D consiste en la reconstrucción de la imagen a través de la computadora de manera estática, el ecógrafo 4D permite observar las imágenes 3D en movimiento. De esta manera se pueden ver por ejemplo diversas actitudes fetales con marcado realismo y además permite al clínico adquirir más fácilmente las imágenes.

El equipo 4D ofrece también una notable mejora en la calidad de la imagen en ecodiagnóstico tradicional o 2D, con una resolución de imagen digital. Del mismo modo, utilizando el ecógrafo en las modalidades Doppler color, espectral y de potencia, ofrece una altísima sensibilidad, mejor definición de los bordes, percepción de órganos o detección vascular.

Esto se logra porque en los aparatos tradicionales, normalmente el procesamiento del haz está formado por una transmisión y una reflexión. En el caso de este nuevo modelo es mucho más rápido gracias a una transmisión y cuatro reflexiones. Los cuatro haces simultáneos aumentan notablemente la velocidad de lectura del ultrasonido, disminuyendo los artefactos de movimiento.

◆ *Adición del efecto Doppler:*

El desarrollo del software de uso en ecografía ha permitido interesantes avances sobretodo en lo referente a estudios cardiológicos, pues de su análisis se desprende un alto acercamiento a la funcionalidad cardiaca.

Por ejemplo, aspectos tan complejos de medir como son las velocidades de flujo y las presiones asociadas en el sistema cardiovascular, se han visto simplificadas con la incorporación del efecto Doppler.

El efecto Doppler se basa en el cambio de frecuencia que se registra en cualquier onda cuando es reflejada (o también producida por un emisor) por un componente en movimiento.

En el caso de los ecocardiógrafos, el principal componente en movimiento a observar es la sangre circulante. Y es su microprocesador el que calcula en unos nanosegundos la

velocidad del flujo de la sangre, a partir de la medida de las diferencias entre la frecuencia de retorno del eco y la frecuencia emitida por el transductor, así como el ángulo conformado por ambos haces, asumiendo como constante la velocidad del ultrasonido en la sangre estática.

Con este dato, el microprocesador puede informar si el flujo de sangre se mueve acercándose ó alejándose del transductor.

En los más recientes ecocardiógrafos dotados de pantalla a color (“Ecocardiógrafo Doppler Color”) se representa con el color rojo al flujo laminar que se acerca al transductor, azul al flujo laminar que se aleja y de color verde al amarillo en los flujos turbulentos como son los que ocurren en los estrechamientos o bifurcaciones del sistema cardiovascular.

Con igual facilidad permite el cálculo de las áreas, presiones y velocidades de flujo en cualquier parte del sistema cardiovascular, que le sea definido. (Freire, 2004).

III.A.8.-Patrones ecográficos

En los modos B y M, las imágenes ecográficas están formadas por puntos de diferente brillo. Cuanto más intenso sea el eco reflejado por una determinada estructura, más brillante aparecerá en la imagen. A esta densidad de brillo se le conoce con el nombre de ecogenicidad, utilizándose para describir las imágenes ecográficas los siguientes términos (Díez, 1992):

1. Hiperecogénico o hiperecoico.

Se produce una gran reflexión de ultrasonidos (escasa o nula transmisión). Los puntos en el monitor aparecen con una intensidad de brillo máxima, es decir, blancos (gas, hueso).

2. Hipoecogénico o hipoecoico.

Se produce una reflexión media (transmisión media), teniendo los puntos distinta densidad de gris según la cantidad de ecos producidos (tejidos blandos). Para comparar la ecogenicidad de los tejidos entre sí, se utiliza esta terminología de forma comparativa, es decir, que un tejido puede ser hiper, hipo o isoecogénico con respecto a otro.

3. Isoecogénico.

De la misma ecogenicidad.

4. Anecogénico o anecoico.

Ausencia de ecos por no producirse reflexión de ultrasonidos (transmisión completa). Los puntos aparecerán de color negro (líquidos).

Ecografía**III.A.9.-Imágenes ecográficas**

Tipos de imágenes ecográficas:

A. IMÁGENES DE CONTORNOS.*1) Imágenes de interfase.*

Las imágenes de interfase se forman por la reflexión de los ultrasonidos a nivel de la zona de contacto entre dos medios de diferente impedancia acústica. Este límite se traduce sobre la pantalla por una línea ecógena que limita el contorno del órgano. Esta línea es tanto más visible cuanto más perpendicularmente incide el haz (reflexión de tipo en espejo).

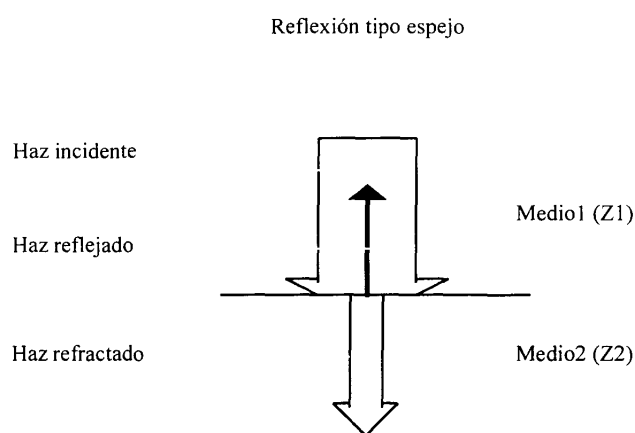


Figura n° 13. Posición perpendicular del haz incidente para obtener una buena imagen.

Si el haz incidente es paralelo a la interfase, no hay reflexión ni se forma ninguna imagen sobre la pantalla (Loriot *et al.*, 1997a).

2) Imágenes de pared y de tabiques.

Están representadas por una línea ecógena continua, sea cual fuere la incidencia de los ultrasonidos. Estas paredes son visibles, incluso si los dos medios que separan poseen impedancias acústicas similares. Las paredes atravesadas siguiendo una incidencia perpendicular son muy ecógenas, mientras que las paredes tangentes al haz no siempre son visibles sobre la pantalla. La imagen ecográfica de los vasos se caracteriza, en un corte transversal, por un disco negro más o menos rodeado de blanco según las características estructurales de la pared, y en un corte longitudinal, por una imagen en conducto negra bordeada de blanco (Loriot *et al.*, 1997a).

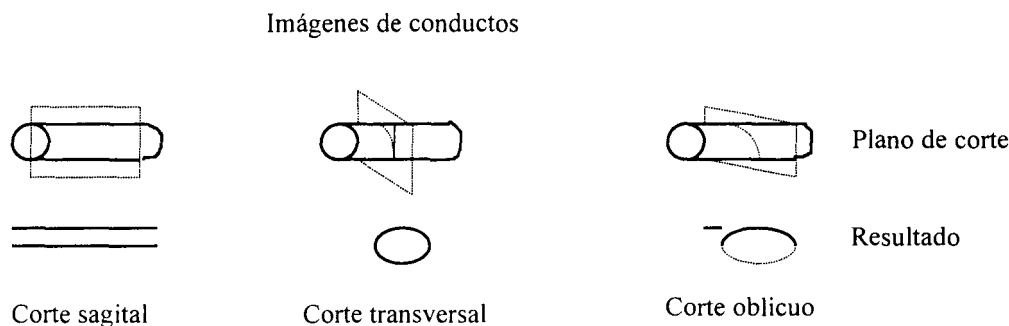


Figura n° 14. Imágenes de conductos: vista de los diferentes cortes.

B. IMÁGENES DE TEJIDOS.

1) *Tejidos blandos.*

Se trata de los músculos y de los diversos parénquimas orgánicos. Obtenemos sobre la pantalla una imagen de textura granulosa, alternando manchas blancas, grises y negras, más o menos finas, y más o menos contrastadas. Esta textura, llamada *speckle*, es debida a la difusión de las ondas ultrasónicas en el seno del tejido. El aspecto de la imagen depende de numerosos factores:

- a. Características estructurales del tejido. Depende del reparto de los reflectores (unidad estructural a nivel de la cual se produce la reflexión de la onda ultrasónica, de su densidad y de su naturaleza).
- b. Características de la sonda. El tamaño de las manchas depende de la resolución del ecógrafo, definida por la frecuencia de la sonda y la focalización del haz.
- c. Características del ecógrafo. Especialmente, del ajuste de la ganancia, del contraste, del umbral de eliminación, etc. El empleo de una ganancia demasiado débil o de un umbral de eliminación demasiado elevado puede hacer que aparezca carente de eco un parénquima únicamente hipoecógeno y que sea posible confundirlo con un líquido (Loriot *et al.*, 1997a).

De esto deriva que el aspecto ecográfico de un hígado, por ejemplo, sea diferente según la especie, la raza, la edad, la sonda, el ecógrafo y el ajuste. Por ello, el clínico debe conocer perfectamente el aparato y haberlo probado durante muchas horas en animales sanos, de especie, raza y edad distintas, antes de pretender identificar una modificación del aspecto ecográfico de un órgano.

2) *Tejidos grasos.*

Los tejidos grasos son tejidos blandos muy ecógenos. Dan a menudo imágenes de mala calidad, ya que la onda ultrasónica está muy atenuada y muy difractada. Los animales obesos y aquellos cuya piel es gruesa son difíciles de ecografiar.

Ecografía3) *Tejidos óseos.*

El hueso es un tejido de fuerte cohesión molecular, con una impedancia acústica elevada. La diferencia de impedancia acústica entre el hueso y los tejidos cercanos es tal, que existe una reflexión muy importante a nivel de su interfase. Por lo tanto, no hay imagen tras un tejido óseo, y su descripción se limita a la superficie (Celorrio, 1994; Lorient *et al.*, 1997a).

C. IMÁGENES DE LÍQUIDOS.

Los líquidos son excelentes transmisores sonoros, aparecen como una zona sin eco (anecogénicos). Estos líquidos son homogéneos o no homogéneos (según si poseen o no partículas en suspensión). La ecogenicidad de los líquidos es variable. Existe una zona de refuerzo posterior más o menos intensa.

En ecografía, los líquidos puros son asimilables al agua y transmiten perfectamente los ultrasonidos. Sobre la pantalla aparecen como zonas carentes de eco; por lo tanto anecogénicas, incluso si aumentamos la ganancia. La orina, el líquido amniótico, la bilis y algunos derrames son líquidos llamados "puros". En cambio, en líquidos de elevada celularidad y/o que contengan partículas en suspensión, llamados líquidos "impuros", los ultrasonidos encuentran una multitud de reflectores. Observamos una imagen punteada blanca con ganancia elevada. La orina de los équidos, el pus y algunos derrames se consideran líquidos impuros (Lorient *et al.*, 1997a).

D. IMÁGENES DE GAS Y CÁLCULOS.

En la interfase de tejido medio gaseoso, los ultrasonidos son totalmente reflejados, ya que la diferencia de impedancia es elevada. Sobre la pantalla, observamos una imagen de interfase hiperecogénica seguida de un cono de sombra. La observamos al principio de la exploración cuando el contacto entre la sonda y la piel aún no es suficiente, y en ecografía digestiva desde el momento en que aire o gas están presentes en un tejido.

Los cálculos también originan un cono de sombra, ya que la totalidad de los ultrasonidos es reflejada. Lo mismo ocurre con el hueso. Los cálculos están representados por un arco hiperecogénico, seguido de un cono de sombra que a veces es más visible que el cálculo mismo, sobre todo si éste último no presenta una cara perpendicular al haz incidente.

III.A.10.-Artefactos

Los artefactos son alteraciones de la imagen producidas artificialmente durante la exploración. No corresponden a ninguna anomalía o lesión ni a una estructura real. Estas alteraciones son debidas a fenómenos físicos inherentes a las leyes de propagación de los ultrasonidos. La interpretación de las imágenes ecográficas debe tener en cuenta estas imágenes, "parásitas", y, por lo tanto, es fundamental reconocerlas ya que pueden representar entre un 30 y un 90% de los ecos observados (Díez, 1992; Celorrio, 1994; Lorient *et al.*, 1997a).

Afectan a la presentación de las imágenes pero no tienen importancia biológica (Peter *et al.*, 1992).

- *Reverberación o eco de repetición.*

Se manifiesta por una sucesión de curvas hiperecogénas paralelas. Ecos de gran amplitud son reflejados de nuevo a nivel del transductor y vuelven a entrar al paciente. Esto produce un segundo eco que aparece a doble distancia del primero o real y que, de repetirse sucesivamente, se observaría una imagen de líneas paralelas disminuyendo de intensidad a medida que aumenta la atenuación. Se origina a partir de reflexiones múltiples entre dos interfases muy reflejantes o entre una interfase y la superficie de la sonda. Únicamente el primer eco corresponde a una estructura real; los demás se presentan como copias de menor intensidad. Se produce en interfases tejido blando/gas (Díez, 1992; Celorrio, 1994; Loriot *et al.*, 1997a).

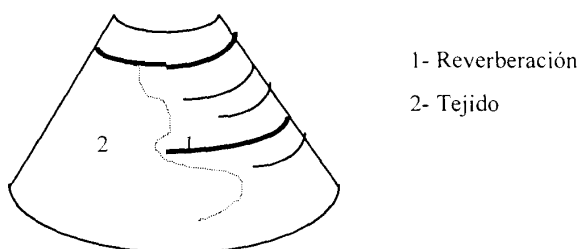


Figura nº 15. Artefacto de reverberación.

- *Cola de cometa.*

Es un trazo vertical hiperecogéno que encontramos cuando el haz de ultrasonidos choca contra una burbuja de aire o una pequeña superficie mineralizada. Es un fenómeno de reverberación. El aparato interpreta los intervalos sucesivos entre reverberaciones como un alejamiento; aparecen entonces una serie de seudointerfases próximas entre sí en forma de "cola de cometa". Éstas aparecen frecuentemente asociadas al cono de sombra en cortes transversales del intestino delgado, en caso de pequeños cálculos o de calcificaciones erráticas.

Esquema cola de cometa en ecografía de digestivo

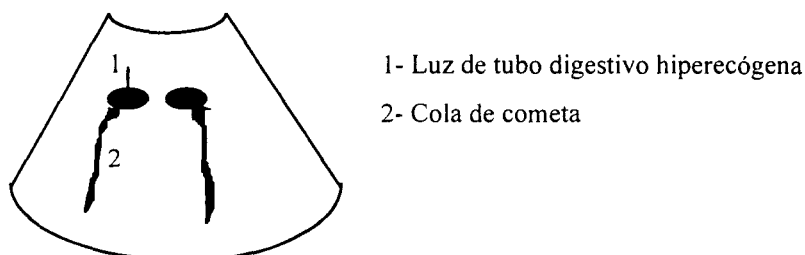


Figura nº 16. Artefacto "cola de cometa".

Ecografía

- *Sombras.*

- *Cono de sombra.*

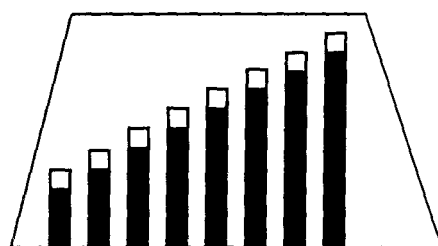
El cono de sombra es una zona oscura, resultado de la ausencia de ecos debida a la reflexión total de la onda ultrasónica a nivel de una interfase con aire, hueso o cálculos.

- *Sombra lateral.*

Se puede observar lateral y distal a estructuras llenas de líquido (vesícula biliar, estructuras quísticas). Se produce por el cambio de dirección (refracción) del haz de ultrasonidos, de forma que en esa zona no hay ecos que vuelven al transductor (Díez, 1992).

- *Sombra acústica.*

Se forma por detrás de una estructura que bloquea el paso de los ultrasonidos como el gas y el hueso. En la imagen aparece una línea hiperecogénica representando la superficie reflectante, y detrás una sombra anecogénica, ya que no han podido pasar ultrasonidos que puedan ser reflejados a partir de interfases más profundas. Este artefacto es de valor diagnóstico por ejemplo para la detección de cálculos (Díez, 1992).



Esquema de sombra acústica
producida por costillas fetales

Figura n° 17. Esquema del artefacto denominado sombra acústica.

- *Refuerzo posterior.*

El refuerzo posterior se traduce por una imagen más ecógena que observamos distalmente a una estructura que no atenúa los ultrasonidos. Una onda que atraviese la vejiga, el corazón, la vesícula biliar o una vesícula embrionaria está poco atenuada. En estas estructuras, las ondas se comportarán, por lo tanto, como si estuviesen amplificadas, los ecos serán más potentes y la imagen subyacente parecerá más ecógena que la adyacente. Este fenómeno se utiliza para el diagnóstico precoz de gestación en el cual empleamos la vejiga como ventana acústica (Díez, 1992; Lorient *et al.*, 1997a).

- *Artefacto en espejo.*

Consiste en la aparición en la pantalla de dos imágenes idénticas, simétricas respecto a una línea muy ecógena. Se observa fundamentalmente durante la ecografía de la cara diafragmática del hígado. La interfase hígado-pulmón refleja totalmente las

ondas que inciden perpendiculares al diafragma debido a la gran diferencia de impedancia en la interfase diafragma/pulmones. Una parte de la energía reflejada alcanza directamente el transductor y permite al ecógrafo construir la imagen correspondiente al intervalo sonda-pulmón. Otra parte de la energía sufre reflexión y difusión, y alcanza al transductor tras una nueva reflexión sobre la interfase hígado-pulmón. Este fenómeno se traduce en la pantalla mediante la formación de una imagen distal al diafragma, simétrica a la imagen próxima (Celorrio, 1994; Loriot *et al.*, 1997a).

Es importante no confundir este fenómeno con hernias diafragmáticas (Díez, 1992).

- *Agujero negro ecográfico.*

Es una imagen negra carente de ecos y que no corresponde a nada. La obtenemos cuando el haz de ultrasonidos es paralelo a una pared. Al no ser reflejada la onda, no se forma ninguna imagen sobre la pantalla. Podemos entonces creer que existe por ejemplo un solo quiste grande cuando en realidad se trata de dos quistes pegados el uno al otro y separados por un tabique delgado. Si el haz es paralelo al tabique, éste no aparece sobre la pantalla. Este artefacto se halla habitualmente en cardiología, y no habrá que establecer un diagnóstico precipitado de comunicación interauricular en el corte de las "cuatro cavidades" mediante abordaje izquierdo. Aquí, de nuevo en algunas fases del ciclo cardíaco, el haz se sitúa paralelo al tabique interauricular. Esto subraya la importancia de una exploración bajo numerosas proyecciones.

- *Efecto de margen.*

Consiste en la formación de una imagen ecógena en un líquido, mientras que éste no contiene ninguna célula ni elemento. Este artefacto se halla en ecografías de la vesícula biliar. El haz de ultrasonidos se caracteriza por tres dimensiones: anchura, profundidad y espesor. Este último es el responsable del efecto margen. Si el haz de ultrasonidos corta la vesícula biliar, de manera que una parte del haz pase por la luz y la otra se sitúe en el margen del parénquima hepático, la proyección de este corte en tres dimensiones sobre la pantalla de dos dimensiones hace aparecer en el centro de la vesícula biliar una masa de contornos difusos que no es más que parénquima hepático.

Esta imagen sólo se obtiene en ciertas incidencias y presenta un aspecto variable en función del ángulo de incidencia.

III.A.11.-Efectos biológicos

Los efectos biológicos nocivos de la ecografía son muy débiles porque los tiempos de emisión de los ultrasonidos representan una mínima parte de la utilización del ecógrafo (un microsegundo por segundo), siendo 3,6 segundos por hora de trabajo. La absorción de los ultrasonidos provoca un aumento de temperatura, rápidamente dispersado por los líquidos del organismo y no entraña aumento de la temperatura corporal.

Ecografía**III.A.12.-Manejo del ecógrafo**

En primer lugar, se deben realizar todas las conexiones con el equipo apagado, incluso cuando queremos cambiar el transductor; y en el caso de las exploraciones transrectales, se recomienda proteger la sonda con un guante desechable largo como los de palpación rectal, previa aplicación del gel sobre la zona de los cristales. El transductor transrectal está diseñado para utilizarse sin protección alguna, pero es mejor esta maniobra previa al inicio del trabajo, para una mejor preservación de la parte más delicada del equipo, y como forma de no “contaminar” el transductor, y poder así vehicular algún microorganismo a otras zonas de trabajo. Durante la tarea es muy común que el ecógrafo se manche por salpicaduras, polvo ambiental y manipulación de los operadores. Al finalizar, debemos limpiarlo con un paño húmedo, y sólo lavaremos con agua la sonda desde el transductor hasta el control remoto. Es recomendable aplicar silicanos periódicamente sobre el equipo, ya que evitan que el polvo y la suciedad se adhieran a la carcasa, resultando más difícil de limpiar. Una o dos veces al año debe limpiarse completamente todo su interior (Bellenda, 2003).

El examinador es una parte importante de la exploración ecográfica a tres niveles:

- ◆ Coordinación ojo-mano (necesario para localizar los órganos).
- ◆ Evaluación correcta de la anatomía ultrasónica (requiere un conocimiento detallado de la anatomía reproductiva y de la patología).
- ◆ Integración de los principios básicos del diagnóstico ecográfico y el conocimiento biológico (Pierson *et al.*, 1988a).

Existen dos grandes obstáculos cuando se está aprendiendo a manejar el ecógrafo:

1. Conocer cual es la apariencia en el monitor de las estructuras que se quieren estudiar (p.e: cómo aparecen los ovarios normales o con alguna patología). Esto puede llevar una considerable cantidad de tiempo y un buen número de animales para explorar (Brad, 1994).
2. Un ecografista principiante debe de ser capaz de conseguir una buena imagen en el monitor. Lograr buenas imágenes dependerá de la experiencia del individuo. Las estructuras se observan mejor cuando están entre 2 y 5 cm de distancia de la sonda, lo que requiere cierta habilidad de manipulación y un conocimiento de la anatomía en cuestión (Brad, 1994).

a.- Protocolo y preparación del animal.

Antes de realizar una ecografía es recomendable conocer los datos obtenidos a partir de la anamnesis, exploración clínica, laboratorio y radiológica. El animal debe de ser presentado en ayunas de 12-24 h para disminuir la cantidad de gas en el intestino y de orina en la vejiga, principalmente si es necesario valorar abdomen pélvico. Nunca se deben realizar previamente contrastes de bario porque esta sustancia bloquea totalmente el paso de ultrasonidos. Los contrastes yodados no tienen este efecto (Díez, 1992).

En general no es necesario anestesiarse a los animales para poder realizar una exploración ecográfica, y la única preparación que se requiere es depilar la región que se desea explorar, para después aplicar un gel acústico que permita un contacto perfecto entre el transductor y la piel del animal, minimizando la cantidad de aire que pueda existir entre ambas superficies, con el fin de obtener una buena imagen (Díez, 1992).

Tanto en la vaca como en la yegua se utiliza la ecografía transrectal para el estudio del aparato reproductor. En el caso de la yegua, es conveniente evacuar la ampolla rectal previamente, a los efectos de no realizar movimientos forzados con el transductor en la mano, y así evitar lesiones del recto. Al mismo tiempo se recorre el borde anterior de los cuernos y el cuerpo uterino, para dejar bien posicionado el órgano, listo para el estudio ecográfico.

En el caso de la vaca no es muy conveniente la evacuación total del recto, ya que la mayor flacidez de sus paredes, permite que muchas veces se introduzca aire y eso nos complica una correcta manipulación y visión de los órganos a estudiar; pero sí es recomendable hacerlo gestaciones tempranas o en vacas difíciles de explorar.

Conviene realizar la manipulación simultánea del transductor y el aparato genital, posicionándolos de acuerdo a la estructura que buscamos estudiar. Es muy importante tener la premisa de que antes de iniciarse en trabajos con el ecógrafo, el veterinario debe tener mucha práctica en la exploración rectal por palpación o tacto, ya que ambas técnicas funcionan en simbiosis, y se sinergizan para llegar a lograr un buen resultado final (Tamayo, 2000; Bellenda, 2003).

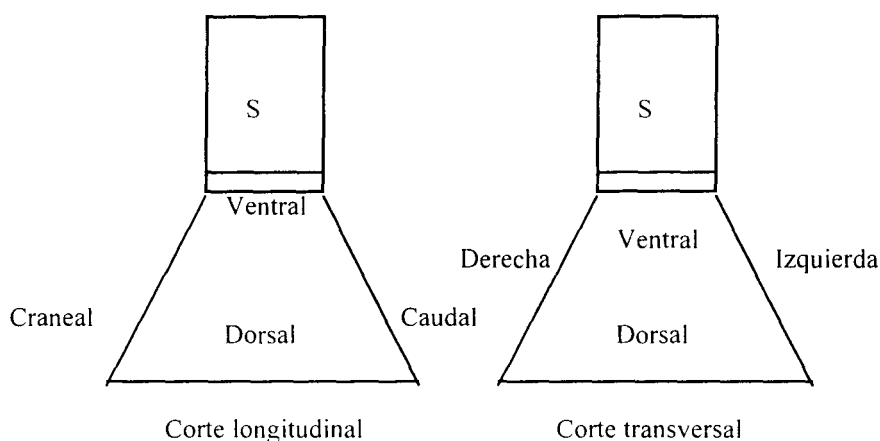
Cuando se realizan exploraciones muy prolongadas, puede utilizarse como ayuda, la anestesia epidural (puede ser útil para una breve relajación de los intestinos) u otros relajantes (p.e: Domosedan que tranquiliza al animal e induce una relajación prolongada de las paredes del recto para una más fácil manipulación mientras el animal permanece en estación) (Pieterse, 1999; Bellenda, 2003).

La ecografía transvaginal no es tan frecuente como la transrectal ya que requiere de medidas higiénicas extras y una pieza de extensión para el transductor debido al largo de la vagina de la vaca. En este examen el transductor y los órganos son manipulados independientemente (Hanzen *et al.*, 1992; Pieterse, 1999).

Las ecografías de abdomen se realizan en general en decúbito supino, por lo que el transductor se coloca sobre la superficie ventral del animal. Los transductores suelen tener una marca orientativa, que en los cortes longitudinales debe siempre dirigirse en dirección craneal, en los transversales hacia la derecha del animal. La parte superior de la imagen será en todos los cortes ventrales y la inferior dorsal del animal. En los cortes longitudinales la izquierda será craneal y la derecha caudal, en los transversales la izquierda será la derecha y la derecha la izquierda (Díez, 1992).

b.- Definición de los planos de corte.

Para cada órgano, se efectúan cortes definidos por un plano cuya orientación corresponde a la orientación de los ultrasonidos. La orientación de los planos se indica respecto al paciente examinado (Loriot *et al.*, 1997a).

Ecografía**Figura n° 18.** Definición de los planos de corte.1. *Cortes transversales.*

Los cortes transversales atraviesan al paciente perpendicularmente a la columna vertebral. Estos cortes presentan una inclinación más o menos craneal o caudal y más o menos hacia la derecha o la izquierda. Se habla entonces de cortes transversales oblicuos con inclinación craneal o caudal, derecha o izquierda. Señalemos que al efectuar el examen del hígado, algunos cortes se denominan recurrentes; se trata, de hecho, de cortes transversales oblicuos con inclinación craneal efectuados cerca del borde costal.

2. *Cortes medianos y paramedianos.*

Son cortes longitudinales que pasan por un plano de simetría. De la misma forma, estos cortes presentan una inclinación más o menos craneal o caudal, y más o menos hacia la derecha o la izquierda.

3. *Cortes frontales.*

Atraviesan al paciente perpendicular al plano sagital y paralelos a la columna vertebral. Estos cortes se efectúan mediante un abordaje lateral derecho o izquierdo. Al igual que los precedentes, podrá dárseles una inclinación más o menos craneal o caudal, y más o menos ventral o dorsal.

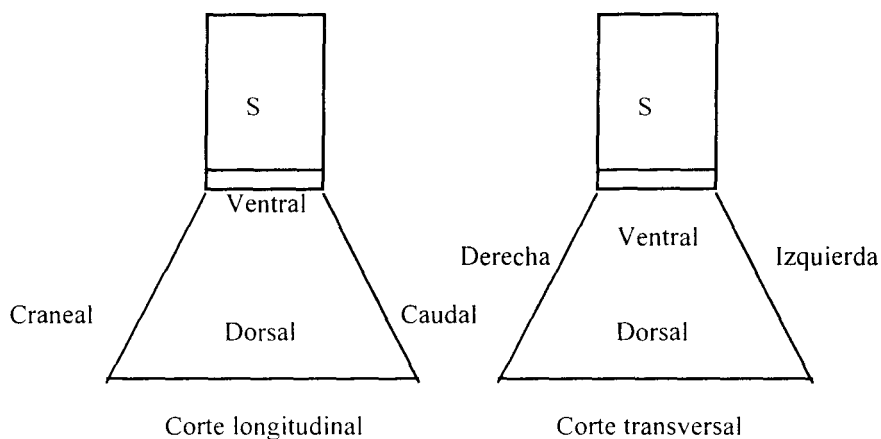


Figura n° 19. Definición de los planos de corte.

c.- Interpretación de la imagen.

Para poder interpretar las imágenes ecográficas es fundamental saber diferenciar los ecos reales y los artefactos. Al realizar una ecografía se deben valorar la situación, el tamaño, la forma y la estructura de los diferentes órganos. La situación y el tamaño de los órganos varían según los individuos y es generalmente valorable mediante radiología. En cuanto a la forma, el contorno de los órganos es fisiológicamente liso y regular. Hay que tener cuidado con el gas intestinal, que en ocasiones puede hacer parecer que un contorno liso aparezca abombado. La posibilidad de valorar la estructura de los órganos es lo que le da a la ecografía su gran valor dentro de los métodos diagnósticos. Cada órgano y tejido presenta una ecogenicidad característica, por lo que al realizar una ecografía se deben analizar detenidamente la intensidad y la distribución de los ecos, valorando las posibles alteraciones difusas de la ecogenicidad (hiper, hipo o normoecogenicidad), así como las alteraciones focales, estudiando la forma, el contorno, el tamaño, el número y la ecogenicidad de dicha alteración con respecto al resto del parénquima (Díez, 1992).

Ecografía**III.A.13.- Aplicaciones de la ecografía en la reproducción bovina****III.A.13.1.-Aparato reproductor de la hembra***Examen general de los ovarios.*

Muchos de los programas de control reproductivo de las explotaciones de ganado vacuno se basan en el arte de la palpación de los ovarios vía rectal, y su correcta interpretación. La precisión en la palpación rectal de los ovarios se puede comprobar observando los ovarios directamente en el matadero. En un trabajo de Dawson se afirma que de 359 ovarios palpados y después examinados visualmente, 250 tenían estructuras correctamente identificadas, 48 tenían estructuras secundarias que no detectaron y 61 (17%) tenían estructuras primarias que no detectaron o se detectaron incorrectamente. Este autor cree que los resultados son buenos, aunque se precisaban palpaciones seriadas y no se puede predecir el estatus funcional de las estructuras palpadas (Kelton, 1989).

Basándonos en el trabajo comentado anteriormente, se puede asumir que la mayoría de los veterinarios clínicos, después de un adecuado entrenamiento y práctica, pueden identificar correctamente las estructuras ováricas, pero hay que ser un poco más escépticos en cuanto a poder predecir el estado funcional en el que se encuentran las estructuras (Kelton, 1989).

Aunque el elevado coste del ecógrafo limita una amplia aplicación para el trabajo rutinario con los bóvidos, la ecografía es un método más preciso y válido para el diagnóstico de las estructuras funcionales del ovario que la palpación rectal (Ribadu *et al.*, 1994; Fricke, 2004).

Con el ecógrafo se puede monitorizar el crecimiento y regresión de las estructuras ováricas de forma no invasiva. Los tres componentes principales del ovario (folículos, CLs y estroma) son fácilmente distinguibles y éste es un método preciso para determinar estas estructuras y sus dimensiones (Peter *et al.*, 1992; Griffin *et al.*, 1992; Fricke, 2004).

Los ovarios contienen abundante información que puede ser usada como ayuda diagnóstica en el chequeo reproductivo y en la selección de las terapias o intervenciones reproductivas apropiadas. Por ejemplo, la presencia o ausencia de CL ayuda en el diagnóstico de la preñez, especialmente si es un diagnóstico temprano. Cuando está presente, el tamaño y la ubicación (ovario derecho o izquierdo) del CL indica la localización del concepto dentro del útero si la vaca está preñada. Debido a que la mayoría de los gemelos en el ganado son dicigóticos (Wilbank *et al.*, 2000), la presencia de múltiples CLs es un indicador diagnóstico de la presencia de gestación gemelar. Las patologías del ovario, como “ovarios estáticos” y quistes foliculares y luteinizados pueden ser fácilmente distinguidos. Sin embargo, el uso de las estructuras ováricas como ayudas diagnósticas durante los exámenes reproductivos, requiere amplio conocimiento de la anatomía y fisiología ovárica y reproductiva.

Además, hay limitaciones a las conclusiones que pueden hacerse de un solo examen, en comparación a exámenes seriados (Fricke, 2004).

El examen ecográfico de los ovarios se realiza habitualmente por vía transrectal. Es indispensable una evacuación completa del recto. Los ovarios se localizan siguiendo los

cuernos uterinos. La mano y el transductor se cubren con gel de contacto y ambos se llevan a una posición dorsal al ovario. La movilidad del ovario hace que esta exploración sea más difícil que la del útero. La sonda se sostiene normalmente entre los dedos pulgar, índice y medio, mientras que para la manipulación del ovario se mantiene éste contra la sonda y se intenta sujetar con el anular y el dedo meñique. El ovario se visualiza moviendo la sonda de izquierda a derecha y viceversa (Pieterse, 1989).

Se utiliza la vía transvaginal para una mejor visualización de los ovarios. Este método de examen supone sin embargo unas condiciones sanitarias más estrictas y la utilización de una sonda (lineal o sectorial) vía vaginal, mientras que los ovarios son sujetos vía transrectal (Hanzen *et al.*, 1992; Pieterse, 1999).

Dinámica folicular.

El estudio de la dinámica folicular se puede realizar durante:

- a) El ciclo estral (Pierson *et al.*, 1987c; Sirois *et al.*, 1988).
- b) La gestación (Guibault *et al.*, 1986; Pierson *et al.*, 1986).
- c) El posparto (Rajamahendran *et al.*, 1990; Savio *et al.*, 1990).
- d) La superovulación (Pierson *et al.*, 1988c; Grasso *et al.*, 1989).

La foliculogénesis es el proceso de formación de folículos maduros capaces de ovular del grupo de folículos primordiales que yacen estáticos en el ovario (Spicer y Echternkamp, 1986; Fricke, 2004).

El crecimiento y regresión folicular han sido durante mucho tiempo objeto de controversia y especulación resultando hipótesis conflictivas. Algunos investigadores sostenían que el crecimiento folicular era continuo e independiente del ciclo (Donaldson y Hansel, 1968; Dufour *et al.*, 1972; Spicer y Echternkamp, 1986), pero Rajakoski (1960) introdujo este nuevo concepto de onda folicular, afirmando que la población de folículos que emergen en los ovarios durante el ciclo estral se caracterizan por una fase de crecimiento, seguida de una fase estática y finalmente ovulan o entran en atresia, con diferentes patrones de desarrollo. Hasta que empieza a aplicarse la ultrasonografía en tiempo real, los conocimientos sobre el desarrollo folicular eran deducidos indirectamente a través del estudio de patrones cíclicos de gonadotropinas y hormonas esteroides, y/o experimentalmente usando técnicas de medida y recuento de folículos en ovarios de matadero, por laparoscopia después de marcarlos, etc. (Rajakoski, 1960; Dufour *et al.*, 1972; Ireland y Roche, 1983; Fortune, 1993). Ahora, gracias a la ecografía se puede afirmar que el crecimiento folicular se produce por ondas, y hay trabajos que afirman la existencia de dos, tres ondas, incluso cuatro en cada ciclo (lo más normal son dos o tres ondas). En una onda folicular hay un crecimiento sincrónico de un grupo de folículos, de los cuales uno llega a ser dominante.

Cada folículo dominante tiene una fase de crecimiento y una fase estática, durando cada una al menos cinco o seis días. El folículo de la primera onda es anovulatorio. Permanece dominante durante cuatro o cinco días, y generalmente hacia el día 11 o 12 del ciclo se pierde su dominancia y comienza a regresar. En este medio tiempo, se ha producido la segunda ola de crecimiento folicular y el folículo dominante de esta segunda ola ya

Ecografía

apareció. Cuando el ciclo tiene dos ondas foliculares este segundo folículo dominante ovulará; si se trata de un ciclo con tres ondas foliculares, el segundo dominante regresará y será el tercero el que ovula (Rajamahendran *et al.*, 1994).

El día cero del ciclo es el primer día que desaparece el folículo preovulatorio (ovulación) y coincide con el surgimiento de la primera onda folicular; por lo tanto, en hembras con dos ondas, estos se inician los días 0 y 10 del ciclo, mientras que en las de 3 ondas comienza los días 0, 9 y 16 (Tamayo, 2000; Bo *et al.*, 2000; Gnemmi, 2004; Fricke, 2004).

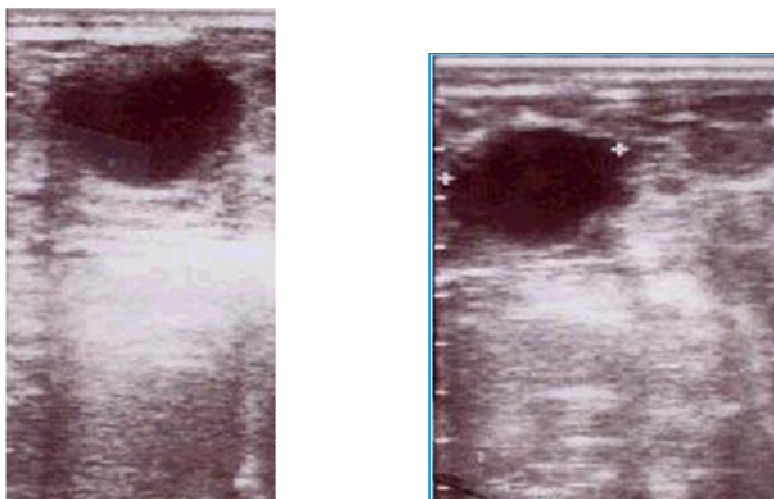
En general las vacas lecheras en producción primíparas y múltiparas exhiben más ciclos de dos ondas mientras que las novillas tienden a exhibir más ciclos de tres y cuatro ondas. Algunos factores que pueden influenciar el número de ondas por ciclo estral en el ganado lechero incluyen la ingesta en la dieta, edad, número de parto y estado de lactancia. (Fricke, 2004).

Estudios recientes sugieren que las vacas no permanecen únicamente bi o trifásicas durante toda su vida, sino que lo pueden alternar entre partos (De la Riera, 2004).

Las ondas foliculares representadas por los folículos antrales pueden estar presentes durante la gestación. En la fase del diestro del ciclo o durante la gestación, un folículo dominante puede llegar hasta 10-15 mm antes de sufrir atresia (De la Riera, 2004). El crecimiento y atresia folicular continúa durante al menos 60 días de gestación, igual que si se tratara de vacas cíclicas (Rajamahendran *et al.*, 1994).

La ecografía también ha ayudado a comprender la influencia de los folículos dominantes sobre los folículos medianos y pequeños.

Los folículos van creciendo durante el ciclo estral de la vaca a razón de 1'5 a 2'5 mm/día en el momento previo a la ovulación (Driancourt *et al.*, 1986, 1988; Pieterse, 1999; Bellenda, 2003). Estos folículos aparecen como zonas negras más o menos bien circunscritas (anecogénicas), limitados por una pared delgada y se distinguen con bastante facilidad por tener un borde relativamente bien definido que contrasta con el estroma ovárico. La falta de atenuación de la onda ultrasonora por el líquido folicular es responsable de la presencia de una zona hiperecogénica de reforzamiento de los ecos en la parte distal del folículo. La ecografía evalúa de 2 a 3 mm menos del tamaño del folículo (Quirk *et al.*, 1986) por lo que sólo la cavidad folicular es evaluada de forma precisa. Cuando hay un grupo de folículos muy próximos, a veces las paredes son muy finas para ser detectadas, apareciendo formas irregulares (se deberá a una compresión por parte de los otros folículos o de un CL adyacente) y la imagen corresponde a dos o más folículos (Pieterse, 1989; Pieterse *et al.*, 1990b; Hanzen *et al.*, 1992; Peter *et al.*, 1992).



Fotografía n° 1. Podemos apreciar la ecogenicidad y formas de los folículos.

Como indican en sus trabajos numerosos autores (Pierson *et al.*, 1984; Quirk *et al.*, 1986; Savio *et al.*, 1988), el diámetro se determina colocando las marcas ecográficas de medida sobre la pared interna y por lo tanto se mide la cavidad folicular y no el folículo en sí. Si tiene forma irregular el diámetro folicular será la media entre el diámetro mayor y el menor. En la práctica no se puede deducir automáticamente la fase del ciclo estral según el tamaño de los folículos.

En el trabajo realizado por Ginther *et al.*, ya en 1989, el número de folículos localizados en el ovario derecho y en el izquierdo no diferían significativamente (distribución 50:50%), y no diferían entre las distintas categorías de las ondas (Ginther *et al.*, 1989a).

Detección del celo.

Cuando a las vacas no preñadas se les realiza un seguimiento ecográfico para detectar el retorno al celo, se observa un folículo ovulatorio, un CL funcional o en regresión y un aumento del tono uterino. Si además se observa fluido en el útero sin que exista un CL activo, la vaca probablemente estará próxima al celo (Boyd *et al.*, 1990; Taverne, 1991).

Proceso de ovulación.

La ovulación se pone de manifiesto indirectamente por la desaparición del folículo preovulatorio, o por la reducción brutal de su diámetro (Larsson *et al.*, 1987; Pierson *et al.*, 1987a; Rajamahendran *et al.*, 1988; Pieterse, 1989; Peter *et al.*, 1992).

El folículo dominante que ovulará las próximas 24 horas toma una forma muy redondeada. Su pared se hace evidente y puede tener hasta 2 mm de grosor. También se hacen visibles en la parte superior e inferior del folículo áreas acústicamente aumentadas, hiperecogénicas. En las últimas 12 horas antes de la ovulación, la pared externa puede adoptar una apariencia puntiaguda que puede verse “ondulando” en la pantalla, como movimientos de ola, en el momento de la ovulación (De la Riera, 2004).

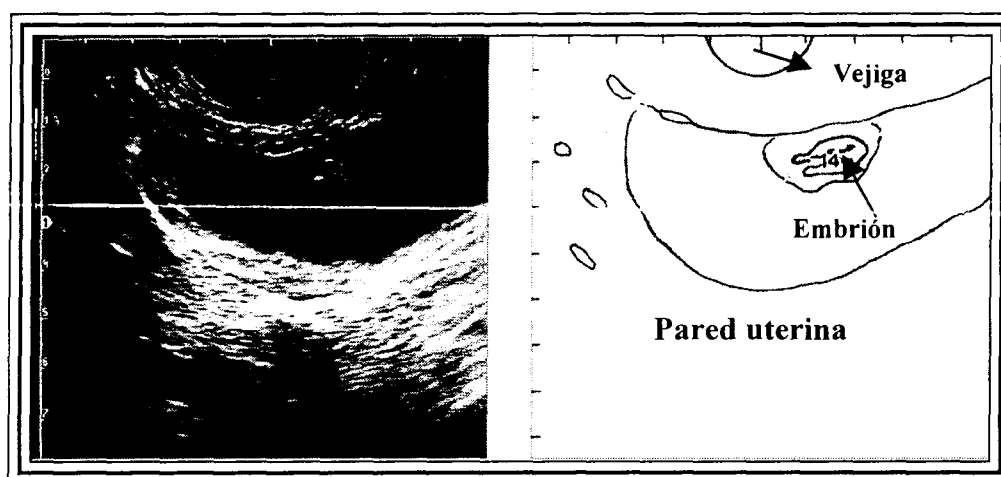
Tras la ovulación no se puede reconocer la fosa de ovulación u otro signo de la misma, sólo se puede reconocer por la desaparición de un folículo preovulatorio que se había observado con anterioridad (Kähn, 1994).

Ecografía**Cuerpo Lúteo: Morfología y crecimiento.**

Dado que este apartado es de especial relevancia en nuestra Tesis Doctoral, lo abordaremos en último lugar.

Diagnóstico de gestación.

Es un hecho la enorme importancia económica del diagnóstico de gestación lo más exacto posible en la vaca. Teniendo en cuenta diferentes fenómenos fisiológicos (la baja prolificidad -1,02-, el largo periodo de gestación -9 meses-, la duración del ciclo estral -21 días-, el plazo de demora necesario durante el puerperio para restaurarse la ciclicidad ovárica y la involución uterina tras el parto), el ganadero dispone solo de dos ciclos ováricos para conseguir el objetivo de un ternero por vaca y año. Este objetivo es considerado como el óptimo en una explotación de ganado vacuno, lo que obliga a los productores a optimizar el potencial de producción del rebaño, reduciendo el intervalo entre partos y consiguiendo la identificación precoz de los animales no gestantes (Hanzen *et al.*, 1987; Chaffaux *et al.*, 1988; Hanzen *et al.*, 1993; Rajamahendran *et al.*, 1994).



Fotografía n° 2. Imagen ecográfica de una gestación de 27 días junto a un esquema indicativo.

Detección de la mortalidad embrionaria.

Utilizando la ecografía se asume que hay mortalidad embrionaria cuando una vesícula amniótica o el embrión se han visto claramente al menos una vez, y después el mismo animal ha sido dado como no gestante por exploración rectal, bien manualmente ó empleando nuevamente el ecógrafo después de sesenta días (Chaffaux *et al.*, 1988).

Wilson *et al.* (1988), realizaron un trabajo utilizando la ecografía para comprobar la mortalidad embrionaria. La pérdida embrionaria se produjo después del reconocimiento maternal de la gestación (aproximadamente el día 16-17 después de la IA). El 18% de las vesículas embrionarias detectadas en hembras receptoras de embriones, y el 8% de las detectadas en hembras inseminadas, que estaban presentes el día 25, se habían perdido el día 39. Por lo tanto, la determinación de la gestación temprana, o de la pérdida embrionaria, se pueden diagnosticar utilizando ultrasonografía.

Hanzen *et al.*, en un trabajo realizado en 1991 afirman que:

- En el 11'7% de las hembras se producía muerte embrionaria cuando el diagnóstico de gestación era antes de los 39 días posinseminación artificial.
- Aparecía un 7'6% de mortalidad cuando el diagnóstico se realizaba entre el día 39 y 59 posinseminación artificial (Taverne, 1991).

Imagen fetal y desarrollo anatómico del embrión.

Son muchos los autores que han realizado estudios sobre la imagen fetal: Hanzen *et al.*, 1987; Kähn, 1989b; 1990; Hanzen *et al.*, 1991.

En la siguiente tabla (n° 3) se puede observar la precocidad en la detección por ecografía de estructuras embrionarias y placentarias (realizado en novillas lecheras con una sonda de 5 MHz) (adaptado por Curran *et al.*, 1986a; Curran *et al.*, 1986b).

	Nº exámenes	Media (días)	Intervalo
Embrión	15	20	19-24
Latidos cardiacos	15	21	19-24
Alantoides	9	23	22-25
Aspecto curvado del embrión	11	25	22-30
Columna vertebral	14	29	26-33
Esbozo miembros anteriores	14	29	28-31
Amnios	14	30	28-33
Cavidades orbitarias	14	30	29-33
Esbozo miembros posteriores	13	31	30-33
Aspecto en L del embrión	12	33	29-39
Placentomas	6	35	33-38
Cristalino	12	40	37-44
Pezuñas	10	45	42-49
Movimientos fetales	9	45	42-50
Costillas	7	53	51-55

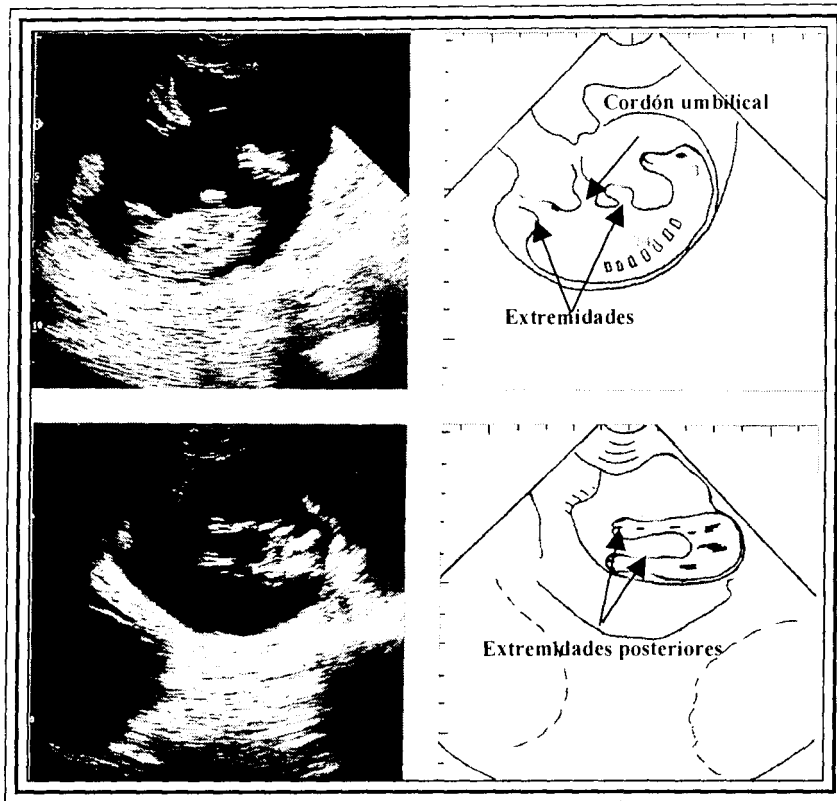
Tabla n° 3. Precocidad en la detección ecográfica de diversas estructuras.

El feto bovino se puede ver a partir del día 20 de gestación, sin embargo, debido al tamaño en relación con el campo visual, todo el feto no puede ser visualizado después de los 90 días usando un transductor de 5 MHz de sección linear (Fricke, 2004).

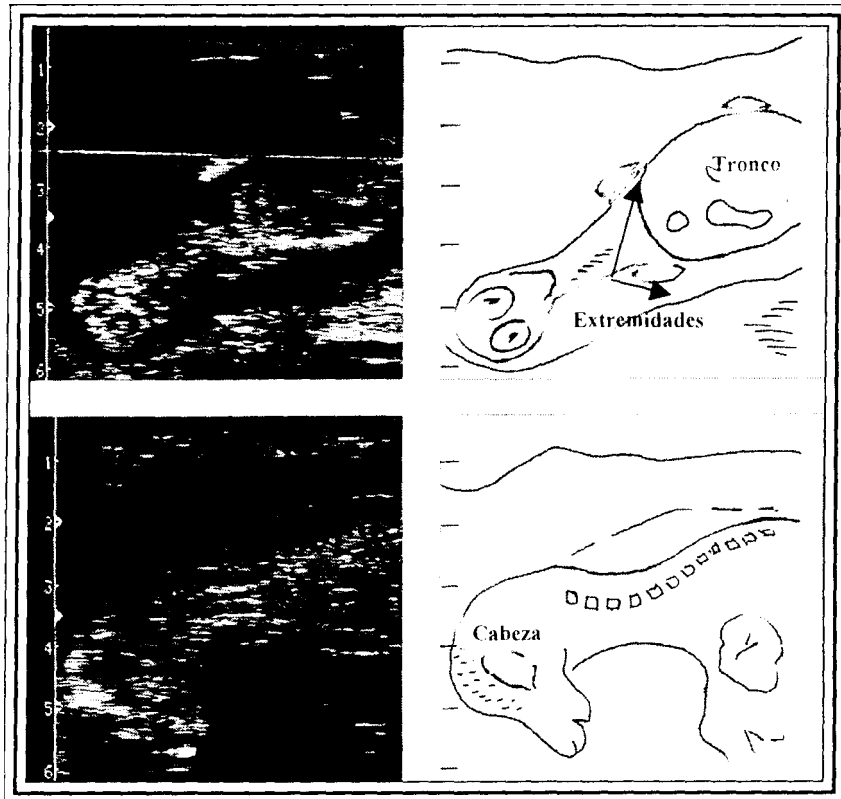
En el embrión se apreciará con mayor facilidad el palpitar cardiaco a partir del día treinta y dos, su ausencia indicará muerte embrionaria (Ruperez, 2004).

Ecografía

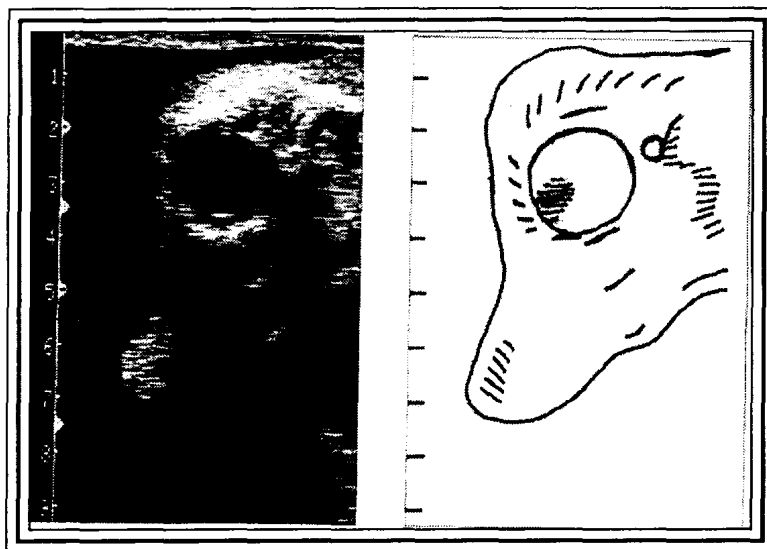
A continuación tenemos una serie de imágenes ecográficas de gestación en distintas fases:



Fotografía n° 3. Imágenes ecográficas de una gestación de 59 días junto con esquema explicativo de las correspondientes imágenes.



Fotografía n° 4. Dos imágenes ecográficas de una gestación de 61 días con esquema para facilitar la interpretación.



Fotografía n° 5. Detalle ecográfico de la cabeza de un feto de 105 días de gestación.

Sexo y edad fetal.

La determinación del sexo fetal es una operación que requiere tiempo y paciencia (Curran *et al.*, 1991; Hanzen *et al.*, 1991; Badtram *et al.*, 1991; Rajamahendran *et al.*, 1994).

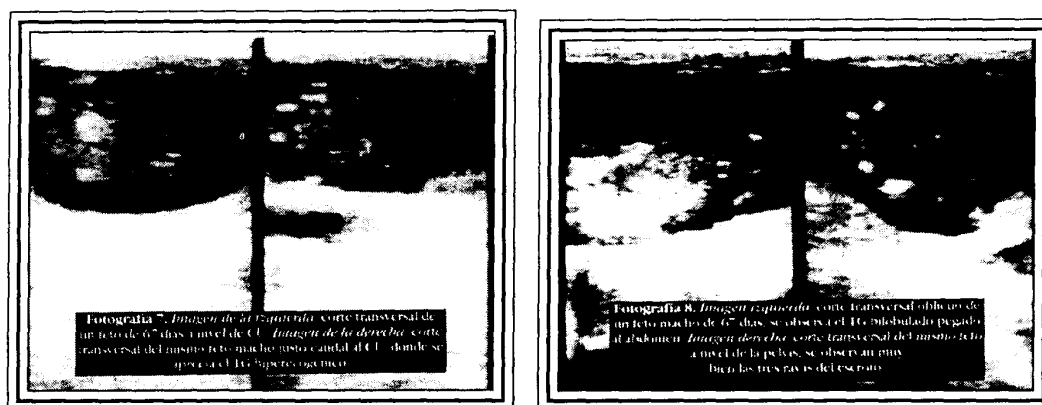
Ecografía

Los primeros datos bibliográficos referidos al diagnóstico del sexo fetal en el vacuno por medio del ultrasonido se remiten a Müller en 1985 y Wittkowski en 1986, quienes basaron sus experiencias en el reconocimiento de la protuberancia escrotal en el macho y de las papilas mamilares en la hembra (Munar, 2004).

El fundamento de la determinación del sexo se basa en la visualización del tubérculo genital en una localización u otra. Su imagen es la de una estructura hiperecogénica que puede aparecer bilobulada o trilobulada. Esta estructura originará el pene en el macho y el clítoris y la vulva en la hembra (Ruperez, 1997; Quintela *et al.*, 2005)

Para el día 80 ya no se habla de tubérculo genital y sí de pene y clítoris. Además se visualizaron ya escroto y mamas (Bo *et al.*, 2000; Tamayo, 2000; Bellenda, 2003; Ruperez, 1997; Quintela *et al.*, 2005)

Hasta el día 50 el tubérculo genital se encuentra en una distancia intermedia entre el cordón umbilical y la base de la cola, en este momento se aproxima hacia el cordón umbilical en el macho o hacia la base de la cola en la hembra (Ruperez, 1997; Quintela *et al.*, 2005)



Fotografías n° 6. Cortes ecográficos para la determinación del sexo fetal.

La ubicación definitiva detrás del cordón umbilical en el macho se produce el día 56 y cerca de la base de la cola en la hembra el día 53 (Bo *et al.*, 2000; Tamayo, 2000).

Por ecografía se diagnostica el sexo a partir del día cincuenta y cinco de gestación. La edad ideal va desde el día cincuenta y ocho al setenta y cinco, esto depende en gran medida de la localización del útero; así, si el útero se mantiene pélvico, el sexaje se puede realizar hasta más de los cien días, pero si la vaca tiene un útero grande y descolgado en cavidad abdominal, es muy difícil llegar con la sonda cerca del feto y obtener una calidad de imagen diagnóstica (Ruperez, 2004; De la Riera, 2004; Gnemmi, 2004).

Una vez localizado el feto, la sonda se pasa por encima, de lado o debajo del útero para tener lo más cerca posible el feto del transductor y conseguir mejor imagen. Si el feto se mueve esperamos a que cese su actividad.

El ecografista debe familiarizarse con las distintas imágenes ecográficas del feto y saber en qué zona está dando el corte ecográfico. La cabeza, el palpitar cardíaco y el cordón umbilical son las estructuras de referencia para saber la situación del feto. La zona del

cordón umbilical y la de la cola son las zonas de diagnóstico para visualizar el tubérculo genital (Ruperez, 2004).

Principalmente son dos las secciones empleadas, la transversal y la frontal. En fetos jóvenes (55 a 60 días) es la frontal la de más utilidad (Bo et al., 2000; Ruperez, 2004).

La vista transversal es la más común sobre todo en fetos de más de 60 días (Bo et al., 2000).

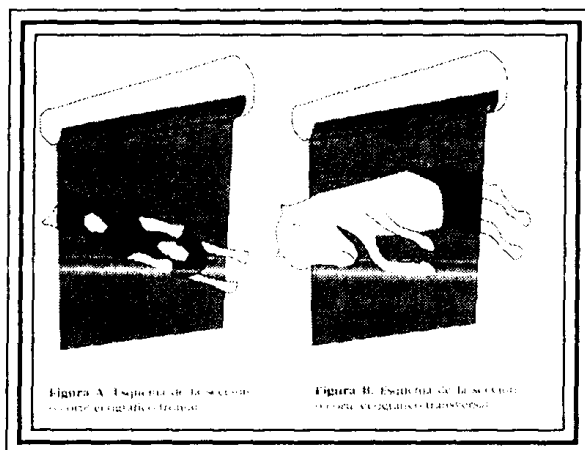


Figura n° 20. Cortes ecográficos recomendados para sexaje fetal.

Existe otra sección o vista difícil de obtener debido a la ubicación del tracto reproductivo y del feto: vista lateral. Esta es útil para identificar el pene alrededor del día 90 de gestación (Bo et al., 2000).

Nunca se debe hacer el diagnóstico en base a la no determinación de los genitales del sexo opuesto porque existe la posibilidad de cometer errores. Así, en las secciones longitudinales laterales se puede confundir una vértebra coccígea con el clítoris, mientras que en las secciones transversales, el cordón umbilical (que tiene pulsaciones) se puede confundir con el pene (Gnemmi, 2004).

La fiabilidad del sexado fetal para un operador entrenado alcanza el 99 por 100 (Tamayo, 2000; Ruperez, 2004; Gnemmi, 2004).

La determinación del sexo fetal, es una herramienta útil para decisiones de planificación en los rebaños que inseminan parte de sus vacas a toros de carne, y para el descarte de vacas marginales que gestan machos sin tener que esperar al parto. Otra ventaja, es el mayor valor de las novillas que gestan hembras. Además, con el diagnóstico del sexo se comprueba la viabilidad del feto en un momento a partir del cual las posibilidades de pérdidas de gestación son ya menores (De la Riera, 2004; Munar, 2004; Fricke, 2004).

EcografíaReconocimiento del feto muerto.

La precoz evaluación del latido cardiaco (día 25) es muy indicativo de la viabilidad del feto, también la separación de las membranas fetales es un signo de mortalidad fetal.

La cantidad y limpieza de los líquidos amnióticos y alantoideo son muy importantes para eliminar el riesgo de interrupción de la gestación. El método ecográfico permite anticipar el diagnóstico de muerte embrionaria o fetal, lo que posibilita inducir rápidamente el celo, recurriendo a la utilización de un agente luteolítico si el feto está muerto, o intentar mantener la gestación recurriendo a la administración de un progestágeno, de liberación lenta, si el feto está vivo (Gnemmi, 2004).

Útero no gestante.

El útero se ha de ecografiar en toda su longitud, obteniéndose cortes transversales, longitudinales y oblicuos. La imagen de los cuernos vacíos es la más fácil de identificar, visualizándose en la pantalla uno o más redondeles de entre dos y cuatro centímetros de diámetro (Tamayo, 2000; Ruperez, 2004).

Las características ecográficas del útero cambian en el curso del ciclo.

Haciendo una ecografía de un útero no gestante, se puede diferenciar:

a) *Diestro.*

En el diestro el endometrio es más ecogénico (más brillante) que el miometrio, existe impregnación progesterónica: los cuernos están enrollados y hay mayor número de secciones ecográficas transversales. A veces se pueden distinguir los pliegues endometriales pero no se ve fluido en la luz uterina (Brad, 1994).

El endometrio tiene más ecogenicidad granular que el útero en estro debido a la ausencia de edema (De la Riera, 2004).

b) *Proestro.*

En el proestro la pared tiene una ecotextura más heterogénea (por el aumento de vascularización y el edema de los cuernos) que en el diestro.

c) *Celo.*

Durante el celo normalmente es posible diferenciar los pliegues endometriales y el miometrio, así como las pequeñas acumulaciones de líquido en la luz del útero, cuya presencia se corresponde con descargas visibles de moco por la vulva o durante las exploraciones vaginales con espéculo. Estas características son presumiblemente debidas a un elevado nivel de estrógenos durante el periodo periovulatorio, lo que causa el aumento del tono, la tubularización del útero y el edema de los pliegues endometriales (Brad, 1994).

Por lo tanto, el aspecto del lumen cambia durante el estro por la producción de moco, apareciendo cintas intensamente hiperecogénicas. Esto se debe al reflejo especular creado por la interacción del moco y la pared del lumen. Ha sido descrito como “Ojos de Búho” ya que a

menudo hay 2 áreas de intensa hiperecogenicidad creadas por el moco en el lumen (De la Riera, 2004).

El grosor de la pared del cuerpo uterino aumenta tres o cuatro días antes de la ovulación (aproximadamente hacia el día 17 del ciclo). Este grosor disminuye el día que precede a la ovulación hasta el día tres del ciclo siguiente y permanece constante a lo largo de todo el diestro.

Quistes foliculares y quistes luteales.

El diagnóstico de quistes en el ganado vacuno ocurre con mayor frecuencia durante los exámenes posparto de rutina (Tamayo, 2000; Fricke, 2004).

La palpación rectal de una estructura grande y llena de fluido es comunmente interpretada como un hallazgo clínico de un quiste folicular. La diferenciación de quiste folicular, quiste folicular luteinizado y CL con cavidad por palpación rectal no es fácil (Pieterse, 1989; Tamayo, 2000; Fricke, 2004).

La precisión en el diagnóstico aumenta cuando se usa ultrasonografía transrectal, con la correcta identificación de más del 90% de los quistes luteales y cerca del 75% de los foliculares (Tamayo, 2000; Fricke, 2004).

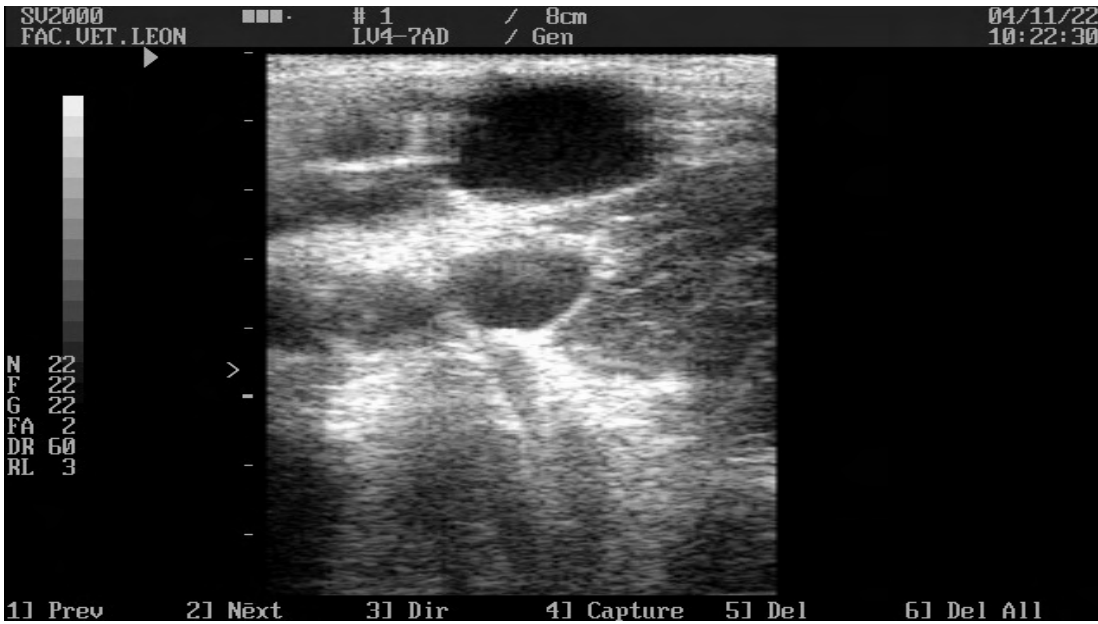
Los quistes foliculares y luteales también se pueden clasificar en base a las concentraciones de progesterona sérica (Farin *et al.*, 1990). El diagnóstico de un quiste con baja progesterona sérica indica un quiste folicular, mientras que un quiste con altos niveles de progesterona sérica es indicativo de un quiste luteal. Usando este criterio, un quiste folicular benigno caería en cualquiera de las dos categorías dependiendo de la etapa del ciclo estral en que la muestra sea obtenida (Jeffcoate *et al.*, 1995; Tamayo, 2000; Fricke, 2004).

Hay que tener en cuenta que una única determinación hormonal, al igual que una sola exploración ecográfica, a menudo no será suficiente y habrá que trazar el perfil ultrasonográfico y hormonal a lo largo de varios días. (Pérez Marín *et al.*, 2002).

Según la morfología de la pared, los quistes ováricos se pueden clasificar en dos categorías:

- Quiste folicular: diámetro superior a los 25 mm, con una pared muy fina (<3 mm) y sin una organización en particular (Fotografía n° 7).
- Quiste folicular luteinizado: paredes con unos mm de grosor con ecogenicidad de tejido luteal. El estroma ovárico que rodea a estos quistes es más ecogénico que la pared del quiste. Tienen un diámetro superior a los 25 mm y la pared luteinizada mayor de 3 mm y menor de 5 mm. De todas formas, pequeños quistes luteinizados con una pared relativamente gruesa, pueden confundirse con un CL con cavidad, en aquellos casos en los que las cavidades son muy grandes y persisten durante mucho tiempo, siendo necesario un perfil completo, tanto hormonal como ecográfico. (Kahn *et al.*, 1989a; Farin *et al.*, 1992; Pérez Marín *et al.*, 2002). (Fotografía n° 8).

Ecografía



Fotografía n° 7. Quiste folicular.



Fotografía n° 8. Quiste folicular luteinizado.

En la siguiente tabla, se señalan las diferencias ecográficas entre ambos tipos de quistes (Ribadu *et al.*, 1993):

<i>Quiste folicular</i>	<i>Quiste folicular luteinizado</i>
Cavidad no ecogénica, uniforme	Partículas más o menos grises en su interior
Pared de 3 mm o menos	Pared con grosor mayor a 3 mm (3-5 mm)
Concentración de progesterona plasmática < 0,9 ng/ml	Concentración de progesterona plasmática > 0,9 ng/ml

Tabla n° 4. Diferencias entre quiste folicular y quiste folicular luteinizado.

Respecto al tamaño quístico, prácticamente todos los trabajos hablan de diámetros superiores a 2.0-2.5cm, pero Carriere *et al.*, (1995) (citado por Pérez Marín *et al.*, 2002) tienen en cuenta la posibilidad de variación de dicha medida dependiendo de la población animal estudiada, ya sea por edad, raza u otros condicionantes, y establecen que el tamaño debe ser igual al diámetro máximo medio de los folículos ovulatorios, más dos veces la desviación standard, determinado en un grupo control.

Hay que tener en cuenta, que a veces el quiste está anatómicamente presente pero funcionalmente anulado, permitiendo a la vaca ciclar normalmente a pesar de su presencia. Esto ocurre particularmente después de haber sido tratados y manualmente nos confunden como quistes que no responden y “necesitan” tratarse otra vez (De la Riera, 2004).

Existen también ovarios microquísticos, poco frecuentes y muy graves, que encuentran en la ecografía su única posibilidad diagnóstica (Gnemmi, 2004).

Condiciones patológicas del aparato reproductor.

Este tema ha sido objeto de estudio en numerosos trabajos: Fissore *et al.*, 1986a; Fissore *et al.*, 1986b; Edmondson *et al.*, 1986a; 1986b; Kähn *et al.*, 1989.

Tiene una gran importancia el conocimiento y diferenciación de los estados individuales del ciclo estral de la vaca, para optimizar las producciones en las granjas. También es de suma importancia conocer las condiciones ováricas, ya que los desórdenes de tipo ovárico constituyen del 25 al 35% de los casos de infertilidad en la vaca (Grygar *et al.*, 1992).

Son frecuentes las colecciones de líquidos fisiológicos (mucus) y sobretudo patológicos (endometritis, metritis o piometra). Estas colecciones líquidas, al contrario de lo que ocurre con las vesículas embrionarias no están contenidas en una membrana. El contorno es, de hecho, irregular (Chaffaux *et al.*, 1982).

El exudado purulento en el útero es altamente ecogénico y podría pasar desapercibido (parece tejido uterino normal), pero se diferencia porque se mueve libremente (Brad, 1994).

◆ *Endometritis.*

Se observa ecográficamente una acumulación de líquido no ecogénico con partículas ecogénicas, fácilmente diferenciable del líquido claro no ecogénico del útero periovulatorio y del gestante (Fissore *et al.*, 1986a; 1986b).

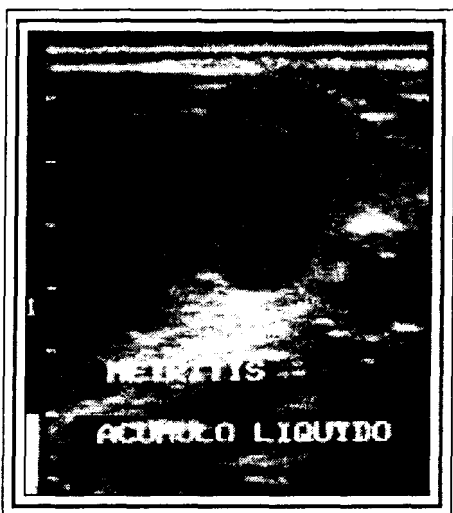
Ecografía

◆ *Metritis.*

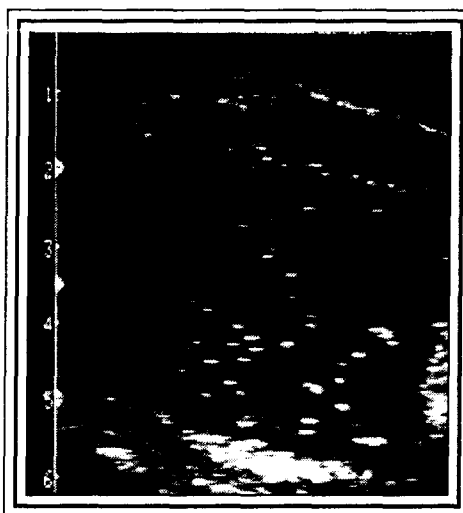
Se visualiza líquido intrauterino, el cuál es más ecogénico que el de la gestación, posee aspecto nevado con punteado en blanco. Cuando el contenido es francamente purulento y denso, la imagen es muy ecogénica y puede llegar a tener una tonalidad más blanca que la de las paredes de los cuernos (Tamayo, 2000; Ruperez, 2004).

◆ *Piómetra.*

Se identifica por la existencia de partículas ecogénicas difusas distribuidas en el fluido dentro del útero, que a su vez se encuentra distendido y con paredes engrosadas. Este grosor es variable.



Fotografía n° 9. Imagen ecográfica de una metritis.



Fotografía n° 10. Imagen de una piómetra.

◆ *Quistes de endometrio.*

Estos tipos de quistes en la vaca son relativamente raros.

◆ *Fetos macerados y momificados.*

En ambos casos se aprecia un acúmulo de huesos cuya distribución se puede evaluar adecuadamente con el ecógrafo. Los fragmentos de huesos se ven como áreas densas ecogénicas. Rodeando y entre los huesos, se ve fluido purulento con la típica apariencia de un fondo no ecogénico conteniendo numerosas y pequeñas partículas ecogénicas (Fissore *et al.*, 1986a; 1986b).

En el caso de la momificación, se puede ver fácilmente una pared engrosada y una masa ecogénica pobremente definida.

III.A.13.2.-Otras aplicaciones de la ecografía

Otras aplicaciones de la ecografía en la reproducción bovina son: la obtención de ovocitos del folículo ovárico in situ (Pieterse *et al.*, 1988; Badtram *et al.*, 1991); obtención de ovocitos por aspiración transvaginal (Bo *et al.*, 2000); inseminación artificial (Pierson *et al.*, 1988a; Beal *et al.*, 1989); desarrollo de protocolos de superovulación más eficientes (Peter *et*

al., 1992); técnicas de sincronización (Peter *et al.*, 1992; Rajamahendran *et al.*, 1994); recogida de embriones (Peter *et al.*, 1992; Roche, Echegoyen, Alabart y Folch *et al.*, 2005); involución uterina (Okano *et al.*, 1987); quistes ováricos (Farin *et al.*, 1990; Carroll *et al.*, 1990); tumores ováricos, pudiendo determinar su tamaño, pero no su origen (Pieterse, 1999; Bellenda, 2003); anormalidades fetales: amielia (falta congénita de médula espinal), malformaciones óseas diversas, schistosomia, etc. Se trata de hallazgos raros que aparecen durante los periodos de examen, numéricamente poco significativos (del orden del 0'7%) (Gnemmi, 2004); exploración del aparato reproductor del macho: tejido testicular (Pechman *et al.*, 1987; Sibide *et al.*, 1992); estado de las glándulas sexuales accesorias (Weberwe *et al.*, 1988).

Recientemente, productores e investigadores están usando la ecografía para ver las características del cuerpo del animal cuando va a ser faenado, es decir, para la realización de mediciones de grasa y músculo en el ganado de abasto. (Torres *et al.*, 2002; Bellenda, 2002; Marrodán *et al.*, 2002; Los Lazos, 2004; Bertrand, 2005).

III.A.14.- Diagnóstico de gestación.

III.A.14.1.-Generalidades

El diagnóstico de gestación es una rutina en el trabajo diario de los veterinarios del ganado vacuno. La posibilidad de diagnosticar definitivamente la gestación antes del día 27 es importante, especialmente en los programas de cría intensiva y para disminuir el número de días abiertos (días en los que la vaca está vacía). Este diagnóstico precoz ha llegado a ser una llave para el éxito económico de las explotaciones, y la confirmación de la gestación es esencial para mejorar la fertilidad en el ganado vacuno. Tres métodos son utilizados normalmente para este diagnóstico (palpación rectal, RIA y ecografía) los cuales se diferencian en efectividad, costo, conveniencia y valor para un diagnóstico precoz (Hanzen *et al.*, 1987; Taverne, 1991; Brad, 1994).

El mayor interés de todo método de diagnóstico de gestación reside en la detección precoz de los animales no gestantes, disminuyendo el intervalo entre inseminaciones. Es igualmente indispensable que el grado de exactitud sea máximo para evitar una interrupción terapéutica de la gestación o la eliminación equivocada del animal del rebaño al considerarlo no gestante. Por lo tanto, al método de detección de gestación se le pide que sea precoz, preciso y seguro (Huges *et al.*, 1989; Hanzen *et al.*, 1993; Ruperez, 2004; Fricke, 2004; De la Riera, 2004).

III.A.14.2.-Parámetros que definen los métodos de diagnóstico

Los diferentes métodos del diagnóstico de gestación se basan en las modificaciones anatómicas del aparato genital, la observación del feto y de sus anejos fetales, o en la puesta en evidencia de moléculas específicas de la gestación (hormonas, proteínas...). Para poder comparar los diferentes métodos es necesario conocer ciertas características de ellos, en particular la exactitud y la fiabilidad de los diagnósticos positivos: sensibilidad, o de los diagnósticos negativos: especificidad (Mialot *et al.*, 1991).

Ecografía1) *Sensibilidad y Especificidad.*

La sensibilidad mide la capacidad del método para diagnosticar correctamente los animales positivos.

La especificidad mide la capacidad de diagnosticar correctamente los animales negativos.

Un diagnóstico con baja sensibilidad ofrece demasiados falsos negativos, mientras que los que tienen baja especificidad dan demasiados falsos positivos (Sprecher *et al.*, 1989).

2) *Precisión del diagnóstico.*

La precisión del diagnóstico: porcentaje de diagnósticos correctos respecto al total de los diagnósticos realizados (Badtram *et al.* 1991).

La exactitud es una medida directa de la eficacia de la técnica y no cambiará con la variación en la fertilidad del rebaño, mientras que la fiabilidad es directamente proporcional a la fertilidad del rebaño (Chaffaux *et al.*, 1986).

3) *Kappa.*

Kappa es un cociente (de cero a uno) que expresa el acuerdo entre el diagnóstico y el resultado correcto. Un kappa con valor uno indica concordancia/acuerdo total. Un kappa de cero significa que no existe ningún acuerdo (Pieterse *et al.*, 1990b).

III.A.14.3.-Evaluación de los métodos de diagnóstico

A continuación se resumen los diferentes pasos a seguir para evaluar un método de diagnóstico y como se calculan los diferentes parámetros (Mialot *et al.*, 1991).

Es necesario diferenciar los diagnósticos de gestación positivos que se representarán como DG (+) y los negativos que expresaremos como DG (-).

Para estimar que el resultado de un método de diagnóstico es exacto o falla, hay que tomar un método de referencia que puede ser por ejemplo, el diagnóstico tardío de gestación por palpación rectal.

➤ *Parámetros utilizados.*

- a: número de DG(+) exactos (++)
- b: número de DG(+) falsos (+-).
- c: número de DG (-) correctos (--).
- d: número de DG(-) falsos (-+).

➤ *Fórmulas de evaluación.*• Exactitud.

Exactitud: aptitud para detectar las hembras gestantes o vacías.

$$\text{Exactitud DG (+)} = a/(a+b)$$

$$\text{Exactitud DG (-)} = c/(c+d)$$

• Fiabilidad.

Fiabilidad: probabilidad para que un animal declarado gestante lo esté (o diagnosticada no gestante esté realmente vacía).

$$\text{Fiabilidad DG (+)} = a/(a+d)$$

La fiabilidad del diagnóstico de gestación positivo se denomina *sensibilidad*.

$$\text{Fiabilidad DG (-)} = c/(c+b)$$

Esta fiabilidad del diagnóstico de gestación negativo la conocemos como *especificidad*.

• Exactitud global.

Tenemos además una exactitud global del método que la podemos calcular aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Exactitud global} = (a+c)/(a+b+c+d)$$

III.A.14.4.-Métodos de diagnóstico de gestación1. *Determinación de la concentración de progesterona.*

Comparada con la de otros animales de renta, como pequeños rumiantes y porcinos, la fecundidad de los bovinos es mediocre. Uno puede actualmente esperar como media 85 terneros /año por 100 vacas, lo que supone un freno evidente a la rentabilidad del rebaño.

Las concentraciones hormonales han sido un principio de estudio de la secreción ovárica después de la fecundación (Chaffaux *et al.*, 1982).

La evaluación de la concentración de progesterona en sangre o leche es un método precoz. Tiene el inconveniente de que se debe de determinar en un periodo muy preciso después de la inseminación (requiere el conocimiento exacto de la fecha de inseminación), del animal ya que ha de realizarse necesariamente entre los días 20 a 24 después de esta fecha (Hanzen *et al.*, 1991; Mialot *et al.*, 1991; Hanzen *et al.*, 1993).

Ecografía

Esta determinación se puede realizar el día 19 después de la inseminación con el fin de descubrir un posible retorno al celo. Sin embargo, haciéndolo así no se puede conseguir la misma exactitud en todos los animales, y llevar a cabo este análisis a todos los animales resulta inviable económicamente. Realizar este análisis entre los días 21 y 24 de gestación se debe de reservar para los animales en los que se busque una mortalidad embrionaria tardía (Hanzen *et al.*, 1991; Mialot *et al.*, 1991).

Muchos autores han observado que vacas que han sido diagnosticadas como positivas, estimando los niveles de progesterona plasmática sobre el día 23 posinseminación artificial, no tienen ya su feto cuando se realiza el diagnóstico de gestación por palpación rectal entre los días 60 y 90. Cuando la mortalidad embrionaria se produce hacia el día 16 o posteriormente, la fase luteal se prolonga, induciendo a errores de falsos positivos (Chaffaux *et al.*, 1986).

Humblot en 1981 (citado por Chaffaux *et al.*, 1982), comparando la concentración de progesterona a diferentes fechas de gestación, en las vacas que no retornan al celo, observó una incidencia elevada de la mortalidad embrionaria en el momento de la implantación.

Otro hecho que puede ser observado en el caso de realizar diagnósticos de gestación, midiendo únicamente las concentraciones de progesterona, es que se pueden diagnosticar como no gestantes a los 23 días posinseminación artificial debido a bajos niveles de progesterona, o como dudosas por tener concentraciones límites, pero se pueden tener imágenes ecográficas claras de gestación (lo que no quita que en una posterior confirmación a los 60 días se observe que han perdido el embrión). Esto sugiere que la causa de esta mortalidad embrionaria podría ser un fallo o una deficiencia en la producción de progesterona.

Este método es mejor para el diagnóstico de los animales no gestantes que los gestantes, porque la exactitud de los resultados negativos (94 a 100%) es superior a la de los positivos (77 a 88%) (Shemesh *et al.*, 1978; Zaied *et al.*, 1979; Foote *et al.*, 1979; Laing *et al.*, 1979; Pennington *et al.*, 1985; Laitinen *et al.*, 1985; Hanzen *et al.*, 1991; 1993).

2. Proteínas de gestación.

Más recientemente, la identificación y la puesta a punto de un sistema radioinmunológico de identificación de proteínas de gestación tales, como la PSPB (Pregnancy Specific Protein B) y la bPAG (bovine Pregnancy Associated Glycoprotein) ha hecho posible la aplicación de un diagnóstico precoz de gestación en la especie bovina. La bPAG permite la posibilidad de realizar un diagnóstico de gestación desde el día 35 después de la inseminación fecundante (Hanzen *et al.*, 1991; Zoli *et al.*, 1991).

3. Diagnóstico de gestación por palpación rectal.

La palpación rectal ha sido considerada como un buen método durante mucho tiempo. La habilidad del veterinario influye tanto en la precisión como en el daño que se causa al animal (al feto). Ya en 1948 Barret *et al.*, atribuyeron el 3% de las muertes fetales a daños en el alantoides durante la palpación rectal y Cassida *et al.* (1955) (citado por Hughes *et al.*, 1989), encontraron que las pérdidas podían elevarse hasta un 10%. Por lo tanto, la palpación

rectal entraña un cierto riesgo en la vida del feto mientras que el examen ecográfico no causa daño fetal.

4. *Diagnóstico de gestación por ecografía.*

Debido a la importancia que tiene económicamente un diagnóstico de gestación preciso en las granjas, se han desarrollado varias técnicas para este fin, siendo la ecografía modo-B de tiempo real, vía transabdominal, una de ellas. Esta técnica ha sido empleada en numerosas especies: gato, perro, oveja, cabra, cerda, yegua y vaca. En la vaca debido al tamaño de su cavidad abdominal es necesario la exploración transrectal, siendo posible en el vacuno la visualización del embrión a partir del primer mes de gestación. Como esta técnica permite detectar la presencia o ausencia del embrión bastante temprano, es posible también estimar los porcentajes de mortalidad embrionaria (Pierson *et al.*, 1987b).

El primer trabajo en el que se utiliza el ecógrafo para el diagnóstico de gestación en la vaca fue en 1982 por Chaffaux *et al.*, quienes utilizaron una sonda de 3,5 MHz y observaron estructuras no ecogénicas en la luz del útero a los 28 días posinseminación. El embrión propiamente se identificó dentro de la vesícula desde el día 35 en adelante. Posteriormente Pierson *et al.* (1984), aportaron que es posible reconocer la presencia de un embrión dentro del útero entre los días 12 y 14 posinseminación.

La determinación de la gestación en vacuno se ha realizado tan pronto como a los 12 días en un ambiente controlado, y hacia el día 25 bajo condiciones de campo. Esta determinación es mucho más temprana que lo que es posible con la palpación rectal del feto y/o de las membranas (Jones *et al.*, 1990; Bellenda, 2003).

Este diagnóstico debe ser sencillo y rápido, para no generar mucha manipulación sobre los cuernos, que en algunos casos puede ser una causa más de la propia pérdida embrionaria precoz (estimada entre el 5 y el 15%). Se dice que el examen ecográfico transrectal entre los días 26 y 33, tiene una sensibilidad del 97% y una especificidad del 87% (Bellenda, 2003).

El diagnóstico de gestación positivo se basa en la presencia de una zona con fluido de tamaño variable en la luz del cuerno uterino. La visualización del feto (según la fecha de exploración) es una confirmación adicional. Si se observa claramente fluido en el útero con un CL palpable (también visible ecográficamente), el diagnóstico de gestación es fiable. Si se observa fluido en el útero sin que exista un CL, la vaca probablemente estará próxima al celo (Pieterse *et al.*, 1990b; Taverne, 1991; Pieterse, 1999).

El tiempo que requiere la exploración ecográfica para el diagnóstico de gestación disminuye a medida que avanza la gestación. Obtener un diagnóstico de gestación antes del día 35 requiere una exploración sistemática de cada cuerno uterino y un tiempo considerable, mientras que a partir del día 35 sólo se necesitan unos segundos para confirmar la gestación (Hanzen *et al.*, 1987).

La cuestión es si el uso de la ecografía hará posible un diagnóstico de gestación más precoz y exacto, ya que al realizar diagnósticos tempranos los falsos negativos no se pueden evitar (Taverne, 1991). Un diagnóstico falso negativo es más probable cuando el útero está localizado delante del borde anterior de la pelvis que cuando está en la cavidad pélvica (Szenci *et al.*, 1993; Pieterse, 1999; Fricke, 2004).

Ecografía

Los diagnósticos dudosos se observan antes de los cuarenta días de gestación en:

- Vacas viejas (más de cuatro lactaciones), con largos cuernos uterinos.
- Vacas con el recto contraído.
- Vacas en las que hay en el útero moco o contenido purulento.
- Vacas con una vesícula embrionaria pequeña (Chaffaux *et al.*, 1986).

Los falsos positivos nunca podrán ser evitados y la especificidad nunca será del 100% (Taverne, 1991).

Muchos trabajos han dejado constancia de la precisión de este método aplicado al diagnóstico de gestación de la especie bovina (Chaffaux *et al.*, 1986; Hanzen *et al.*, 1987; 1991; Wilson *et al.*, 1988).

El momento de la primera detección del embrión está influenciado por el tipo de sonda utilizada. Así mismo, existen una serie de factores que también influyen de forma importante en el logro de este diagnóstico y en su nivel de precisión, tal como: el número de partos del animal, el número de días que han pasado tras la inseminación, la frecuencia de las exploraciones que se realicen, la disposición de los cuernos uterinos, la experiencia del operador... (Badtram *et al.*, 1991; Rajamahendran *et al.*, 1994).

La ecografía no es una técnica que sustituye el control de la gestación por palpación rectal, que con experiencia es confiable, rápido y económico, pero sí es una ayuda valiosa, particularmente para casos dudosos, casos de urgencia, animales de alto valor y en vacas repetidoras (Tamayo, 2000).

A. Factores que afectan al diagnóstico de gestación por ecografía.

Entre los factores que pueden influir en el diagnóstico precoz de gestación por ecografía debemos recordar (Gnemmi, 2004):

- ❑ Posición del útero.
- ❑ N° de parto de la vaca.
- ❑ Temperamento de la hembra.
- ❑ Calidad del transductor utilizado.
- ❑ Luminosidad del ambiente.
- ❑ Experiencia del veterinario.

Además de variar según el operador y su experiencia, podemos observar en la Tabla n° 5 la importancia que tiene el tipo de sonda utilizada, el número de exploraciones y el momento en el que se realiza el examen tras la inseminación artificial.

		1	2	3	4	5	6
<i>Estado (Días)</i>		21-70	21-60	24-81	26-70	16-31	10-24
<i>Sonda (MHz)</i>		3,0	3,5	5,0	5,0	5,0	5,0
<i>Ecografía</i>	<i>Palpación</i>						
(+)	(+) (a)	129	166	222	1252	80	92
(+)	(-) (b)	3	9	14	126	35	12
(-)	(-) (c)	62	102	61	349	107	65
(-)	(+) (d)	7	32	61	349	107	65
<i>Número de exámenes</i>		201	309	304	1766	299	217
<i>Número de animales</i>		201	100	304	1766	200	34
<i>Sensibilidad (%)</i>		95	84	97	97	51	65
<i>Especificidad (%)</i>		95	92	81	74	75	84
<i>Exactitud (+) (%)</i>		98	95	94	91	70	88
<i>Exactitud (-) (%)</i>		90	76	90	90	58	57
<i>Exactitud total (%)</i>		95	87	93	91	63	72

Tabla n° 5. Resultados comparados del diagnóstico de gestación por ecografía (Hanzen *et al.*, 1993).

c: número de DC(-) correctos (--)

a: número de DC(+) exactos (++)

(+): Diagnóstico de gestación positivo

(-): Diagnóstico de gestación negativo.

b: número de DG(+) falsos (+-).

d: número de DG(-) falsos (-+).

Los diagnósticos realizados con el ecógrafo están influidos, como hemos visto en la tabla anterior, por el momento en el que se realice la exploración con respecto al momento de la inseminación artificial. En la Tabla n° 6, podemos observar que la exactitud global del diagnóstico aumenta a medida que lo hace el intervalo inseminación-diagnóstico.

Ecografía

	<i>Intervalo entre IA DG por ecografía</i>				
	<i><30d</i>	<i>30-39d</i>	<i>40-49d</i>	<i>50-59d</i>	<i>60-70d</i>
<i>N° exámenes total (%)</i>	57(3)	722(41)	620(35)	312(18)	55(3)
<i>N° exámenes novillas (%)</i>	15(4)	175(45)	117(30)	65(17)	14(4)
<i>N° exámenes vacas (%)</i>	42(3)	547(40)	503(36)	247(18)	41(3)

<i>Ecografía</i>		<i>Palpación</i>				
<i>(+)</i>	<i>(+) (a)</i>	42	502	444	232	32
<i>(+)</i>	<i>(-) (b)</i>	6	63	39	17	1
<i>(-)</i>	<i>(-) (c)</i>	7	132	129	60	21
<i>(-)</i>	<i>(+) (d)</i>	2	25	8	3	1
<i>Sensibilidad (%)</i>		95	95	98	98	97
<i>Especificidad (%)</i>		54	67	77	77	95
<i>Exactitud (+) (%)</i>		88	89	92	93	97
<i>Exactitud (-) (%)</i>		78	84	94	95	95
<i>Exactitud total (%)</i>		86	88	93	94	96

Tabla n° 6. Influencia del estado de gestación en el diagnóstico por ecografía (Hanzen *et al.*, 1991).

(+): Diagnóstico de gestación positivo. (-): Diagnóstico de gestación negativo.
 a: número de DG(+) exactos (++) b: número de DG(+) falsos (+-).
 c: número de DG(-) correctos (--). d: número de DG(-) falsos (-+).

Cuando estos diagnósticos de gestación se realizan antes de los treinta y cinco días posinseminación artificial, baja la exactitud del diagnóstico, según el momento en el que se realice.

Además, podemos apreciar en la Tabla n° 7, que aunque se realicen con el mismo tipo de sonda, los resultados varían con respecto a la persona que realice las exploraciones.

		1	2	3	4
<i>Estado (Días)</i>		<30	<30	16-31	10-24
<i>Sonda (MHz)</i>		5,0	5,0	5,0	5,0
<i>Ecografía</i>	<i>Palpación</i>				
(+)	(+) (a)	12	42	80	92
(+)	(-) (b)	5	6	35	12
(-)	(-) (c)	3	7	107	65
(-)	(+) (d)	1	2	77	48
<i>Número exámenes</i>		21	57	299	217
<i>Sensibilidad (%)</i>		92	95	51	65
<i>Especificidad (%)</i>		38	54	75	84
<i>Exactitud (+) (%)</i>		71	88	70	88
<i>Exactitud (-) (%)</i>		75	78	58	80
<i>Exactitud total (%)</i>		71	86	63	72

Tabla n° 7. Resultados del diagnóstico de gestación por ecografía antes de los 35 días (Hanzen *et al.*, 1993).

(+): Diagnóstico de gestación positivo.

a: número de DG(+) exactos (++)

c: número de DG(-) correctos (--)

(-): Diagnóstico de gestación negativo.

b: número de DG(+) falsos (+-)

d: número de DG(-) falsos (-+)

Cuando observamos lo que ocurre al realizar el diagnóstico después de los treinta y cinco días posinseminación, los resultados varían sensiblemente.

Podemos apreciar en la Tabla n° 8 como los valores de la sensibilidad, especificidad y exactitud (tanto de los diagnósticos positivos, negativos y total), se incrementan cuando avanzamos en el tiempo a la hora de realizar los diagnósticos de gestación.

Ecografía

		1	2	2	2
<i>Estado (Días)</i>		40-49	40-49	50-59	60-70
<i>Sonda (MHz)</i>		5,0	5,0	5,0	5,0
<i>Ecografía Palpación</i>					
(+)	(+) (a)	73	444	232	32
(+)	(-) (b)	2	39	17	1
(-)	(-) (c)	17	129	60	21
(-)	(+) (d)	1	8	3	1
<i>Número de examen</i>		93	620	312	55
<i>Sensibilidad (%)</i>		98	98	98	97
<i>Especificidad (%)</i>		89	77	77	95
<i>Exactitud(%) (+)</i>		97	92	93	97
<i>Exactitud (-) (%)</i>		94	94	95	95
<i>Exactitud total (%)</i>		97	93	94	96

Tabla n° 8. Resultados comparados del diagnóstico de gestación por ecografía después del día 35 de gestación (Hanzen *et al.*, 1993).

(+): Diagnóstico de gestación positivo. (-): Diagnóstico de gestación negativo.
 a: número de DG(+) exactos (++). b: número de DG(+) falsos (+-).
 c: número de DG(-) correctos (--). d: número de DG(-) falsos (-+).

Otro factor que hay que tener en cuenta a la hora de realizar estos diagnósticos de gestación por ecografía es la edad del animal. Ésta influirá en el número de partos que ha tenido el animal. Un estudio de este hecho lo tenemos reflejado en la Tabla n° 9 donde se puede seguir la variación de la especificidad, sensibilidad y exactitud según el número de lactaciones del animal.

			N° DE LACTACIONES							
			0	1	2	3	4	5	>5	TOT
<i>Ecografía</i>	<i>Palpación</i>									
(+)	(+)	(a)	299	372	297	174	55	33	22	1252
(+)	(-)	(b)	24	38	31	20	7	3	3	126
(-)	(-)	(c)	56	117	95	51	10	7	13	349
(-)	(+)	(d)	7	14	11	4	2	1	0	39
<i>Número total</i>			386	541	434	249	74	44	38	1766
<i>%</i>			22	31	24	14	4	3	2	100
<i>Intervalo (+) (días)</i>			41	42	43	41	42	44	40	41
<i>Intervalo (-) (días)</i>			44	42	43	42	42	42	42	43
<i>Sensibilidad (%)</i>			98	96	96	98	97	97	100	97
<i>Especificidad (%)</i>			70	75	75	72	59	70	81	74
<i>Exactitud (+) (%)</i>			93	91	91	90	89	92	88	91
<i>Exactitud (-) (%)</i>			89	89	90	93	83	88	88	90
<i>Exactitud total</i>			92	90	90	90	88	91	92	91

Tabla n° 9. Influencia del número de lactaciones en los resultados del diagnóstico de gestación (Hanzen *et al.*, 1991).

(+): Diagnóstico de gestación positivo. (-): Diagnóstico de gestación negativo.
 a: número de DG(+) exactos (++) . b: número de DG(+) falsos (+-).
 c: número de DG(-) correctos (--). d: número de DG(-) falsos (-+).

Como ya se ha indicado, a la hora de realizar las confirmaciones del diagnóstico se elige un método de referencia. En este caso ha sido la palpación rectal realizada un tiempo después de la ecografía.

Para Chaffaux *et al.* (1986), la aplicación de los ultrasonidos al diagnóstico de gestación bovino nos proporciona un 100% de resultados reales positivos a partir del día 45 y reales negativos a partir del día 50. Boyd *et al.*, (1990), examinan entre los días 14 y 17 tras la inseminación artificial y encuentran un diagnóstico correcto en un 33% de los casos en el día 16 y superior al 33% a partir del día 17, alcanzando el 100% el día 20. Coincide con Kastelic *et al.*, (1990), que no concede al diagnóstico una seguridad mayor del 50% antes de los 16 días.

Una revisión de diferentes publicaciones sobre el diagnóstico de gestación (Taverne *et al.*, 1985; Chaffaux *et al.*, 1986; Hanzen *et al.*, 1987; 1991; Kastelic *et al.*, 1989b; Badtram *et al.*, 1991), como demuestran los resultados reflejados en la Tabla n° 7, permite concluir que este método es más apto para detectar animales gestantes (sensibilidad: 91%: 51 a 97) que los no gestantes (especificidad: 55%: 74 a 95).

Ecografía

B. Confirmación del diagnóstico.

Por estudios realizados por Quito *et al.* (1986) (citado por Griffin *et al.*, 1992), se demuestra que el examen ecográfico en gestaciones tempranas en la vaca no tiene ningún efecto sobre la gestación.

El diagnóstico ecográfico entraña menos riesgos sobre la viabilidad del embrión que la palpación a los 35-50 días posinseminación artificial (Hanzen *et al.*, 1987).

En el caso de las novillas, el diagnóstico precoz se puede confundir con la presencia de fluido intrauterino, por lo que hay que poner especial cuidado en estas exploraciones (Kastelic *et al.*, 1989b).

En el trabajo descrito por Rajamahendran *et al.*, (1994), se exploraron ecográficamente todos los días ocho novillas desde el celo que se inseminaba hasta cincuenta días después. Se utilizó una sonda de 5 MHz y el hallazgo más significativo fue que era posible detectar la pérdida embrionaria en novillas tan pronto como a los 20 días posinseminación artificial. Curran *et al.* (1986a, 1986b) describieron el desarrollo del embrión bovino desde el día diez hasta el día sesenta. La vesícula embrionaria se detectaba por primera vez como media a los $11,7 \pm 0,4$ días y el embrión era visible a los $20,3 \pm 0,3$ días.

El examen del útero bovino, para determinar las gestaciones y las no gestaciones antes del día 30, utilizando un ecógrafo de tiempo real con una sonda de 5 MHz, no parece ser un método altamente preciso bajo condiciones de campo (Badtram *et al.*, 1991; Pieterse, 1999). Si se llegase a realizar, lo más conveniente sería a partir del día 25 de gestación en novillas y del día 28 en vacas (Bo *et al.*, 2000).

Lo que se busca es el animal no gestante, por lo que es cuestionable intentar diagnosticar antes de los 30 días debido al alto nivel de muertes embrionarias antes de este momento, al mayor tiempo empleado para la exploración y al alto número que deben ser revisadas. Por motivos prácticos el veterinario clínico, en el trabajo diario, puede rápidamente adquirir seguridad en el diagnóstico de gestaciones a partir de 30 días. Se puede hacer un diagnóstico rápido en ese momento por exploración rutinaria sin manipulación uterina, ni originar daños, y permite el tratamiento de las vacas vacías (De la Riera, 2004).

Aún así, diversos autores han conseguido buenos resultados (realizando un diagnóstico de gestación entre los días 21 y 30) utilizando sondas de 3 y 5 MHz (Chaffaux *et al.*, 1982; Pierson *et al.*, 1984; Kahn, 1986; Fissore *et al.*, 1986b; Hanzen *et al.*, 1987; Boyd *et al.*, 1990).

Se realiza la confirmación de las gestaciones por la observación del propio embrión, del latido cardiaco o de las membranas fetales (Kastelic *et al.*, 1990b).

En los trabajos realizados por Chaffaux *et al.*, las imágenes más precoces de vesículas embrionarias, se obtienen con precisión el día 28 utilizando un ecógrafo portátil VÉTOSCAN, equipado con una sonda de 3,5 MHz, especial para su introducción en la ampolla rectal de las grandes hembras domésticas. A los 28 días

después de la inseminación artificial (es decir sobre el día 27 después de la fecundación), se distingue, de forma constante en la luz uterina una vesícula embrionaria. Se trata de una estructura anecogénica de forma oblongada o circular, donde su diámetro vertical es como media de 20 mm (Chaffaux *et al.*, 1982; 1988).

En un trabajo realizado por Hanzen *et al.*, en 1987, confirmaron las gestaciones con la presencia de las cavidades amniótica y/o alantoidea. El observar el feto o el embrión, lo que no se buscaba sistemáticamente en este trabajo, proporcionaba una confirmación adicional del resultado positivo. Cuando no se encontraba ninguno de estos signos, se desechara la idea de la gestación y la vaca se daba como negativa. Todos los diagnósticos ecográficos de gestación eran posteriormente confirmados por palpación rectal.

En el trabajo de Wilson *et al.*, en 1988, estudiaron 74 y 145 vacas (a los 25 y 29 días posinseminación), buscando la presencia de la vesícula embrionaria o del embrión. Los intentos para detectar la vesícula embrionaria antes del día 25 son variables e inconsistentes. Se examinaron ambos cuernos uterinos y ambos ovarios. El examen requiere aproximadamente un minuto, de todas formas es imperativo que el cuerno uterino ipsilateral al CL, sea examinado en toda su longitud porque la vesícula embrionaria puede encontrarse cerca de la unión útero-tubal el día 25.

En el trabajo realizado por Fissore *et al.*, en 1986b, el embrión se detectó por primera vez el día 27 posinseminación artificial, apareciendo como una estructura ecogénica (blanca) en los fluidos no ecogénicos de gestación. La vesícula amniótica se veía claramente el día 32, viéndose el embrión ecogénico dentro del amnios. El latido cardiaco se apreció el día 35.

Otros autores como Pierre, 1997; Bo *et al.*, 2000; Tamayo, 2000; Gnemmi, 2004; De la Riera, 2004, afirman que a partir del día 20 ya se aprecia el latido cardiaco, siendo este de unos 188 latidos por minuto. A partir del día 26 el latido cardiaco sería de unos 145 latidos por minuto, manteniéndose constante hasta el día 60.

La visualización de la vesícula embrionaria sólo es posible a partir del día 25 de gestación. Por ello, entre los días 25 y 33 el diagnóstico se realiza por la presencia de una zona de fluido sin eco de tamaño variable, en el centro de la estructura ecogénica uterina. En este periodo sólo se puede observar ocasionalmente el embrión.

Esto coincide con los resultados obtenidos por numerosos autores, pero es un periodo de tiempo considerablemente más largo que lo obtenido por Pierson *et al.* (1984), quienes utilizando una sonda de 5MHz visualizan la vesícula embrionaria a los 13 días de gestación (Hanzen *et al.*, 1987).

En los primeros estadios se utiliza la presencia de la vesícula amniótica para determinar la gestación, y al igual que ocurre con el diagnóstico de palpación rectal, la edad influye en la precisión. A las cuatro semanas, la precisión en los animales de dos años fue del 100%, pero disminuía con la edad, y en el grupo de más edad no se diagnosticó ningún animal. A las cinco semanas la gestación se diagnosticó con el 100% de precisión en todos los grupos, excepto en el de las más viejas, donde se diagnosticaba la gestación a las seis semanas. La correlación entre la edad de la vaca y la precisión del diagnóstico de gestación en todos los grupos fue alta y negativa ($r = -$

Ecografía

0,97), cuando se calculaba a partir de los datos que se obtuvieron a las cuatro, cinco y seis semanas (Hughes *et al.*, 1989).

En 1987 Hanzen *et al.*, describen la gran utilidad del ecógrafo para diagnósticos de gestación bajo condiciones de campo. Utilizaron una sonda de 3,5 MHz para escanear 320 vacas y novillas. La gestación se diagnosticó incluso a los 25 días posinseminación y el embrión era visible el día 30. Las observaciones ecográficas se diagnosticaban posteriormente a los sesenta días por palpación rectal. La precisión del diagnóstico positivo era del 94% cuando se exploraban los animales a los 41 días posinseminación artificial (Rajamahendran *et al.*, 1994).

Por lo tanto, este diagnóstico de gestación a los 30 días es satisfactorio bajo condiciones de campo, e incluso si este diagnóstico no corre excesiva prisa, sería bueno retrasarlo 5 días más, para minimizar el riesgo de posibles traumas en el feto, sobretodo si el operador no tiene una gran experiencia con el ecógrafo (Rajamahendran *et al.*, 1994).

Para un buen diagnóstico de gestación es necesario haber visto dilatación del cuerno uterino con líquido limpio, membranas fetales, embrión y latido cardiaco. Si se ven todos estos signos podemos decir con un 100% de probabilidad que el animal está gestante. Para esto, se introduce la sonda por vía transrectal sobre el útero y se exploran ambos cuernos en toda su longitud desde arriba; a continuación es recomendable colocar la sonda por ambos lados del útero enviando los ultrasonidos hacia el centro para asegurarnos que hemos visto los dos cuernos por completo. A lo largo de esta exploración localizaremos en las hembras gestantes una zona de la luz uterina dilatada y con líquido (se trata de la vesícula embrionaria), en este punto es donde debemos centrar nuestra atención para localizar el embrión y las membranas fetales (amnios). El embrión se verá como una mancha blanca en medio del líquido y las membranas aparecerán como una línea blanca que lo rodea; al principio esta línea puede ser discontinua pero a medida que avanza la gestación se puede ver por completo rodeando el embrión. Llegados a este punto centraremos la imagen sobre el embrión realizando movimientos muy lentos, hasta localizar el centro de la masa blanca, que representa una zona que alterna a intervalos regulares imágenes anecogénicas e hiperecogénicas (es el corazón latiendo). Hasta los 35 o incluso 40 días de gestación es posible ver imágenes del útero sin dilatación ni líquido por eso es importante la exploración completa de los cuernos, ya que una exploración incompleta puede llegar a darnos un diagnóstico erróneo (Quintela *et al.*, 2005).

C. Evolución de la imagen ecográfica durante la gestación.

Seis días después de la fecundación el blastocisto del bovino es esférico y su diámetro es de unos 0,2 mm. Este dato es comparable al de la yegua. El día 9, tras la ruptura de la membrana pelúcida, la vesícula embrionaria pierde la forma de globo y se elonga progresivamente. Mide unos 0,4 mm de largo y 0,25 mm de ancho, pero muy pronto, el crecimiento longitudinal se dispara. El día 13 tiene unos 10 mm de largo y su mayor anchura, a nivel del disco embrionario es solamente de 1,5 mm. En este momento, está situado en el extremo ovárico del cuerno. A los 15 días alcanza los 20 mm y luego 50 mm hacia el día 16. Ya ocupa los dos tercios de la longitud del cuerno uterino. Hacia el día 17 mide 150 mm de largo y su ancho no excede los 2 mm en la parte media que lleva el disco embrionario (Chafaux *et al.*, 1982).

Las investigaciones revelan imágenes de la dinámica embrionaria y fetal desde 3'5-4'0 mm alrededor del día 20 hasta 64'5-67'5 mm a los 2 meses de preñez. La morfología del embrión se transforma de una fina línea a una forma de herradura entre los días 20 a 25, pero luego se aprecia en forma de *e*le mayúscula (Tamayo, 2000).

♦ A los nueve días posinseminación se puede observar la vesícula embrionaria de 2 mm de diámetro en la luz uterina del cuerno ipsilateral al CL, utilizando una sonda de 7,5 MHz, y desde el día 12 (ovulación día cero) con una sonda de 5 MHz (Kastelic *et al.*, 1991).

Aparece como una zona anecogénica de 2 mm de altura y de 7 a 12 mm de longitud.

Es esférica en el 73% de las exploraciones y oval en el 27% de los casos.

En este momento no existe un grado de exactitud suficiente como para hacer esta exploración de forma rutinaria. Se debe tener mucho cuidado en estas gestaciones tempranas de explorar la totalidad de los cuernos ya que es muy fácil perder una gestación ocupando un área pequeña en la parte alta del cuerno (De la Riera, 2004).

El examen ecográfico en gestaciones tempranas, como ya hemos indicado anteriormente, no tiene ningún efecto negativo sobre la viabilidad embrionaria (Hanzen *et al.*, 1987; Griffin *et al.*, 1992).

♦ Hacia el día 17 esta vesícula ocupa totalmente el cuerno ipsilateral al CL.

♦ Entre el día 20 y 32 ocupa ya la totalidad del cuerno contralateral. La confirmación se realiza por la presencia de una zona de fluido sin eco, de tamaño variable en el centro de la estructura ecogénica uterina. En este periodo sólo se puede observar ocasionalmente el embrión (Hanzen *et al.*, 1987; Quintela *et al.*, 2005).

♦ El día 30 de gestación hay mayor cantidad de fluido y se puede ver el latido cardiaco. Un CL en el ovario ipsilateral ayuda a confirmar esta gestación (Brad, 1994; Quintela *et al.*, 2005).

♦ La membrana del saco amniótico se puede ver a partir de los 30 días, aparece como una línea hiperecogénica que circunda al embrión, su diámetro es de aproximadamente 10 mm. Si se logra una buena imagen, se pueden identificar los brotes de los miembros anteriores y posteriores (De la Riera, 2004; Quintela *et al.*, 2005).

♦ A partir del día 35 tras la inseminación, el diagnóstico es más fácil. Es incluso posible visualizar el embrión en el seno de la vesícula. El diámetro de la cavidad extra-embriónica aumenta progresivamente, alcanzando en este momento un diámetro de unos 30 mm (Chaffaux *et al.*, 1982; 1988).

Ecografía

El aspecto de “agujero negro” se ve todo a lo largo y a veces se extiende al cuerpo uterino y al otro cuerno. La longitud craneo-pelvis del feto es ahora de 15 mm. El latido cardiaco, los brotes de los miembros y la forma de L del embrión se ven fácilmente. A veces se pueden visualizar pequeños placentomas en la región del embrión, de unos 5 mm de largo y 2 mm de alto. El diámetro del amnios es aproximadamente de 18 mm (De la Riera, 2004; Quintela *et al.*, 2005).

♦ Los primeros cotiledones se ven claramente hacia el día 45 (Chaffaux *et al.*, 1982; 1988).

La imagen de los cotiledones puede ser de ayuda en la determinación de la edad de la gestación avanzada. Algunas gestaciones son muy difíciles de diagnosticar por el engrasamiento o la profundidad de la vaca. Algunas veces es imposible hacerlo manualmente y la ecografía puede ser de ayuda. En la mayoría de estos casos se pueden visualizar los cotiledones en el extremo final de la sonda y podemos valorar la edad de la gestación por el tamaño medio de estos cotiledones. El feto no se puede visualizar, pero es posible predecir la salud de este feto por el aspecto de estos cotiledones y el líquido alantoideo, así como por la corriente de sangre arterial uterina que bombea en el extremo del cotiledón.

Los cotiledones no son un método preciso para valorar la edad de la gestación pero un ojo experimentado puede confirmar la gestación y hacer una buena estimación del tiempo de preñez con una sonda lineal (De la Riera, 2004).

♦ Durante la 6ª y 7ª semana de gestación se puede observar un rápido desarrollo de la cavidad amniótica y alantoidea, lo que contribuye a dar un aspecto más vacuolado al útero. El embrión se visualiza como una estructura de 2-3 cm flotando libremente en el saco amniótico (Hanzen *et al.*, 1987; De la Riera, 2004).

El saco amniótico estadísticamente tiene 23 mm de largo por 15 mm de alto. El “agujero negro” se visualiza en la mayor parte del útero y el transductor ya lo capta fácilmente nada más entrar en el recto, permitiéndonos localizarlo para una exploración más detallada. La visualización de cortes transversales nos permite ver varias vueltas del útero al mismo tiempo (De la Riera, 2004).

♦ El día 50 la vesícula embrionaria tiene como media 42 mm de diámetro (Chaffaux *et al.*, 1982; 1988).

♦ El día 56, el embrión tiene una longitud aproximada de 53 mm. Las mediciones pierden exactitud y la fiabilidad por las diferencias naturales entre embriones y los movimientos fetales comienzan a detectarse a los 45 días. En esta fase se empiezan a visualizar las costillas. Al comenzar la calcificación también otros huesos comienzan a hacerse ecogénicos. El amnios es ahora aproximadamente de 54 mm de largo por 30 mm de alto. El “agujero negro” se ve muy fácilmente y el diagnóstico de gestación es muy rápido (De la Riera, 2004; Quintela *et al.*, 2005)

♦ Después del día 70 de gestación, los fluidos aparecen negros, los huesos blancos y las membranas fetales y cotiledones muestran distintos grados de ecogenicidad (Fissore *et al.*, 1986b).

No es posible con el ecógrafo diagnosticar adecuadamente la gestación avanzada. El periodo real para un diagnóstico correcto, con un valor predictivo positivo del 95%, varía entre el día 20 y 42 posinseminación artificial. Basándonos en esto, la fecha real de un buen diagnóstico de gestación positivo bajo condiciones de campo, estaría en los 30 días posinseminación artificial. Incluso, aunque se diagnostique gestación temprana con el ecógrafo, es aconsejable observar al animal en las fechas próximas al celo y confirmar la gestación hacia el día 60 (ecográficamente o por una cuidadosa palpación rectal) (Rajamahendran *et al.*, 1994).

Aunque existen trabajos en los que se afirma que es posible realizar este diagnóstico de gestación entre los días 16 y 20 posinseminación artificial, hay que darse cuenta que estos estudios fueron realizados bajo condiciones de investigación, a menudo con numerosas exploraciones.

Pierson *et al.* (1986) observaron la presencia de una vesícula no ecogénica entre los días 12 y 14 posinseminación artificial. Curran *et al.* (1986a, b) detectaban la vesícula embrionaria temprana dentro del cuerno ipsilateral al CL como media a los 11,7 días posinseminación artificial, utilizando una sonda de 5 MHz. Sin embargo Boyd *et al* describen la detección de la vesícula el día 9 empleando una sonda de 7,5 MHz (Boyd *et al.*, 1990; Badtram *et al.*, 1991).

El nivel de precisión en el diagnóstico de gestación que se logra con la ecografía varía ampliamente y puede depender de múltiples factores. A esta variabilidad contribuyen el tipo de equipo utilizado, la frecuencia de la sonda, la frecuencia de las exploraciones que se realicen, la edad del animal, el número de días posinseminación al que se explore, la experiencia del observador...

Esta vesícula embrionaria, entre los días 12 y 20 posinseminación tiene un diámetro más o menos constante, entre 2-4 mm.

En el trabajo de Boyd *et al.* 1990, el diagnóstico de gestación se basó en la detección de la vesícula embrionaria dentro del cuerno uterino. Primero se reconoció una discreta área no ecogénica de aproximadamente 1,75 mm de altura, generalmente redondeada pero no simétrica dentro de la luz del cuerno ipsilateral, hacia el día nueve posinseminación. Esta estructura se va alargando a través del cuerno y aparece dentro de la luz del cuerno contralateral hacia el día 14. Hacia el día 18, se extiende por todo el cuerno contralateral y entre los días 18 y 20 se expande en un área localizada, dentro del cuerno ipsilateral.

El día 28 posinseminación artificial, se distingue de forma constante en la luz uterina una vesícula embrionaria. Se tratará de una estructura anecogénica de forma oblongada o circular, que tiene como media un diámetro mayor vertical de unos 20 mm. Debe de estar en la luz uterina. Pero además, estas estructuras anecógenas deben, para ser realmente vesículas embrionarias, tener las dimensiones que les correspondan respecto a la fecha de inseminación artificial (Chaffaux *et al.*, 1982; 1988).

En el trabajo realizado por Fissore *et al.* 1986b, el fluido asociado con la gestación se detectó en la luz del útero después del día 22, viéndose como áreas oscuras en la pantalla, pero no se extendían a lo largo de todo el cuerno. Sólo por ecografía, es difícil distinguir el fluido de una gestación temprana del fluido que se

Ecografía

observa durante el estro, aunque existen diferencias importantes. Por palpación rectal del útero, el tono es blando durante la gestación en comparación con la turgencia durante el estro.

En la vaca la calidad de la imagen del útero es satisfactoria. No obstante, es un poco peor que la que se obtiene en el caso de la yegua debido al contacto mediocre que se produce entre la sonda y la mucosa rectal, debido a que no se puede hacer un vaciado perfecto de la ampolla rectal (Chaffaux *et al.*, 1988).

Se deben de tomar medidas de las vesículas embrionarias para relacionarlas con la edad del embrión (Chaffaux *et al.*, 1982).

Como orientación, en las siguientes tablas se muestra el tamaño de la vesícula embrionaria y la relación con la edad y la longitud del embrión en el ganado vacuno:

<i>Largo (mm)</i>	<i>Ancho(mm)</i>	<i>Días</i>
0,4	0,25	9
10	1,5	13
20		15
50		16
150	< 2	17

Tabla n° 10. Tamaño de la vesícula embrionaria y edad estimada del embrión.

También el poder medir las dimensiones del embrión, puede resultarnos orientativo, como apreciamos en la Tabla n° 11.

<i>Edad (semanas)</i>	<i>n</i>	<i>Media (cm)</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
4	25	0,89	0,6	1,1
5	35	1,28	0,8	1,9
6	50	2,02	1,6	2,6
7	47	2,77	2,3	3,6
8	41	4,55	3,6	5,2
9	48	8,74	6,1	10,1
10	39	10,65	9,5	11,8
11	39	10,65	9,05	11,8
12	32	12,18	10,7	13,7

Tabla n° 11. Relación edad del embrión y longitud (Huges *et al.*, 1989).

D. Diagnóstico de gestación gemelar.

Los gemelos son un producto inevitable en la reproducción en ganado de leche y es un factor indeseable en la granja porque reduce la rentabilidad y la eficiencia reproductiva. La incidencia de gemelos en el ganado de leche varía de 2'5 a 5'8% y es afectada por el número de lactaciones, con un rango del 1% en la primera lactación hasta cerca del 10% en lactaciones posteriores.

El efecto de la paridad en la incidencia de gemelos no está muy claro, pero puede ser explicado por un aumento en la capacidad de las vacas viejas de mantener los gemelos durante toda la gestación, un incremento en el porcentaje de doble ovulación, o una interacción entre ambas. Se ha observado un aumento en la capacidad uterina de las vacas que paren gemelos. Además, la incidencia de doble ovulación en vacas lecheras en producción está alrededor del 14%. Y al igual que la incidencia de gemelos, se incrementa con el número de lactaciones.

Las vacas que tienen partos gemelares pueden ser identificadas con precisión por medio del ultrasonido transrectal en el intervalo de 35/40 y 55/60 días post IA. Cuando se hace un examen de gestación gemelar, la totalidad de ambos cuernos debe ser cuidadosamente examinada para verificar que un embrión no ha sido pasado por alto. Debido a que la mayoría de gestaciones gemelares en ganado de leche ocurre debido a la doble ovulación, la presencia de dos o más CLs al momento del diagnóstico es un excelente indicativo de vacas con gestaciones gemelares. En general, indicativos ováricos como el número y tamaño de los CLs pueden mejorar el diagnóstico de gestación y de gemelación. Más del 50% de las gestaciones gemelares son unilaterales y por doble ovulación. Sólo el 10% de los nacimientos dobles son gemelos univitelinos.

Varios escenarios de manejo pueden ser considerados tras la identificación de una vaca con gestación gemelar. El manejo de la vaca puede ser evitado con la venta de la misma (descarte) o con la interrupción de la preñez, con la administración de un agente abortivo como PGF_{2α}. Lo adecuado sería no inducir el aborto en gestaciones gemelares con la intención de volver a cubrir la vaca. Primero, la duración estimada de la lactación de una vaca sometida a un aborto y cubierta de nuevo llegaría a los 500 días (≈18'5 meses de intervalo entre partos). Segundo, el riesgo de una preñez gemelar durante la siguiente gestación se incrementa.

En gestaciones gemelares de menos de 35 días, que es cuando tiene lugar la anastomosis entre las dos placentas, puede morir un embrión y continuar gestando el otro normalmente. Después de los 35 días esto ya no es posible y si uno muere lo hace también el otro debido a la unión de las dos placentas que ecográficamente nos dan un área placentaria más engrosada (“línea de gemelos”).

Las pérdidas de gestaciones gemelares es el doble que en las individuales, siendo en las unilaterales ligeramente superior que en las bilaterales (De la Riera, 2004).

Ecografía

5. Comparación de los diferentes métodos de diagnóstico de gestación.

En la siguiente tabla, podemos ver un esquema con las principales características de los distintos métodos de diagnóstico de gestación que podemos emplear. Se incluye las ventajas e inconvenientes que presentan.

Método	Detección	Exactitud	Observaciones	Retraso
Progesterona	21-24d	100% (+) 75/80% (-)	Precisa laboratorio Muestra: sangre, leche Prevalencia corta y precisa	De 2 a 5d Kit rápido
PSPB	>30d	90/98% (+) 100% (-)	Precisa laboratorio Muestra: sangre A los 100d posparto	De 3 a 7d
Estrógenos	>120d	96 a 100%	Precisa laboratorio Muestra: sangre o leche	De 3 a 7 d
Palpación rectal	30-45d	Variable (según el veterinario)	Método referencia Precocidad según operador	Ninguno
Ecografía	>30d	98-100% >d30	Inversión elevada	Ninguno

Tabla nº 12. Comparación de los diferentes métodos de diagnóstico de gestación en la vaca (Mialot *et al.*, 1991).

III.A.15.- Cuerpo Lúteo.

III.A.15.1.-Introducción

El ciclo estral clásicamente se divide en cuatro fases:

- Celo o periodo de receptividad sexual que se corresponde con el día cero del ciclo.
- Metaestro o periodo posovulatorio (días 1-4).
- Diestro (días 5-18) que se corresponde con la fase luteal.
- Proestro (días 18-20) justo antes del celo.

Sin embargo esta clasificación no es del todo apropiada en el caso de la vaca como ocurre en todas las especies. Es mejor describir el ciclo en base a la función ovárica considerando en este caso dos fases, la fase *folicular* y la fase *luteal*, con un comportamiento de celo durante la fase folicular.

La duración media del ciclo estral en la vaca es de 21 días, aunque existe una considerable variación en cuanto a este valor. La mayoría de los estudios muestran que entre el 60 y 70% de las vacas tienen un ciclo cuya duración varía entre los 17 y 25 días. Se ha sugerido, basándose en evidencias indirectas, que los ciclos son más regulares y uniformes en las novillas que en las vacas adultas (Peters *et al.*, 1987).

La ovulación se produce entre las 12 y 15 h tras el celo. A partir de este momento comienza la formación del CL.

El CL es una glándula endocrina temporal que produce principalmente progesterona para mantener la gestación. Es controlado por hormonas que aportan el soporte luteotrópico durante el ciclo estral y la gestación, y que inducen la luteolisis al final del ciclo.

La pared del folículo, formada por células de la granulosa y células de la teca interna, se vasculariza y luteiniza tras la ovulación para formar el CL. Esta glándula temporal productora de esteroides sufre marcados cambios estructurales y funcionales en un corto periodo de tiempo durante su desarrollo, vida funcional y regresión, lo cual ha sido objeto de extensivos estudios morfológicos (Milvae *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 1997).

Es una llave importante en numerosos procesos de la reproducción, tales como la ovulación, la duración del ciclo estral, el reconocimiento de la gestación y la supervivencia del embrión en los mamíferos.

El término "CL" literalmente significa cuerpo amarillo. En la vaca su color se debe a los elevados niveles de B-carotenos, un precursor de la vitamina A antioxidante. El CL de otras especies también se caracteriza por el elevado contenido de vitaminas antioxidantes (Milvae *et al.*, 1996).

El CL bovino ha sido utilizado como modelo en el estudio de la función luteal por diversas razones. Entre ellas se encuentra la cantidad de tejido que puede proporcionar, y la relativa facilidad con la que dicho tejido luteal puede ser obtenido por enucleación del CL

Ecografía

del ovario, a través de una incisión en la pared anterior vaginal bajo los efectos de anestesia epidural (Hansel *et al.*, 1996).

Como en muchas otras áreas de la biología, las investigaciones han estado influenciadas enormemente por la técnica disponible en un momento dado. Los primeros estudios se basaron principalmente en la histología y la anatomía del CL. Posteriormente, los estudios se centraron en análisis de la hipófisis y de la hormona ovárica. Esta fase de estudio se vio rápidamente superada por las técnicas de cultivo celular y tisular, y la utilización de anticuerpos monoclonales para estudiar el origen de las células luteales. Más recientemente, los avances en biología molecular, biotecnología e inmunología han sido los puntos a desarrollar. Sin embargo, para el veterinario clínico resulta fundamental en su práctica diaria el estudio ecográfico del ovario.

La ecografía ofrece la posibilidad de poder cuantificar, por una medida de superficie, el desarrollo del tejido luteal en el curso de un ciclo.

III.A.15.2.-Formación del Cuerpo Lúteo

Durante la ovulación, el ovocito y el líquido folicular que le rodea, salen hacia la zona fimbria del oviducto, creándose una cavidad. Tras la ovulación los restos del folículo se reorganizan en el CL bajo la influencia de la LH. El folículo contiene un lecho avascular de células de la granulosa rodeadas por una membrana basal, una capa de teca interna y una capa más exterior: la teca externa. Después de la ovulación se producen una serie de cambios estructurales: la membrana basal se rompe, la teca interna vascular y las células de la granulosa invaden la cavidad folicular. Las células de la granulosa y de la teca interna crecen y se dividen (se denominan células luteales, las cuales están provistas de numerosas vesículas de sangre), al mismo tiempo que proliferan nuevos vasos para proporcionar una red vascular al CL. El CL contiene dos tipos de células, las cuales se pueden diferenciar por su tamaño. En las vacas no gestantes, el diámetro de las pequeñas células luteales varía entre 10-20 μm (serán las que derivan de la teca interna del folículo). Las células mayores tienen un diámetro de 25-30 μm (Milvae *et al.*, 1996).

El flujo de sangre ovárico aumenta a medida que el CL crece. Los cambios en el riego sanguíneo al ovario que alberga un CL pueden atribuirse a los cambios vasculares de éste, el cual recibe la mayor parte del aporte sanguíneo que llega al ovario. Parece que el riego sanguíneo al CL tiene un papel importante en la regulación de esta glándula y de la actividad de las hormonas gonadotrópicas a nivel de la célula luteal. Una acción secundaria de la LH puede consistir en incrementar el riego sanguíneo del CL. La $\text{PGF}_{2\alpha}$ afecta a los componentes vasculares del CL (Hafez, 1996).

III.A.15.3.-Crecimiento del Cuerpo Lúteo

El crecimiento del CL joven es muy rápido. Su peso se incrementa sobre seis veces en la primera mitad del ciclo estral. Durante su desarrollo, hay cambios estructurales a nivel celular (Milvae *et al.*, 1996).

La anchura del CL aumenta todos los días más o menos 1 mm y su longitud unos 2 mm alcanzando su tamaño máximo de 20 mm, e incluso de 30 mm, aproximadamente a los 8-10 días (Kähn, 1994).

En un trabajo realizado por Assey *et al.*, en 1993, en la fase de desarrollo el diámetro del CL aumentaba a razón de 0,87 mm/día ($p < 0,001$) en las vacas y de 0,78 mm/día ($p < 0,001$) en las novillas (Assey *et al.*, 1993).

En animales no gestantes, el CL alcanza su tamaño máximo alrededor del día doce del ciclo (Pierson *et al.*, 1984).

III.A.15.4.-Funciones secretoras del Cuerpo Lúteo

El CL constituye principalmente un órgano secretor que produce progesterona y oxitocina. Dependiendo de las especies, también se pueden producir adicionalmente otras hormonas. En la vaca se ha evidenciado la producción de neurofisina y relaxina (Milvae *et al.*, 1996).

◆ PRODUCCIÓN DE PROGESTERONA.

La progesterona es esencial para el ciclo normal de la vaca, y es la principal hormona responsable del mantenimiento de la gestación tras la concepción. Ésta disminuye la descarga pulsátil de GnRH y por ello impide nuevas ovulaciones.

Rusbridge *et al.* (1991) afirmaron que el CL inducido por una inyección de GnRH durante el estro temprano, tiene una vida media más corta que el CL formado tras el celo natural. Las elevadas concentraciones de progesterona secretada por el CL inhiben la maduración de más folículos actuando sobre el hipotálamo y la hipófisis anterior (Harvey *et al.*, 1994).

Los progestágenos son necesarios para mantener la gestación. Actúan en parte alterando la permeabilidad iónica a través de la membrana de la célula muscular del miometrio, dando como resultado el aumento en el potencial de descanso de la membrana, y disminuyendo la conducción celular y la excitabilidad. Algunos progestágenos sirven como precursores inmediatos de otros esteroides que también son necesarios durante la gestación (Hafez, 1996).

Además, la progesterona prepara el endometrio para la nidación del embrión en desarrollo, e inhibe las contracciones incontroladas de la pared uterina. Si el ovocito, que es liberado del folículo durante la ovulación, no es fecundado, el animal no recibirá señal de gestación del embrión. Alrededor del día 16 después de la ovulación, el endometrio del útero no gestante liberará $\text{PGF}_{2\alpha}$. La $\text{PGF}_{2\alpha}$ es luteolítica, lo que significa que inicia la regresión del CL. No se ha aclarado totalmente el mecanismo por el que las prostaglandinas producen luteolisis, pero incluye una reducción del aporte sanguíneo al CL por vasoconstricción y un efecto directo de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre las células luteales.

Tal como afirman Howell *et al.* (1994), la concentración de progesterona basal tiene unos valores menores a 1 ng/ml. Las concentraciones plasmáticas se mantienen entre 6 y 10 ng/ml durante el diestro, disminuye durante el proestro y permanece por debajo de 1ng/ml desde aproximadamente tres días antes del celo hasta tres días después. Los niveles aumentan durante el metaestro paralelamente al desarrollo del CL (Kelton 1989). Es decir, la

Ecografía

concentración de progesterona comienza a elevarse hacia el día 4 del ciclo, se llega al pico de concentración el día 8 y continúa elevada hasta más o menos el día 17 del ciclo. Baja a niveles basales antes del próximo celo y ovulación (Sprecher *et al.*, 1989).

En un trabajo realizado por Ribadu *et al.* (1994a), la media (\pm error estándar) de la concentración de progesterona plasmática de 20 vacas con CLs de medio ciclo fue $6,13 \pm 0,67$ ng/ml. En las tres vacas con CLs en regresión la concentración fue de $0,22 \pm 0,11$ ng/ml y en las vacas sin CLs $0,10 \pm 0,02$ ng/ml.

Durante el desarrollo luteal la concentración de progesterona plasmática tenía los siguientes valores para vacas y novillas el día cero y siete (Assey *et al.*, 1993).

	Día 0	Día 7
Vaca	$3,0 \pm 0,6$ ng/ml	$11,4 \pm 2,6$ ng/ml
Novilla	$2,6 \pm 0,7$ ng/ml	$11,8 \pm 2,1$ ng/ml

Tabla n° 13. Concentraciones de progesterona plasmática en vacas y novillas.

La concentración de progesterona en la sangre desciende como consecuencia de la regresión del CL, y desaparece el bloqueo ejercido por la progesterona sobre la liberación de GnRH. Ello da lugar al inicio de una nueva fase folicular, y a que se ultime el desarrollo de un folículo preovulatorio. Al periodo en que tiene lugar la maduración folicular, el celo y la ovulación, que se caracteriza por la producción de estradiol, se le conoce como fase folicular del ciclo. La fase dominada por la progesterona, desde la ovulación hasta la luteolisis, se denomina fase luteal del ciclo.

◆ PRODUCCIÓN DE OXITOCINA.

Se cree que la oxitocina producida en el CL también juega un papel en la luteolisis. En 1982, Whates *et al.* (citado por Peters *et al.*, 1987), establecieron que la oxitocina se produce en el CL tanto de la oveja como de la vaca. Si bien es cierto que ya en 1960 Hansel *et al.* (citado por Peters *et al.*, 1987), habían establecido que la oxitocina exógena puede inducir la luteolisis del CL y, recientemente, se ha podido comprobar que la oxitocina puede tener un papel fisiológico en la luteolisis induciendo la liberación de la $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Esta capacidad secretora tendrá influencia en otros aspectos del CL, tal como en su vida media o en el cese de sus funciones reproductivas.

Se ha podido observar durante la pubertad y el posparto una vida media corta del CL de la vaca. Para este hecho se han propuesto cuatro causas:

- Hay una disminución de la inhibición de los receptores de la oxitocina en el endometrio, lo que puede provocar la luteolisis temprana causada por un aumento de la concentración de estrógenos y $\text{PGF}_{2\alpha}$.

- Mayor respuesta del CL a la $\text{PGF}_{2\alpha}$.
- Inadecuado desarrollo folicular previamente a la ovulación.
- Inadecuado soporte de gonadotropina para el CL (Lulai *et al.*, 1994)

En animales de edad avanzada las funciones del CL declinan a consecuencia de:

- La incapacidad de las células de la granulosa.
- Los estímulos en la cantidad o calidad de la secreción hormonal.
- Reducción del estímulo para la secreción hormonal (Hafez, 1996).

III.A.15.5.-Regresión del Cuerpo Lúteo

En ausencia de gestación, el CL sufre cambios morfológicos y funcionales. Este proceso, denominado *luteolisis*, se caracteriza por el cese de la producción de progesterona y una disminución de los componentes celulares, incluyendo la reducción del aporte sanguíneo (por engrosamiento de las paredes de las arterias del CL), proliferación del tejido conectivo, aumento de la desorganización celular, una disminución en la granulación citoplasmática, el exterior de la célula se vuelve redondo, vacuolización periférica de las células luteínicas grandes, degeneración y fagocitosis de las células luteales (Milvae *et al.*, 1996).

Conforme estas células degeneran, el órgano completo disminuye en tamaño, volviéndose de color blanco o café claro, y se le conoce como *corpus albicans* (cuyos residuos permanecen durante varios ciclos sucesivos). El CL cíclico se puede observar durante su fase de regresión hasta 1-3 días (como media) después de la ovulación siguiente.

La evidencia de un deterioro morfológico del CL se observa el día 14 del ciclo estral y el día 20 en el caso de existir gestación. En el caso del ganado lechero estos procesos de involución luteal, en ausencia de gestación, se retrasan un poco apareciendo el día 17 (observándose a nivel microscópico menores inclusiones mitocondriales, menos lípidos citoplasmáticos...) (Fields *et al.*, 1996).

Es posible que se produzca una luteolisis funcional precediendo a la regresión física del CL (Assey *et al.*, 1993).

A1 final del ciclo, la regresión luteal es más lenta que la caída de progesterona plasmática. La superficie luteal disminuye un 20% al día mientras que la concentración de progesterona lo hace a razón de un 28% al día (Hanzen *et al.*, 1992).

En un trabajo realizado por Assey *et al.* (1993), observaron que el diámetro del CL en la fase de regresión disminuía 0,26 mm ($p > 0,05$) en novillas y 0,47 mm ($p < 0,05$) en el caso de las vacas.

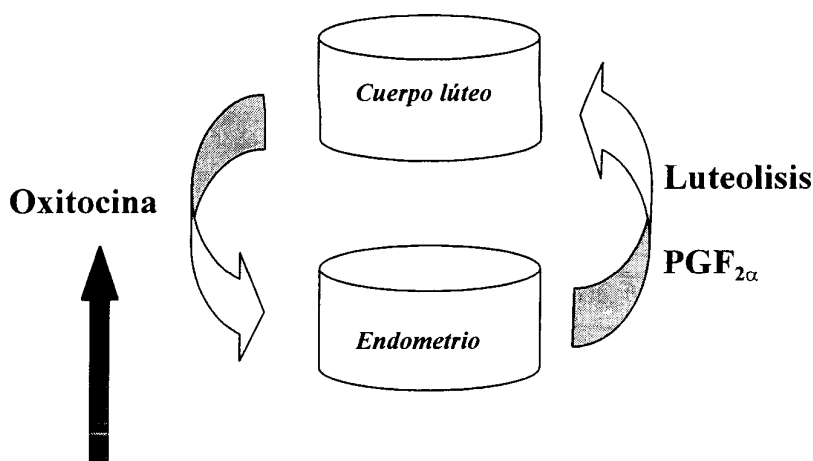
Ecografía

Al tener lugar la luteolisis se produce un nuevo folículo preovulatorio que comienza a madurar. Los folículos no ovulatorios durante la mitad y final del ciclo estral son necesarios para la regresión del CL en las vacas no gestantes (Thatcher *et al.*, 1989).

Se reconoce que en la vaca, como entre otras especies, una secreción endometrial causa la regresión del CL. Ya hace más de treinta años que Wiltbank *et al.* (1956) (citado por Peters *et al.*, 1987), comprobaron que realizando la histerectomía en el ganado vacuno se prolonga la fase luteal.

La mayor evidencia de que la $\text{PGF}_{2\alpha}$ es agente luteolítico se puede resumir como sigue:

- Es sintetizada en el endometrio.
- Existe una elevada concentración de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en la sangre venosa uterina en el momento de la regresión luteal.
- Si se realiza una inmunización contra la $\text{PGF}_{2\alpha}$ se produce la persistencia del CL.



Secreción bloqueada durante la gestación

Figura n° 21. Relación oxitocina - prostaglandina en la luteolisis.

III.A.15.6.-Peso del Cuerpo Lúteo

El aumento de peso del CL es inicialmente rápido. Por lo general, el periodo de crecimiento abarca hasta la mitad del ciclo estral (Hafez, 1996).

Tal como afirman Fields *et al.* (1996), un folículo preovulatorio pesa aproximadamente 200 mg, y tras la ovulación, crecerá en 11 días hasta 4 g en el caso del vacuno de carne, e incluso puede alcanzar mayor peso en el caso de las razas lecheras.

Como puede verse en esta tabla de Singh *et al.* (1997), la masa luteal aumenta durante el metaestro y el diestro temprano y medio con una disminución durante el proestro.

<i>Fase del ciclo</i>	<i>Masa luteal (g)</i>
Día 0 (ovulación)	
Día 3 (metaestro)	1,7 ± 0,2 g
Día 6 (diestro temprano)	3,9 ± 0,3 g
Día 8 al día 13 (diestro medio)	5,1 ± 0,5 g
Día 17 al día 21 (proestro)	3,1 ± 0,5 g

Tabla n° 14. Relación entre el día del ciclo estral y la masa luteal.

Ya en 1980 Lukaszewska *et al.*, comprobaron que el peso del CL era mayor en las hembras gestantes que en las vacías.

Según afirman Ribadu *et al.* (1994a), los CLs de medio ciclo pesan entre 2,17 y 8,86 g. En un estudio realizado por Deichert *et al.* (1988) y posteriormente revisado por Purwantara *et al.* (1993) con 87 CLs el peso medio de los mismos fue de 3,2 g.

En un trabajo realizado por Maciel *et al.* (1992) utilizando novillas superovuladas y no superovuladas, la media de peso de los CLs (3,72 g) en las novillas no superovuladas que se obtuvo, se encuentra dentro de los valores del peso del CL para el día siete que aporta la literatura.

En la vaca, el peso y el contenido de progesterona del CL aumentan rápidamente entre los días tres y doce del ciclo, y permanece relativamente constante hasta el día 16 en que la regresión comienza.

En la vaca se ha demostrado que existe un paralelismo entre la cantidad de tejido luteal y el aumento de la concentración de progesterona plasmática entre los días 2 y 8 del ciclo.

En 1980 Lukaszewska *et al.* encuentran una alta correlación ($r = 0,82$; $p < 0,001$) entre los pesos de los CLs y las concentraciones de progesterona en el plasma obtenido de la vena yugular en el momento de la regresión del CL.

El hecho más notable (como afirman Fields *et al.* en 1996), observado con respecto al peso de los CLs y los valores de progesterona, es la elevada variación asociada con los menores valores medios que hay en los CLs recién formados (día 3) y los CLs bajo regresión (día 19). Esta variación no se atribuye a diferencias en la duración del ciclo estral, sino más a diferencias individuales en el proceso de regresión.

En la siguiente tabla, aportada por Fields *et al.* (1996), se pueden observar los pesos de los CLs (g) ± error estándar y las concentraciones plasmáticas de progesterona (ng/ml) desde el día 3 al día 19 del ciclo.

Ecografía

Día	3	7	11	14	17	19
(n)	(15)	(23)	(16)	(20)	(19)	(14)
CL	0,64 ± 0,34	3,56 ± 0,28	4,08 ± 0,33	5,07 ± 0,30	4,03 ± 0,30	3,23 ± 0,36
P	1,11 ± 0,63	3,91 ± 0,65	5,08 ± 0,71	6,84 ± 0,61	5,05 ± 0,83	2,83 ± 0,68

Tabla n° 15. Peso del CL (CL: g) y concentración de progesterona plasmática (P: ng/ml) a lo largo del ciclo estral. En la tabla n: es el número de CLs estudiados.

III.A.15.7.-Diámetro del Cuerpo Lúteo

La mayoría de los investigadores están de acuerdo en considerar que un diámetro de CL de 2-3 cm se corresponde con un CL maduro y con las máximas concentraciones de progesterona. Este diámetro es mayor que aquel del folículo graafiano maduro del que procede (Sprecher *et al.*, 1989; Hafez, 1996).

El diámetro medio el día tres después del celo es de $22,0 \pm 5,4$ mm (Bungartz *et al.*, 1994). Este diámetro de un CL activo puede aumentar hasta incluso los 30 mm. Al final de la fase luteal (sobre el día 17 del ciclo), el CL comienza a disminuir su tamaño (Pieterse *et al.*, 1989; Bungartz *et al.*, 1994).

El diámetro máximo del CL fue menor ($19,9 \pm 2,0$ mm) para los ciclos de corta duración que para los ciclos de duración normal ($25,8 \pm 0,8$ mm; $p < 0,002$). En ambos tipos de ciclos se vieron CLs con y sin cavidad (Lean *et al.*, 1992; Evans *et al.*, 1994).

Jakowski *et al.* (1993) observaron el desarrollo del CL en nueve vacas durante el ciclo estral utilizando ultrasonografía lineal (sonda de 5 MHz). Los exámenes se realizaron el primer día del celo y luego los días 5, 12 y 18. El diámetro máximo del CL se observó el día 12.

Correlaciones del diámetro del Cuerpo Lúteo con otros parámetros.*A. Correlación diámetro-masa luteal.*

El diámetro luteal está altamente correlacionado con otros parámetros que podemos cuantificar, así en un trabajo realizado por Singh *et al.* (1997), el diámetro luteal estaba altamente correlacionado con la masa luteal ($r = 0,74$; $p < 0,05$).

B. Correlación diámetro-concentración de progesterona.

Ribadu *et al.* (1994a) encontraron una alta correlación entre el diámetro del CL y la concentración de progesterona plasmática ($r = 0,85-0,89$), con las mayores discrepancias entre el día 18 y 21. Por lo tanto, aunque se encontró una elevada correlación entre el diámetro del CL medido por ecografía y la concentración de progesterona en la mayor parte del ciclo, esta correlación no existe en los últimos días del ciclo.

En los días -2 y -3 (0 = día del celo), el diámetro del CL era el mismo que los valores que se obtienen a medio ciclo aunque era funcionalmente inactivo (concentración de progesterona $< 0,5$ ng/ml) (Ribadu *et al.*, 1994a).

C. *Correlación diámetro-día-progesterona.*

Assey *et al.* (1993), comprobaron que el día del ciclo tenía una influencia significativa sobre el tamaño del CL y sobre los niveles plasmáticos de progesterona.

III.A.15.8.-Área del Cuerpo Lúteo

Con el ecógrafo se puede cuantificar por una medida de la superficie el desarrollo del tejido luteal en el curso del ciclo.

Son muchos los trabajos, (Kastelic *et al.*, 1989a; 1990b Ginther *et al.*, 1989b; Peter *et al.*, 1992), en los cuales el área del CL se calcula utilizando la fórmula:

$$A = 1/2 \text{ altura} \times 1/2 \text{ ancho} \times \pi.$$

La media de las áreas de tejido luteal se puede normalizar en el intervalo interovulatorio utilizando los datos del día 9 por ejemplo. Si el CL no es esférico el tamaño se calcula por la fórmula:

$$A = \sqrt{\text{mayor anchura} \times \text{mayor longitud}}.$$

En un trabajo realizado por Kastelic *et al.* (1990b), en novillas preñadas del día veinte al sesenta, el área de tejido luteal aumentaba linealmente: como media aumentaba 2,6 mm²/día.

Área-Concentración de progesterona:

Como afirman Kastelic *et al.* (1990a), el área de tejido luteal y la concentración de progesterona aumentan de forma similar (no existen diferencias significativas) durante la fase de crecimiento luteal (días 2, 5, 8), pero durante la fase de regresión luteal, el área de tejido luteal decrece más lentamente que la concentración de progesterona (esta concentración comienza a declinar hacia el día dos de la regresión luteal y el área de tejido luteal declina sobre el día seis).

Numerosos autores (Kastelic *et al.*, 1990a; Hanzen *et al.*, 1992; Assey *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1997), están de acuerdo a la hora de afirmar que existe una correlación estrecha y significativa entre la superficie de tejido luteal y la concentración de progesterona plasmática en la primera mitad del ciclo estral en la vaca, tanto en animales gestantes como en animales no gestantes ($r = 0,73$ a $0,85$). Esta correlación no ha sido observada durante la segunda mitad del ciclo entre los animales gestantes ($r = 0,77$ vs. $0,33$) (Evans *et al.*, 1994).

También en las novillas el área de tejido luteal determinada ecográficamente está positivamente correlacionada con la progesterona circulante (Evans *et al.*, 1994).

Ecografía**III.A.15.9.-Volumen del Cuerpo Lúteo**

Para calcular el volumen del CL se asume que tiene una forma esférica. Este cálculo, tal y como se refleja en numerosos trabajos (Maciel *et al.*, 1992; Kamimura *et al.*, 1993), se estima gracias a la siguiente fórmula:

$$V = 4/3 \times \text{máxima área esférica} \times (\text{alto del CL}/2 + \text{ancho CL}/2)/2$$

Como puede apreciarse en la Tabla n° 16, en un trabajo realizado por Kähn (1994), el volumen total del CL con y sin cavidad pasa de tener el día 3 unos 1984 mm³ (con cavidad) y 1329 mm³ (sin cavidad), a tener entre el día 8 y 13 un volumen de 6000-7000 mm³ (CL con cavidad) y 4000 mm³ (CL sin cavidad). Simultáneamente, la cavidad pasa de tener un volumen de 170 mm³ a 400 mm³.

	<i>Volumen CL con cavidad</i>	<i>Cavidad</i>	<i>Volumen CL sin cavidad</i>
<i>Día 3</i>	1984 mm ³	170 mm ³	1329 mm ³
<i>Día 8-13</i>	6000-7000 mm ³	400 mm ³	4000 mm ³

Tabla n° 16. Variaciones en el volumen del CL.

Si al volumen total del CL le restamos el que corresponde a la cavidad en caso de existir, observamos de forma sorprendente que los CLs quísticos contienen más tejido luteal. Entre los días 6 y 20 la diferencia de cantidad de parénquima entre los dos tipos de CLs alcanza los 1000-3000 mm³.

Volumen-Concentración de progesterona.

El volumen estimado del CL y la concentración de progesterona sérica aumentan de forma similar durante la fase de crecimiento luteal. En la fase de regresión luteal, el volumen del CL disminuye más lentamente (Kamimura *et al.*, 1993).

Estos últimos autores constatan que, de acuerdo con el volumen del CL, el nivel de progesterona plasmática aumenta del día 3 al 6 después de la ovulación. El día de la ovulación el nivel de progesterona plasmática era inferior a la sensibilidad del ensayo (<0,5 ng/ml), mientras que el CL viejo era aún detectable ecográficamente teniendo un área de 1,5-2 cm² y un volumen estimado de 1,38-2,13 cm³.

En el caso de los CLs quísticos, sólo el contenido de progesterona estaba correlacionado significativamente con el volumen total, el volumen luteal y el peso (Purwantara *et al.*, 1993).

Correlación del volumen con otros parámetros del Cuerpo Lúteo:

Deichert *et al.* (1988) (tal como citan Purwantara *et al.*, 1993) estudiando 63 CLs sólidos (sin cavidad) encontraron correlaciones significativas con respecto a:

- Su volumen total (media 3,5 ml).
- Su peso (3,0 g).
- El contenido en estrógenos (3,4 ng).
- La concentración de estrógenos (1,1 ng/g).
- El contenido de progesterona (63,7 µg).
- La concentración de progesterona (20 µg/g).

Estudiando un grupo de vacas durante el periodo posparto Kamimura *et al.* (1993), observaron que el volumen del CL y el pico de progesterona plasmática eran menores después de la primera ovulación posparto comparándolo con la segunda o tercera ovulación.

III.A.15.10.-Palpación del Cuerpo Lúteo

En el manejo de vacas durante el diestro, un clínico no sólo debe de ser capaz de identificar el CL, también debe de poder diagnosticar en que grado de desarrollo y estado funcional en el que se encuentra. Esta determinación es importante a la hora de predecir si la vaca está en la fase luteal del ciclo, si responde a tratamientos exógenos de prostaglandina, o si se trata de un CL en desarrollo o en regresión. Aproximadamente el 18% de las vacas pueden ser incorrectamente diagnosticadas como que están en una fase de diestro, y hasta un 37% pueden ser incorrectamente diagnosticadas de estar en proestro, estro o metaestro cuando nos basamos en una única exploración rectal (Kelton, 1989).

La experiencia del examinador en la palpación se utiliza para indicar la firmeza de la estructura luteal como indicador del tipo de tejido luteal que se trata (para diferenciar cuerpo hemorrágico, CL y corpus albicans) (Sprecher *et al.*, 1989).

Según un criterio morfológico (Zemjanis, 1970), se clasifican los CLs en: CLs jóvenes o en desarrollo (días 1 a 4), de medio ciclo o endocrinológicamente maduro (días 5 a 16), o CL en regresión (días 17 a 21). Esta misma clasificación ha sido utilizada por numerosos autores a la hora de clasificar los diferentes tipos de CLs: Sprecher *et al.*, 1989; Pieterse *et al.*, 1990a; Pieterse *et al.*, 1990b; Ribadu *et al.*, 1994a.

Hay otros trabajos en los que los CLs se clasifican según los distintos tamaños: 6-10 mm, 11-20 mm y mayores de 20 mm, considerando los dos últimos grupos los más importantes para el diagnóstico (Sprecher *et al.*, 1989).

Palpación rectal de los distintos tipos de Cuerpos Lúteos:

Al realizar una palpación rectal de los ovarios, se puede intentar diferenciar el tipo de estructura luteal que se está palpando siguiendo las siguientes indicaciones:

Ecografíaa) *Cuerpo Lúteo joven.*

El CL joven o en desarrollo, es una estructura pequeña y blanda en la superficie del ovario.

b) *Cuerpo Lúteo maduro.*

Si se trata de un CL maduro o de medio ciclo se aprecia una estructura más definida que a veces hace protuberancia en la superficie del ovario (Pieterse *et al.*, 1990b; Ribadu *et al.*, 1994a).

c) *Cuerpo Lúteo viejo.*

El CL en regresión aparece como una estructura que sobresale de la superficie del ovario, pero menos que un CL de medio ciclo, más compacto y casi tan firme como el estroma ovárico (Pieterse *et al.*, 1990b; Ribadu *et al.*, 1994a).

Determinación de la funcionalidad del Cuerpo Lúteo por palpación:

En el trabajo de Dawson (1975) (citado por Kelton, 1989), se afirma que gracias a las palpaciones repetidas, de los 141 CLs presentes en la necropsia, en 10 casos se falló en el diagnóstico y seis fueron considerados folículos o quistes. Watson *et al.* (1980), constatan que el tamaño y forma del CL no están altamente relacionados con su funcionalidad. Aunque la consistencia se relaciona con la producción de progesterona, los CLs blandos producen más altos niveles de progesterona. Estos resultados soportan la premisa de que la palpación por sí sola no es suficiente para un diagnóstico preciso de la presencia de un CL. La medida de los niveles de progesterona se necesita como medida de la funcionalidad.

La concentración de progesterona plasmática y la palpación rectal de los ovarios para el estudio del CL tiene una compatibilidad de 77 a 87% (Archbald *et al.*, 1992). Una correlación similar la obtuvieron Watson *et al.* (1980) entre la palpación rectal y la concentración de progesterona plasmática.

La palpación rectal puede no ser un buen método para determinar la función luteal. Las vacas que por palpación rectal se diagnosticó que tenían una buena función luteal, sólo en un 85% de los casos coincidía con lo que se diagnosticaba por RIA en leche. También se encontró que no había correlación entre el tamaño del CL palpado y el nivel de progesterona. Teniendo en cuenta la precisión necesaria no se consideró muy adecuada la palpación rectal para predecir la susceptibilidad del CL a las prostaglandinas, ya que sólo fue correcto en un 63% de los casos (Sprecher *et al.*, 1989).

III.A.15.11.-Ecografía del Cuerpo Lúteo

La ecografía transrectal tipo B de tiempo real da una imagen bidimensional del tejido luteal bovino. La imagen ecográfica del CL es uniforme, circunscrita, menos ecogénica que el estroma ovárico que le rodea, y puede contener un área central no ecogénica o una pequeña zona densa y ecogénica (Sprecher *et al.*, 1989; Assey *et al.*, 1993).

La apariencia ecográfica de las estructuras luteales varía según el estado de desarrollo (Pierson *et al.*, 1984; Omran *et al.* 1988; Pieterse, 1989). Se reconoce al CL

por su tamaño, forma y ecoestructura característica, aparece como una estructura ecogénica granular la cual se intensifica durante la fase luteal. El gris bastante oscuro del CL cíclico se destaca del parénquima ovárico más claro (Kahn, 1994).

Cuando se realiza una comparación diaria de la imagen, pequeños cambios en la ecogenicidad de esta imagen se corresponden con cambios de cuerpo hemorrágico a CL y a corpus albicans. Como afirma Grygar *et al.*, 1992, hay sólo unas diferencias muy limitadas y frecuentemente no visibles en la ecogenicidad del CL durante las distintas fases del ciclo estral.

La estimación del día exacto del ciclo estral no se puede hacer ecográficamente basándose en las imágenes del CL sobre la pantalla realizando una sólo exploración.

El CL aparece como una zona gris más o menos ecógena, al contrario de los folículos que no son ecógenos o del estroma ovárico que es más ecógeno. La ecogenicidad de la estructura luteal se intensifica en el curso del diestro (Pieterse, 1989). No es posible precisar por ecografía el estado del ciclo estral en que el animal se encuentra (Pieterse *et al.*, 1990b). El CL cíclico es discernible durante su fase de regresión como media tres o cuatro días después de la ovulación siguiente (corpus albicans) (Pierson *et al.*, 1984; Kastelic *et al.*, 1990b; Bo *et al.*, 2000). La imagen del CL no se diferencia, en esta fase del ciclo, entre un animal gestante y no gestante (Hanzen *et al.*, 1992).

Ecogenicidad de los distintos tipos de Cuerpos Luteos:

El CL se reconoce bien con una sonda de 5 MHz desde el principio de su formación hasta el final del diestro, y casi siempre hasta el día de la ovulación siguiente (en promedio: 1'4 días antes de la misma) (Bo *et al.*, 2000). Se le puede observar como corpus albicans después del principio del siguiente celo.

En un trabajo realizado por Carnes *et al.* (1988), (citado por Singh *et al.*, 1997), las medidas de los coeficientes de absorción ultrasónica en ovarios extraídos de un variado número de especies (incluidas las vacas), indicaron que, las diferencias de los diversos estadios fisiológicos estaban asociadas con variaciones significativas en la impedancia acústica, debido a cambios en el contenido macromolecular y en la estructura.

La densidad del volumen de tejido luteal se puede calcular examinando las secciones por "contaje de puntos" (Maciel *et al.*, 1992).

A. *Cuerpo Lúteo joven o en desarrollo (1-4 días):*

El CL joven es siempre difícil de localizar, especialmente si no se ha visualizado previamente la localización del folículo preovulatorio antes de producirse la ovulación, incluso utilizando una sonda de 7,5 MHz (Pieterse, 1989).

Posee una ecogenicidad peculiar: zona anecogénica, pobremente definida, irregular, color gris-negro con manchas ecogénicas, todo dentro del perímetro del ovario (Pieterse *et al.*, 1990b; Ribadu *et al.*, 1994a).

Como media se puede detectar por ecografía los 2-3-4 días después de la ovulación. El día tres los CLs reconocibles tienen como media 14 mm de ancho y de 18

Ecografía

a 21 mm de longitud (Pierson *et al.*, 1984; Kähn *et al.*, 1986; Tamayo, 2000; Bo *et al.*, 2000).

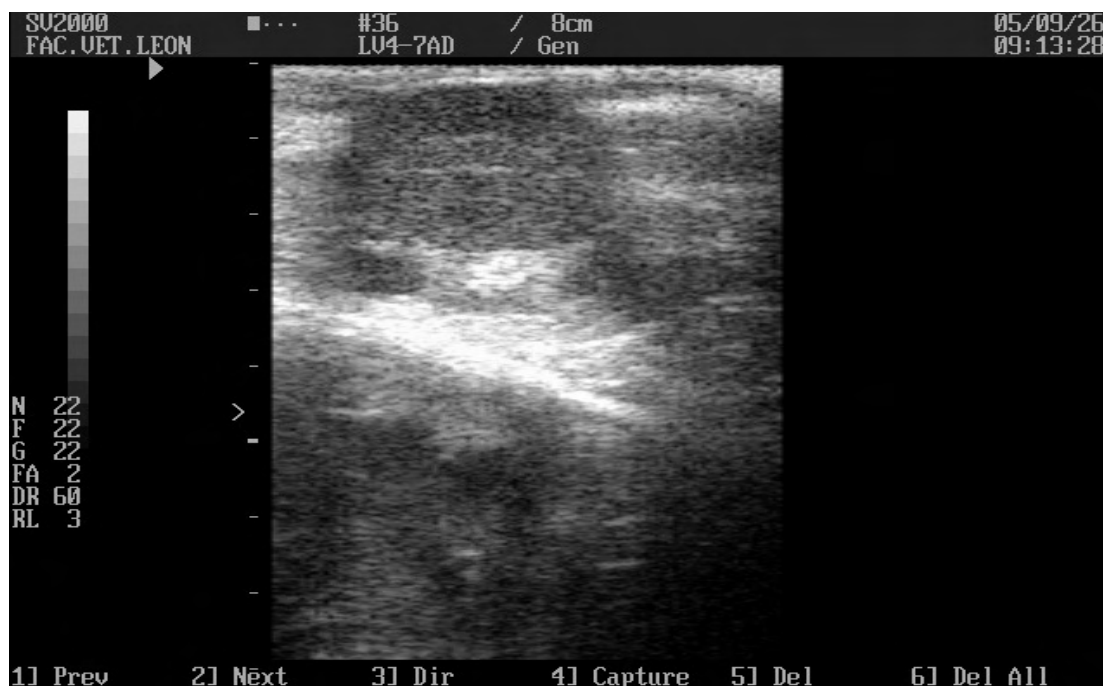
La detección de los CLs más jóvenes es difícil, tanto por ecografía como por palpación rectal, debido a un menor tamaño y a la pobre ecogenicidad de este tipo de CL (Pieterse, 1989; Pieterse *et al.*, 1990b).

B. Cuerpo Lúteo maduro (5-16 días):

Ecográficamente es una estructura ecogénica, grisácea, con aspecto granular, borde bien definido (posee una línea de demarcación visible entre el CL y el estroma ovárico, como resultado de la diferente ecogenicidad de los dos tejidos) (Pieterse *et al.*, 1990b; Ribadu *et al.*, 1994a).

Se diferencia claramente del estroma ovárico por la uniformidad de su textura y por su relativamente menor ecogenicidad cuando se compara con sombras grises. A menudo el CL tiene una línea densa ecogénica en el centro y una línea no ecogénica sobre su superficie dorsal. A medida que el CL regresa la densidad comparada con el estroma ovárico se mantiene (Omran *et al.*, 1988).

La detección del CL de medio ciclo es buena tanto, por palpación rectal como por ecografía, aunque con la ecografía se obtiene mejor valor predictivo (Pieterse *et al.*, 1990b).

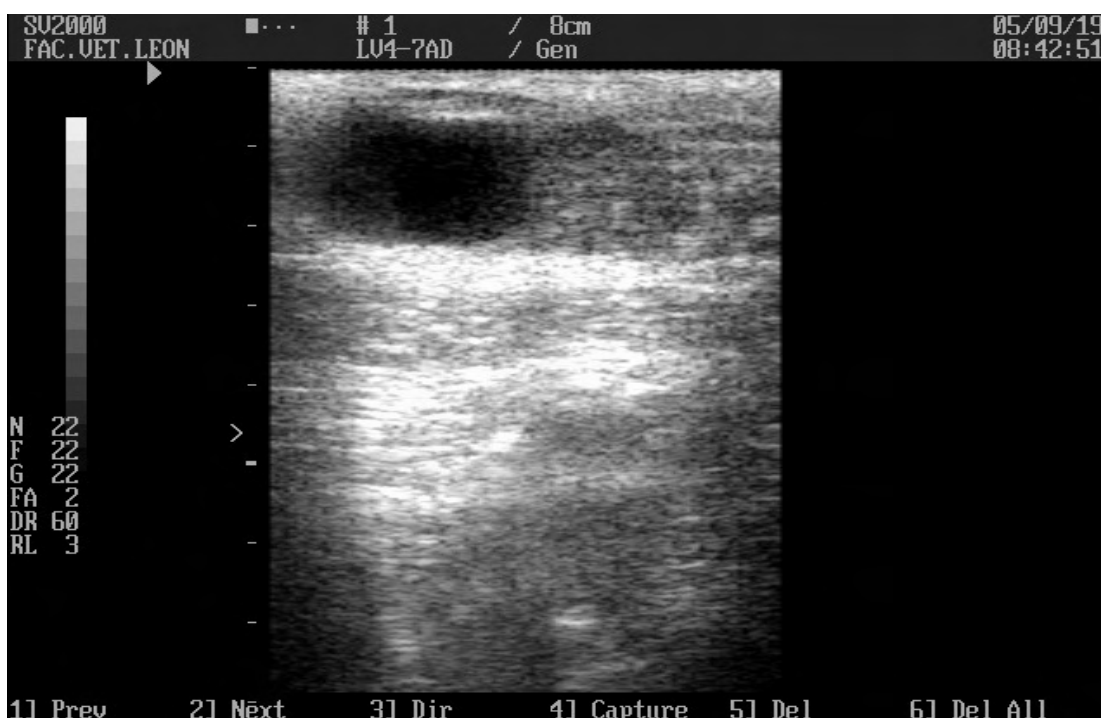


Fotografía n° 11. Ecografía de un CL maduro.

C. Cuerpos Lúteos viejos o en regresión (17-21 días):

En este caso, la línea de demarcación es tenue debido a una ligera diferencia de ecogenicidad entre los dos tejidos. Su densidad es casi la misma que la densidad del estroma ovárico y además tiene un pequeño efecto ecogénico, lo que dificulta su diferenciación ecográfica. Es por ello, por lo que los CLs de ciclos anteriores no se diferencian del resto del ovario al tener una ecogenicidad muy similar a la del estroma ovárico (Pieterse, 1989; Pieterse *et al.*, 1990b; Ribadu *et al.*, 1994a).

Como se demuestra en el trabajo realizado por Pieterse *et al.* (1990a), los valores de la sensibilidad y valor predictivo de la ecografía para la detección de CLs viejos son bajos.



Fotografía n° 12. Ovario con un CL viejo junto a un folículo preovulatorio.

Posibilidades de la detección del Cuerpo Lúteo por ecografía:

La detección de un CL hemorrágico o de un CL en vías de luteolisis es difícil tanto por palpación rectal como por ecografía (Pieterse *et al.*, 1990b). El CL viejo tiene una ecogenicidad similar a la del estroma ovárico (Hanzen *et al.*, 1992).

Para algunos autores, el CL puede ser detectado ecográficamente con una sonda de 5 MHz desde el día siguiente del celo. Un estudio realizado por Kastelic *et al.* (1990b), confirma la posibilidad de detectar el CL en el 73% de los casos en este día. Sin embargo, tres o cuatro días después de la ovulación se diferencia una estructura luteal bien definida (CL hemorrágico) bajo la imagen de una zona anecógena, rodeada por puntos más ecógenos, bien demarcada del estroma ovárico (Pierson *et al.*, 1984; Kastelic *et al.*, 1990b; Hanzen *et al.*, 1992; Griffin *et al.*, 1992).

Ecografía

En contraposición, para otros autores como media el CL no es visible hasta tres días después de la ovulación (Pierson *et al.*, 1984).

Incluso, hay trabajos en los que los CLs jóvenes, de medio ciclo y viejos intencionadamente no se diferencian, porque según Kähn *et al.* (1986), y Grygar *et al.*, 1992, hay sólo unas diferencias muy limitadas, y frecuentemente no visibles en la ecogenicidad del CL durante las distintas fases del ciclo estral.

III.A.15.12.-Comparación entre ecografía y palpación rectal para detectar Cuerpos Lúteos

Ribadu *et al.* (1994a), realizaron un estudio con 34 vacas de raza frisona con una historia reproductiva desconocida. Los ovarios se palparon, se examinaron ecográficamente y se diseccionaron posmortem con el fin de clasificar los CLs en: CL en desarrollo (1 a 4 días), CL de medio ciclo (de 5 a 16 días) y CL en regresión (de 17 a 21 días). Se recogieron muestras de sangre con el fin de determinar la concentración de progesterona plasmática. Hubo una total correspondencia entre la clasificación del CL por disección y la concentración de progesterona plasmática, por lo que se utilizó esta clasificación como estándar para determinar la precisión de la palpación rectal y la ecografía. Así, se obtuvieron los siguientes valores para ambos métodos en la detección del CL (son valores globales sin diferenciar los diferentes tipos de CLs):

1. *Detección por palpación rectal:*

Para la interpretación de la Tabla n° 17, hay que decir que siempre que se pone (+) significa CL existente o encontrado, y (-) lo ponemos para indicar su ausencia o error en la detección.

	ENCONTRADO	NO ENCONTRADO
CL PRESENTE	17 (a) (++)	2 (b) (+-)
CL NO PRESENTE	3 (c) (-+)	46 (d) (--)

Tabla n° 17. Palpación rectal del CL.

$$\text{Sensibilidad} = a/(a+c) \times 100 = (17/20)100 = 85\%$$

$$\text{Especificidad} = d/(b+d) \times 100 = (46/48)100 = 95,8\%$$

$$\text{Valor predictivo positivo} = a/(a+b) \times 100 = (17/19)100 = 89,5\%$$

En la Tabla n° 18 observamos los parámetros de valoración de la palpación rectal como método de detección del CL. Estos valores se corresponden a los obtenidos en su trabajo por Ribadu *et al.* (1994a).

<i>Parámetros</i>	<i>Valores</i>
Sensibilidad	85%
Especificidad	95,8%
Valor predictivo	89,5%

Tabla n° 18. Valores en los parámetros de valoración de la palpación rectal.

2. *Detección por ecografía:*

Al igual que se hizo en el caso de la palpación rectal, para la interpretación de la Tabla n° 19, siempre que se pone (+) indicamos CL existente o encontrado, y el signo (-) lo ponemos para indicar su ausencia o error en la detección.

	<i>ENCONTRADO</i>	<i>NO ENCONTRADO</i>
<i>CL PRESENTE</i>	19 (a) (++)	0 (b) (+-)
<i>CL NO PRESENTE</i>	1 (c) (-+)	48 (d) (--)

Tabla n° 19. Detección ecográfica del CL.

$$\text{Sensibilidad} = a/(a+c) \times 100 = (19/20)100 = 95\%$$

$$\text{Especificidad} = d/(b+d) \times 100 = (48/48)100 = 100\%$$

$$\text{Valor predictivo positivo} = a/(a+b) \times 100 = (19/19)100 = 100\%$$

Por tanto, podemos valorar la ecografía como método de detección del CL. Los valores obtenidos por Ribadu *et al.* (1994a), los tenemos reflejados en la Tabla n° 20:

<i>Parámetros</i>	<i>Valores</i>
Sensibilidad	95%
Especificidad	100%
Valor predictivo	100%

Tabla n° 20. Valores en los parámetros de valoración de la ecografía.

Tal como afirman diversos autores (Kastelic *et al.*, 1990a; Ribadu *et al.*, 1994a, 1994b), la ecografía es una alternativa viable a la determinación de progesterona plasmática y la palpación rectal para la evaluación de la función luteal (Boyd *et al.*, 1990).

Ecografía**III.A.15.13.-Cavidades en el Cuerpo Lúteo**

Un CL con cavidad se denomina CL quístico, pero no existen evidencias de que estas estructuras sean patológicas (Kähn *et al.*, 1989a; Foley, 1996).

Esta cavidad es frecuentemente oval, a veces es redonda y casi siempre es de situación central (Kähn *et al.*, 1989a; Kähn, 1994).

1. *Frecuencia de aparición de la cavidad.*

Hasta el día 10 después de la ovulación en los ciclos normales, del 30 al 50% de los CLs poseen una cavidad visible ecográficamente. La frecuencia de CLs cavitarios disminuye luego un 3-4% por día. Así, hacia el día 13-15 del ciclo menos del 30% de los CLs presentan cavidad (Kähn, 1994; Gnemmi, 2004).

Grygar *et al.* (1994) aportan que de los 3.222 CLs que se observaron ecográficamente utilizando una sonda transrectal de 5 MHz, el 69% eran compactos y el 31% tenían cavidades de diversas formas y tamaños.

Sin embargo, Hanzen *et al.* 1992, afirman que un CL con cavidad se puede identificar del 37 al 79% de las veces. Las diferencias observadas en las prevalencias de aparición de los CLs quísticos, pueden ser debidas a la frecuencia de los exámenes realizados así como a las dimensiones de estas cavidades luteales centrales.

Otros autores como Pieterse *et al.* 1999, afirman que el CL con cavidad se puede identificar en un 60% de las veces.

Para Tamayo (2000), se encontrarían entre un 30 y un 80% de los casos, porcentajes en los que se incluyen el 48% para Bo *et al.*, 2000 y 30% para Ruperez, 2004.

Según Kastelic *et al.* 1990b; Singh *et al.* 1997 en base a exámenes de ultrasonidos en vacas, el 79% de los CL de aspecto normal contienen cavidades.

2. *Tamaño de la cavidad.*

Las cavidades de los CLs pueden alcanzar un tamaño considerable sobretodo en los quince días siguientes a la ovulación.

La cavidad central del CL tiene un diámetro comprendido entre los 2 y 20-22 mm, rara vez alcanza un tamaño mayor (Kähn, 1994). Según Kito *et al.* 1986 el 83%, 59% y 24% de las cavidades tienen un diámetro superior a los 6, 9 y 20 mm respectivamente. Según Kastelic *et al.*, (1990b) el 35% de las cavidades tienen un diámetro superior a los 10 mm, el 52% de ellas tienen un diámetro comprendido entre los 6 y 10 mm y un 13% entre 2 y 5 mm.

Es entre el quinto, sexto y séptimo día después de la ovulación cuando se puede medir su diámetro máximo, sea cual sea su tamaño. Sin embargo, las grandes cavidades se detectan durante más tiempo que las pequeñas, y en general se mantienen hasta el día

anterior a la siguiente ovulación. Al contrario, las cavidades pequeñas o de tamaño medio regresan más o menos a la semana (Hanzen *et al.*, 1992; Kastelic *et al.*, 1990b).

Kähn *et al.*, (1989a) afirma que la culminación en el desarrollo de la cavidad fue sobre el día 9 en los ciclos normales y en las gestaciones tempranas.

El crecimiento del CL con y sin cavidad difiere, alcanzando mayor tamaño el CL con cavidad que el que no lo tiene. Los dos tipos de CLs alcanzan su tamaño máximo de 28 mm en el caso de los que poseen cavidad (hacia el día 10), y de 24,5 mm si no son cavitarios (hacia el día 8 del diestro).

	Tamaño máximo	Día del ciclo
Cuerpo lúteo quístico	28 mm	10
Cuerpo lúteo no quístico	24,5 mm	8

Tabla n° 21. Comparación del tamaño del CL quístico y no quístico.

En un trabajo realizado por Kähn *et al.*, (1989a) observa que los CLs quísticos eran más largos, más anchos, y tenían mayor cantidad de tejido luteal que las estructuras no quísticas, tanto en animales cíclicos como en animales gestantes.

La superficie total del CL depende del tamaño de la cavidad central, ya esté o no el animal gestante (Hanzen *et al.*, 1992).

Desde el día 9 al 21 de gestación los CLs quísticos son de 1 a 3 mm mayores que los CLs sin cavidad.

En el CL en desarrollo y en los totalmente desarrollados, el tamaño del CL aumenta significativamente con el tamaño de la cavidad. Esto no ocurre en el caso de los CLs en regresión o de gestación (Peter *et al.*, 1992).

Los CLs quísticos tienen un volumen significativamente mayor (media 4,5 ml), aunque con el mismo volumen de tejido luteal (4,1ml) y contenían significativamente más estrógenos (7,9 ng) y progesterona (91,6 µg) (Deichert *et al.*, 1988).

En la Tabla n° 22, tenemos el contenido de estrógenos (E₂), su concentración [E₂], el contenido en progesterona (P) y su concentración [P], así como el peso medio de los dos tipos de CLs (con y sin cavidad).

Ecografía

<i>CL QUISTICO</i>	<i>CL SOLIDO</i>
Peso medio: 3,2 g	Peso medio: 3,0 g
Contenido E ₂ : 4,7 ng/CL	Contenido E ₂ : 3,4 ng/CL
	[E ₂]: 1,1 ng/g
	Contenido P: 63,7 µg
[P]: 21,7 µg/g	[P]: 20,4 µg/g

Tabla n° 22. Comparación entre CL quístico y sólido (Deichert *et al.*, 1988).

La mayor incidencia de cavidades en los CLs se encontró en los CLs en desarrollo, y esta incidencia disminuía a medida que aumentaba el grado de desarrollo del CL (estos resultados estaban en concordancia con los obtenidos por Quito *et al.*, -citado por Okuda *et al.*, 1988- quienes monitorizaron el CL con un ecógrafo en 1986).

Regresión de la cavidad:

Esta cavidad central puede persistir o por el contrario, desaparecer en el curso del ciclo: se engrosará la pared del CL y la cavidad disminuirá (Kähn *et al.*, 1989a; Hanzen *et al.*, 1992).

Cuando los CLs disminuyen progresivamente de tamaño, los quísticos lo hacen a más velocidad que los no cavitarios. Después del día 9, las cavidades decrecen aproximadamente medio mm por día.

Estas cavidades normalmente decrecen después del día 10 (día 0 es el día de la ovulación) y frecuentemente desaparecen a las tres semanas (Kähn *et al.*, 1989a).

En el caso de existir gestación, la reducción de la cavidad es más lenta, siendo posible su detección después del día 20 de gestación (en este caso, la cavidad se puede detectar incluso entre los días 28 a 42 de gestación) (Grygar *et al.*, 1994).

3. *Ecogenicidad de la cavidad.*

Esta cavidad tiene una ecogenicidad similar a la del folículo (espacios no ecogénicos) aunque es menos esférica (más lobulada).

El área anecogénica de la cavidad, corresponde a líquido posiblemente folicular del folículo que originó el CL (Tamayo, 2000; Ruperez, 2004).

La pared del CL quístico tiene una ecogenicidad igual que la de un CL compacto. Esta pared del CL quístico sirve para la diferenciación de los folículos ováricos y la cavidad del CL quístico (Kähn *et al.*, 1989a).

A1 realizar el examen ecográfico, en el interior del CL a veces se puede observar una cavidad o una trabécula que aparecerá como una fina línea blanca (Pieterse, 1989; Bo *et al.*, 2000; De la Riera, 2004).

Otros autores han explicado que la presencia de una línea central hiperecogénica se debe a un entramado de tejido conectivo a través del tejido luteal. Sin embargo, a veces puede verse en el ovario desde todos los planos posibles, lo que sugiere que su presencia es en algunos casos simplemente un artefacto, producido probablemente por las ondas de sonido rebotando en las paredes del CL (De la Riera, 2004).

Un CL con un centro hiperecogénico, que a menudo se ve en vacas gestantes, puede ser debido a un coágulo de sangre que rellena la laguna y permanece desde el cuerpo hemorrágico al formarse tejido luteal a su alrededor. Alternativamente, este centro hiperecogénico puede ser el resultado de la coagulación de la laguna central por tejido luteal de alta ecogenicidad. Este último tipo se ve principalmente en vacas preñadas debido al tiempo que necesita este tejido para desarrollarse (De la Riera, 2004).



Fotografía n° 13. Corte ecográfico de un CL con cavidad.

Ecografía

Fotografía n° 14. Corte ecográfico de un CL con trabécula.

En un trabajo realizado por Singh *et al.* (1997), en 42 de los 58 CLs estudiados (72,4%), se observaba ecográficamente una cavidad de al menos 3 mm de diámetro como un área anecogénica. En todas ellas sin embargo, la cavidad presente el día de la ovariectomía estaba llena de un transudado seroso claro. En uno de los CLs (durante el metaestro), la cavidad contenía sangre coagulada. Las medidas de los pixels de las imágenes ecográficas del tejido luteal, el contenido de progesterona luteal, y los valores de la bioquímica no diferían entre los CLs con y sin cavidad central ($p > 0,15$). Por ello en este trabajo, los datos se combinaron y analizaron sin la categorización de la cavidad central.

4. Relación cavidad-fertilidad.

Son muchos los autores que en sus trabajos han comprobado que estas cavidades que se pueden encontrar en el interior de los CLs no interfieren:

- ◆ Con la gestación (Kähn *et al.*, 1989b; Peter *et al.*, 1992; Hanzen *et al.*, 1992; Griffin *et al.*, 1992; Grygar *et al.*, 1994).
- ◆ Con la concentración de progesterona sérica (Peter *et al.*, 1992; Hanzen *et al.*, 1992; Griffin *et al.*, 1992; Ribadu *et al.*, 1994a).
- ◆ Con los perfiles hormonales (Kähn *et al.*, 1989b;1994).
- ◆ Con el área de tejido luteal (Kastelic *et al.*, 1990a; Griffin *et al.*, 1992).
- ◆ Con la duración del ciclo estral (Kähn *et al.*, 1989a; 1994).
- ◆ Con el retraso en el retorno al celo (Hanzen *et al.*, 1992).

♦ Con la fertilidad (Kähn *et al.*, 1989a; 1994; Hanzen *et al.*, 1992; Grygar *et al.*, 1994).

Grygar *et al.* (1994), realizaron un trabajo en el que los exámenes repetidos de 32 vacas sanas durante 36 ciclos estrales, mostraron que el día cuatro después de la ovulación las cavidades estaban presentes en 20 (67%) de los 30 CLs de gestación, pero en sólo 2 (33%) de los 6 CLs cíclicos. Se concluyó que las cavidades en los CLs no afectaban ni a la fecundidad ni a la fertilidad.

En numerosos trabajos (Kähn, 1986; 1994; Kito *et al.*, 1986), el estudio de la concentración hormonal de ambos tipos de CLs (quísticos y no quísticos), no ha revelado una disminución en la capacidad de producir progesterona en el caso de existir una cavidad.

No hay una tendencia a ver una cavidad central de un ciclo a otro en un mismo animal (Kito *et al.*, 1986; Hanzen *et al.*, 1992).

Cuando se encontraba una cavidad en el CL como no hay correlación entre el tamaño de la cavidad y los niveles plasmáticos de progesterona, el tamaño de esta cavidad en muchos trabajos se ignora a la hora de hacer las medidas del CL (Assey *et al.*, 1993).

La presencia de cavidades luteales no está influenciada por las estaciones del año (Howell *et al.*, 1994).

III.A.15.14.-Cuerpo Lúteo de gestación

La regulación de la vida media del CL, para mantener la secreción de progesterona, es crítica para el éxito de la gestación en la vaca (Thatcher *et al.*, 1989).

Poco se conoce sobre los mecanismos por los cuales la presencia de un embrión en el útero causa el mantenimiento del CL durante la gestación. El embrión demuestra su presencia y causa el mantenimiento del CL en el día 17 o 18 (Lukaszewska *et al.*, 1980).

El crecimiento del CL de ciclo y el de gestación muestran una evolución semejante. Los CLs de gestación son globalmente un poco más voluminosos que los de ciclo.

En el bovino, el CL aumenta el tamaño entre el segundo y tercer mes de gestación, y entra en regresión entre los meses cuarto y sexto; de ahí en adelante permanece relativamente constante hasta el momento del parto, cuando degenera en el transcurso de la semana posterior al mismo.

1. Ecografía del Cuerpo Lúteo de gestación.

Kähn en 1994 afirma que no se puede distinguir el CL de ciclo con el CL de gestación bajo la base de su imagen ecográfica. De la misma opinión son Edmondson *et al.* (1986a) quienes aportan que la imagen del CL no es diferente en animales gestantes y no gestantes durante los primeros estadios de la gestación.

Ecografía

Jaskowski *et al.* (1993), haciendo un seguimiento ecográfico (sonda de 5 MHz) del CL en nueve vacas durante el ciclo estral, y en once vacas inseminadas con éxito, observó que el tamaño de dicho CL era significativamente mayor en las vacas preñadas que en las que no lo estaban (se observaba este hecho el día 12).

Estudios anteriores aportaban que hay considerables diferencias entre el aspecto ecográfico del CL de vacas preñadas y no preñadas entre los días 16 y 19 posinseminación (Omran, 1989).

Las imágenes ecográficas del CL de gestación comenzaron a ser diferentes del CL de una vaca no gestante el día 17, este hecho se puede tener en cuenta a la hora de mejorar la precisión del diagnóstico de gestación, y además, los cambios morfológicos detectados ecográficamente del cuerno en las vacas no gestantes, empezaron a aparecer en la mayoría de los animales a partir del día 17 (Boyd *et al.*, 1990).

El tamaño luteal y características ecogénicas evaluadas en momentos específicos después de la cubrición puede demostrar ser un método útil para mejorar la precisión en el diagnóstico temprano de preñez en el ganado de leche (Fricke, 2004).

2. Producción de progesterona.

Tal como afirman Boyd *et al.* (1990), la funcionalidad del CL de gestación se puede monitorizar midiendo la concentración de progesterona plasmática.

Hay que tener en cuenta que al principio el CL produce considerablemente más cantidad de progesterona, de la cantidad mínima que se precisa para mantener el embrión hasta el día 15 de gestación. Es a partir de este día 15, siendo normal el desarrollo del embrión, cuando la producción de progesterona excede el valor umbral representado por 100 µg de progesterona luteal total; el día 15 el CL normalmente contiene casi 300 µg de progesterona (Hansel *et al.*, 1996).

3. Cuerpos Lúteos de gestación con cavidad.

Durante las primeras semanas de gestación también se han observado CLs quísticos semejantes a los de un ciclo normal. Es a partir de la tercera semana de gestación cuando se encuentra la cavidad sólo esporádicamente.

Desde el día 9 al 21 de gestación los CLs quísticos son de 1 a 3 mm mayores que los CLs sin cavidad. El día 18 del ciclo el CL sin cavidad tiene un diámetro de 22 a 24 mm, en comparación con los 24 a 26 mm de diámetro al principio de la gestación. Por lo tanto, los CLs sin cavidad tienen menor tamaño en el ciclo que durante la gestación.

En un trabajo realizado por Grygar *et al.* (1994), de los 1.204 CLs que se encontraron en vacas gestantes (el día 25 de gestación) el 92% eran compactos y el 8% tenían cavidad.

III.A.15.15.-Comportamiento del Cuerpo Lúteo durante la superovulación

En 1992 Maciel *et al.*, realizaron un trabajo con novillas superovuladas intentando encontrar diferencias entre los CLs de los dos grupos de animales (con tratamiento de superovulación y sin tratamiento de superovulación), llegando a las siguientes conclusiones:

1. Respecto a la palpación rectal.

Cuando se realiza transferencia embrionaria, al aumentar la respuesta superovulatoria, en términos de número de CLs, la precisión de la palpación disminuye. Los resultados de este trabajo concuerdan con los obtenidos por Guay *et al.* (1981) y Monniaux *et al.* (1983) (citados por Maciel *et al.*, 1992), quienes afirmaron que la palpación era más precisa cuando el ovario contenía menos de diez CLs. Los hallazgos de "CLs ocultos" confirmaron las mismas observaciones de Donaldson (1985) (citado por Maciel *et al.*, 1992), y la necesidad de diseccionar los CLs de los ovarios para un conteo preciso.

2. Respecto al peso y volumen de los Cuerpos Lúteos.

Aunque no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control (NO superovuladas: NO S.O.) y las tratadas (superovuladas: S.O.) en lo que se refiere al peso y volumen de sus CLs, el peso medio del CL en el grupo control (NO S.O.) fue casi del doble comparándolo con el peso medio del grupo S.O., y el volumen del grupo S.O. fue 2/5 del volumen luteal del grupo NO S.O. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Donaldson, 1985 (citado por Maciel *et al.*, 1992): los CLs de ovarios superovulados son normalmente menores que los CLs de ciclos normales.

La relación peso CL/ovario mostró que los CLs de las novillas superovuladas representa casi 1/3 más del peso total de la estructura ovárica, que los CLs de novillas no superovuladas (Maciel *et al.*, 1992).

	Número	Peso CL(g)	Volumen	CL/ovario (g)
S.O.	35	1,97 ± 0,57	1332 ± 538,1	1: 1,63 17,40 / 28,40
NO S.O.	2	3,72 ± 1,66	2144 ± 1015,4	1: 2,30 3,72 / 8,57

Tabla n° 23. Diferencias entre CLs entre vacas con y sin tratamiento (MACIEL *et al.*, 1992).

Bungartz *et al.* (1994), observaron que las vacas superovuladas en ausencia de un folículo dominante producían más CLs ($11,7 \pm 0,9$ contra $4,7 \pm 1,1$; $p < 0,01$) comparándolo con vacas tratadas en presencia de un folículo dominante.

Ecografía**III.A.15.16.-Influencia de la temperatura ambiente sobre el Cuerpo Lúteo**

Howell *et al.* (1994), estudian el efecto que la temperatura podía tener sobre distintas características del CL.

Se monitorizó el crecimiento y función del CL diariamente durante un ciclo estral completo en 16 vacas cíclicas Holstein en lactación (8 en primavera y 8 en verano), por ecografía y por la concentración de progesterona en el suero de sangre periférica. Como media la temperatura ambiente fue de $21,2 \pm 0,9$ °C en primavera y de $31,1 \pm 0,3$ °C en verano.

En el verano, comparado con la primavera, la temperatura rectal por la mañana era más alta los días 1, 2 y 3 del ciclo, que era cuando el CL se estaba formando, y los días 15 y 19 pero:

- ◆ La longitud de la fase luteal y el área de la sección del CL era similar para las dos estaciones.
- ◆ Las cavidades centrales se observaron tanto en primavera como en verano.
- ◆ El área del CL era para la primavera y el verano de $384,1 \pm 10,7$ mm² contra $327,9 \pm 12,9$ mm² en otoño e invierno ($p < 0,005$). La estación no afecta al crecimiento, tamaño máximo o a la velocidad de regresión del CL.
- ◆ La progesterona total secretada en la fase luteal y la magnitud del pico de progesterona tendía a ser más bajo durante el verano. La concentración de progesterona en el intervalo día 6/día 18 fue menor durante el verano que en la primavera. Estos resultados sugieren que la supresión de la función luteal podría contribuir a la menor fertilidad cuando las vacas son inseminadas durante el verano. Aunque esta concentración es menor, está en el rango de las vacas cíclicas normales.

Los investigadores han elucubrado que las condiciones hipertérmicas pueden, directamente o indirectamente, producir la alteración de la función luteal. En este trabajo, los datos son confusos ya que esta función del CL se vio elevada, no afectada o disminuyó en vacas sometidas a altas temperaturas.

En este trabajo, el tamaño máximo del CL se observa en Noviembre y estaba positivamente relacionado con el diámetro del folículo ovulatorio del ciclo anterior. Los resultados indican que el desarrollo del folículo ovárico y la dominancia pueden ser alterados durante el verano.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

III. A. Ecografía.

III. B. Niveles de testosterona en sangre materna y su relación con el sexo fetal.

Niveles de testosterona en sangre materna y su relación con el sexo fetal**III.B. NIVELES DE TESTOSTERONA EN SANGRE MATERNA Y SU RELACIÓN CON EL SEXO FETAL.****III.B.1.-Esbozo embrionario del testículo**

El signo más temprano de diferenciación sexual masculino es el desarrollo de los testículos a partir del primordium gonadal indiferenciado. (Ribera *et al.*, 2000).

Los testículos son las gónadas masculinas y están contenidos en una bolsa de piel especializada denominada escroto, que protege y soporta a los testículos. La función principal del escroto es regular la temperatura interna de las gónadas mediante la contracción involuntaria del músculo dartos que recubre el escroto interna y basalmente (González *et al.*, 1961; Sisson *et al.*, 1963; Barrios, 2002).

Los testículos están recubiertos por dos capas serosas de la túnica vaginalis, y una capa de tejido conectivo denso e irregular, que constituye la túnica albugínea. De la túnica albugínea emergen trabéculas de tejido conectivo que convergen en el mediastino ubicado en el centro del parénquima testicular, y dividen al testículo en un número variable de lobulillos testiculares (ó pirámides testiculares) que contienen de 1 a 4 túbulos seminíferos contorneados. Estos se unen a la salida de cada lobulillo, y forman los túbulos rectos agrupados en el mediastino, que a su vez conforman la “*rete testis*”. De la rete testis sale una docena de túbulos llamados vasos eferentes que convergen en la porción dorsal del mediastino para luego llegar a la cabeza del epidídimo (González *et al.*, 1961; Sisson *et al.*, 1963; Barrios, 2002).

El parénquima de los testículos está formado principalmente por túbulos seminíferos, descritos por primera vez por De Graaf en 1668. Estos túbulos son estructuras más ó menos cilíndricas que están empaquetados juntos dejando espacios tridimensionales entre ellos. Estos espacios intersticiales contienen los vasos sanguíneos y linfáticos, los nervios y las células intersticiales ó células de Leydig que producen la mayor parte de la testosterona. (Cole *et al.*, 1984 y Marina, 2003).

En los testículos se producen los espermatozoides y la testosterona. Los espermatozoides pasan desde el testículo al epidídimo, donde, después de adquirir la capacidad para fecundar y para moverse, son almacenados. Durante la eyaculación son exprimidos a lo largo del conducto deferente hasta el interior de la uretra y mezclados con las secreciones de las glándulas accesorias para formar el eyaculado. (Cole *et al.*, 1984).

III.B.1.1.- Túbulos seminíferos

Se encuentran en ellos las células germinales y las células de Sertoli, que protegen y nutren a los espermatozoides, producen la globulina fijadora de andrógenos (ABG) y el MIF (factor inhibidor Mulleriano) e intervienen en la regularización de la secreción de la FSH (hormona folículo estimulante), (Rivera, 2000 y Marina, 2003).

III.B.1.2.- Células de Sertoli (Células de Sostén ó Nutricionales)

Estas células proliferan en el embrión alrededor de los 36 días. En el embrión masculino de 8 semanas las células de Sertoli están organizadas en cordones y separadas del intersticio por una membrana basal.

En la célula de Sertoli se expresa el gen TDF (Testicular Differentiating Factor) y el gen de la hormona antimülleriana localizado en el cromosoma 19.

En el periodo fetal, las células de Sertoli de manera activa inhiben la espermatogénesis. Al contrario, en la edad adulta, las células de Sertoli la estimulan y la inducen. En el adulto, están fijadas a la membrana basal del túbulo seminífero.

La célula de Sertoli tiene receptores para la FSH y la testosterona pero no para la LH. Las células de Sertoli reciben estímulos endocrinos (FSH) y paracrinos procedentes de las células de Leydig, de las células mioides peritubulares y de las células germinales. (Marina, 2003).

Las funciones de las células de Sertoli se resumen en: (Pascualini, 1973 y Marina, 2003).

1. Mantiene la estructura del túbulo seminífero.
2. Divide el epitelio seminífero en dos compartimentos, basal y luminal, gracias a la formación de la “tight junctions”. En el hipogonadismo hipogonadotrófico prepuberal estas últimas no se forman ni por tanto la barrera hemato-testicular.
3. Traslado de las células germinales del compartimento basal al luminal. Para ello se requiere reconocimiento de que la espermatogonia situada en el compartimento basal inicia su maduración a espermatocito; y rotura y reparación de las “tight junctions”.
4. Fagocitosis de las células germinales degeneradas.
5. Espermiación, es decir liberación de los espermatozoides en la luz del túbulo seminífero.
6. Secreción del fluido del túbulo seminífero que ayuda a el transporte espermático desde la luz del túbulo seminífero a los túbulos rectos, rete testis, eferentes y epidídimo.
7. Aporte de nutrientes a las células germinales como resultado de la barrera hemato-testicular formada por las “tight junctions”.
8. Secreción de proteínas y otros productos. Es productora de inhibina, la cual frena la secreción de FSH con escaso o nulo efecto sobre la LH, además está considerada como el mayor productor del organismo de piruvato y lactato, que son utilizados como fuente de energía por el epitelio seminífero. También sintetiza MIF (Ribera et al., 2000).
9. Una función que se ha adscrito definitivamente a las células de Sertoli es la síntesis de una proteína que se une específicamente a los andrógenos (ABG). Esta proteína facilita la entrada de testosterona desde el tejido intersticial a los túbulos y su producción está controlada por la FSH. Dicha producción se ha demostrado en cultivos aislados de células de Sertoli de rata. (Cole *et al.*, 1984).

Niveles de testosterona en sangre materna y su relación con el sexo fetal**III.B.1.3.-Células germinales**

Las células germinales masculinas comprenden las espermatogonias, espermatocitos I y II, espermátidas y espermatozoides.

III.B.1.4.-Células de Leydig (Células intersticiales)

El tejido intertubular, que rellena el espacio entre los tubos y que constituye aproximadamente el 15% de la masa testicular, está constituido por fibras colágenas y de reticulina, fibrocitos, fibroblastos, adipocitos, macrófagos, vasos sanguíneos y nervios y, como elemento más característico y destacado las células de Leydig. Éstas también conocidas como células intersticiales.

Estas células están sujetas a una doble influencia hormonal, en un sentido para impulsar su maduración y multiplicación, y en otro para asegurar su actividad secretora. (Pascualini, 1973).

Las células de Leydig producen hormonas masculinas como respuesta a su estimulación por parte de la hormona luteinizante (LH), liberada por la hipófisis, a su vez estimulada por la GnRH secretada por el hipotálamo. La testosterona producida por las células de Leydig es necesaria, entre otras cosas, para la función de las células de Sertoli y la producción de espermatozoides. (Barrios, 2002)

Las células de Leydig se localizan en el tejido intersticial en estrecha aposición con los vasos sanguíneos y linfáticos. Son células poliédricas cuyo citoplasma contiene numerosas vacuolas lipídicas y abundante retículo endoplásmico liso. Los productos de secreción de estas células son los andrógenos, más la inhibina y la activina y el “factor de crecimiento parecido a insulina” o IGF-I. (Barrios, 2002)

La producción de esteroides está directamente relacionada con la cantidad de retículo endoplásmico liso presente en la célula de Leydig, ya que allí se produce colesterol a partir de acetato y se almacena libre o en compuestos esterificados. (Barrios, 2002)

Los andrógenos sintetizados en las células de Leydig salen del testículo a través de los vasos linfáticos y sanguíneos y de los túbulos seminíferos.

III.B.2.-Bioquímica de los andrógenos**III.B.2.1.-Introducción**

Las hormonas sexuales masculinas se diferencian en andrógenos naturales y sintéticos. Los andrógenos naturales derivan del anillo del androstano y son esteroides C-19 con grupos CH₃ en los carbonos C-10 y C-13. Cualitativa y cuantitativamente destacan entre ellos principalmente la testosterona y la androstendiona que se diferencian en su estructura química solamente por la existencia de un grupo hidroxilo, o bien cetónico, en el C-17. (Smidt *et al.*, 1972).

Las células intersticiales de Leydig constituyen los puntos principales de producción de andrógenos, particularmente testosterona y androstendiona. Los andrógenos se producen en cantidad relativamente importante en la cápsula suprarrenal, mientras que en el ovario o en la

placenta sólo se encuentran en pequeña cantidad. Ciertos tumores de estos órganos llegan a producir grandes cantidades de andrógenos.

Como producto de la desintegración se encuentra en orina el derivado androsterona y diversos productos de conjugación de andrógenos en forma de glucuronatos y sulfatos. Es peculiar el hecho de que en las heces de vacas preñadas se encuentren cantidades considerables de andrógenos.

Los andrógenos se trasladan por vía humoral, o sea, por sangre o linfa, desde sus lugares de producción a los órganos de destino.

Tanto los andrógenos naturales como aquellos sintéticos de estructura correspondiente, son inactivados en el hígado y, por lo tanto, solamente pueden ser aplicados por vía parenteral. (Smidt *et al.*, 1972; De Alba, 1985; Hafez, 2000).

III.B.2.2.-Estructura básica y nomenclatura

Los andrógenos, estrógenos, progesterona y hormonas de la corteza adrenal derivan del colesterol y poseen todos una estructura básica esteroídica. A partir de materiales biológicos, o bien por medio de síntesis química, se han aislado alrededor de 1800 esteroides activos. Cada una de estas hormonas posee un nombre vulgar y un nombre sistemático que describe sus características químicas y esteroisómeras.

Los andrógenos se denominan sistemáticamente (químicamente) refiriéndolos a su relación con la estructura esteroídica, androstano, con un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno, que está compuesto de 19 átomos de carbono totalmente reducidos, ordenados en tres anillos de seis átomos de carbono (A, B y C) y uno de cinco átomos de carbono. En la naturaleza aparecen distintas sustituciones en los anillos que pueden ser del tipo *-ona* (=O) o del tipo *-ol* (OH) en el carbono 3 ó 17. Éstos andrógenos se denominan como derivados del androstano y si aparece un doble enlace en uno de los anillos como derivados del androsteno. (Pascualini, 1973; Cole *et al.*, 1984; De Alba, 1985; Hafez, 2000; Malgor *et al.*, 2005).

III.B.2.3.-Esteroisomería

Las orientaciones espaciales de los anillos de la molécula de progesterona y de los sustituyentes en los átomos de carbono determinan la actividad fisiológica de las hormonas androgénicas en los órganos blanco y la unión de estas hormonas a las proteínas y/o enzimas durante su transporte, así como su actividad celular. Los átomos de carbono no se sitúan en el mismo plano. Están situados en el espacio en la conformación de silla, los sustituyentes en los átomos de carbono pueden estar en conformación *cis* ó β (por encima del anillo) o *trans* ó α (por debajo del anillo). Así, el androstano se puede presentar en dos conformaciones 5 α -androstano ó 5 β -androstano.

En los andrógenos activos los anillos A y B están en *trans* y son derivados del 5 α -androstano, o tienen un doble enlace en el anillo A entre los carbonos C-4 y C-5. Los anillos B/C y C/D están siempre en configuración *trans*. Los grupos metilo de los átomos de carbono 10 y 13 se unen en posición *cis* con respecto a la estructura total del esteroide. (Cole *et al.*, 1984).

Niveles de testosterona en sangre materna y su relación con el sexo fetal

La denominación química de la testosterona es Δ 4-androstene-17 β -ol-3-ona: delta 4 significa que existe una doble ligadura entre los carbonos 4 y 5; androstene indica su núcleo básico androstano, cambiando el sufijo ano pues no está saturado; 17-beta-ol indica que existe una función alcohol en el carbono 17 en posición beta, es decir, por encima – o por delante – del plano de la molécula; 3-ona señala una función cetónica en el carbono 3.

III.B.2.4.-Biosíntesis de los andrógenos

La célula de Leydig elabora la testosterona con intervención de procesos moleculares que se cumplen en la membrana celular, las mitocondrias y los microsomas, siguiendo líneas similares a las de la síntesis de otros esteroides hormonales. El producto específico final, la testosterona, es la resultante de los sistemas enzimáticos disponibles y de las características inherentes de la propia célula. Como en la esteroidogénesis adrenocortical, placentaria y ovárica, el material básico es el colesterol, procedente de la sangre o sintetizado a partir del acetato. El primer paso de la síntesis se cumple en las mitocondrias, que disponen del sistema enzimático para producir el cambio de la cadena lateral de colesterol, principalmente hidroxilasas, convirtiéndolo en 5-pregnenolona. La segunda etapa es completada principalmente en los microsomas, de los cuales se han podido aislar todas las enzimas necesarias para la conversión de la pregnenolona en progesterona, que es hidroxilada en seguida en hidroxiprogesterona y ésta en androstenediona, que origina finalmente la testosterona. En menor proporción, ésta puede ser producida por conversión de la pregnenolona en hidroxipregnenolona, seguida de dehidroepiandrosterona y testosterona.

La androstenediona ejerce una apreciable acción androgénica, y la dehidroepiandrosterona, mucho más reducida; ambas son también producidas por la corteza suprarrenal en cantidad considerable. Ambos compuestos, cualquiera sea su origen, pueden ser convertidos en testosterona fuera de los testículos, principalmente en el hígado, y en proporción menor en los músculos, tubos seminíferos, próstata y corteza suprarrenal. No obstante la fracción de testosterona producida por ésta vía es muy reducida. (Pascualini, 1973; Cole *et al.*, 1984; Illera, 1984; Martín *et al.*, 1985; Hafez, 2000; Malgor *et al.*, 2005).

III.B.2.5.-Catabolismo e interacciones en los tejidos sensibles a andrógenos

La testosterona, producida en las células de Leydig de los testículos, se transporta en el plasma sanguíneo por medio de unas proteínas transportadoras a las que se une de forma débil y reversible. La testosterona se une a la albúmina del suero en la sangre mientras que la testosterona-17 β -sulfato y testosterona-17 β -glucurónico se unen a la globulina transportadora de corticosteroides. La androstenediona circulante puede unirse a la albúmina del plasma ó a la globulina transportadora de corticosteroides, algunas veces puede aparecer libre.

El hígado cataboliza de forma muy activa la testosterona en androstenediona por oxidación del grupo 17 β -hidroxilo en presencia de 17 β -hidroxi-esteroide deshidrogenada (17 β -HSD). La androstenediona se reduce posteriormente a 5 α - y 5 β -androstenediona. Estas dos androstenedionas se transforman en androsterona (3 α -OH), epiandrosterona (3 β -OH) y 5 β -androsterona (inactiva). Estos tres compuestos se excretan en orina o en las heces en forma de sulfatos glucuronósidos solubles. La testosterona puede transformarse también en 5 α - y 5 β -androstenediol por reducción específica de la Δ 4-3cetoesteroid-5 α - y 5 β -reductasas y una 3 α -HSD específica. Los androstenedioles se eliminan posteriormente en forma de glucuronósidos. La importancia relativa de estas rutas depende de la actividad de estas enzimas específicas, las cuales se sabe que están presentes en el hígado, próstata, piel, etc.

La dehidroepiandrosterona se hidroliza a DHA sulfato por la acción del esteroide sulfatasa que puede transformarse en testosterona en los testículos tanto in vivo como in Vitro. La DHA sulfato aparece en cantidades 5 veces superiores a la hormona libre en el testículo. La DHA es también un producto del catabolismo de andrógenos y su forma DHA sulfato es un producto de secreción importante de las glándulas adrenales tanto en el macho como en la hembra, pudiendo tener efectos biológicos.

Los descubrimientos realizados en la caracterización cuantitativa y cualitativa de la excreción de metabolitos de andrógenos en la orina ha dado lugar a importantes avances en el campo de la endocrinología y de la terapéutica, especialmente a lo que concierne a los 17 β -cetoesteroides (17-KS). Los testículos contribuyen en un 30% del total de los 17-KS de la orina mientras que la corteza adrenal lo hace en un 70%. La androsterona y sus isómeros de menor actividad, 3 β -OH y 5 β , son los principales metabolitos de la testosterona en orina. La DHA es el 17-KS más abundante de origen adrenal. Existen métodos capaces de separar y cuantificar los 17-KS de origen adrenal y testicular, lo que permite conocer si los cambios en la cantidad total de 17-KS se deben a un fallo funcional en los testículos o en la corteza adrenal. (Pascualini, 1973; Cole *et al.*, 1984; Illera, 1984; Martín *et al.*, 1985; Hafez, 2000).

III.B.2.6.-Metabolismo en los tejidos sensibles a andrógenos

El metabolito mayoritario de la testosterona es la dihidrotestosterona (DHT). Aparentemente, las reductasas implicadas en la transformación de la testosterona en dihidrotestosterona poseen esteroespecificidad al transferir los iones de hidrógeno desde el NADPH.

El riñón utiliza testosterona como andrógeno intracelular mientras que los demás tejidos sensibles a andrógenos utilizan dihidrotestosterona.

La unión específica de la dihidrotestosterona en el núcleo está controlada por la presencia y naturaleza de los receptores citoplasmáticos, así como, por ciertos factores presentes en la cromatina nuclear, tratándose probablemente de proteínas no histónicas asociadas al ADN. (Pascualini, 1973; Cole *et al.*, 1984; Hafez, 2000).

III.B.2.7.-Secreción de andrógenos

En el macho las células de Leydig del testículo son las productoras principales de andrógenos. Se ha demostrado que el ovario produce secreciones con actividad androgénica, pero no se han podido aislar andrógenos puros de éste tejido.

Sin embargo, se han aislado andrógenos de la corteza adrenal y en mujeres con hiperplasia adrenocortical se detectan en la orina concentraciones altas de andrógenos. En pacientes con hipofunción adrenocortical disminuyen las cantidades de andrógenos en la orina. Por otra parte, después de una gonadectomía se encuentran andrógenos en orina. (Rothe, 1974; Cole *et al.*, 1984; De Alba, 1985).

III.B.2.8.-Métodos de dosaje

La determinación de la actividad androgénica de preparados químicos y de líquidos orgánicos, se logra aprovechando su propia actividad androgénica mediante pruebas

Niveles de testosterona en sangre materna y su relación con el sexo fetal

biológicas, o alguna propiedad de la molécula de testosterona, y en su caso de otros esteroides, que permite su identificación y cuantificación mediante procedimientos fisicoquímicos.

Estos exámenes se realizan cuando los síntomas indican que puede haber una producción anormal de andrógenos.

El aumento en la producción de testosterona puede indicar: (A.D.A.M, 2005)

- Pubertad precoz.
- Resistencia a los andrógenos.
- Cáncer ovárico.
- Hiperplasia suprarrenal congénita.
- Enfermedad ovárica poliquística.
- Cáncer testicular.

La disminución en la producción de testosterona puede indicar: (A.D.A.M , 2005)

- Hipopituitarismo.
- Insuficiencia testicular.
- Retraso en la pubertad.
- Enfermedad crónica.
- Prolactinoma.

Las respuestas típicas a los niveles bajos de testosterona biodisponible son: (S.A.A., 2005)

- Menor impulso sexual.
- Cambios emocionales, psicológicos y de conducta.
- Menor masa muscular.
- Pérdida de la resistencia muscular.
- Aumento de la grasa corporal a nivel central y superior del cuerpo.
- Osteoporosis o huesos débiles y lumbalgia.

- Aumento del riesgo cardiovascular.

Métodos biológicos.

Antiguamente la única forma de determinar la existencia y potencia de los esteroides androgénicos, consistía en pruebas biológicas basadas en la respuesta selectiva de ciertos tejidos, principalmente *la cresta de pollo capón*. La castración del pollo induce la involución de la cresta, que alcanza la atrofia óptima para realizar la prueba a los 6 meses. La sustancia a investigar, se aplica en inyección intramuscular o en la superficie lateral de la cresta, que después de algunos días se hipertrofia en relación con la potencia del preparado, comparándose con el crecimiento logrado en animales testigos tratados con una cantidad conocida de testosterona. También se utilizan pollos de 2 ó 3 días, sin distinción de sexo, inyectándose el material en la misma cresta durante siete días, a cuyo término se sacrifican los animales y se disecciona y pesa la cresta.

Pruebas equivalentes pueden realizarse en la rata castrada, determinando *el incremento de peso de la próstata ventral, vesículas seminales ó músculos elevadores del ano*. La testosterona ó la sustancia problema deben ser administradas subcutáneamente en siete inyecciones diarias conteniendo la dosis estándar. Los animales son sacrificados veinticuatro horas después de la última inyección y se extraen las vesículas seminales y el lóbulo ventral de la próstata; a continuación se pesan, una vez eliminada la grasa. Los resultados pueden expresarse como peso glandular total o bien como porcentaje del peso corporal.

Estos procedimientos proporcionaron la base para alcanzar los principales conocimientos acerca de la fisiología testicular, pero ya no se usan con fines clínicos, pues demandan mucho tiempo, son relativamente imprecisos, su sensibilidad es limitada y se dispone de otros muy superiores. (Pascualini, 1973; Cole *et al.*, 1984; De Alba, 1985).

Métodos fisicoquímicos.

Desde 1960 se dispone de métodos para determinar químicamente la testosterona en la orina, que más tarde fueron aplicados a la sangre.

En cuanto a la orina, se trata principalmente de métodos cromatográficos, en columna, en capa delgada o papel, valorándose la testosterona por métodos químicos, con la reacción de Zimmermann, por conversión en estrógenos o por cromatografía de gas-líquido. Con el fin de valorar la pérdida de actividad durante el procedimiento, se agrega inicialmente una cantidad conocida de testosterona marcada con C¹⁴, cuya proporción de recuperación indica la pérdida.

La sensibilidad de estos procedimientos es elevada, y permite detectar hasta menos de 0,5 µg, de testosterona en la orina de 24 horas.

Los métodos aplicados a la determinación en el plasma son aún más variados que los utilizados para la orina, y se basan principalmente en la cromatografía de gas-líquido y de doble dilución isotópica, por una parte, y por la otra en la fijación proteica de la testosterona.

La doble dilución isotópica consiste, en principio, en extraer la testosterona del plasma, agregando como primer isótopo testosterona marcada con C¹⁴, extrayendo a continuación por cromatografía, y tratando con anhídrido acético marcado con tritio (H³), con lo que se forma acetato de testosterona radiactivo, separado a su vez por cromatografía. Realizando el conteo

Niveles de testosterona en sangre materna y su relación con el sexo fetal

separado del C¹⁴ y del H³, se obtienen los valores de la testosterona agregada, marcada con los dos isótopos y la proporción de pérdida durante el procedimiento, y la testosterona de la muestra marcada sólo con el segundo.

Una gran promesa, en el sentido de facilitar las técnicas y su aplicación al diagnóstico clínico, se apoya en los métodos de desplazamiento sobre proteínas similares a los utilizados para los corticoides, con la diferencia que como proteína de fijación se usa plasma de embarazada. La testosterona se extrae de la sangre por cromatografía, y los pasos subsiguientes son similares a los aplicados al dosaje de estrógenos, pero en lugar de estradiol marcado con tritio se utiliza testosterona igualmente marcada. La valoración se realiza por comparación con una curva estándar. (Pascualini, 1973).

Actualmente, los métodos más utilizados son los inmunoensayos de electroquimioluminiscencia y quimioluminiscencia.

La quimioluminiscencia se basa en la luz producida por acción química ó luz que produce acciones químicas.

En la electroquimioluminiscencia, al igual que en la quimioluminiscencia, se generan (a partir de sustratos estables) productos capaces de emitir fotones al pasar de un estado intermedio inestable y energéticamente superior, a uno de energía inferior más estable; aunque en este caso su origen es electroquímico y no una reacción enzimática. En este inmunoensayo no competitivo, el anticuerpo utilizado recubre unas micropartículas imantadas, que tras la formación del complejo antígeno-anticuerpo, se fijan a un electrodo por magnetismo. Dicho anticuerpo está conjugado con un marcador (derivado del rutenio) capaz de emitir fotones cuando se aplica una pequeña diferencia de potencial sobre el electrodo. En cualquier caso la energía lumínica se sigue detectando en un fotomultiplicador. Las ventajas atribuibles a la quimioluminiscencia, lo son también a ésta técnica, pero además ofrecen una fácil separación entre las fases ligada y libre.

Los parámetros determinados por ésta técnica son: Folato sérico, vitamina B12, LH, FSH, estradiol, progesterona, testosterona total, prolactina (macroprolactina), TSH, T4 libre, T3 libre, AFP, CEA, CA 125, CA 15.3, CA 19.9, PSA total, PSA libre, Ag HBs y pro BNP.

III.B.3.-Fisiología

El efecto más notorio de los andrógenos consiste en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios en la época de la pubertad. En muchas especies, el pelaje típico sexual, o las diferencias en la estructura de la piel, son tan característicos para el sexo masculino como su tono de voz. Como es sabido, por tratamiento con andrógenos se masculinizan en las gallinas la forma de la cresta y el cacareo. La agresividad y el comportamiento típico masculino se atribuyen al efecto de las hormonas sexuales masculinas. En las hembras, pueden inducirse artificialmente por empleo de testosterona o manifestarse como síntomas patológicos, por ejemplo en el virilismo adrenal, en los que se producen sustancias activas androgénicas en cantidades excesivas en la corteza suprarrenal. La castración de los animales macho invierte el comportamiento masculino e incluso da lugar a alteraciones corporales que corresponden al sexo contrario. Es evidente la decisiva participación de los andrógenos en el estadio posnatal precoz para la diferenciación del hipotálamo hacia lo "masculino". Ya en el estadio fetal los andrógenos actúan en el fenómeno de diferenciación de las gónadas. Esto se muestra claramente en los gemelos de distinto sexo de algunas especies animales, en los que el animal

genéticamente femenino, bajo el influjo de los andrógenos del feto masculino, entre otras cosas, desarrolla gónadas masculinas y resulta estéril.

Los andrógenos pueden estimular continuamente la síntesis de ácidos nucleicos. Además, mediante los andrógenos se aumenta la retención de nitrógeno, fósforo y potasio, incrementándose el anabolismo de proteínas y la formación de lípidos. Mediante estos fenómenos se fomenta el desarrollo general del cuerpo, particularmente el desarrollo de los músculos y huesos, siendo también estimulados el riñón y el tiroides.

Los andrógenos actúan sobre el testículo, en el cual estimulan el desarrollo del epitelio germinal, regulan o controlan la espermatogénesis y desempeñan un papel importante en la activación y almacenaje del semen en el epidídimo. La vesícula seminal y la próstata son lugares de producción de fructosa, la cual sirve como fuente de energía para el esperma, y del ácido cítrico, el cual tiene importancia para la consistencia del plasma seminal. El desarrollo de las glándulas y la calidad de la secreción pueden servir como medida directa de la actividad androgénica. Por último, la erección del pene depende de los andrógenos, pues el tratamiento con andrógenos en animales castrados restablece o puede restablecer en ellos la capacidad para la erección.

En los animales hembra, las hormonas sexuales masculinas estimulan el desarrollo de una próstata rudimentaria, así como del clítoris, el cual, por ejemplo en la vaca, puede llegar a aumentar notablemente de peso tras un tratamiento prolongado con andrógenos. (Smidt *et al.*, 1972; Illera, 1984)

III.B.3.1.-Diferenciación sexual

El embrión pasa por un estadio de diferenciación para desarrollar los órganos sexuales, determinados por su información genética. Hasta cierto punto, los andrógenos son responsables de esta diferenciación embrionaria, ya que en su ausencia se forma el aparato sexual femenino. Los testículos de los mamíferos contienen cantidades apreciables de testosterona que, probablemente sea la responsable del desarrollo de los conductos mesonéfricos o conductos de Wolff.

Los conductos de Müller ó conductos Paramesonéfricos se forman a ambos lados del embrión, aunque sólo en la hembra tiene una prolongación definitiva en los órganos genitales cavitarios (útero y vagina). Aparecen en un engrosamiento del epitelio celómico, en el lado externo del cuerpo de Wolf, a la altura del tercer segmento torácico. Se observa una depresión lineal de este epitelio que se hunde cada vez más de delante atrás; la gotera así formada se transforma en canal, que se aísla del epitelio germinativo de la eminencia genital. En su parte más alta, los canales de Müller van paralelamente y por fuera de los conductos de Wolf; pero a nivel de la entrada de la pelvis se colocan por dentro de éstos, cruzándolos. Los cuatro conductos son en esta región englobados por un cordón conjuntivo, que recibe el nombre de *cordón genital*. Los dos tubos de Müller, situados, como hemos dicho, muy próximos, acaban por fusionarse de manera de manera completa en la hembra y sólo en su parte caudal en el macho. En la hembra se desarrollan los oviductos a expensas de las porciones craneales de los tubos de Müller, mientras que el útero procede de la fusión de las porciones caudales. En el macho, los conductos de Müller se atrofian, salvo en su extremidad más caudal, donde se sueldan, originando el llamado *utrículo prostático*. Este tiene la significación de una vagina masculina (González *et al.*, 1961; Climent *et al.*, 1989).

Niveles de testosterona en sangre materna y su relación con el sexo fetal

Los testículos de los animales domésticos se originan cerca de los riñones pero, en muchos, sino en todos los mamíferos, descienden al escroto durante la vida fetal (en aves los testículos no descienden). Los andrógenos se han utilizado con éxito relativo, para coadyuvar el descenso de los testículos cuando se están moviendo con lentitud hacia el escroto.

Es interesante que, en los fetos del caballo, los testículos alcanzan su tamaño máximo cuando el feto sólo tiene 50cm de largo. En el morueco, los testículos fetales contienen más testosterona y androstendiona a los 90 días de vida fetal que en el nacimiento o antes de la pubertad y la concentración de testosterona en el suero sanguíneo de los fetos vacunos fue mayor entre los tres y los siete meses de vida fetal que a los nueve meses y mayor en los fetos machos que en las hembras.

Los animales cuyos testículos no han descendido al escroto, llamados criptórquidos, son invariablemente estériles, aunque, por lo general, tienen una libido normal porque la producción de testosterona está sólo un poco por debajo del nivel normal. (Pascualini, 1973; Sorensen, 1982; Illera, 1984; Cole *et al.*, 1984).

III.B.3.2.-Desarrollo y mantenimiento de los órganos sexuales primarios

El crecimiento de los órganos primarios se observa sobre todo durante el periodo prepuberal. El tamaño de los testículos aumenta conforme se multiplica el número de túbulos seminíferos y se inicia la espermatogénesis. Con la mayor vascularización de la zona escrotal, tiene lugar el crecimiento de todos sus componentes: cremáster, testículo, epidídimo y conducto deferente.

El pene crece bajo la influencia de los andrógenos, y el glande y la porción terminal del pene, se separan del área prepucial a medida que los tejidos se diferencian para formar un epitelio escamoso estratificado. En ciertas especies el crecimiento de los tejidos del pene continúa con la formación de la flexura sigmoidea y con el desarrollo del lecho vascular en el propio pene.

La castración, debido a que provoca la pérdida de los andrógenos, ocasiona suspensión del crecimiento y una regresión. La administración de hormonas a un individuo castrado le ocasiona cierto crecimiento, pero nunca hasta el tamaño normal. La administración de testosterona a machos intactos puede reducir la espermatogénesis al provocar una degeneración de las células espermatogénicas; esto disminuye el tamaño de los testículos y se necesita de cierto tiempo para que se normalicen la espermatogénesis y el tamaño testicular después de suspender el tratamiento. (Mc Donald, 1969; Pascualini, 1973; Sorensen, 1982).

III.B.3.3.-Desarrollo y mantenimiento de las glándulas accesorias

El desarrollo de las glándulas vesiculares, próstata y bulbouretrales está bajo el control de los andrógenos. Todas empiezan a crecer antes de la pubertad, a medida que aumenta la potencia de los andrógenos, y siguen desarrollándose también en la madurez. En edades avanzadas, las glándulas accesorias pueden estar hiperestimuladas por la presencia de altos niveles de hormonas, lo cual provoca hipertrofias dañinas para el individuo.

La castración elimina el estímulo para el crecimiento. En temprana edad ocasiona la interrupción del desarrollo, mientras que la intervención tardía provoca regresión. La terapia con andrógenos estimula el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de las glándulas, aunque

en menor grado que la forma fisiológica. (Mc Donald, 1969; Pascualini, 1973; Sorensen, 1982; De Alba, 1985; Gabilondo *et al.*, 1998).

Los efectos de la dihidrotestosterona (DHT) sobre el desarrollo del tejido prostático se describieron en 1975, en donde se demostró que los pacientes con deficiencia congénita de 5-alfa-reductasa tenían escaso tejido prostático. (Gabilondo *et al.*, 1998).

III.B.3.4.-Libido

El deseo sexual se mantiene relativamente alto en el macho, debido al nivel de andrógenos en su cuerpo más o menos constante. La combinación de andrógenos y del comportamiento psíquico, impulsa al macho a buscar hembras en estro.

La castración borra todo deseo sexual en los animales jóvenes y en la mayoría de los maduros. Si estos últimos copularon con muchas hembras, conservan su libido después de la castración; suelen ser un problema y se les debe retirar del rebaño de inmediato, aunque es posible usarlos como recelas de hembras en estro para la inseminación artificial.

La administración de andrógenos en animales con una libido muy baja, ocasiona la aparición de actividad sexual. Las dosificaciones varían con la edad, el tamaño y el comportamiento del macho. Incluso se llega a administrar andrógenos a hembras ovariectomizadas para detectar otras hembras en celo, con la ventaja de que así no existe un pene que pueda transmitir posibles enfermedades.

La falta de libido en los machos de cría puede aumentarse mediante el uso de andrógenos, pero es mejor recurrir a un mayor estímulo y al empleo de alguna fuente de ICSH para permitir que las células intersticiales sinteticen una mayor cantidad de hormona. (Pascualini, 1973; Sorensen, 1982; De Alba, 1985).

III.B.3.5.-Control endocrino de la espermatogénesis

Para el funcionamiento testicular normal se requiere de estimulación hormonal por gonadotropinas adenohipofisarias, las cuales a su vez son controladas por la secreción pulsátil de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) del hipotálamo. En la rata hipofisectomizada, es posible restablecer la espermatogénesis mediante tratamiento con FSH y LH o con FSH y testosterona, indicando que el soporte hipofisario es esencial, ya que la hipofisectomía, extirpación quirúrgica de la hipófisis, produce la supresión de la espermatogénesis. Sin embargo, dosis altas de testosterona sola mantienen la espermatogénesis en ratas hipofisectomizadas, siempre y cuando el tratamiento se inicie inmediatamente después de la extirpación de la hipófisis. No obstante, en otras especies se requiere hormona folículo estimulante además del esteroide para mantener la espermatogénesis.

Es posible que otras hormonas hipofisarias (como la prolactina, hormona de crecimiento y hormona estimulante del tiroides) tengan funciones secundarias en el apoyo del funcionamiento testicular. Los testículos no sólo producen el principal andrógeno, la testosterona, sino también una serie de hormonas esteroides.

Al parecer la principal acción de los andrógenos es sobre las células de Sertoli más que directamente sobre las germinales. Igualmente las células mioides también dependen de

Niveles de testosterona en sangre materna y su relación con el sexo fetal

andrógenos. La dependencia de esteroides se satisface mediante la producción pulsátil de andrógenos por las células intersticiales de Leydig, que son adyacentes a los túbulos seminíferos.

Las células de Leydig son estimuladas por pulsos de LH hipofisaria para secretar andrógenos. Los andrógenos producidos por las células mencionadas no sólo se difunden en las células de Sertoli adyacentes, sino que también se secretan en la sangre, donde ejercen retroalimentación tanto en el hipotálamo como en la hipófisis para bloquear la liberación de LH adicional. La otra gonadotropina principal, FSH, estimula la producción de ABP e inhibina por las células de Sertoli.

La ABP forma un complejo con los andrógenos y es transportada junto con los espermatozoides hacia el epidídimo. Las células epiteliales del epidídimo requieren concentraciones relativamente elevadas de andrógenos para su funcionamiento normal. La inhibina tiene un efecto de retroalimentación negativa sobre la secreción de FSH, pero no sobre la LH.

Aunque gran parte de la testosterona secretada en los túbulos seminíferos es convertida en dihidrotestosterona (DHT) por una enzima reductasa de este esteroide, otra parte es convertida en estrógenos por una enzima aromatasas. Se requiere una concentración relativamente alta de testosterona para la maduración de las espermátides.

Las células de Sertoli y germinales regulan recíprocamente su secreción de proteínas a lo largo del tubo seminífero. Este proceso es amplificado por las células mioideas a través de los factores de crecimiento transformante, moduladores humorales y modificación de la matriz extracelular.

La activina y la inhibina, que son secretadas por las células de Sertoli, tienen la notable característica de generar diversas señales. Las activinas, potentes dímeros (de subunidades β de inhibina) liberadores de FSH, tienen mecanismos paracrinos (que inhiben la secreción de hormona del crecimiento y de adenocorticotropina) y autocrinos (que estimulan la secreción de FSH).

La activina y la inhibina también actúan dentro de las gónadas como moduladores autocrinos y paracrinos de la producción de esteroides, otras hormonas y factores de crecimiento. Es posible que el factor de crecimiento transformante (TGF), un péptido multifuncional inducido en respuesta a esteroides, participe en la regulación del funcionamiento testicular.

Dos grupos de compuestos intervienen en la regulación del eje hipotálamo-hipofisario gonadal. Estos son:

- Neurotransmisores, dopamina, serotonina y noradrenalina.
- Opioides cerebrales y otros péptidos

Otros moduladores fisiológicos de la proliferación celular, como las chalonas, influyen en el ciclo celular del epitelio seminífero. (Pascualini, 1973; Sorensen, 1982; Cole *et al.*, 1984; Martin *et al.*, 1985; Hafez, 2000; Marina, 2003; Paz y Miño *et al.*, 2003; Malgor *et al.*, 2005).

III.B.3.6.-Caracteres secundarios

Comúnmente se dice que el animal macho tiene una apariencia masculina. Los caracteres que ocasionan esta condición están bajo la influencia de los andrógenos; la ausencia de dichas hormonas provoca la aparición de caracteres femeninos o, quizá, una apariencia de animal castrado.

Pelo

Los esteroides sexuales masculinos influyen en la pigmentación y crecimiento del pelo en los mamíferos, y en la pigmentación y crecimiento de las plumas en las aves de corral. El pelaje de los machos poseedores de atributos masculinos bien manifiestos tiende a ser más oscuro, especialmente en ciertas regiones del cuerpo, que en los machos castrados o en las hembras.

Por lo general el pelo es más grueso, y tal vez más rizado en el macho que en la hembra; además, suele tener un aspecto más áspero. Los de la cabeza de algunos toros adoptan una apariencia rizada a la que se denomina "bucles". En el hombre, la aparición de vello facial depende de la testosterona; la calvicie está bajo el control de los genes, pero también es influenciada por esta hormona. (Mc Donald, 1969; Pascualini, 1973; Sorensen, 1982).

Cuernos

Por lo general, los cuernos de los machos son más largos que los de las hembras y tienen una base más ancha. En el caso de las ovejas, la presencia de los mismos puede estar ligada al sexo y sólo los machos los presentan.

En otras especies, el desarrollo de las astas sufre la influencia definitiva de los incrementos en el nivel de testosterona, pero la descamación de la zona velluda, y la caída final de las astas, está bajo el control exclusivo de dicha hormona. La castración de un animal, cuando las astas todavía tienen la cubierta velluda, ocasiona la retención de ambos elementos; un nivel bajo de testosterona, en condiciones normales provoca la caída de las astas. Si se administra dicha hormona cuando la cornamenta todavía está presente, el macho no la pierde sino hasta que se reduce el nivel de la hormona. (Sorensen, 1982).

Sonidos guturales

Las cuerdas vocales crecen a medida que se alcanza la pubertad por lo que se cambia el sonido de la voz: el timbre agudo del becerro, el cordero o el niño, se vuelve grave durante ese periodo. Es muy probable que el fenómeno sea más notable en el hombre que en los animales domésticos. La castración provoca la retención del timbre soprano o agudo, lo que condujo a la castración de los niños del coro papal, hasta el siglo XIX, para garantizar que sus voces no se alteraran. (Pascualini, 1973; Sorensen, 1982; De Alba, 1985).

Músculo

La mayor evidencia del efecto anabólico (metabolismo de asimilación) de andrógenos es el desarrollo muscular del macho. La retención de nitrógeno y su conversión en aminoácidos y proteínas musculares, confiere al macho su conformación particular. En general, la

Niveles de testosterona en sangre materna y su relación con el sexo fetal

formación de músculos es uniforme en todo el cuerpo, pero los de los hombros y los muslos, así como los del cuello, se vuelven más pronunciados.

El cuello agrandado, sobre todo como se observa en los toros, se denomina cresta. Esta área engrosada es una acumulación de fibras musculares que aparece principalmente en la parte dorsal, aunque también se forma a los lados. La cresta no debe confundirse con la joroba del ganado cebú, que se presenta igualmente en machos y hembras. Los efectos benéficos de la testosterona se evidenciaron en experimentos de nutrición; con moruecos intactos o con “escroto corto”. Estos observaron mayores ganancias diarias de peso e índices de conversión y canales más pesados de mayor calidad que los animales castrados. (Pascualini, 1973; Sorensen, 1982; De Alba, 1985)

Hueso

La testosterona ejerce una acción bien definida sobre el crecimiento. Dicha acción es doble y disociada. Por una parte estimula la actividad de los cartílagos epifisarios, tanto metabólicos como de las células cartilaginosas y de la aposición ósea, y estimula considerablemente la síntesis proteica de todos los tejidos. Por otra parte, los andrógenos aceleran la maduración y osificación de los cartílagos, con lo cual adelantan la detención del crecimiento. Por esto el exceso de testosterona adelanta el crecimiento.

La testosterona posee un tropismo específico sobre los cartílagos de crecimiento, semejante al que tiene sobre las estructuras sexuales y la laringe, en tanto que sobre el metabolismo proteico lo hace acelerando el proceso de su síntesis.

La castración determina un exceso de crecimiento debido al retardo de la osificación de los cartílagos epifisarios. (Pascualini, 1973; Sorensen, 1982)

III.B.3.7.-Acción metabólica

La testosterona, y en la medida correspondiente otros esteroides androgénicos, ejercen una marcada acción metabólica, que se refleja en modificaciones estructurales y de la masa de diversos órganos y tejidos, y en algunos cambios funcionales.

En conjunto induce aumento de peso por aumento de las masas musculares y óseas y de los órganos internos, actuando en sentido inverso que la castración, aunque después de ésta el peso corporal puede aumentar debido a la acumulación de tejido adiposo.

Metabolismo de las proteínas

La testosterona ejerce una potente acción anabólica, con retención de nitrógeno y disminución de su excreción urinaria, con aumento de la síntesis de tejidos, y según el caso, hipertrofia celular o hiperplasia. La formación de urea está disminuida, lo mismo que la de creatinina, las cuales aumentan sustancialmente cuando existe insuficiencia androgénica.

La acción anabólica proteica se refleja en el efecto miotrófico, con el ya mencionado aumento del volumen muscular, y en los efectos organotróficos, patentes en particular en el hígado, el corazón y los riñones. En algunas especies esta acción se extiende a las glándulas salivales submaxilares, lo cual es patente en el ratón. Estos efectos, caracterizados

principalmente por la hipertrofia, son los determinantes de la diferencia de peso visceral entre ambos sexos.

La piel, incluyendo el pelo y sus glándulas, y el tejido conjuntivo en general, particularmente el integrante del sistema vascular periférico, sufren una influencia análoga.

La testosterona también ejerce acción sobre la sangre, estimulando la eritropoyesis y la reticulocitosis. Favorece la involución del timo y otros tejidos linfáticos, a lo cual se atribuye el menor volumen del bazo en el macho comprobado en algunas especies. (Pascualini, 1973; Malgor *et al.*, 1975; Valsecia *et al.*, 1988).

Metabolismo de las grasas

No cabe duda que la testosterona influye no sólo en el contenido total, sino también en la distribución del tejido adiposo subcutáneo y de algunas áreas profundas. En este sentido existen diferencias entre las especies, y así, mientras algunas lo pierden después de la castración, otras lo aumentan, siendo esto último lo más común en aves y mamíferos.

Un estudio realizado por Chen *et al.*, (2005) en pollos, mostró que en los pollos capones disminuía la concentración de testosterona en sangre e incrementaba el peso de la grasa abdominal. A su vez, también incrementaba la lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL), y disminuía el colesterol libre de LDL, HDL-FC y los porcentajes de fosfolípido HDL.

Después de la castración, la adiposidad es condicionada por el desequilibrio creado por insuficiencia de testosterona con la insulina, somatotrofina (GH), catecolaminas y probablemente, prostaglandinas. (Pascualini, 1973).

Metabolismo de los hidratos de carbono

La acción de la testosterona es limitada, habiéndose señalado una disminución del glucógeno muscular y hepático. (Pascualini, 1973).

Metabolismo mineral

Se produce retención de sodio, cloruros, potasio, calcio, fosfato, sulfato y agua, con disminución de su excreción urinaria y aumento de su concentración en el medio interno, y en lo que concierne a algunos de ellos, de su incorporación a los tejidos. El mecanismo de estos efectos es complejo, y en algunos son indirectos, como la retención de calcio y fosfato, vinculada a la acción anabólica, incluyendo el aumento de la matriz proteica del hueso con retención secundaria de sales, en tanto que ni la calciuria ni la fosfaturia aparecen modificadas.

La retención de sodio implica la de agua, con aumento del espacio extracelular, que secundariamente puede traducirse en edema e hipertensión.

El metabolismo basal puede experimentar un ligero aumento, lo mismo que el cociente respiratorio y la frecuencia cardiaca. (Pascualini, 1973; Malgor *et al.*, 2005).

Niveles de testosterona en sangre materna y su relación con el sexo fetal**III.B.4.-Tratamiento hormonal**

La testosterona se usa para la supresión del celo, especialmente en los galgos de competición. La *mibolerona*, un esteroide androgénico débil, se usa para prevenir el celo en perras. No debe emplearse en gatos, y puede exacerbar los tumores perianales. La administración crónica de testosterona puede producir degeneración testicular en los machos.

La *finasterida*, un inhibidor de la 5 α -reductasa, impide la conversión de testosterona en 5 α -dihidrotestosterona, el andrógeno activo en las glándulas sexuales accesorias masculinas. Es útil en el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna en el perro. La *flutamida* bloquea los receptores de dihidrotestosterona y se emplea con el mismo propósito.

Las modificaciones químicas de la testosterona potencian sus efectos anabolizantes a la vez que reducen sus efectos virilizantes. Estos compuestos (es decir, *el undecilenato de boldenona*, *el estanozolol*, *el decanoato de nandrolona*) se emplean por sus efectos anabolizantes en animales convalecientes ó de competición. Su uso prolongado puede causar al menos infertilidad temporal en ambos sexos.

La testosterona, es un potente anabolizante en concentraciones relativamente elevadas de 1 a 5ng/ml, no se usa individualmente como anabolizante en los animales de granja. Generalmente se usa en forma de *propionato* junto con 20mg de *benzoato de estradiol* en un implante ó en comprimido; su principal función puede ser el enlentecimiento de la tasa de liberación de estradiol. En concentraciones sanguíneas elevadas, inducen conductas sexuales en el macho (por ejemplo, agresión y monta), lo cual no constituye un problema con las concentraciones que se suministran en las formulaciones actuales; el comportamiento resultante del uso de 20mg de benzoato de estradiol y 200mg de progesterona, no difiere del que se observa tras administrar 20mg de benzoato de estradiol y 200mg de propionato de testosterona. (Hafez, 2000).

III.B.5.-Esteroides anabolizantes

Los esteroides anabolizantes son derivados sintéticos de la testosterona con mayor actividad anabolizante y escasa actividad androgénica. La testosterona ó sus derivados se difunden a través de las membranas celulares de los órganos diana, y se combinan en el citoplasma con proteínas receptoras específicas. El complejo hormona-receptor migra al núcleo celular y se une a la cromatina celular, estimulando la producción de ARN mensajero específico. El ARN mensajero regula entonces la síntesis de la enzima responsable de la actividad fisiológica del esteroide anabolizante.

Los esteroides anabolizantes estimulan y mantienen un equilibrio de nitrógeno positivo, reduciendo la eliminación renal de nitrógeno, sodio, potasio, cloro y calcio (Asensio, 2002). La producción de miosina y proteínas miofibrilares sarcoplasmáticas se incrementa. Los esteroides anabolizantes estimulan el apetito, la ganancia de peso, y mejoran la capacidad mental, por lo que se emplean para mejorar el debilitamiento asociado a la cirugía, a los traumatismos, a la enfermedad, al catabolismo inducido por glucocorticoides y a la edad. En todos los casos, la mejora en el bienestar depende del consumo adecuado de proteínas y calorías y del tratamiento de la enfermedad subyacente. (Asensio, 2002)

Los esteroides anabolizantes presentan numerosos efectos indeseables. Inducen efectos androgénicos, como un aumento de libido en los machos y un comportamiento sexual

anormal en las hembras, además de alteraciones en la reproducción, como azospermia, disminución de la libido, atrofia testicular, hipertrofia del clítoris e inhibición de la formación de folículos y de la ovulación. Favorecen la formación de edemas debido a la retención de sodio y agua. Pueden provocar picazón, ictericia y peliosis hepática (degeneración hemorrágica de un quiste en el hígado, lo cual puede llegar a fibrosis y a hipertensión portal) por colestasis intrahepática (Harm, 2005; Malgor *et al.*, 2005). Los esteroides anabolizantes pueden inducir la fusión de la placa epifisaria, retrasando por tanto el crecimiento.

Los esteroides anabolizantes también afectan al sistema cardiovascular provocando cambios estructurales en el corazón con hipertrofia del ventrículo izquierdo y una reducción en la relajación diastólica. (Harm, 2005)

El uso de estos agentes también afectará al perfil de lípidos séricos. El colesterol total tiende a incrementarse, mientras que el colesterol HDL muestra una marcada reducción. El colesterol LDL muestra una respuesta variable: un ligero aumento o sin cambios. (Harm, 2005; Malgor *et al.*, 2005).

Los esteroides anabolizantes se emplean en la práctica veterinaria en el tratamiento de animales debilitados; sin embargo, frecuentemente se utilizan de forma ilegal para obtener ventajas en los animales de competición (elevación de los glóbulos rojos). (Hafez, 2000; Glenn *et al.*, 2004).

Los andrógenos anabolizantes más importantes son: (Malgor *et al.*, 2005)

- Nandrolona decanoato.
- Nandrolona fenilpropionato y desoxicorticosterona.
- Oximetolona.
- Metenolona.
- Estanozolol.

En general, las indicaciones terapéuticas para este grupo de agentes incluyen: (Manual Merck Veterinaria, 1993; Malgor *et al.*, 2005).

- Fomento del crecimiento.
- Edema angioneurótico hereditario.
- Debilidad después de enfermedad y cirugía.
- Distrofia muscular.
- Casos geriátricos.
- Tumores mamarios.

Niveles de testosterona en sangre materna y su relación con el sexo fetal

- Anemia.
- Insuficiencia renal.
- Osteoporosis y afecciones ortopédicas.
- Trastornos hepáticos.
- Uso prolongado de corticosteroides.

El uso clínico inadecuado de estos agentes sería: (Asensio, 2002)

- Disfunción eréctil.
- Infertilidad masculina.
- Déficit parcial de testosterona.

III.B.6.-Antiandrógenos

Los antiandrógenos son sustancias que bloquean la fijación de la testosterona a nivel de sus receptores, anulando sus efectos. Deben distinguirse de los agentes que suprimen la producción testicular por inhibición de las gonadotropinas a nivel hipotalámico ó de los tejidos periféricos, y también de los compuestos que desvían la esteroidogénesis testicular.

Las sustancias de este tipo mejor conocidas hasta ahora en base a una extensa experimentación animal y una creciente investigación terapéutica son: *estrógenos* (no en bajas concentraciones), *progesterona*, *noretandrolona*, *11 α -hidroxiprogesterona*, *metil-colantreno*, *α -norprogesterona*, *acetato de ciproterona*, *dietilestilbestrol*, *flutamida*, *finazteride*, *ketoconazol*, *bicatulamida*, *dutasterida*, *nilutamida* y *espirolactona*.

Aparte de las implicaciones fisiológicas y clínicas, estas sustancias revisten el particular interés experimental de proporcionar un recurso singular para el estudio de todas las funciones de la testosterona, pues permiten efectuar una especie de castración química, cuyos frutos pueden llegar a ser tan significativos como lo fue la castración, así por ejemplo posibilitan estudiar los efectos de la supresión de andrógenos en cualquier momento del desarrollo embrionario y fetal, y su repercusión sobre la diferenciación sexual. (Smidt *et al.*, 1972; Pascualini, 1973; Illera, 1984).

III.B.7.-Factores que afectan a la función de las células de Leydig

La función esteroide del testículo corre paralelamente a la actividad gametogénica en los machos durante la estación reproductora. Como consecuencia, las glándulas accesorias y los caracteres sexuales especiales experimentan los cambios correspondientes en estas especies.

En contraste con el grave efecto dañino de la posición intraabdominal o de cualquiera otra ectópica de los testículos sobre el epitelio germinal, las células de Leydig de los testículos con criptorquidia artificial desempeñan su función durante algún tiempo, como ha podido demostrarse basándose en el tamaño de las glándulas sexuales accesorias, en la agresividad y

la libido. Sin embargo, existen pruebas en el sentido de que es afectada la función de las glándulas sexuales accesorias.

La prolongación del estado criptóquidico produce los cambios hipofisarios y la atrofia de las glándulas sexuales accesorias típica de la carencia de andrógenos. Se ha observado que el testículo criptóquidico unilateral en ratas poseía menos capacidad que el testículo escrotal para convertir la progesterona en 17-alfa-hidroxiprogesterona, 4-alfa-androstenediona y testosterona. Además el testículo abdominal mostraba menos susceptibilidad a la respuesta de la estimulación por gonadotropina coriónica humana (HCG). Eik-Nes (1966) (citado por McDonald, 1969) midió los ritmos de secreción de testosterona en las venas espermáticas de perros con criptorquidia congénita unilateral. Tanto el testículo eutópico como el criptóquidico secretaron cantidades menores de la hormona.

La administración de dietas exentas de proteínas a ratas macho sexualmente inmaduras produce regresión del aparato reproductor, y la prescripción de dietas ricas en proteínas sólo invierte parcialmente la deficiencia de la secreción de andrógenos. La restricción del ingreso dietético, que produce carencia de energía, causa atrofia y disminución funcional de las glándulas sexuales accesorias. La restricción energética en carneros redujo el flujo sanguíneo testicular y la captación de oxígeno y glucosa, así como el gasto diario de testosterona.

La exposición al frío intenso (-5° C), causa atrofia de las glándulas sexuales accesorias similar a la producida por restricción de energía, y también un efecto adicional sobre estas glándulas por depresión ulterior de la secreción de andrógenos, que bien puede ser debida a disminución adicional del reflujo sanguíneo.

Los resultados de experimentos encaminados a valorar los efectos de la testosterona exógena sobre la función de las células de Leydig, debe interpretarse teniendo en cuenta que las dosis iguales, ó incluso mayores, que los valores fisiológicos, pueden suprimir la función de dichas células, pero conservar los órganos dependientes de los andrógenos.

Las concentraciones de fructosa seminal aumentaron en relación con la dosis de testosterona administrada a verracos sanos, pero después de la castración la testosterona restableció los valores a niveles aproximadamente iguales a los observados antes del tratamiento, y la administración de cantidades adicionales de testosterona no influyó en absoluto sobre las concentraciones de éste azúcar. Además, se registró mayor variación en las concentraciones de fructosa seminal entre los animales sometidos a estudio que entre las dosis de testosterona. Estos hallazgos indican que ciertos factores no testiculares condicionan a las glándulas vesiculares a los efectos de los andrógenos, y que estos reciben la acción sinérgica de otros factores testiculares no identificados.

La radiación produce daños graves en el epitelio germinal de machos después de la pubertad, pero las células de Leydig no parecen afectarse como se demuestra por observación de las glándulas sexuales accesorias. No se han dilucidado los efectos de la radiación sobre las células intersticiales prepuberales, en trance de diferenciación y proliferación, aunque podrían ser más susceptibles que en la edad adulta. Las sales de cadmio producen necrosis selectiva del testículo en ratas, ratones, conejos, cricetos, cobayos, machos cabrios y monos. A la necrosis completa del epitelio seminífero y del tejido intersticial sigue una regeneración de las células de Leydig, pero el epitelio espermatogénico es destruido de forma permanente. El efecto del cadmio consiste en necrosis isquémica primaria. Algunos animales son insensibles a las sales de cadmio por vía subcutánea, pero casi todas las especies estudiadas son sensibles a las inyecciones intratesticulares.

Niveles de testosterona en sangre materna y su relación con el sexo fetal

El Zinc protege al testículo de la destrucción por cadmio durante 10 días después de la inyección de este metal, pero el efecto protector del Zinc no es indefinido. La regeneración del tejido intersticial es sin duda más metódica, y mejor organizada en los testículos de ratas que reciben cadmio y Zinc, que cuando se administra tan sólo el primero. Aproximadamente un año después de una sola inyección subcutánea de cloruro de cadmio, el 70 a 80 por 100 de los ratones y ratas inyectados, presentan tumores de células intersticiales. La administración de Zinc impide la formación de dichos tumores después de la inyección de cadmio.

A su vez, el Zinc tiene una función bacteriostática, estabilizando el núcleo del espermatozoide y mejorando la capacidad de fecundación. (Gabilondo et al., 1998).

La deficiencia de Zinc provoca mayor actividad aromatizante sobre la testosterona a estradiol en el hígado. Este sería uno de los mecanismos responsables de la disminución de la testosterona circulante y el aumento de los estrógenos. La deficiencia de Zinc también causa disminución de la conversión de testosterona a dihidrotestosterona (DHT), así como una producción disminuida de otros metabolitos 5α -reducidos de origen hepático.

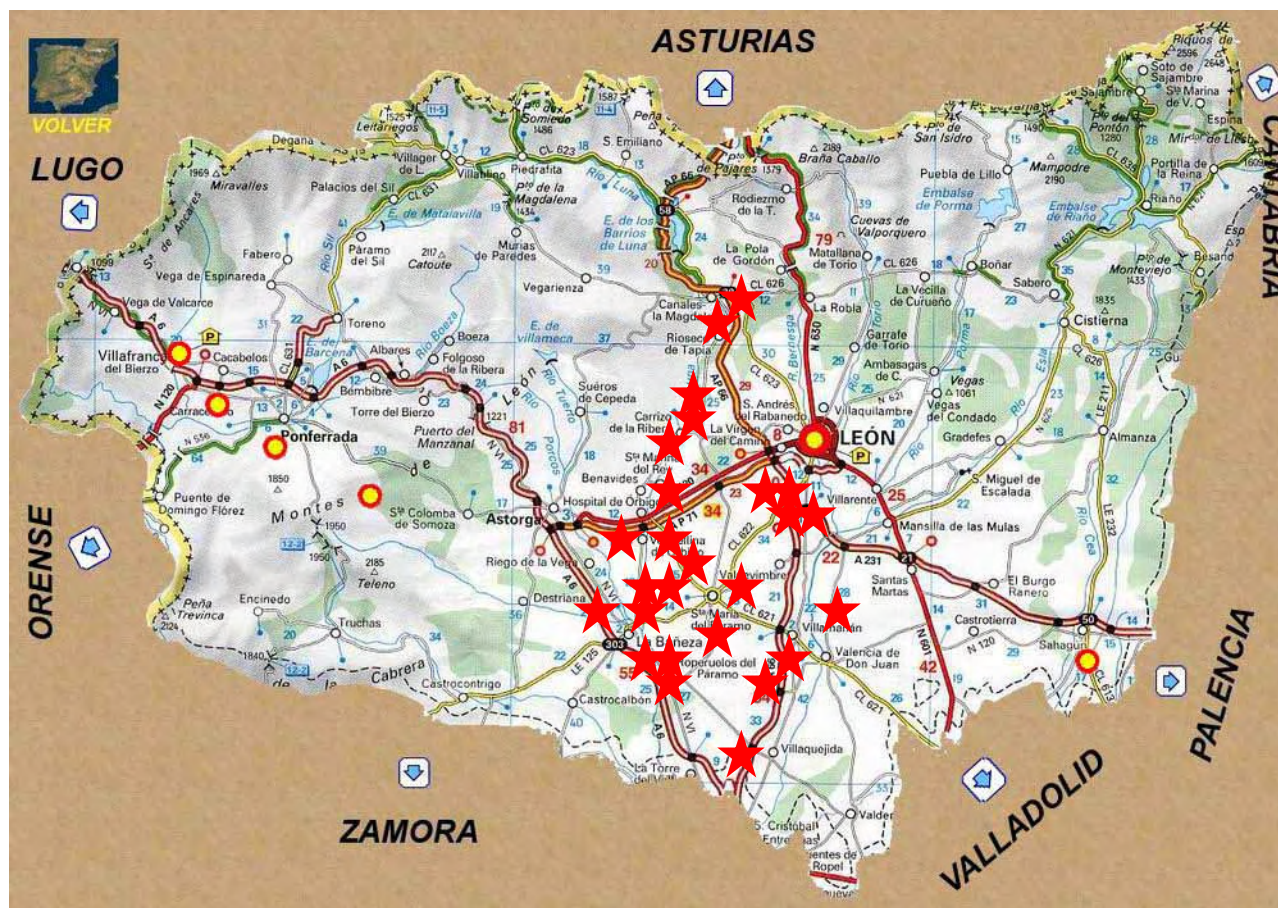
El Zinc participa en la síntesis de las hormonas luteinizante (LH) y foliculo estimulante (FSH). La LH regula la producción de testosterona por estimulación de la esteroideogénesis en las células de Leydig, vía el aumento de la disponibilidad de sustratos esteroides, y el incremento de la actividad de las enzimas relacionadas con este proceso anabólico. La disminución de los niveles de LH y testosterona circulantes a causa de la deficiencia de Zinc afecta negativamente la actividad de las células de Leydig. (Salgueiro *et al.*, 2004)

Se han producido también, tumores de células de Leydig en ratas y ratones por la administración de grandes dosis de estrógenos, trasplante de tejido testicular debajo de la cápsula esplénica o en la cámara anterior del ojo de animales gonadectomizados, y por ligadura de los vasos que riegan el testículo y el sistema de conductos escrotales. Los tumores de células de Leydig son frecuentes en el testículo de perros y toros. En individuos antes de la pubertad estos tumores secretan andrógenos y provocan desarrollo sexual temprano; los fragmentos de tumores de células intersticiales humanas sometidos a incubación produjeron andrógenos a partir de pregnenolona. (Mc Donald, 1969)

IV. MATERIAL Y MÉTODOS.

Material y métodos**IV.- MATERIAL Y MÉTODOS.****IV. 1.- Animales utilizados**

En la presente Tesis Doctoral se han utilizado un total de 729 vacas de raza frisona pertenecientes a 37 explotaciones intensivas de ganado vacuno, situadas en: Villademor de la Vega, Agadefe, Cimanes de la Vega, Toral de los Guzmanes, San Esteban de Villacabriel, Cebrones del Río, Valcabado, Moscas del Páramo, Azares del Páramo, Valdefuentes, Laguna Dalga, Valdesandinas, Santa M^a de la Isla, Villagarcía de la Vega, Seison de la Vega, Mansilla del Páramo, Bustillo, Fojedo, Mozondiga, Palacios de Fontecha, San Martín del Camino, La Milla del Río, Quintanilla de Sollamas, Llamas de la Ribera, Callejo de Ordás y Carrocera. Todas estas explotaciones pertenecen a la Cooperativa AFRIVEPA (Asociación Frisona Vega-Páramo) de Santa M^a del Páramo (León).



★ Ubicaciones de las explotaciones intensivas de ganado vacuno pertenecientes a la Cooperativa AFRIVEPA de Santa M^a del Páramo (León).

Los animales utilizados se encuentran en explotaciones de carácter intensivo, con una media de producción entre los 8000 y 10000 litros por lactación. Su alimentación se prepara con un carro Unifeed. En éste se incluye harina de maíz, cebada, soja, algodón y pulpa de remolacha. La alimentación se complementa con forraje, concentrados y corrector vitamínico- mineral. Cada hembra está identificada individualmente mediante pendientes o collares numerados, estando integradas en un programa de control reproductivo. Se realizan

Material y métodos

2ª Fase.- Una vez tomados los parámetros de referencia obtenidos en el apartado anterior, y comprobando a través de una comparación de medias utilizando el procedimiento t-test (prueba no pareada), que los cambios más significativos para el diámetro, área y volumen del CL entre vacas gestantes y no gestantes se encuentran en los días 13, 16 y 21 del ciclo, se estudió el CL de vacas inseminadas los días previamente establecidos como útiles para establecer un eficaz método de diagnóstico de una posible gestación, es decir, a cada vaca inseminada se realizaron las siguientes exploraciones:

- Estudio ecográfico del CL el día 13 post-IA.
- Estudio ecográfico del CL el día 16 post-IA.
- Estudio ecográfico del CL el día 21 post-IA.

En esta fase se utilizaron 302 vacas. De las que 124 quedaron preñadas y 178 no.

3ª Fase.- Esta tercera fase experimental se divide en dos apartados:

a) Determinación de la testosterona plasmática en vacas no gestantes y recién paridas (de cero a diez días), y en vacas preñadas entre los siete y nueve meses de gestación. Para este estudio, se utilizaron 40 vacas, de las cuales, 20 estaban vacías, 10 recién paridas y otras 10 preñadas entre los siete y nueve meses de gestación.

b) Predicción del sexo del feto por determinación de la testosterona en sangre periférica de la madre. En esta fase experimental se utilizaron 311 vacas preñadas (entre 90 y 100 días de gestación).

IV. 3.-Ecógrafo y exploración ecográfica del Cuerpo Lúteo

Las exploraciones ecográficas del CL a 378 vacas de raza frisona para poder establecer un posible diagnóstico ultraprecoz de gestación, se realizaron con un ecógrafo SONOVET 2000, con una sonda multifrecuencia LV4-7AD.

Los transductores estaban especialmente diseñados para una inserción transrectal.

Los animales a explorar se colocaban en los amarres de alimentación. Con la mano enguantada y convenientemente lubricada, se realizaba un vaciado del contenido del recto, una palpación rectal para localizar los ovarios y luego se introducía la sonda ecográfica. Hay que hacer un buen contacto entre la sonda y la mucosa rectal para evitar que el aire impida la propagación de las señales ecográficas y atenúe el haz incidente.

Lo primero que aparece en la pantalla del ecógrafo es la vejiga urinaria, caracterizada por la ausencia de ecos en su cavidad. A continuación, y cranealmente se observa el pubis: área de alta ecogenicidad. Avanzando, una vez que la sonda está sobre el útero se escanea lateralmente en varios planos para la localización de los ovarios. Moviendo el transductor a lo largo de la superficie del ovario se identifica la presencia de las estructuras ováricas, y por lo tanto del CL si existe. Buscando cortes ecográficos claros del mismo se congela la imagen, y con el caliper del ecógrafo se toman las medidas del diámetro mayor y menor del CL (medidas entre los puntos más distales).

En el caso de existir cavidad luteal apreciable ecográficamente, también se registraron los valores de sus diámetros (mayor y menor).

Tal como se ha expuesto en la revisión bibliográfica, nos encontramos con una ecogenicidad diferente según los tipos de CL, es decir, según si se trata de CLs jóvenes, maduros ó en regresión.

- **CL joven:** era difícil de localizar, especialmente sino habíamos visualizado previamente el folículo preovulatorio. Ecográficamente es una zona pobremente definida.
- **CL maduro:** nos aparecería como una estructura con borde bien definido y diferenciable del estroma ovárico. Tiene un color grisáceo de aspecto granular.
- **CL viejo:** la línea de demarcación es tenue, debido ya a una ligera diferencia de ecogenicidad con el estroma ovárico.

IV. 4.- Diagnóstico clínico de gestación por palpación rectal

La palpación rectal se utiliza desde hace más de 60 años como un método de diagnóstico de gestación en la vaca y aún se acepta generalmente como el método más útil, práctico y fiable. Este método clínico de diagnóstico está basado en la apreciación, por exploración rectal de una serie de modificaciones que ocurren en el útero durante la gestación, y que en resumen son las siguientes (García Alfonso, C. 1962):

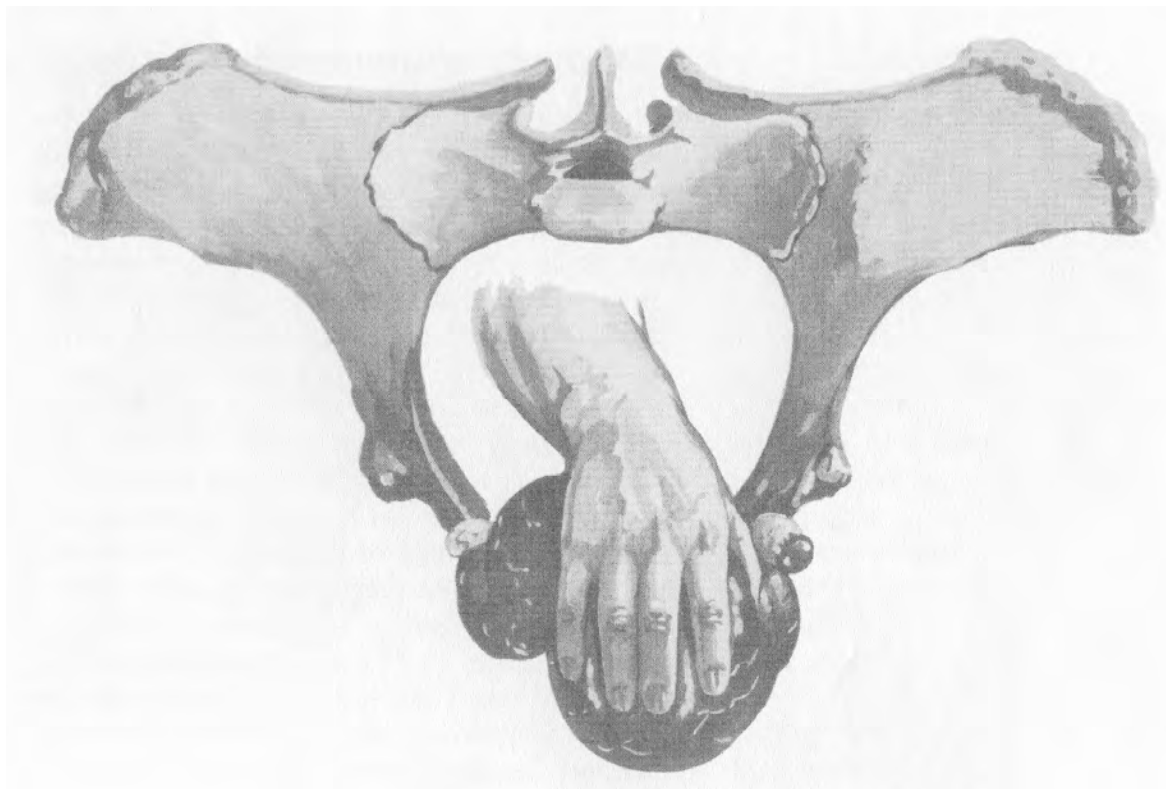
Asimetría del cuerno gestante
 Deslizamiento de las envolturas fetales
 Sensación de fluctuación
 Palpación de la vesícula amniótica
 Palpación de cotiledones
 Presencia fetal
 Examen de la arteria uterina

Asimetría cornual

A menos que haya dos embriones gemelos, uno en cada cuerno uterino, es posible detectar una diferencia en el tamaño de los dos cuernos uterinos. Esto se debe en gran parte a la presencia de líquidos fetales, en concreto, el líquido alantoideo, que concede al cuerno uterino un tacto fluctuante con un buen tono. Puede parecerse al tacto de un globo que se ha llenado con agua hasta el extremo en que la pared comienza a estirarse. Al mismo tiempo, si la pared del cuerno se aprieta puede apreciarse que es mucho más delgada que la del cuerno no gestante.

En muchos casos puede realizarse un diagnóstico definitivo de gestación a partir de estos indicios. La presencia de un cuerpo lúteo en el ovario contiguo al cuerno aumentado de tamaño es un signo útil para dicha confirmación. Sin embargo, puede realizarse un diagnóstico de gestación falso en casos de piómetra, mucómetra o de involución uterina incompleta.

Material y métodos



Fotografía n° 15. Detección de la preñez en la vaca por asimetría cornual (Arthur. G., 1991).

Palpación de la vesícula amniótica

Este método fue descrito por primera vez en 1923 por los veterinarios alemanes Pissst y Rüther (citado por Arthur. G., 1991), que afirmaron que eran capaces de identificar el amnios hacia el final del primer mes de gestación.

El método consiste en la localización de la bifurcación de los cuernos uterinos, la parte libre de los cuernos y se palpan suavemente en toda su longitud entre el pulgar y los dos dedos medios. Se puede distinguir el amnios como una estructura turgente y redonda de 1 a 2 cm de diámetro que flota en el líquido alantoideo. No se debe comprimir directamente la vesícula, pero se puede empujar con suavidad hacia delante y hacia atrás.

Como ocurre en todas las técnicas rectales, el cuidado es fundamental y debe evitarse tanto la presión excesiva como la manipulación brusca.

Palpación del alantocorion (deslizamiento de la membrana)

El método se basa en el hecho de que en la vaca la implantación del alantocorion en el endometrio tiene lugar sólo en los cotiledones y las carúnculas y en que la parte intercotiledonaria de la membrana fetal está libre.

El método fue descrito por primera vez en 1928 por Abelein que declaró que se podía emplear a partir de la quinta semana de gestación. Posteriormente Euler (1930), Gotze (1940) y Fincher (1943) lo popularizaron (citados por Arthur. G., 1991). El método consiste en

identificar la bifurcación de los cuernos y apretar suavemente el cuerno en todo su grosor. Se identificará el alantocorion como una estructura muy fina que se desliza entre el pulgar y el dedo medio dentro del pliegue de la pared uterina y rectal incluidas en el pellizco. Es importante en las etapas tempranas de gestación pellizcar el cuerno en toda su anchura porque como el alantocorion es muy delgado en esta fase, la estructura que puede identificarse más fácilmente es la banda de tejido conectivo que contiene los vasos sanguíneos que alimentan el alantocorion. Fincher (1943) (citado por Arthur. G., 1991), recomendó que no debería usarse este método antes de los cuarenta días de gestación y que era no fiable hasta los 95 días. La ventaja de este método radica en que permite un diagnóstico diferencial de gestación, de la mucómetra o de la piómetra. En algunos casos, sobre todo después de los 60 días de gestación se puede detectar con más facilidad en el cuerno no gestante debido a que la tensión en la pared es menor y esto permite pellizcarlo más fácilmente.

Palpación precoz del feto

Alrededor de los 45 a 50 días de gestación el amnios se hace menos turgente y a veces es posible palpar directamente el pequeño embrión en desarrollo. Esto debe hacerse con cuidado.

Palpación de las carúnculas/cotiledones

Las carúnculas/cotiledones se pueden reconocer por primera vez mediante palpación rectal alrededor de los 90 a 100 días de gestación. En las fases iniciales es difícil identificarlos como estructuras individuales. El útero se aprecia como si tuviera una superficie rugosa e irregular. Se ha comparado con la palpación de un puñado de patatas pequeñas. A medida que avanza la gestación los cotiledones crecen, pero una vez que el útero ha caído en el abdomen, entre el quinto y sexto mes, a menudo es imposible palparlos.

La identificación de los cotiledones puede inducir a un error en el diagnóstico de gestación, ya que inmediatamente después de un parto también puede apreciarse en el útero.

Hipertrofia y frémito de las arteria uterina

La identificación de las arterias uterinas medias puede realizarse mediante palpación rectal en una vaca no gestante o en las primeras fases de gestación. La arteria circula por el ligamento ancho siguiendo un curso tortuoso, pasando hacia abajo y adelante del borde pélvico. Los principiantes lo confunden algunas veces con las arterias ilíaca y obturadora, pero la arteria uterina media es muy móvil y puede rodearse con el pulgar y el índice.

La identificación de la hipertrofia y el frémito de la arteria uterina media se considera normalmente como un diagnóstico de gestación, pero persiste también durante algunos días después del parto y está presente en casos de piómetra.

Palpación del feto

La palpación del feto permite también el diagnóstico de gestación. La dificultad de la palpación depende del tamaño de la vaca y del grado de relajación, tanto del recto como de la pared uterina.

Para poder valorar los resultados del método de diagnóstico ultraprecoz de gestación por ecografía, tuvimos que tomar este método de diagnóstico de gestación como referencia

Material y métodos

(palpación rectal), basándonos fundamentalmente en la apreciación de la asimetría cornual, palpación de la vesícula amniótica y palpación del alantocorion (deslizamiento de la membrana), método que practicábamos sistemáticamente entre los 30 y 40 días pos-IA.

IV. 5.- Valoración de la eficacia de los métodos de diagnóstico de gestación

Para poder valorar la eficacia de un método de diagnóstico de gestación, hay que calcular su exactitud y fiabilidad, tanto para el diagnóstico positivo, como para el negativo, siendo la fiabilidad la probabilidad para que un animal declarado gestante realmente lo esté, ó diagnosticada no gestante que esté realmente vacía.

La fiabilidad del diagnóstico de gestación positivo se denomina sensibilidad y la del diagnóstico negativo la conocemos como especificidad.

$$\text{Exactitud DG (+)} = a/(a+b)$$

$$\text{Exactitud DG (-)} = c/(c+d)$$

$$\text{Exactitud total} = a+c/a+b+c+d$$

$$\text{Fiabilidad DG (+)} = a/(a+d)$$

$$\text{Fiabilidad DG (-)} = c/(c+b)$$

Siendo: a: número de DG (+) exactos (++).

b: número de DG (+) falsos (+-).

c: número de DG (-) correctos (--).

d: número de DG (-) falsos (-+).

IV. 6.-Recogida y procesamiento de las muestras de sangre

Las 341 muestras de sangre se recogieron en tubos de vacío VACUTAINER[®], con heparina como anticoagulante, utilizando agujas estériles. Estos tubos estaban adecuadamente identificados con la fecha de extracción de la sangre, número del animal, fecha de nacimiento, número de parto, fecha de inseminación gestante (muy importante para saber los días de gestación) y propietario.

Una vez recogidas las muestras, estos tubos conteniendo la sangre (5 cc) eran centrifugados. Inmediatamente se extraía el plasma mediante pipetas de un solo uso y se colocaba en tubos Eppendorff correctamente identificados (con el n° del animal, fecha y n° de muestra).

Las muestras se congelaban a -20 °C para posteriormente realizar las determinaciones de testosterona plasmática total IMMULITE/IMMULITE 1000.

IV. 7.-Determinaciones hormonales

Para las determinaciones de la testosterona plasmática a partir de las muestras tomadas, y convenientemente conservadas hasta este momento, tal como se ha descrito anteriormente, se utilizó un test de IMMULITE/IMMULITE 1000.

Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales e Instalación Radiactiva de la Universidad de León.

IV. 7. 1.-Fundamentos del immuliteUtilidad del análisis

Medición cuantitativa de Testosterona total en suero y en plasma heparinizado. Está estrictamente indicado para su uso como ayuda en el diagnóstico y seguimiento de las patologías con exceso ó defecto de este andrógeno.

Referencia: **LKTW1** (100 tests); **LKTW5** (500 tests).

Código del test: **TES**.

Código de color: **Verde oscuro**.

Principio del análisis

El Immulite/Immulite 1000 Testosterona total es un inmunoensayo enzimático quimioluminiscente competitivo en fase sólida.

Ciclos de incubación: 1 x 60 minutos.

Material y métodos



Recogida de la muestra

Los tubos con EDTA no deben utilizarse en el ensayo de Testosterona Total Immulite/Immulite 1000.

Las muestras lipémicas ó ampliamente contaminadas pueden dar resultados erróneos. Se recomienda el uso de una ultracentrífuga para aclarar las muestras lipémicas.

Las muestras hemolizadas podrían indicar una mala manipulación de la muestra antes de ser recibida por el laboratorio. En este caso los resultados deben interpretarse con precaución.

La centrifugación de las muestras de suero antes de que se forme el coágulo puede ocasionar la presencia de fibrina. Para evitar resultados erróneos debidos a la presencia de fibrina, hay que asegurarse que se ha formado el coágulo completamente antes de centrifugar las muestras. Algunas muestras, particularmente aquellas de pacientes sometidos a terapia anticoagulante, pueden requerir mayor tiempo de coagulación.

Los tubos para recoger sangre de distintos fabricantes pueden producir valores diferentes, dependiendo del material del tubo y de los aditivos, incluyendo barreras de gel ó barreras físicas, activadores de la coagulación y/o anticoagulantes.

Volumen requerido: 20µl de suero (el recipiente de la muestra debe contener como mínimo 100µl más que el volumen total requerido).

Conservación: 7 días a 2-8 °C ó 2 meses a -20 °C.

Advertencias y precauciones

Reactivos: mantener a 2-8 °C. Desechar de acuerdo a la legislación en vigor.

Se ha usado Ázida Sódica, en concentraciones menores de 0,1 g/dl, como conservante. Para su eliminación lavar con grandes cantidades de agua para evitar la constitución de residuos de ázidas metálicas, potencialmente explosivas, en las cañerías de cobre y plomo.

Sustrato quimioluminiscente: evitar la contaminación y exposición a la luz directa del sol.

Agua: usar agua destilada ó desionizada.

Materiales suministrados

Los componentes representan un juego completo. Las etiquetas de código de barras son necesarias para el ensayo.

Unidades de análisis de Testosterona Total (LTW1). Cada unidad etiquetada con código de barras contiene una bola recubierta de anticuerpos policlonal de conejo anti-testosterona. Estable a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad.

Hay que esperar a que las bolsas de las unidades de análisis alcancen la temperatura ambiente antes de abrirlas. Se abren cortando el extremo superior, dejando el borde del cierre de cremallera intacto. Se vuelven a cerrar las bolsas herméticamente para protegerlas de la humedad.

Vial de reactivo de Testosterona Total (LTW2). Con códigos de barras. 7,5ml fosfatasa alcalina (de intestino de ternera) conjugada con testosterona en solución tampón. Hay que guardarlo tapado y refrigerado: estable a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad. Se recomienda utilizarlo antes de que pasen 30 días después de abrirlo cuando se guarda según lo indicado.

Ajustadores de Testosterona Total (LTWL, LTWH). Dos viales (bajo y alto), 4ml de Testosterona en suero humano tratado, con conservante. Estable a 2-8 °C durante 30 días después de abrirse, ó hasta 6 meses (alícuotas) a -20 °C.

Componentes del Kit

Todos los componentes del kit se suministran por separado.

- LSUBX: sustrato quimioluminiscente.
- LPWS2: lavado de sonda.
- LKPM: kit de limpieza de sonda.

Material y métodos

- LCHX-Y: soportes de recipientes de muestras (con códigos de barras).
- LSCP: recipientes de muestras (desechables).
- LSCC: tapas para los recipientes de muestras (opcionales).
- CON6: control multiconstituyente de tres niveles.

También son necesarios: pipetas de transferencia de muestras; agua destilada ó desionizada; controles.

IV. 7. 2.-Unidades de la concentración plasmática de testosterona

Al realizar el procesado de las muestras, el resultado de las concentraciones de testosterona viene expresado en ng/dl y no en el Sistema Internacional de Unidades, es decir, en nmol/L. Es posible realizar la conversión en nmol/L utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{ng/dl} \times 0,03467 = \text{nmol/L}$$

Esta conversión se ha utilizado en todos los datos obtenidos de las lecturas realizadas de concentración de testosterona plasmática.

IV. 8.-Organización del trabajo

En la primera fase experimental, las exploraciones se realizaban cada 48 horas. En la primera explotación se hacía antes del primer ordeño (a las 7 horas de la mañana) y en la segunda después del primer ordeño (a las 8 horas de la mañana). La razón de realizar estas exploraciones cada 48 horas fue el poder identificar cambios en el diámetro del CL, ya que las diferencias, realizando las exploraciones cada 24, horas podrían no ser patentes realizándolas ecográficamente bajo condiciones de campo.

Los animales comenzaron a explorarse el día que salían en celo o el primer día tras la inseminación artificial, para adaptarse al plan de trabajo de exploraciones ecográficas cada 48 horas. De ésta manera un grupo de animales era explorado los días 0, 2, 4, 6,... y el otro grupo se exploraba los días 1, 3, 5, 7,... post-IA.

Para los animales que no quedaban gestantes, se realizaron las exploraciones hasta el día en que nuevamente salían en celo y para los animales gestantes, si no se observaban signos de celo a los 21 días, se continuaba la exploración ecográfica del CL. A partir del día 30 post-IA se realizaba en cada explotación un diagnóstico de gestación, intentando visualizar la vesícula embrionaria en el útero. Cuando se confirmaba la gestación se dejaba de realizar el seguimiento ecográfico del CL. En estos animales, con el fin de unificar los datos para su estudio se ha utilizado la información recogida hasta el día 30 de gestación.

Comparando los tamaños del CL (diámetro mayor y menor, área y volumen luteal) obtenidos en el apartado anterior y contrastando los de las vacas preñadas (P) con los de las no preñadas (NP), pudimos observar que las diferencias más significativas tenían lugar los días 13, 16 y 21, por lo que nuestros estudios se centraran en estos tres días.

Los parámetros discriminativos de gestación a través de la exploración del CL se calcularon de la siguiente manera: a los valores medios obtenidos en estos tres días, tanto para las vacas preñadas, como para las no preñadas, se les sumaba y se les restaba su error estándar, por lo tanto, tendríamos dos valores extremos para cada grupo experimental. El valor discriminativo se determinó hallando el punto medio entre la distancia de la media de las preñadas menos su error estándar y la media de las no preñadas más su error estándar. Resultando finalmente los siguientes parámetros discriminativos para poder diagnosticar el estado o no de gestación:

- *Diámetro menor.*
 - Día 13: > 18,73mm Preñada.
 - Día 16: >18,78mm Preñada.
 - Día 21. >16,9mm Preñada.

- *Diámetro mayor.*
 - Día 13: > 26,96mm Preñada.
 - Día 16: > 26,82mm Preñada.
 - Día 21: > 24,28mm Preñada.

- *Área.*
 - Día 13: > 403,26mm² Preñada.
 - Día 16: > 400,98mm² Preñada.
 - Día 21: > 328,94mm² Preñada.

- *Volumen.*
 - Día 13: > 6416,84mm³ Preñada.
 - Día 16: > 6495,54mm³ Preñada.
 - Día 21: > 4761,51mm³ Preñada.

En la segunda fase experimental y una vez tomados los parámetros de referencia obtenidos anteriormente, se procedió al estudio del CL de 302 vacas previamente inseminadas, utilizando el siguiente criterio para establecer una posible gestación.

A.- Seguimiento ecográfico del CL el día 13 post-IA.

B.- Seguimiento ecográfico del CL el día 16 post-IA.

C.- Seguimiento ecográfico del CL el día 21 post-IA.

Por último, en la tercera fase experimental y con ayuda de un programa informático (REPRO GTV de Joan Galí) (www.arrakis.es/~gtv/REPROGTV/htm), localizábamos las vacas preñadas entre 90 y 100 días de gestación que teníamos que sangrar cada día. Una vez obtenido el listado, mirábamos a que granjas correspondían esas vacas para seguir el mejor itinerario, es decir, para adaptarnos al horario de cada granja.

Todas las extracciones de sangre se realizaban por las mañanas después del primer ordeño de la mañana. Los animales seleccionados se colocaban en los amarres de alimentación, y antes de la extracción, se comprobaba mediante palpación rectal, que el animal estaba

Material y métodos

gestante y la gestación continuaba con normalidad. Una vez realizada esta comprobación, se procedía a la extracción de sangre de los vasos coxigeos.

IV. 9.-Parámetros estudiados

Una vez recogidos los datos del diámetro mayor y menor del CL y siguiendo las directrices de otros investigadores (para el área: Kastelic *et al.*, 1989; 1990b; Ginther *et al.*, 1989b; Peter *et al.*, 1992; para el volumen: Maciel *et al.*, 1992; Kamimura *et al.*, 1993) se calculó el área y el volumen del CL.

Estos cálculos se realizaron a lo largo de todo el ciclo de exploraciones ecográficas a las que se sometía el CL. Para ambos cálculos, y admitiendo los errores en los que podemos incurrir, pero aceptando también que es la única manera de poder obtener estos parámetros realizando estudios ecográficos, se asume una forma esférica del CL y por ello se aplican las fórmulas siguientes en las determinaciones:

- *Área del CL.*

Para la obtención de este parámetro se aplica la fórmula:

$$A = 1/2 \text{ diámetro mayor} \times 1/2 \text{ diámetro menor} \times \pi.$$

- *Volumen del CL.*

En los cálculos del volumen luteal aplicamos la siguiente ecuación:

$$V = 4/3 \times \text{área esférica} \times (\text{diámetro mayor}/2 + \text{diámetro menor}/2)/2.$$

IV. 10.-Registro de datos

Se diseñaron dos tipos de fichas, una para registrar los resultados obtenidos del seguimiento ecográfico del CL tras la inseminación artificial para establecer un posible diagnóstico ultraprecoz de gestación (Ficha nº 1), y otra para registrar los resultados del laboratorio (concentración plasmática de testosterona) y los de campo (fecha de parto y sexo de la cría), para una posible predicción del sexo fetal (Ficha nº 2).

Ficha número 1:

- Ganadero.
- N° de la vaca.
- Fecha de nacimiento.
- Parto ó lactación.
- Fecha de Inseminación.
- Ovario (derecho ó izquierdo).

- Fecha de exploración.
- Diámetro menor del CL.
- Diámetro mayor del CL.
- Área del CL.
- Volumen del CL.

En el caso de existir cavidad, se anotaban todas las medidas que se podían realizar.

- Apartado de observaciones para poder anotar las incidencias encontradas.
- Resultados: para indicar si las vacas estaban gestantes ó vacías.

Ficha número 2:

- Ganadero.
- N° de vaca junto con el n° de sangre correspondiente.
- Fecha de nacimiento de la vaca.
- N° de parto ó lactación.
- Fecha de inseminación gestante.
- Fecha de la extracción de sangre.

Con estos dos últimos datos podíamos saber los días de gestación (gestaciones entre 90 y 100 días).

- Concentración plasmática de testosterona (en ng/dl y nmol/L).
- Fecha de parto.
- Sexo de la cría.

Material y métodos**IV. 11.-ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

En el análisis de los datos de nuestro trabajo de Tesis Doctoral, se utilizó el paquete estadístico SAS (Statistic Analysis System) y los programas estadísticos Minitab 14 y SPSS.

Los parámetros estudiados han sido: el diámetro mayor y menor del CL, área y volumen luteal y concentración plasmática de testosterona.

Se han utilizado como factores de variación el día del ciclo (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 y 22), el estado de preñez de los animales (NP: animales no preñados y P: animales preñados) y el sexo fetal (ternero ó ternera).

Los diferentes estudios estadísticos realizados para el seguimiento ecográfico del CL se exponen a continuación:

Análisis de Varianza

El análisis de varianza de los datos se realizó con el procedimiento GLM (General Linear Mode) del paquete SAS para todos los parámetros. Se utilizó como factores de variación el día del ciclo y el estado de preñez (NP y P).

$$Y_{ijk} = \mu + GEST_i + Día_j + e_{ijk}$$

Explicando los términos de la ecuación:

Y_{ijk} : es el parámetro analizado.

μ : media general.

GEST: gestación (i = NP: animales no preñados ó i = P: preñados).

Día_j: día del ciclo (j de 0 a 22).

e_{ijk} : error residual.

Comparación de medias

Se realizó una comparación de medias de los diferentes parámetros entre los dos grupos experimentales diseñados (NP y P) utilizando el procedimiento t-test (prueba no pareada). En este caso, lo que se pretende es determinar si las medias poblacionales difieren, y si es así, cuál es la mayor.

Cálculo de correlaciones

Se estudiaron las correlaciones entre todos los parámetros anteriormente citados y se determinó el coeficiente de Pearson así como las significaciones correspondientes.

En el análisis de estudios Clínico-epidemiológicos con frecuencia interesa estudiar, a partir de los datos de un grupo de individuos, la posible asociación entre dos variables. En el caso de datos cuantitativos ello implica conocer si los valores de una de las variables

tienden a ser mayores (o menores) a medida que aumentan los valores de la otra, o si no tienen nada que ver entre sí. La correlación es el método de análisis adecuado cuando se precisa conocer la posible relación entre dos variables de este tipo. Así, el grado de asociación entre dos variables numéricas puede cuantificarse mediante el cálculo de un coeficiente de correlación. Debe entenderse, no obstante, que el coeficiente de correlación no proporciona necesariamente una medida de la causalidad entre ambas variables, sino tan sólo del grado de relación entre las mismas.

La medida más habitualmente utilizada para el estudio de la correlación es el coeficiente de correlación lineal de Pearson. El coeficiente de Pearson mide el grado de asociación lineal entre dos variables cualesquiera, y puede calcularse dividiendo la covarianza de ambas entre el producto de las desviaciones típicas de las dos variables. Para un conjunto de datos, el valor r de este coeficiente puede tomar cualquier valor entre -1 y $+1$. El valor de r será positivo si existe una relación directa entre ambas variables, esto es, si las dos aumentan al mismo tiempo. Será negativo si la relación es inversa, es decir, cuando una variable disminuye a medida que la otra aumenta. Un valor de $+1$ ó -1 indicará una relación lineal perfecta entre ambas variables, mientras que un valor 0 indicará que no existe relación lineal entre ellas. Hay que tener en consideración que un valor de cero no indica necesariamente que no exista correlación, ya que las variables pueden presentar una relación no lineal.

Este estudio de cálculo de correlaciones entre los diferentes parámetros se realizó en tres momentos distintos:

A) A lo largo del ciclo de exploraciones.

Se determinaron unos coeficientes de Pearson globales de los parámetros a lo largo de todo el ciclo de exploraciones (desde el día cero hasta el día veintidós).

B) En la primera y segunda mitad del ciclo de exploraciones.

Ante lo aportado por numerosos autores sobre la existencia de correlaciones altas y significativas entre diferentes parámetros durante la primera mitad del ciclo, se planteó este apartado. Hemos considerado la primera mitad del ciclo como el periodo entre el día cero (día de la inseminación artificial) y el día once. La segunda mitad estaría comprendida entre el día doce y el día veintidós.

C) Día diecisiete: punto de referencia en el ciclo de exploraciones.

Considerando que estamos trabajando con ganado vacuno lechero y que en el caso de no existir gestación los procesos evidentes de regresión luteal se retrasan un poco, hasta el día diecisiete, hemos querido considerar el comportamiento de los parámetros teniendo en cuenta este día. Así, se estudió la correlación entre los distintos parámetros desde el día cero hasta el día diecisiete y desde el día diecisiete hasta el veintidós.

Material y métodos

Cálculo de probabilidades

El cálculo de probabilidades se realizó a través del test de la Chi cuadrado del programa estadístico Minitab 14. Se estudiaron las posibles diferencias entre los grupos experimentales diseñados para los días 13, 16 y 21 post-IA.

Por último, los diferentes estudios estadísticos realizados para la predicción del sexo fetal mediante la determinación hormonal de testosterona plasmática son los siguientes:

Comparación de medias

Se realiza una comparación de medias entre los dos grupos experimentales diseñados (terneros y terneras), utilizando una *prueba T* de comparación de medias para muestras independientes.

Análisis de varianza

El análisis de varianza se efectúa según la *prueba de Levene* para la igualdad de varianzas, y poder suponer que existen diferencias significativas para las concentraciones de testosterona plasmática entre gestaciones de terneros y terneras.

Técnicas de regresión logística

El objetivo primordial que resuelve esta técnica es el de modelar cómo influye en la probabilidad de aparición de un suceso, habitualmente dicotómico, la presencia o no de diversos factores y el valor o nivel de los mismos. También puede ser usada para estimar la probabilidad de aparición de cada una de las posibilidades de un suceso con más de dos categorías (politómico).

De todos es sabido que este tipo de situaciones se aborda mediante técnicas de regresión. Sin embargo, la metodología de la regresión lineal no es aplicable ya que ahora la variable respuesta sólo presenta dos valores (nos centraremos en el caso dicotómico)

El modelo de regresión que intentamos buscar es de la forma:

$$P(Y=1) = \frac{1}{1 + e^{-\alpha - \beta \cdot x}}$$

Siendo α y β los parámetros del modelo (cuando consideremos una de las variables ng/dl como predicción).

$$P(Y=1) = \frac{1}{1 + e^{-\alpha - \beta^1 x^1 - \beta^2 x^2 - \dots - \beta_k x_k}}$$

Siendo α , β^1 , β^2 , \dots , β_k los parámetros a determinar del modelo (cuando consideremos dos variables: ng/dl y la otra como predicción).

V. RESULTADOS.

V.A. Seguimiento ecográfico del cuerpo lúteo tras la inseminación artificial para establecer un posible diagnóstico ultraprecoz de gestación.

V.B. Predicción del sexo del feto por determinación de la testosterona en sangre periférica de la madre.

Seguimiento ecográfico del CL tras la IA para establecer un diagnóstico ultraprecoz de gestación**V.A.-SEGUIMIENTO ECOGRÁFICO DEL CUERPO LÚTEO TRAS LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL PARA ESTABLECER UN POSIBLE DIAGNÓSTICO ULTRAPRECOZ DE GESTACIÓN****V.A.1.-Seguimiento ecográfico del Cuerpo Lúteo de hembras bovinas tras la inseminación artificial**

En la tabla n° 66 del anexo se recogen todos los valores individualizados del diámetro menor y mayor del CL, así como del área y del volumen luteal de todas las vacas de la primera fase experimental. En esta tabla, quedarán reflejados también el día de exploración tras la inseminación artificial, ovario explorado y grupo al que pertenece cada vaca, es decir, a vacas preñadas (P) ó a vacas no preñadas (NP).

A.- Diámetro menor del Cuerpo Lúteo.*A.1.- Diámetro menor del Cuerpo Lúteo en vacas no preñadas.*

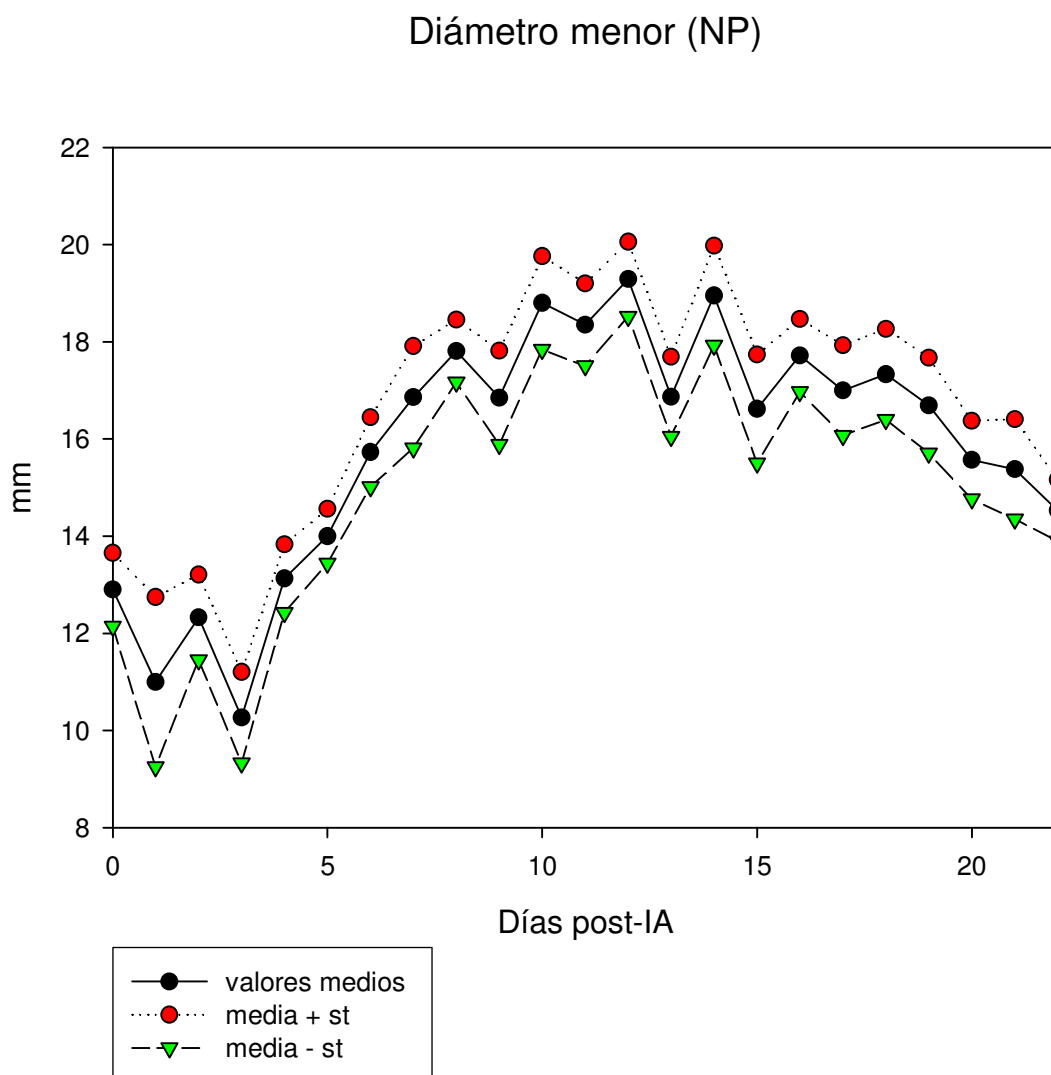
En la tabla n° 24 se recogen las medias de los valores del diámetro menor (expresado en mm), del CL en vacas que una vez inseminadas no quedaron preñadas (grupo NP), desde el día 0 (día de la inseminación) hasta el día 22.

	Media \pmst	n
NP0	12,90 \pm 0,7570	20
NP1	11,00 \pm 1,7457	7
NP2	12,33 \pm 0,8782	18
NP3	10,27 \pm 0,9350	11
NP4	13,13 \pm 0,7013	29
NP5	14,00 \pm 0,5606	15
NP6	15,73 \pm 0,7158	30
NP7	16,86 \pm 1,0504	15
NP8	17,81 \pm 0,6450	27
NP9	16,85 \pm 0,9656	14
NP10	18,80 \pm 0,9626	25
NP11	18,35 \pm 0,8486	17
NP12	19,29 \pm 0,7696	24
NP13	16,87 \pm 0,8209	16
NP14	18,95 \pm 1,0258	24
NP15	16,62 \pm 1,1175	16
NP16	17,72 \pm 0,7488	18
NP17	17,00 \pm 0,9275	17
NP18	17,33 \pm 0,9343	21
NP19	16,69 \pm 0,9830	13
NP20	15,57 \pm 0,8068	19
NP21	15,38 \pm 1,0286	13
NP22	14,53 \pm 0,6314	15

Tabla n° 24. Valores medios del diámetro menor del CL (mm) a lo largo del ciclo de exploraciones.

Se ha considerado día cero el día de la inseminación artificial, y con el valor de “n” reflejamos el número de observaciones.

En la gráfica que se muestra a continuación (Gráfica n° 1), tenemos la evolución de este parámetro (diámetro menor del CL) a lo largo del ciclo de exploraciones.



Gráfica n° 1. Evolución del diámetro menor del CL en el grupo NP

A partir del día tres del ciclo se produce un aumento, constante y progresivo, del diámetro menor del CL hasta el día ocho. Partimos de un diámetro menor con un valor medio de $10,27 \pm 0,93$ mm el día tres, y llegamos a medir $17,81 \pm 0,64$ mm de diámetro menor el día ocho del ciclo. Se ha producido por lo tanto un incremento de 7,54 mm en cinco días (ha experimentado un crecimiento medio diario de 1,708 mm).

Entre los días ocho y dieciséis del ciclo, podemos observar elevaciones y caídas en el diámetro menor del CL. A pesar de esta serie de oscilaciones en los valores medios de este parámetro, el día ocho tenemos un valor medio de $17,81 \pm 0,64$ mm, y el día dieciséis tenemos valores prácticamente iguales: $17,72 \pm 0,74$ mm. Es en este periodo, en el que

Seguimiento ecográfico del CL tras la IA para establecer un diagnóstico ultraprecoz de gestación

registramos el valor medio máximo en el diámetro menor del CL: $19,29 \pm 0,76$ mm el día doce del ciclo.

A partir del día dieciséis post-IA comienza una fase de regresión en los valores medios del parámetro. La disminución diaria es lenta pero continua, como puede observarse en la tabla n° 25 en la que se refleja en mm la caída diaria de este parámetro:

Día	(mm)
Entre d16 y d17	-0,72 mm
Entre d17 y d18	-0,33 mm
Entre d18 y d19	-0,64 mm
Entre d19 y d20	-1,12 mm
Entre d20 y d21	-0,19 mm
Entre d21 y d22	-0,85 mm

Tabla n° 25. Caída diaria (mm) del diámetro menor del CL en el grupo NP

Terminamos el ciclo de exploraciones ecográficas el día veintidós con un valor medio de $14,53 \pm 0,63$ mm.

A. 2.- Diámetro menor del Cuerpo Lúteo en vacas preñadas.

En la tabla n° 26, se recogen los valores medios obtenidos al realizar las mediciones del diámetro menor del CL (expresado en mm), en el grupo P (vacas que tras la inseminación artificial quedaron gestantes).

Las exploraciones se realizaron durante treinta días utilizándose los datos hasta el día veintidós para poder realizar un estudio comparativo entre los dos grupos.

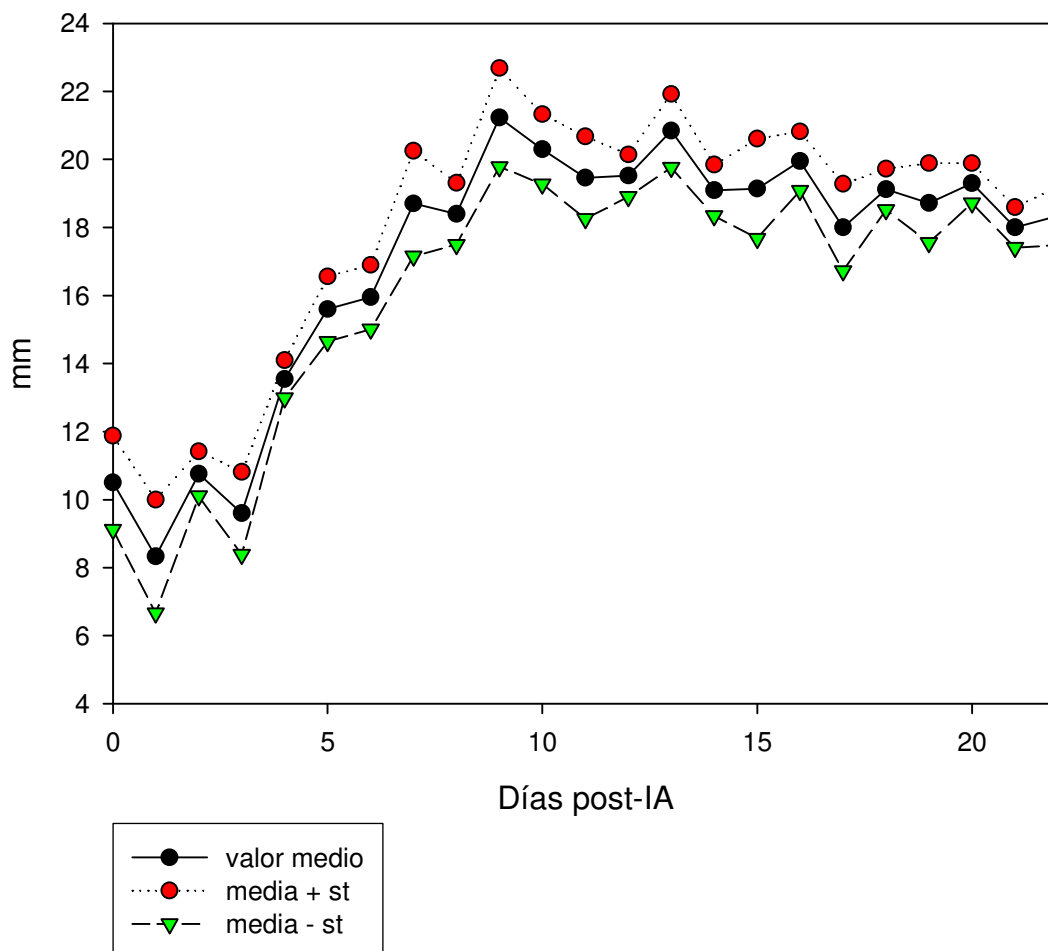
	Media±st	n
P0	10,50 ± 1,3758	8
P1	8,33 ± 1,6666	3
P2	10,76 ± 0,6543	21
P3	9,60 ± 1,2083	5
P4	13,54 ± 0,5533	22
P5	15,60 ± 0,9568	10
P6	15,95 ± 0,9477	22
P7	18,70 ± 1,5495	10
P8	18,40 ± 0,9084	22
P9	21,23 ± 1,4507	13
P10	20,30 ± 1,0262	20
P11	19,46 ± 1,2121	13
P12	19,52 ± 0,6229	19
P13	20,84 ± 1,0792	13
P14	19,09 ± 0,7499	22
P15	19,14 ± 1,4633	14
P16	19,95 ± 0,8690	22
P17	18,00 ± 1,2795	14
P18	19,12 ± 0,6064	25
P19	18,72 ± 1,1684	11
P20	19,30 ± 0,5878	23
P21	18,00 ± 0,5962	10
P22	18,34 ± 0,8611	23

Tabla n° 26. Valores medios del diámetro menor del CL (mm) a lo largo del ciclo de exploraciones.

Para poder seguir la evolución de este parámetro se hizo la Gráfica n° 2:

Seguimiento ecográfico del CL tras la IA para establecer un diagnóstico ultraprecoz de gestación

Diámetro menor (P)



Gráfica n° 2. Evolución del diámetro menor del CL en el grupo P.

Al igual que ocurría con este parámetro en el grupo NP, a partir del día tres post-IA comienza un incremento constante del diámetro menor del CL hasta el día ocho. Partimos de un diámetro medio el día tres de $9,6 \pm 1,2$ mm, llegando el día ocho a tener $18,4 \pm 0,90$ mm.

Aparece un gran incremento entre los días ocho y nueve. Es en este día nueve cuando se produce un gran pico registrándose los mayores valores para este parámetro ($21,23 \pm 1,45$ mm).

Entre los días nueve y trece aparece una meseta. Aunque los valores de los días intermedios sufren una ligera caída, el día nueve teníamos un valor medio de $21,23 \pm 1,45$ mm y llegamos al día trece con un diámetro medio de $20,84 \pm 1,07$ mm.

Se produce una fuerte disminución de este parámetro entre los días dieciséis y diecisiete post-IA. Pasamos de $19,95 \pm 0,86$ mm a $18 \pm 1,27$ mm.

A partir del día dieciocho los valores son más o menos estables, manteniéndose en este grupo P un diámetro medio de $18,34 \pm 0,86$ mm el día veintidós del ciclo.

A. 3.- Comparación del diámetro menor del Cuerpo Lúteo en vacas preñadas y no preñadas.

Podemos observar en la siguiente tabla (Tabla n° 27), los valores medios del diámetro menor del CL en ambos grupos: P y NP a lo largo del ciclo de exploraciones.

En la tabla podemos observar que tenemos pares de datos en negrita. Esto significa que al realizar los análisis estadísticos nos aparecieron diferencias significativas. Los diferentes grados de significación se explican a continuación:

* Diferencias significativas ($p < 0,05$).

** Diferencias muy significativas ($p < 0,01$).

*** Diferencias altamente significativas ($p < 0,001$).

Día	Dm-NP	Dm-P
0	12,9	10,5
1	11	8,33
2	12,33	10,76
3	10,27	9,6
4	13,13	13,54
5	14	15,6
6	14,73	15,95
7	16,86	18,7
8	17,81	18,4
9	16,85*	21,23*
10	18,8	20,3
11	18,35	19,46
12	19,29	19,52
13	16,87**	20,84**
14	18,95	19,09
15	16,62	19,14
16	17,72	19,95
17	17	18
18	17,33	19,12
19	16,69	18,72
20	15,57**	19,3***
21	15,38*	18*
22	14,53***	18,34***

Tabla n° 27. Valores del diámetro menor en los dos grupos experimentales (mm)

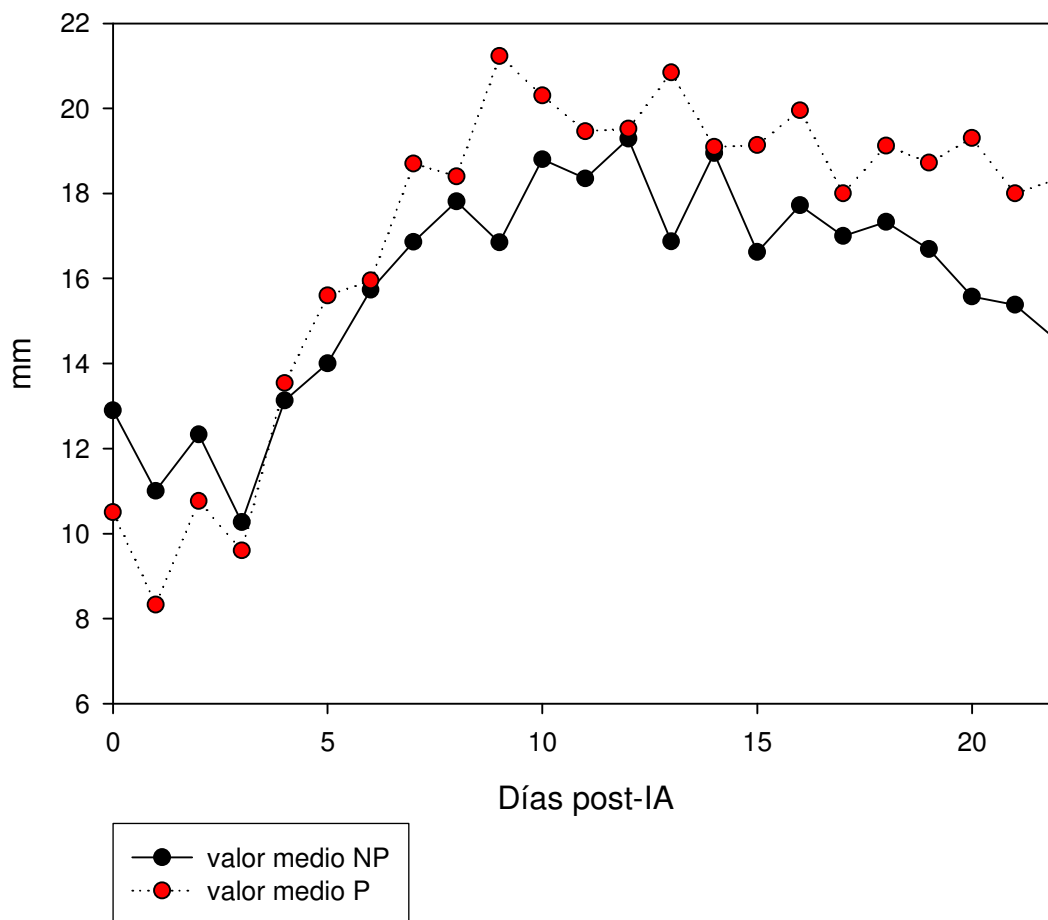
Dm-NP: Diámetro menor en el grupo de vacas no preñadas.

Dm-P: Diámetro menor en el grupo de vacas preñadas.

Para poder ver esta evolución conjunta se diseñó el Gráfico n° 3 que tenemos a continuación.

Seguimiento ecográfico del CL tras la IA para establecer un diagnóstico ultraprecoz de gestación

Diámetro menor



Gráfica n° 3. Evolución del diámetro menor del CL en los grupos NP y P

Podemos observar que en los días cero, uno, dos y tres los valores medios que se registraron en el diámetro menor del CL en el grupo P (animales que quedaron gestantes tras la inseminación artificial), son menores que los registrados en el grupo NP (animales que no quedaron gestantes tras la inseminación artificial).

El día tres del ciclo los valores prácticamente se igualan. En el grupo NP los valores son de $10,27 \pm 0,93$ mm y de $9,6 \pm 1,20$ mm en el grupo P.

Entre los días cuatro y ocho post-IA el parámetro en ambos grupos sigue una evolución ascendente, aproximándose mucho los valores nuevamente el día ocho. En este momento tenemos un valor medio de diámetro menor del CL, en el grupo NP, de $17,81 \pm 0,64$ mm y de $18,4 \pm 0,90$ mm en el grupo de hembras que quedaron gestantes (P).

El día nueve aparece una gran diferencia en los valores medios de éste parámetro: en el grupo P se alcanzan valores de $21,23 \pm 1,45$ mm, mientras que en el grupo NP se produce una brusca caída en el diámetro pasando a tener $16,85 \pm 0,96$ mm. Tenemos en este momento una diferencia de 4,38 mm a favor del grupo P. Estadísticamente esta diferencia es significativa ($p < 0,05$).

El día doce post-IA prácticamente se igualan los valores. Hemos registrado unos valores medios de $19,29 \pm 0,76$ mm en el grupo NP y de $19,52 \pm 0,62$ mm en el grupo P.

Las diferencias entre el diámetro menor del CL se vuelven a acentuar el día trece, día en el que se registra un pico en el valor del grupo P (animales que quedaron gestantes): $20,84 \pm 1,07$ mm. En el grupo NP sin embargo, los valores caen a $16,87 \pm 0,82$ mm. Esta diferencia es muy significativa ($p < 0,01$).

Los valores vuelven a igualarse el día catorce, teniendo un valor medio el diámetro en el grupo NP de $18,95 \pm 1,02$ mm y de $19,09 \pm 0,74$ mm en el grupo P.

A partir de este momento (día dieciséis) en el grupo NP comienza una lenta disminución, pero continua, en el valor de este parámetro. Finaliza el ciclo de exploraciones ecográficas el día veintidós con un valor de $14,53 \pm 0,63$ mm.

En el caso del grupo P, tras una caída en el diámetro, entre los días dieciséis y diecisiete de gestación, el diámetro menor del CL se mantiene más ó menos constante hasta el día veintidós ($18,34 \pm 0,86$ mm).

El día veinte podemos observar unas diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) entre los valores medios de los dos grupos experimentales.

Cuando analizamos los valores en el caso del día veintiuno post-IA, nos aparecen diferencias significativas ($p < 0,05$).

Al final de las exploraciones (día veintidós) tenemos una diferencia de 3,81 mm entre el diámetro registrado en ambos grupos (NP y P) a favor del grupo P. Esta diferencia es altamente significativa ($p < 0,001$).

B.- Diámetro mayor del Cuerpo Lúteo.

B. 1.- Diámetro mayor del Cuerpo Lúteo en vacas no preñadas.

Hemos recogido en la tabla nº 28, los valores medios obtenidos al hacer un seguimiento del diámetro mayor del CL en el grupo NP (animales que no han quedado gestantes después de la inseminación artificial).

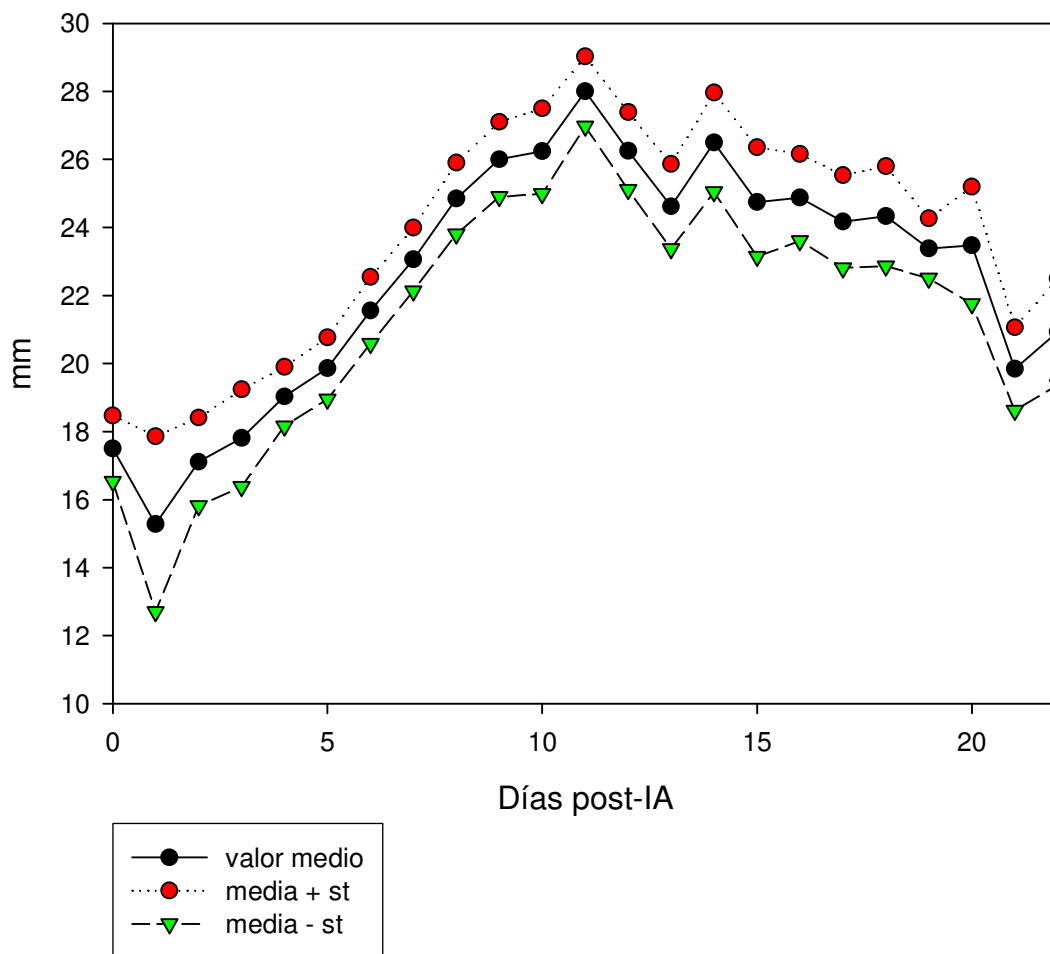
Cada día del ciclo de exploraciones se ha expuesto la media obtenida para el diámetro mayor del CL en este grupo de animales, junto con el error estándar obtenido al realizar los análisis estadísticos de los datos recogidos.

Seguimiento ecográfico del CL tras la IA para establecer un diagnóstico ultraprecoz de gestación

	Media±st	n
NP0	17,50 ± 0,9719	20
NP1	15,28 ± 2,5793	7
NP2	17,11 ± 1,3008	18
NP3	17,81 ± 1,4258	11
NP4	19,03 ± 0,8702	29
NP5	19,86 ± 0,9095	15
NP6	21,56 ± 0,9810	30
NP7	23,06 ± 0,9333	15
NP8	24,85 ± 1,0469	27
NP9	26,00 ± 1,0994	14
NP10	26,24 ± 1,2546	25
NP11	28,00 ± 1,0254	17
NP12	26,25 ± 1,1408	24
NP13	24,62 ± 1,2479	16
NP14	26,50 ± 1,4583	24
NP15	24,75 ± 1,6085	16
NP16	24,88 ± 1,2779	18
NP17	24,17 ± 1,3618	17
NP18	24,33 ± 1,4692	21
NP19	23,38 ± 0,8809	13
NP20	23,47 ± 1,7208	19
NP21	19,84 ± 1,2186	13
NP22	20,93 ± 1,5628	15

Tabla n° 28. Valores medios del diámetro mayor del CL (mm) a lo largo del ciclo de exploraciones.

Estos datos fueron posteriormente utilizados para realizar el gráfico n° 4 y poder hacer un seguimiento visual de la evolución de este parámetro.

Diámetro mayor (NP)**Gráfico n° 4.** Evolución del diámetro mayor del CL en el grupo NP

El día uno post-IA comienza un crecimiento constante del diámetro mayor del CL en este grupo, hasta alcanzar un pico el día once del ciclo.

En la siguiente tabla (n° 29), se puede observar que el crecimiento medio diario ha sido de 1,34 mm/día desde el día uno ($15,28 \pm 2,57$ mm) hasta el día nueve ($26 \pm 1,09$ mm).

Seguimiento ecográfico del CL tras la IA para establecer un diagnóstico ultraprecoz de gestación

Día	(mm)
Entre d1 y d2	+1,83 mm
Entre d2 y d3	+0,70 mm
Entre d3 y d4	+1,22 mm
Entre d4 y d5	+0,83 mm
Entre d5 y d6	+1,70 mm
Entre d6 y d7	+1,50 mm
Entre d7 y d8	+1,79 mm
Entre d8 y d9	+1,15 mm

Tabla n° 29. Crecimiento medio diario del CL en el periodo indicado.

El máximo valor lo hemos registrado el día once del ciclo: $28 \pm 1,02$ mm.

Entre los días catorce y veinte post-IA nos aparece una meseta en los valores medios registrados, cayendo los valores a $19,84 \pm 1,21$ mm el día veintiuno.

B. 2.- Diámetro mayor del Cuerpo Lúteo en vacas preñadas.

Como puede observarse en la siguiente tabla (n° 30), se han calculado los valores medios del diámetro mayor en este grupo P cada día de las exploraciones. También hemos realizado un análisis descriptivo de los valores de éste parámetro.

Se han utilizado los valores medios, obtenidos al hacer el seguimiento ecográfico, del diámetro mayor del CL en el grupo de animales que quedaron gestantes tras la inseminación artificial (reflejado como grupo P).

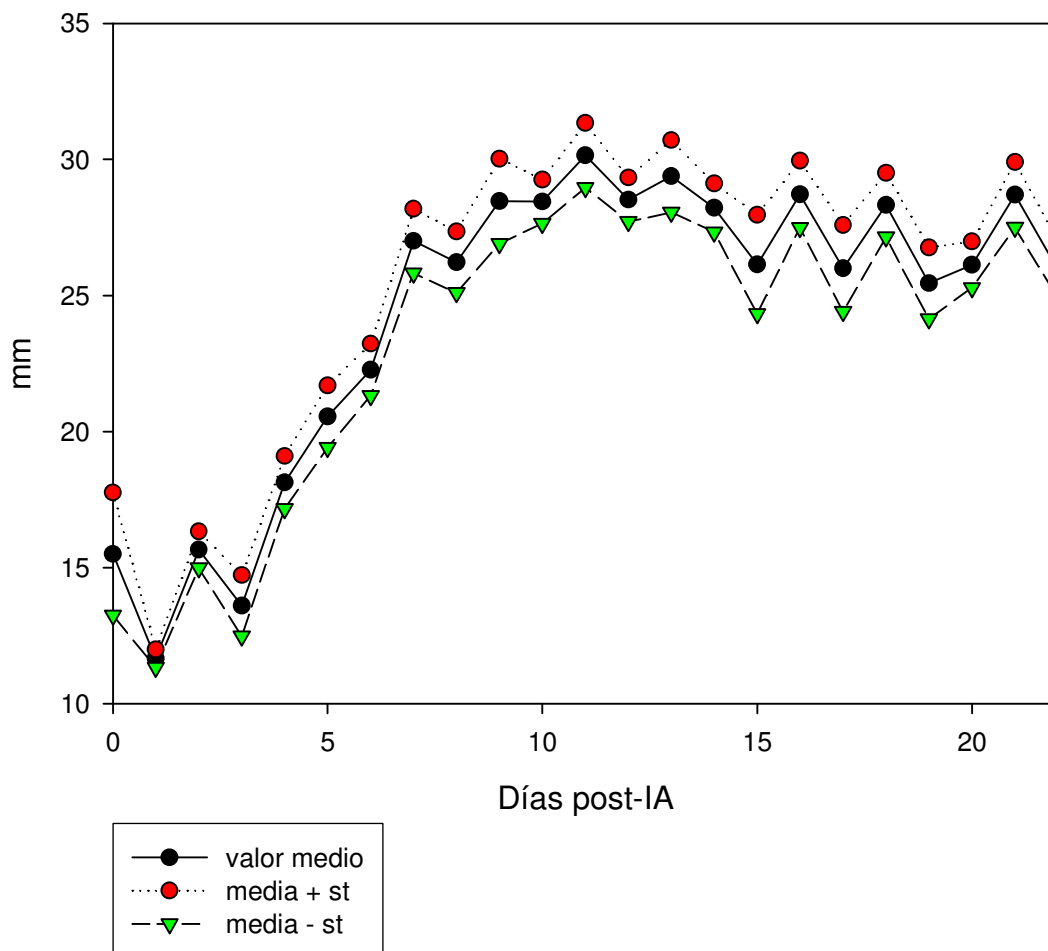
	Media±st	n
P0	15,50 ± 2,2598	8
P1	11,66 ± 0,3333	3
P2	15,66 ± 0,6702	21
P3	13,60 ± 1,1224	5
P4	18,13 ± 0,9721	22
P5	20,55 ± 1,1377	10
P6	22,27 ± 0,9584	22
P7	27,00 ± 1,1832	10
P8	26,22 ± 1,1241	22
P9	28,46 ± 1,5591	13
P10	28,45 ± 0,8028	20
P11	30,15 ± 1,1867	13
P12	28,52 ± 0,8106	19
P13	29,38 ± 1,3278	13
P14	28,22 ± 0,8947	22
P15	26,14 ± 1,8212	14
P16	28,72 ± 1,2312	22
P17	26,00 ± 1,5898	14
P18	28,32 ± 1,1771	25
P19	25,45 ± 1,3096	11
P20	26,13 ± 0,8511	23
P21	28,70 ± 1,2023	10
P22	25,95 ± 1,0453	23

Tabla n° 30. Valores medios del diámetro mayor del CL (mm) a lo largo del ciclo de exploraciones.

Al igual que hemos hecho con los parámetros anteriores, hemos diseñado la Gráfica n° 5 para poder seguir con mayor claridad la evolución del parámetro a lo largo del tiempo.

Seguimiento ecográfico del CL tras la IA para establecer un diagnóstico ultraprecoz de gestación

Diámetro mayor (P)

**Gráfica n° 5.** Evolución del diámetro mayor del CL en el grupo P

Partiendo del día uno post-IA con un diámetro mayor medio de $11,66 \pm 0,33$ mm, se produce un incremento importante en este parámetro hasta el día siete, en el que hemos registrado un valor medio de $27 \pm 1,83$ mm. Se han constatado los mayores saltos entre los días tres y cuatro post-IA (pasamos de un diámetro medio de $13,6 \pm 1,12$ mm a $18,13 \pm 0,97$ mm), y entre los días seis y siete: de $22,27 \pm 0,95$ mm a tener el día siete los $27 \pm 1,83$ mm que habíamos dicho anteriormente.

Los días ocho y quince de gestación tienen unos valores medios prácticamente iguales, pero entre ambas fechas se producen incrementos de diámetro importantes:

- El día ocho tenemos un valor medio del diámetro mayor del CL de $26,22 \pm 1,12$ mm.
- Del día ocho al once hay un aumento progresivo del diámetro, momento en el que se registra el máximo valor para este parámetro a lo largo de todas las exploraciones: $30,15 \pm 1,86$ mm.

- Del día once al quince hay una caída en el DM, teniendo en este día quince unos valores medios similares a los que habíamos obtenido el día ocho del ciclo. En este caso el diámetro medio es de $26,14 \pm 1,82$ mm (frente a los $26,22 \pm 1,12$ mm que tuvimos el día ocho).

El día quince y el día diecinueve se produce una serie de picos en los valores medios del diámetro mayor del CL seguidos de bruscas caídas.

Se alcanzan valores similares en los picos que se producen los días catorce, dieciséis, dieciocho y veintiuno del ciclo, como se puede observar en la tabla n° 31:

Día	Media \pm st(mm)
d14	$28,22 \pm 0,89$ mm
d16	$28,72 \pm 1,23$ mm
d18	$28,32 \pm 1,17$ mm
d21	$28,7 \pm 1,20$ mm

Tabla n° 31. Picos registrados en la segunda fase del ciclo de exploraciones.

Lo mismo ocurre con la caída en los valores de los días quince, diecisiete, diecinueve y veintidós, todos ellos tienen valores similares. Los valores medios registrados de esta caída los hemos recogido en la tabla n° 32:

Día	Media \pm st(mm)
d15	$26,14 \pm 1,82$ mm
d17	$26 \pm 1,58$ mm
d19	$25,45 \pm 1,30$ mm
d22	$25,95 \pm 1,04$ mm

Tabla n° 32. Caída de los valores del diámetro mayor del CL.

B. 3.- Comparación del diámetro mayor del Cuerpo Lúteo en vacas preñadas y no preñadas.

En la siguiente tabla (n° 33), hemos reflejado los valores medios de éste parámetro cada día del ciclo de exploraciones realizadas. En negrita se resaltan los valores de ambos grupos que manifiestan diferencias estadísticamente significativas:

* Diferencias significativas ($p < 0,05$).

** Diferencias muy significativas ($p < 0,01$).

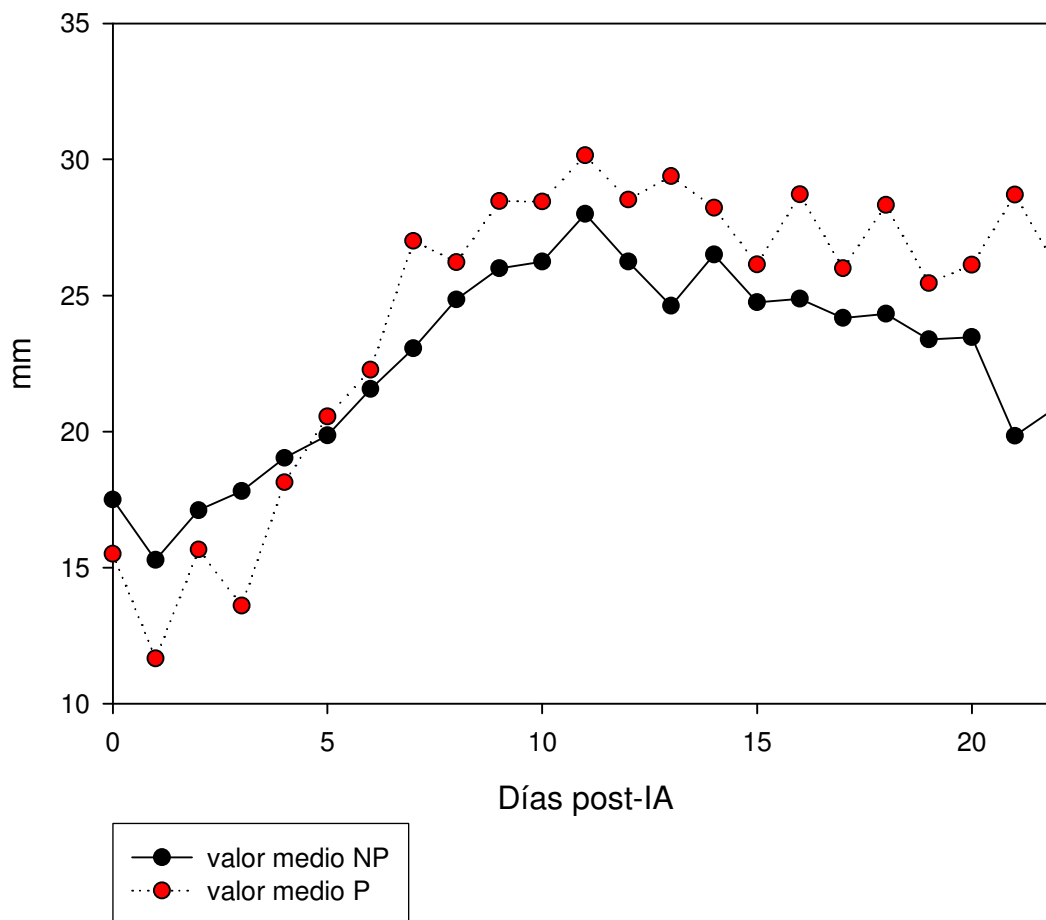
*** Diferencias altamente significativas ($p < 0,001$).

Seguimiento ecográfico del CL tras la IA para establecer un diagnóstico ultraprecoz de gestación

Días	DM-NP	DM-P
0	17,5	15,5
1	15,28	11,66
2	17,11	15,66
3	17,81	13,6
4	19,03	18,13
5	19,86	20,55
6	21,56	22,27
7	23,06*	27*
8	24,85	26,22
9	26	28,46
10	26,24	28,45
11	28	30,15
12	26,25	28,52
13	24,62*	29,38*
14	26,5	28,22
15	24,75	26,14
16	24,88*	28,72*
17	24,17	26
18	24,33	28,32
19	23,38	25,45
20	23,47	26,13
21	19,84***	28,70***
22	20,93**	25,95**

Tabla n° 33. Valores medios del diámetro mayor en ambos grupos (mm).
DM-NP: Diámetro mayor en el grupo de vacas no preñadas.
DM-P: Diámetro mayor en el grupo de vacas preñadas.

En la Gráfica n° 6 podemos observar la evolución conjunta de este parámetro (diámetro mayor del CL) en los dos grupos planteados: P y NP, es decir, animales que han quedado gestantes tras la inseminación artificial y animales que no han quedado gestantes después de la inseminación artificial.

Diámetro mayor**Gráfica n° 6.** Evolución del diámetro mayor del CL

Hasta el día cuatro post-IA, momento en el que se igualan los valores del parámetro en ambos grupos, tenemos unos valores medios menores en el grupo P (animales gestantes) que en el grupo NP (animales que no quedaron gestantes). Esta diferencia está muy acusada en el día tres, en el que aparece un pico en el valor del grupo NP: tenemos un valor medio de $17,81 \pm 1,42$ mm para este grupo NP, y de $13,6 \pm 1,12$ mm en el grupo P.

Durante los días cuatro, cinco y seis post-IA en ambos grupos los valores son similares, comenzando ya a ser un poco mayores los registrados en el grupo de animales que quedaron gestantes.

Se produce una diferencia muy marcada el día siete del ciclo de exploraciones. En el grupo NP sigue la evolución ascendente produciéndose un pico en el grupo P. Esta diferencia es de 3,94 mm ya que los valores medios registrados han sido de $27 \pm 1,18$ mm para el grupo P y de $23,06 \pm 0,93$ mm en el caso del grupo NP. Esta diferencia encontrada es estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Seguimiento ecográfico del CL tras la IA para establecer un diagnóstico ultraprecoz de gestación

En ambos grupos el día once post-IA se registran los valores medios máximos del ciclo de exploraciones: $28 \pm 1,02$ mm en el grupo NP y $30,15 \pm 1,18$ mm en el grupo P (animales que han quedado gestantes tras la inseminación artificial).

Mientras que en el grupo NP los días trece, dieciséis, dieciocho y veintiuno siguen una evolución descendente, en el grupo P se producen incrementos significativos, por lo que se acentúan marcadamente las diferencias del DM entre ambos grupos, tal como queda reflejado en la tabla n° 34:

Día	Grupo NP	Grupo P	Diferencias
d13	$24,62 \pm 1,24$ mm	$29,38 \pm 1,32$ mm	4,76 mm
d16	$24,88 \pm 1,27$ mm	$28,72 \pm 1,23$ mm	3,84 mm
d18	$24,33 \pm 1,46$ mm	$28,32 \pm 1,17$ mm	3,99 mm
d21	$19,84 \pm 1,21$ mm	$28,7 \pm 1,20$ mm	8,86 mm

Tabla n° 34. Diferente evolución del diámetro mayor en ambos grupos.

En los días trece y dieciséis post-IA estas diferencias estadísticamente son significativas ($p < 0,05$), cuando comparamos los valores medios del diámetro mayor del CL entre ambos grupos (P y NP).

El día veintiuno las diferencias que hemos encontrado son altamente significativas ($p < 0,001$).

Las diferencias el día veintidós son marcadas (estadísticamente muy significativas: $p < 0,01$).

C.- Área del Cuerpo Lúteo.

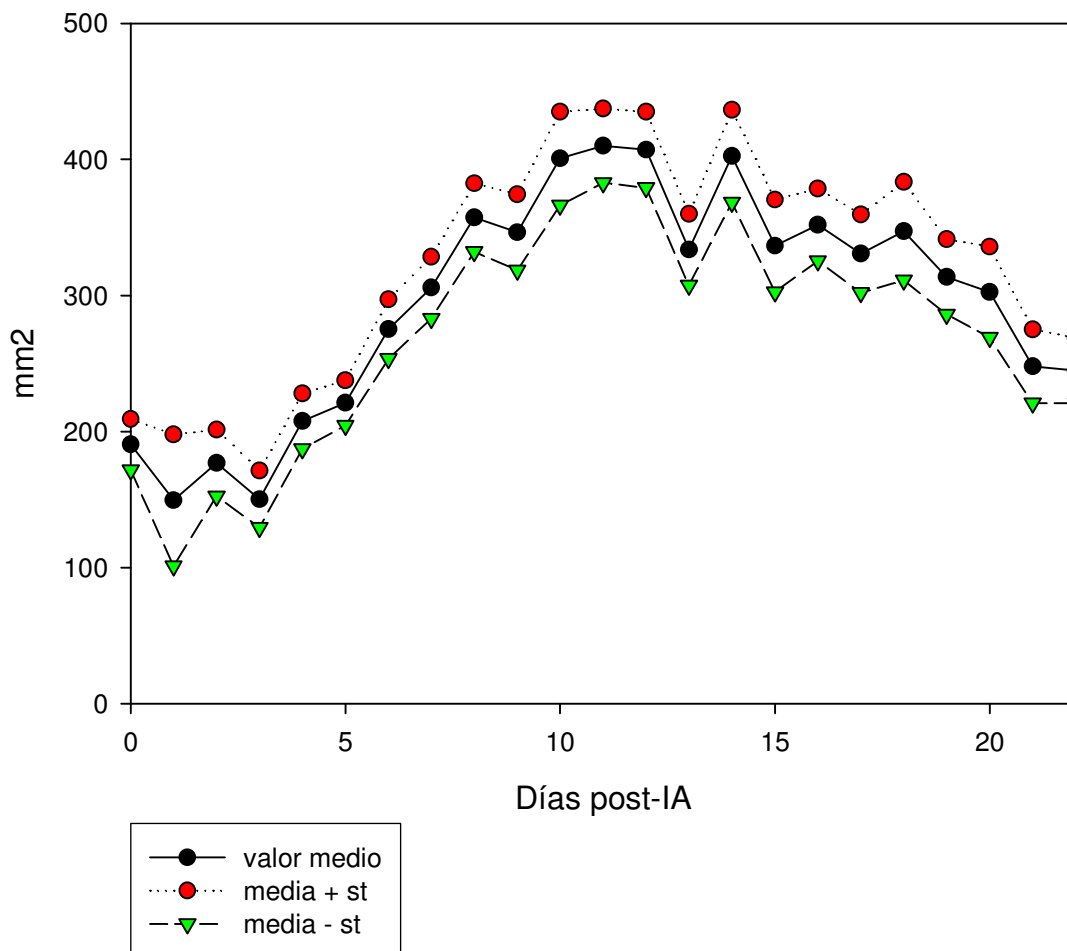
C. 1.- Área del Cuerpo Lúteo en vacas no preñadas.

En la tabla que mostramos a continuación (n° 35), tenemos los valores medios obtenidos al hacer el cálculo del área del CL (mm^2) en el grupo NP (animales que no han quedado gestantes tras la inseminación artificial).

	Media±st	n
NP0	190,52 ± 18,7496	19
NP1	149,56 ± 48,2497	7
NP2	176,88 ± 24,4118	18
NP3	150,29 ± 20,9669	11
NP4	207,61 ± 20,3859	29
NP5	221,01 ± 16,6227	15
NP6	275,33 ± 21,8677	30
NP7	305,72 ± 22,6376	15
NP8	357,23 ± 25,0981	27
NP9	346,36 ± 27,9759	14
NP10	400,67 ± 34,3456	25
NP11	410,02 ± 27,2138	17
NP12	407,06 ± 27,9649	24
NP13	333,69 ± 26,2258	16
NP14	402,35 ± 34,1295	24
NP15	336,49 ± 33,9292	16
NP16	351,94 ± 26,5805	18
NP17	330,69 ± 28,7539	17
NP18	347,22 ± 36,1019	21
NP19	313,67 ± 27,6317	13
NP20	302,50 ± 33,2522	19
NP21	247,94 ± 27,1064	13
NP22	244,88 ± 24,0492	15

Tabla n° 35. Valores medios del área del CL (mm²) a lo largo del ciclo, grupo NP.

Hemos querido estudiar su evolución a lo largo del ciclo de exploraciones por lo que se hace un seguimiento gráfico como podemos apreciar a continuación:

Seguimiento ecográfico del CL tras la IA para establecer un diagnóstico ultraprecoz de gestación**Área del cuerpo lúteo (NP)****Gráfica nº 7.** Evolución del área del CL (mm²) en el grupo NP

Desde el día tres post-IA tenemos un incremento constante en los valores medios del área del CL en este grupo hasta el día ocho. Pasamos de $150,29 \pm 20,96$ mm² el día tres, a tener un valor medio el día ocho de $357,23 \pm 25,09$ mm².

Los valores se mantienen más o menos constantes el día nueve post-IA, pero se produce un incremento importante el día diez: pasaremos de $346,36 \pm 27,97$ mm², a tener $400,67 \pm 34,34$ mm² el día diez.

Aparece una meseta entre los días diez y doce post-IA, momento en el que hay un ligero incremento y registramos el máximo valor para el área del CL en este grupo NP: tenemos un valor medio de $407,06 \pm 27,96$ mm².

Hay una caída importante el día trece: tenemos un valor medio de $333,69 \pm 26,22$ mm² (hay una disminución de $73,37$ mm²), recuperándose al día siguiente y volviendo a un valor similar el día quince ($336,49 \pm 26,22$ mm²).

Los valores se mantienen estables entre los días quince y dieciocho, pero a partir de este momento tenemos un valor medio de $347,22 \pm 36,10 \text{ mm}^2$ y llegamos al día veintidós post-IA con un área de $244,88 \pm 24,04 \text{ mm}^2$. La caída de los valores ha sido importante, se ha reducido en cuatro días $102,34 \text{ mm}^2$.

C. 2.- Área del Cuerpo Lúteo en vacas preñadas.

Tenemos esta tabla, en la que hemos reflejado los valores medios del área del CL, expresado en mm^2 .

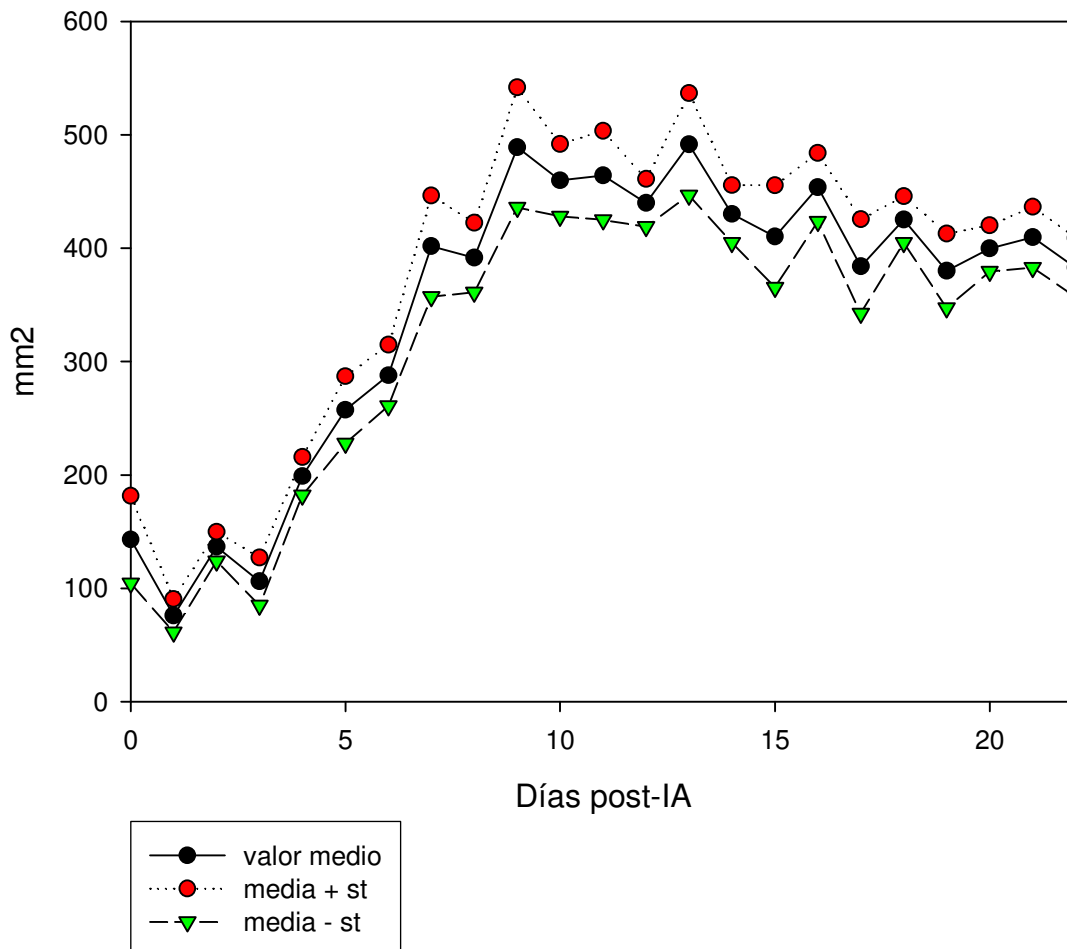
	Media\pmst	n
P0	142,94 \pm 38,5431	8
P1	75,92 \pm 14,5764	3
P2	136,80 \pm 12,9272	21
P3	106,02 \pm 21,1474	5
P4	198,84 \pm 16,9006	22
P5	257,37 \pm 29,6685	10
P6	287,84 \pm 26,9480	22
P7	401,73 \pm 44,5807	10
P8	391,69 \pm 30,5118	22
P9	488,75 \pm 52,9773	13
P10	459,77 \pm 31,8825	20
P11	464,11 \pm 39,3442	13
P12	439,86 \pm 21,0418	19
P13	491,59 \pm 44,9831	13
P14	430,07 \pm 25,3987	22
P15	410,31 \pm 44,9534	14
P16	453,67 \pm 30,2232	22
P17	384,00 \pm 41,4468	14
P18	425,12 \pm 20,4577	25
P19	379,98 \pm 32,8901	11
P20	399,73 \pm 20,049	23
P21	409,58 \pm 26,7451	10
P22	382,79 \pm 26,0624	23

Tabla n° 36. Valores medios del área del CL (mm^2) a lo largo del ciclo de exploraciones (grupo P).

Para poder seguir la evolución diaria del parámetro se diseñó la siguiente gráfica:

Seguimiento ecográfico del CL tras la IA para establecer un diagnóstico ultraprecoz de gestación

Área de cuerpo lúteo (P)



Gráfica n° 8. Evolución del área del cuerpo lúteo en el grupo P

Entre los días tres y siete post-IA se producen incrementos importantes en la evolución diaria del área del CL en este grupo P, como queda reflejado en esta tabla n° 37, destacando sobre todo el salto que se produce entre los días seis y siete:

Día	mm ²
Entre d3 y d4	+92,82 mm ²
Entre d4 y d5	+58,53 mm ²
Entre d5 y d6	+30,47 mm ²
Entre d6 y d7	+113,89 mm ²

Tabla n° 37. Variaciones del área del CL entre los días señalados para el grupo P.

Otro incremento a destacar se produce entre los días ocho y nueve: pasamos de tener un valor medio el día ocho de $391,69 \pm 30,51 \text{ mm}^2$ a un valor de $488,75 \pm 52,97 \text{ mm}^2$, lo que supone un aumento de $97,06 \text{ mm}^2$.

A pesar de producirse una disminución en el valor medio del área del CL entre los días nueve y trece post-IA, los valores se recuperan este día trece, registrándose el mayor valor en este grupo de animales (grupo P), teniendo un valor medio de $491,59 \pm 44,98 \text{ mm}^2$.

A partir del día trece los valores descienden suavemente. Aparece un pico entre los días quince y diecisiete. Se trata del día dieciséis en el que el valor medio es de $453,67 \pm 30,22 \text{ mm}^2$.

Terminamos el ciclo de exploraciones el día veintidós con un valor del área del CL de $382,79 \pm 26,06 \text{ mm}^2$.

C. 3.- Comparación del área del Cuerpo Lúteo entre vacas preñadas y no preñadas.

Se puede observar en la tabla nº 38 los valores medios calculados del área del CL (mm^2) en los dos grupos.

En la tabla hemos reflejado en negrita los pares de valores en los que hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas. Los diferentes grados de significación los hemos reflejado con asteriscos:

* Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

** Diferencias muy significativas ($p < 0,01$).

*** Diferencias altamente significativas ($p < 0,001$).

Seguimiento ecográfico del CL tras la IA para establecer un diagnóstico ultraprecoz de gestación

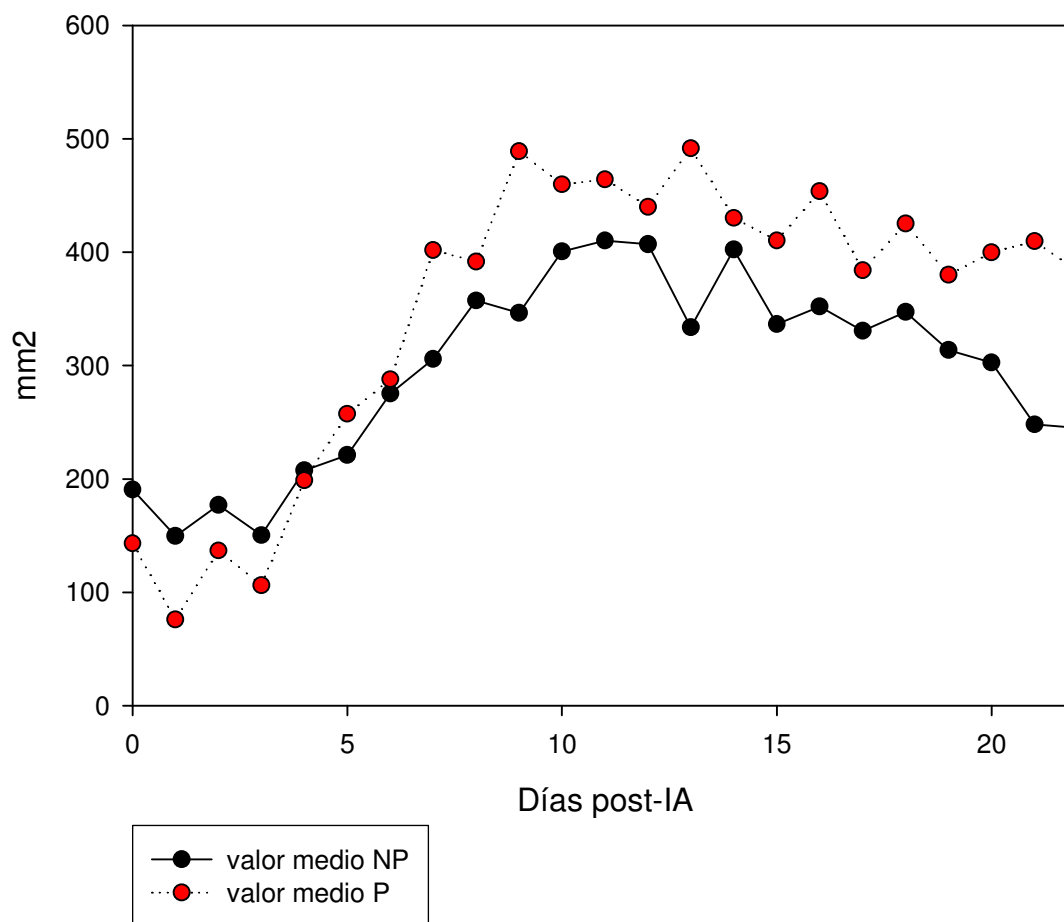
Días	Área-NP	Área-P
0	190,52	142,94
1	149,56	75,92
2	176,88	136,8
3	150,29	106,02
4	207,61	198,84
5	221,01	257,37
6	275,33	287,84
7	305,72*	401,73*
8	357,23	391,69
9	346,36*	488,75*
10	400,67	459,77
11	410,02	464,11
12	407,06	439,86
13	333,69**	491,59**
14	402,35	430,07
15	336,494	410,31
16	351,94*	453,67*
17	330,69	384
18	347,22	425,12
19	313,67	379,98
20	302,50*	399,73*
21	247,94***	409,58***
22	244,88***	382,79***

Tabla n° 38. Valores del área del CL en los dos grupos experimentales (mm²).

Área-NP: Área del CL en el grupo de vacas no preñadas.

Área-P: Área del CL en el grupo de vacas preñadas.

Para detallar la evolución conjunta del parámetro a lo largo de las exploraciones en ambos grupos, nos fijaremos en el gráfico que se muestra a continuación:

Área del cuerpo lúteo**Gráfica n° 9.** Evolución del área de CL en los grupos NP y P

Desde el día de la inseminación artificial (día cero) hasta el día tres, llama la atención el hecho de que los valores en el grupo de animales que quedaron gestantes son inferiores a los que no quedaron gestantes.

El día cuatro post-IA se acercan los valores medios obtenidos, aunque siguen siendo ligeramente superiores los registrados en el grupo NP. Tenemos un área de $207,61 \pm 20,38$ mm² en el grupo NP frente a los $198,84 \pm 16,90$ mm² del grupo P.

La primera gran diferencia se produce el día siete post-IA, siendo de $96,01$ mm² al tener un área de $305,72 \pm 22,63$ mm² en el grupo NP y de $401 \pm 44,58$ mm² en el grupo P ($p < 0,05$).

La segunda gran diferencia entre los valores medios la encontramos el día nueve, al tener un valor de $346,36 \pm 27,97$ mm² en el grupo NP y de $488,75 \pm 52,97$ mm² en el grupo P ($+142,39$ mm²). Esta diferencia estadísticamente es significativa ($p < 0,05$).

En ambos grupos durante los días diez, once y doce del ciclo de exploraciones permanecen estables los valores, observándose una meseta en la gráfica con valores superiores para el grupo P.

Seguimiento ecográfico del CL tras la IA para establecer un diagnóstico ultraprecoz de gestación

Se comportan de forma opuesta el día trece post-IA. Mientras que en el grupo de animales que han quedado gestantes los valores se disparan (se produce un pico registrándose el máximo valor: $491,59 \pm 44,98 \text{ mm}^2$), caen los valores en el grupo NP: $333,69 \pm 26,22 \text{ mm}^2$. Este diferente comportamiento se refleja estadísticamente ($p < 0,01$).

Otro día en el que aparecen diferencias importantes es el dieciséis ($p < 0,05$). Tenemos un valor medio de $351,94 \pm 26,58 \text{ mm}^2$ en el grupo NP y se produce un pico en los valores del grupo de animales que quedaron gestantes: $453,67 \pm 30,22 \text{ mm}^2$.

A partir del día dieciséis post-IA comienzan a declinar los valores en el grupo NP. Asimismo, en el grupo P también observamos una ligera caída, aunque no tan acusada ya que al final de las exploraciones se mantiene un valor medio de $382,79 \pm 26,06 \text{ mm}^2$.

El día veinte post-IA las diferencias entre los valores medios registrados son acusadas ($p < 0,05$), ya que caen los valores del área del CL en el grupo NP.

Los días veintiuno y veintidós, las diferencias incrementan sus valores siendo altamente significativas ($p < 0,001$).

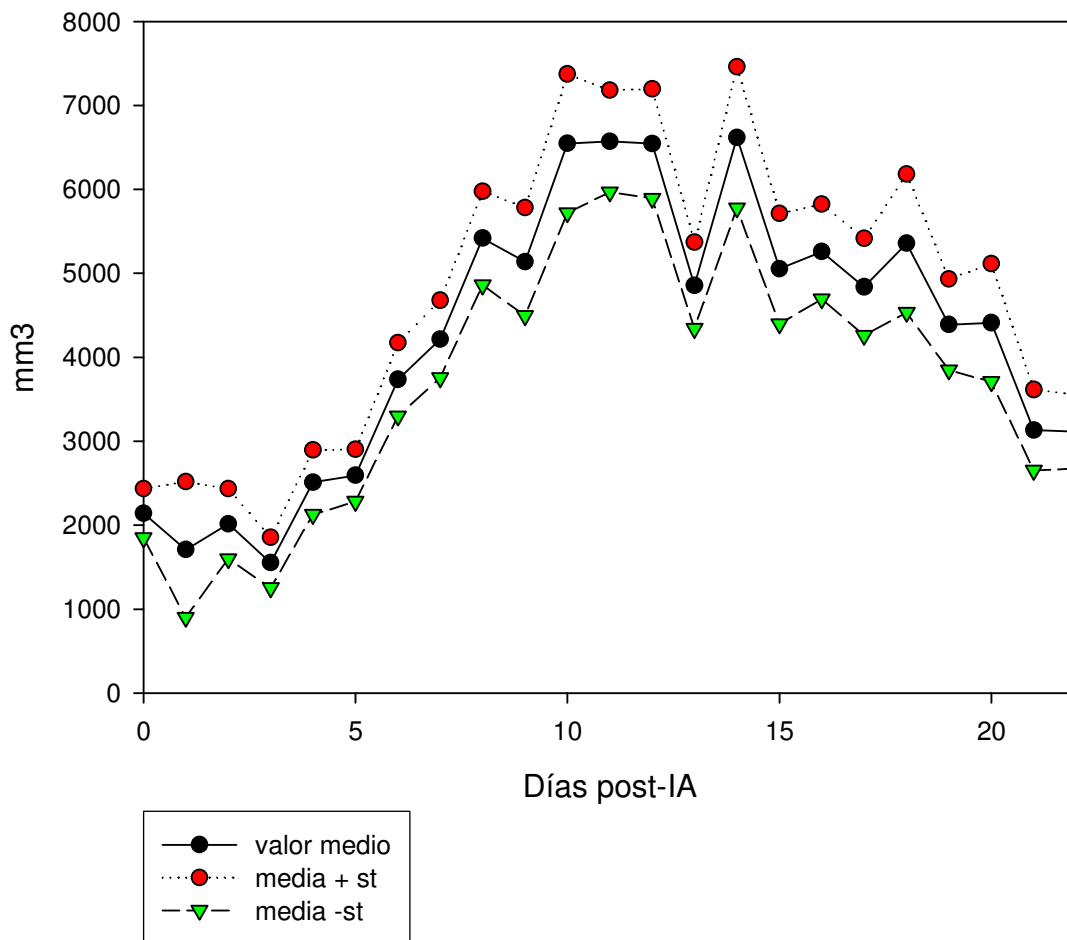
D.- Volumen del Cuerpo Lúteo.*D. 1.- Volumen del Cuerpo Lúteo en vacas no preñadas.*

Se registraron los valores medios del volumen del CL (mm^3) a lo largo del ciclo de exploraciones, tal y como se refleja en la siguiente tabla (nº39):

	Media±st	n
NP0	2142,12 ± 293,8389	19
NP1	1708,35 ± 808,2918	7
NP2	2015,41 ± 418,4068	18
NP3	1552,42 ± 300,7374	11
NP4	2509,35 ± 383,2386	29
NP5	2592,93 ± 309,4939	15
NP6	3735,56 ± 437,8485	30
NP7	4215,63 ± 461,7406	15
NP8	5417,05 ± 557,7700	27
NP9	5137,25 ± 643,8466	14
NP10	6547,81 ± 826,5141	25
NP11	6572,79 ± 605,6247	17
NP12	6544,17 ± 651,0262	24
NP13	4856,50 ± 514,5766	16
NP14	6617,98 ± 841,0223	24
NP15	5054,29 ± 656,2356	16
NP16	5257,28 ± 563,8366	18
NP17	4837,71 ± 578,0984	17
NP18	5357,63 ± 823,9668	21
NP19	4388,56 ± 543,1512	13
NP20	4411,12 ± 702,9491	19
NP21	3132,57 ± 481,0792	13
NP22	3115,27 ± 440,1989	15

Tabla n° 39. Valores medios del volumen el CL (mm³) a lo largo del ciclo de exploraciones (grupo NP).

Podemos observar la evolución de este parámetro siguiendo la Gráfica n° 10 que tenemos representada a continuación:

Seguimiento ecográfico del CL tras la IA para establecer un diagnóstico ultraprecoz de gestación**Volumen del cuerpo lúteo (NP)****Gráfica nº 10.** Evolución del volumen del CL en el grupo NP

Durante los tres primeros días post-IA se mantienen más o menos constantes los valores medios del volumen del CL en este grupo NP.

Desde el día tres al día ocho se produce un aumento progresivo y uniforme de éste parámetro. Tenemos el día tres un volumen de $1552,42 \pm 300,73 \text{ mm}^3$, llegando a registrarse el día ocho del ciclo un volumen luteal de $5417,05 \pm 557,77 \text{ mm}^3$.

Nos aparece entre el día nueve y diez post-IA un primer salto en los valores registrados. Pasaremos de un volumen de $5137,25 \pm 643,84 \text{ mm}^3$ el día nueve, a tener un volumen medio de $6547,81 \pm 826,51 \text{ mm}^3$ el día diez.

Entre los días diez y doce aparece una meseta en los valores del volumen, manteniéndose elevados.

Se produce una fuerte caída en este volumen luteal (desciende hasta $4856,5 \pm 514,57 \text{ mm}^3$), recuperándose el día catorce, momento en el que se produce un pico y se registra el máximo

volumen del CL en este grupo (NP). Para este día catorce el valor medio del parámetro es de $6617,98 \pm 841,02 \text{ mm}^3$.

Después de este máximo registrado, caen los valores manteniéndose más o menos constantes hasta el día dieciocho ($5357,63 \pm 823,96 \text{ mm}^3$).

Desde el día dieciocho post-IA comienza un descenso ya permanente de los valores del volumen luteal, terminando el ciclo de exploraciones con un valor de $3115,27 \pm 440,19 \text{ mm}^3$

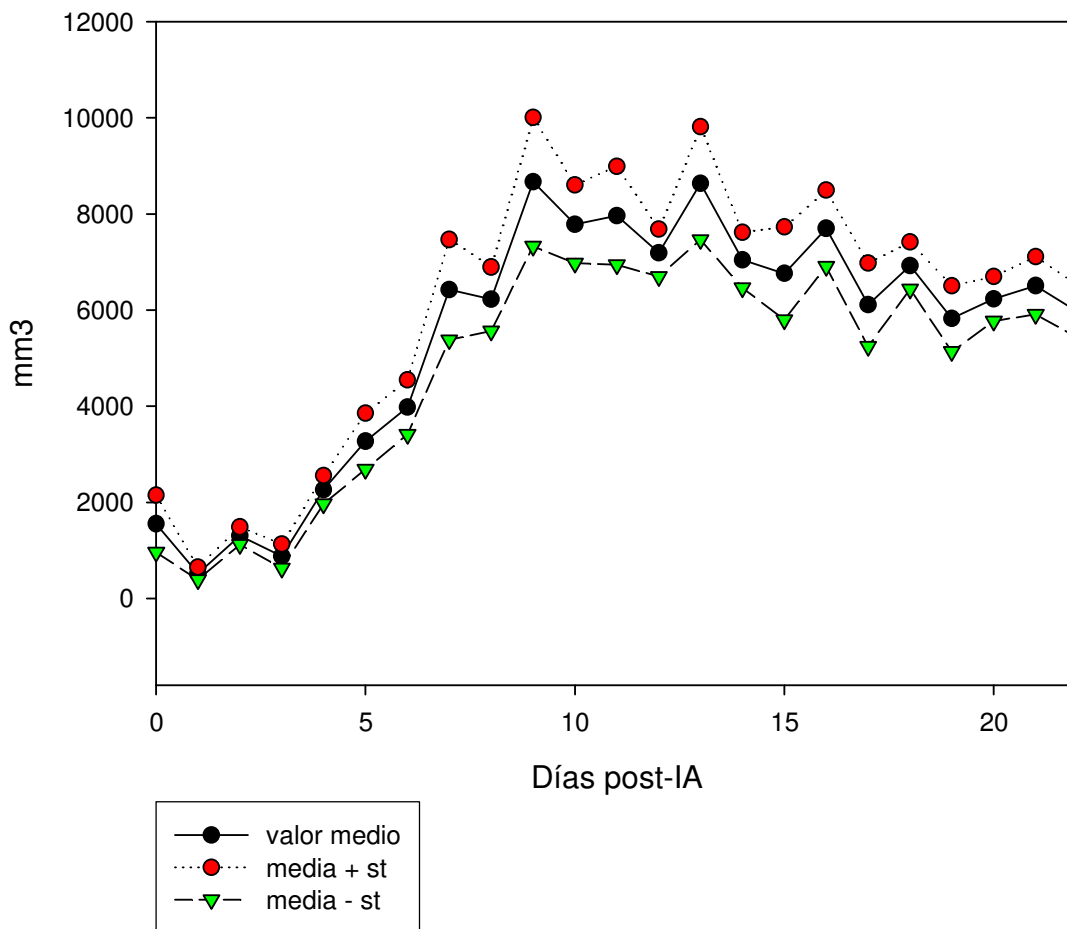
D. 2.- Volumen del Cuerpo Lúteo en vacas preñadas.

En todas las vacas exploradas ecográficamente se calculó el volumen luteal (mm^3) reflejándose en la siguiente tabla los datos obtenidos.

	Media\pmst	n
P0	1555,54 \pm 596,3541	8
P1	5220,98 \pm 129,3989	3
P2	1306,95 \pm 182,2437	21
P3	882,36 \pm 252,7705	5
P4	2263,96 \pm 296,9229	22
P5	3273,33 \pm 584,4166	10
P6	3981,01 \pm 568,0044	22
P7	6424,09 \pm 1043,699	10
P8	6229,06 \pm 665,1599	22
P9	8670,83 \pm 1341,501	13
P10	7787,95 \pm 815,9501	20
P11	7966,11 \pm 1025,118	13
P12	7191,16 \pm 493,5244	19
P13	8637,72 \pm 1175,119	13
P14	7041,73 \pm 579,7418	22
P15	6762,72 \pm 964,8770	14
P16	7703,18 \pm 793,3595	22
P17	6113,57 \pm 868,5020	14
P18	6926,86 \pm 491,0842	25
P19	5823,84 \pm 683,5452	11
P20	6233,87 \pm 464,6833	23
P21	6511,31 \pm 601,9485	10
P22	5968,93 \pm 540,4230	23

Tabla n° 40. Valores medios del volumen del CL (mm^3) a lo largo del ciclo de exploraciones (grupo P).

Se diseñó la Gráfica n° 11 para poder observar detenidamente la evolución seguir en este grupo P:

Seguimiento ecográfico del CL tras la IA para establecer un diagnóstico ultraprecoz de gestación**Volumen del cuerpo lúteo (P)****Gráfica nº 11.** Evolución del volumen del CL (mm³) en el grupo P

Durante los tres primeros días post-IA comienza a incrementarse el volumen luteal, destacando el salto que se produce entre los días seis y siete. Tenemos un volumen medio de $3981,01 \pm 568 \text{ mm}^3$ el día seis, produciéndose un gran salto el día siete: $6424,09 \pm 1043,69 \text{ mm}^3$.

Un segundo salto en el volumen luteal se produce entre los días ocho y nueve. El incremento es de $2441,77 \text{ mm}^3$ ya que tenemos un volumen de $6229,06 \pm 665,15 \text{ mm}^3$ el día ocho y pasa a tener $8670,83 \pm 1341,50 \text{ mm}^3$ el día nueve.

El máximo volumen luteal lo obtuvimos el día trece post-IA con un valor medio de $8637,72 \pm 1175,11 \text{ mm}^3$.

Durante la última fase del desarrollo del volumen del CL caen los valores con respecto a este pico registrado el día trece, teniendo el día diecisiete un volumen de $6113,57 \pm 868,50 \text{ mm}^3$.

Finalizamos el ciclo de exploraciones en este grupo P (animales gestantes) con un volumen luteal de $5968,93 \pm 540,42 \text{ mm}^3$.

D. 3.- Comparación del volumen del cuerpo lúteo entre vacas preñadas y no preñadas.

Se reflejan en la siguiente tabla (n° 41), los valores medios obtenidos en el volumen luteal (mm³) para los dos grupos de animales (NP y P).

Días	Volumen-NP	Volumen-P
0	2142,12	1555,54
1	1708,35	520,98
2	2015,41	1306,95
3	1552,42	882,36
4	2509,35	2263,96
5	2592,93	3273,33
6	3735,56	3981,01
7	4215,63	6424,09
8	5417,05	6229,06
9	5137,25*	8670,83*
10	6547,81	7787,95
11	6572,79	7966,11
12	6544,17	7191,16
13	4856,5**	8637,72**
14	6617,98	7041,73
15	5054,29	6762,72
16	5257,28*	7703,18*
17	4837,71	6113,57
18	5357,63	6926,86
19	4388,56	5823,84
20	4411,12*	6233,87*
21	3132,57***	6511,31***
22	3115,27***	5968,93***

Tabla n° 41. Valores medios del volumen del CL en ambos grupos (mm³).
 Volumen-NP: Volumen del CL en el grupo de vacas no preñadas.
 Volumen- P: Volumen del CL en el grupo de vacas preñadas.

Hemos reflejado en negrita los pares de valores en los que hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas. Los diferentes grados de significación los hemos señalado con asteriscos:

* Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

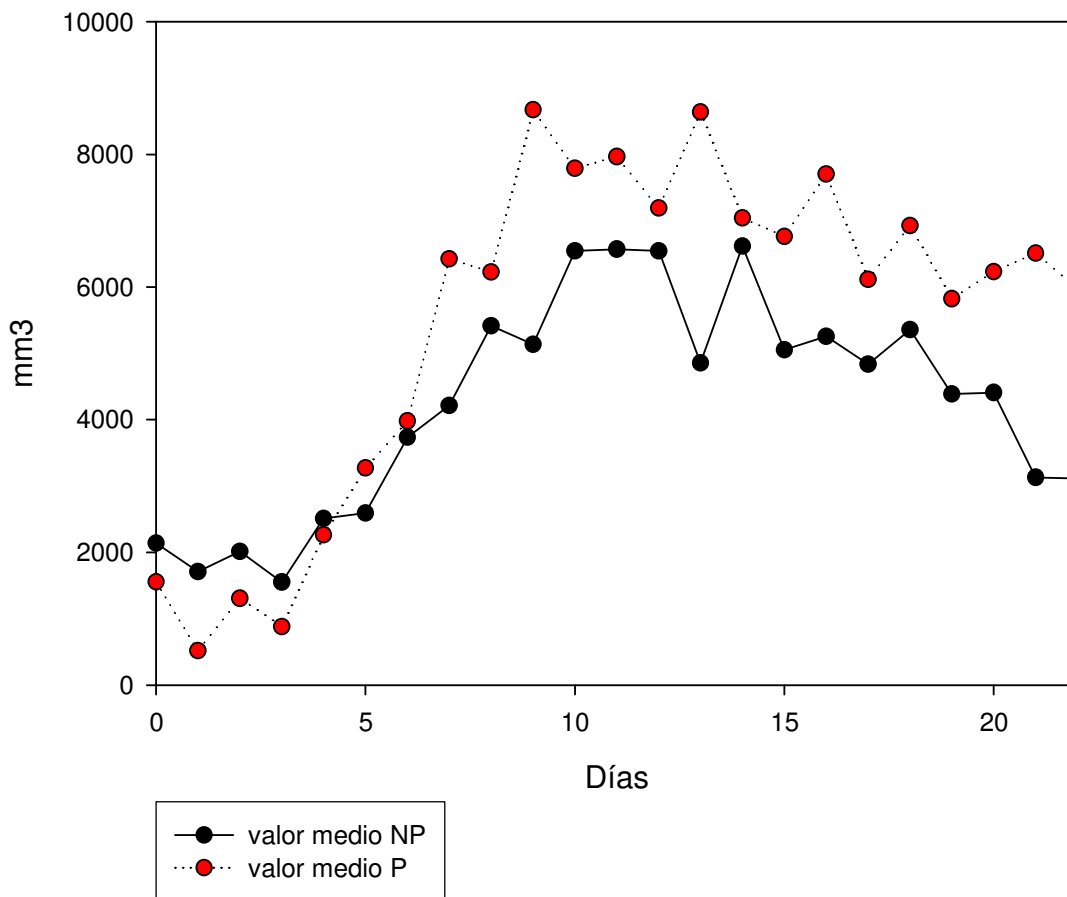
** Diferencias muy significativas ($p < 0,01$).

*** Diferencias altamente significativas ($p < 0,001$).

Se puede seguir la evolución conjunta del parámetro en ambos grupos (P y NP) observando la siguiente gráfica:

Seguimiento ecográfico del CL tras la IA para establecer un diagnóstico ultraprecoz de gestación

Volumen del cuerpo lúteo



Gráfica n° 12. Evolución del volumen del CL en los grupos NP y P

Como hemos venido describiendo en los anteriores parámetros estudiados del CL, durante los cuatro primeros días explorados, los valores que tenemos en el grupo P se mantienen por debajo de los registrados en el grupo NP.

Prácticamente se igualan los valores el día cuatro post-IA. En el grupo NP tenemos un valor medio de $2509,35 \pm 383,23 \text{ mm}^3$ y $2263,96 \pm 296,92 \text{ mm}^3$ en el grupo P. Aún siguen siendo menores los valores registrados en el grupo de animales que quedaron gestantes.

Desde el día cuatro comienzan a ser mayores los valores de volumen lúteo registrados en el grupo P con respecto a los del grupo NP.

El día siete post-IA aparece la primera gran diferencia entre los valores de este parámetro. Tenemos un valor medio de $4215,62 \pm 461,74 \text{ mm}^3$ en grupo NP, mientras que en el grupo P llega hasta $6424,09 \pm 1043,69 \text{ mm}^3$, por lo que la diferencia entre ambos valores en el día siete es de $2208,47 \text{ mm}^3$.

La acentuada diferencia que se puede apreciar el día nueve post-IA en la evolución de este parámetro entre los dos grupos, viene apoyada por los estudios estadísticos realizados ($p < 0,05$).

Los volúmenes luteales siguen una evolución paralela entre los días diez y doce, para producirse un gran pico el día trece en el grupo de animales que quedaron gestantes, mientras que registramos una caída en los valores del grupo de vacas no preñadas (para el día trece del ciclo $p < 0,01$). Por lo tanto en este día las diferencias son muy significativas (en términos absolutos de $3781,22 \text{ mm}^3$), ya que tenemos un valor medio de $4856,5 \pm 514,57 \text{ mm}^3$ en el grupo NP frente a los $8637,72 \pm 1175,11 \text{ mm}^3$ del grupo P.

Aún siendo grande la diferencia entre el volumen de ambos grupos el día dieciséis, estas diferencias se reducen a $2445,9 \text{ mm}^3$ ($p < 0,05$), ya que tenemos un volumen medio de $5257,28 \pm 823,96 \text{ mm}^3$ en el grupo NP y de $7703,18 \pm 793,35 \text{ mm}^3$ en el grupo P.

El día diecinueve post-IA se observa claramente cómo termina la evolución del volumen del CL en ambos grupos. Mientras que los valores se mantienen en el grupo de animales gestantes, comienzan a disminuir los valores del grupo de animales que no han quedado gestantes, aumentando las diferencias entre los valores registrados en ambos grupos.

Estas diferencias registradas el día veinte son estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Terminamos el estudio del volumen luteal con los días veintiuno y veintidós siendo en estos casos las diferencias altamente significativas ($p < 0,001$).

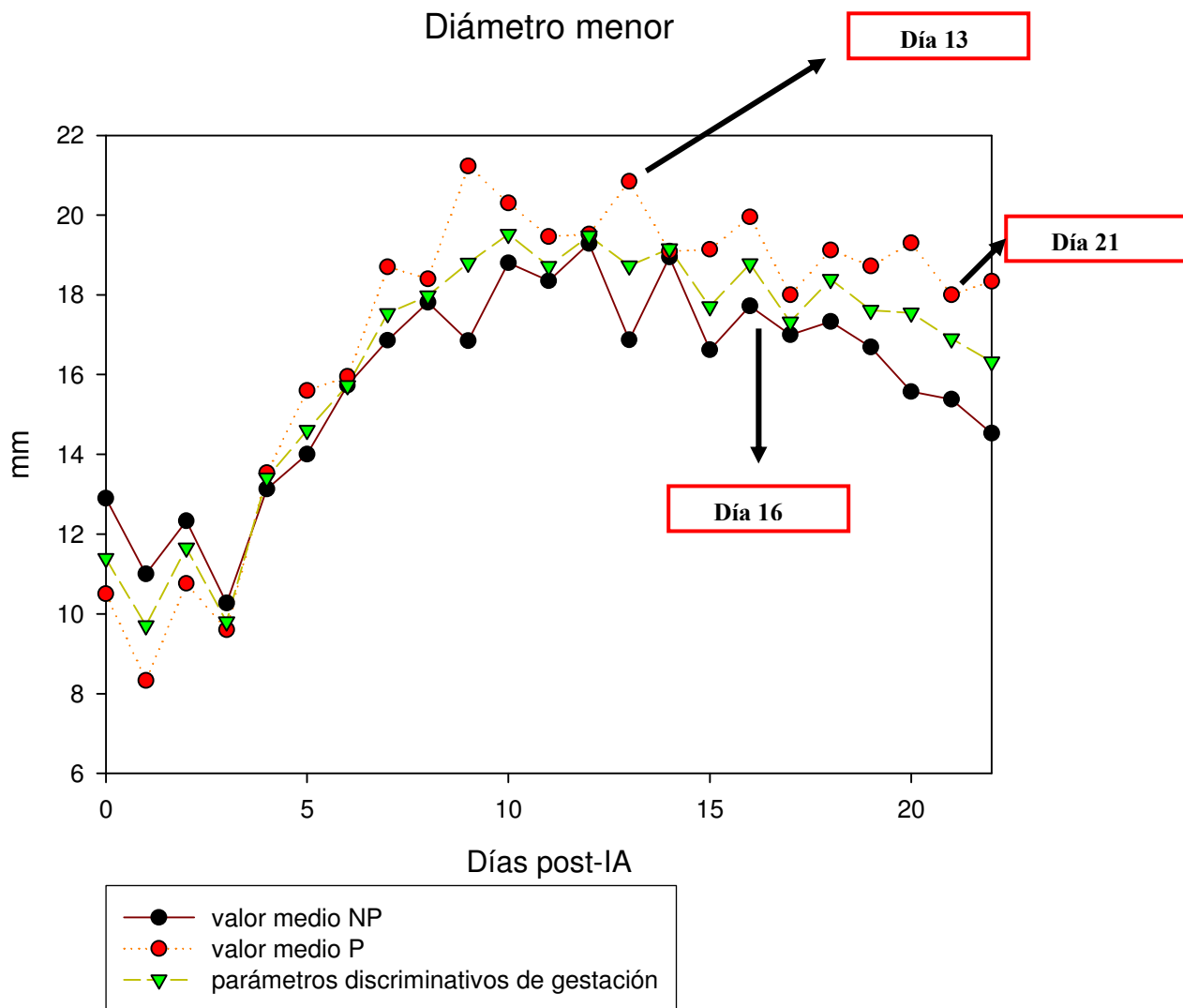
V.A.2.-Determinación del tamaño discriminativo del Cuerpo Lúteo para la distinción de vacas gestantes y no gestantes.

Comparando los tamaños del CL (diámetro mayor y menor, área y volumen luteal) obtenidos en el apartado anterior y contrastando los de las vacas preñadas (P) con los de las no preñadas (NP), pudimos observar que las diferencias más significativas tenían lugar los días 13, 16 y 21 del ciclo.

Los parámetros discriminativos de gestación a través de la exploración del CL se calcularon de la siguiente manera: a los valores medios obtenidos en estos tres días, tanto para las vacas preñadas, como para las no preñadas, se les sumaba y se les restaba su error estándar, por lo tanto, tendríamos dos valores extremos para cada grupo experimental. El valor discriminativo se determina hallando el punto medio entre la distancia de la media de las preñadas menos su error estándar y la media de las no preñadas más su error estándar. Resultando finalmente los siguientes parámetros discriminativos para poder diagnosticar el estado o no de gestación:

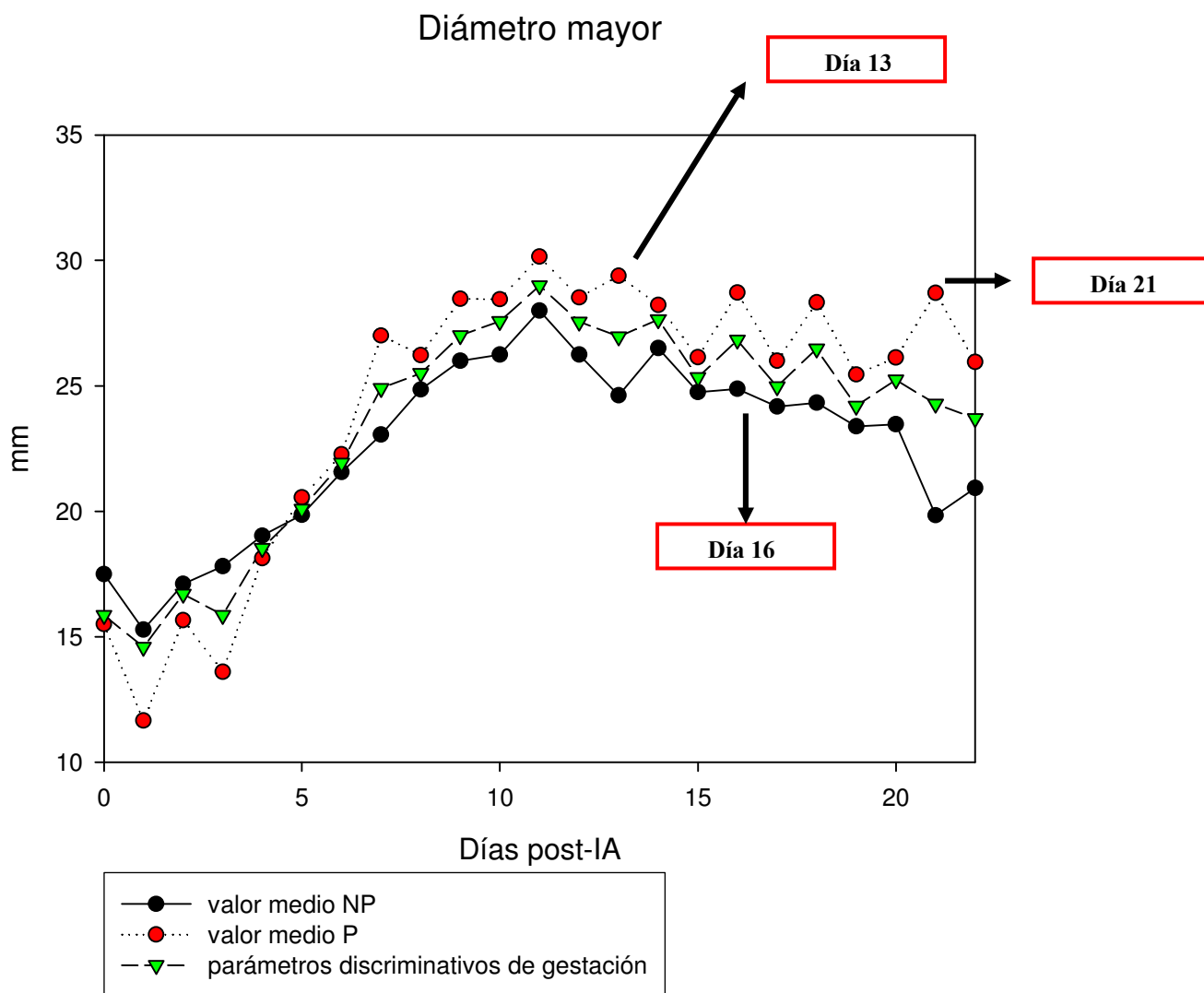
- *Diámetro menor.*
 Día 13: Preñada (P) $> 18,73 \text{ mm}$ $>$ No Preñada (NP).
 Día 16: Preñada (P) $> 18,78 \text{ mm}$ $>$ No Preñada (NP).
 Día 21: Preñada (P) $> 16,9 \text{ mm}$ $>$ No Preñada (NP).

Seguimiento ecográfico del CL tras la IA para establecer un diagnóstico ultraprecoz de gestación



Gráfica n° 13. Parámetros discriminativos de gestación para el diámetro menor del CL

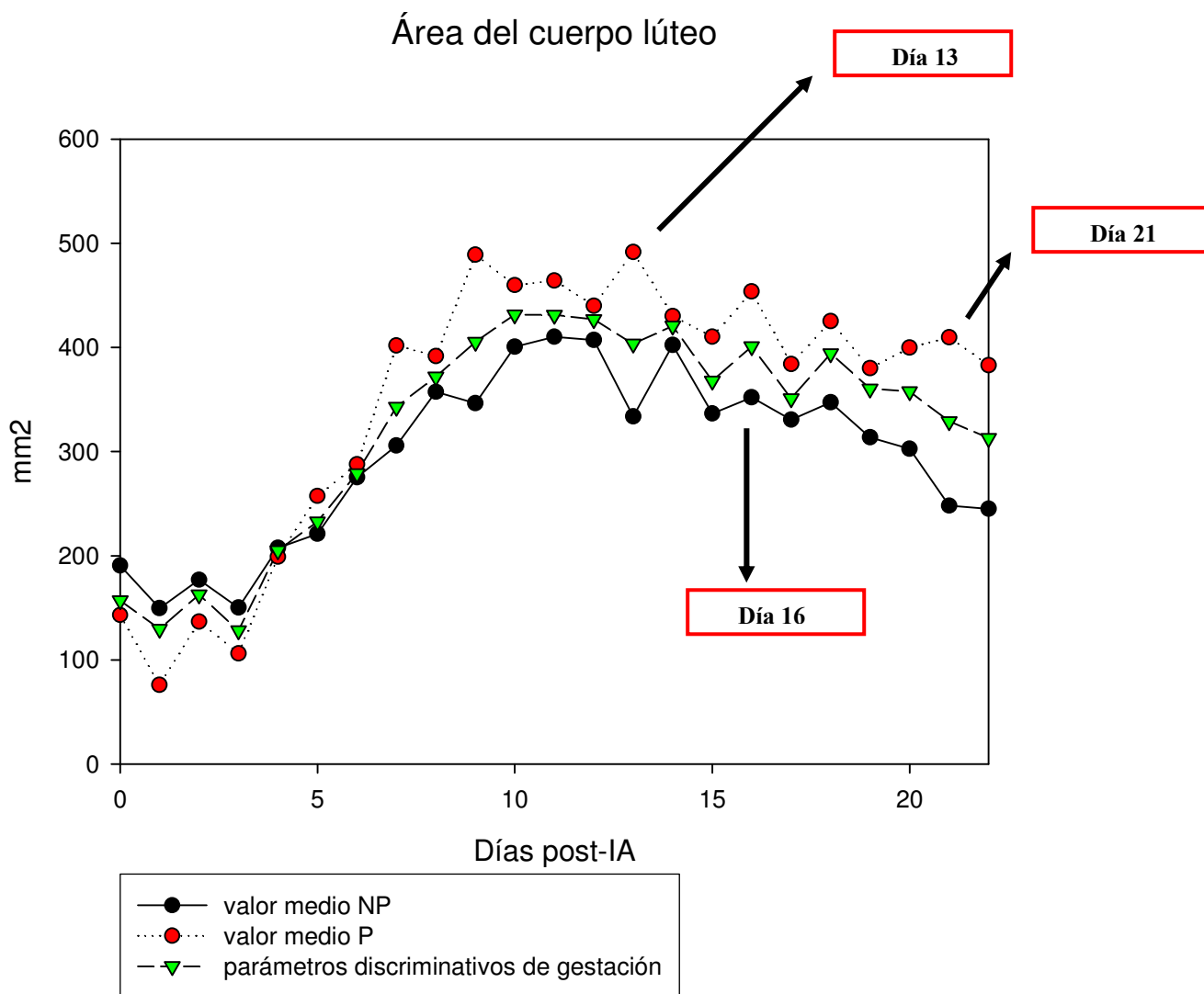
- *Diámetro mayor.*
 Día 13: Preñada (P) > 26,96 mm > No Preñada (NP).
 Día 16: Preñada (P) > 26,82 mm > No Preñada (NP).
 Día 21: Preñada (P) > 24,28 mm > No Preñada (NP).



Gráfica n° 14. Parámetros discriminativos de gestación para el diámetro mayor del CL

- *Área.*
 - Día 13: Preñada (P) > 403,26 mm² > No Preñada (NP).
 - Día 16: Preñada (P) > 400,98 mm² > No Preñada (NP).
 - Día 21: Preñada (P) > 328,94 mm² > No Preñada (NP).

Seguimiento ecográfico del CL tras la IA para establecer un diagnóstico ultraprecoz de gestación



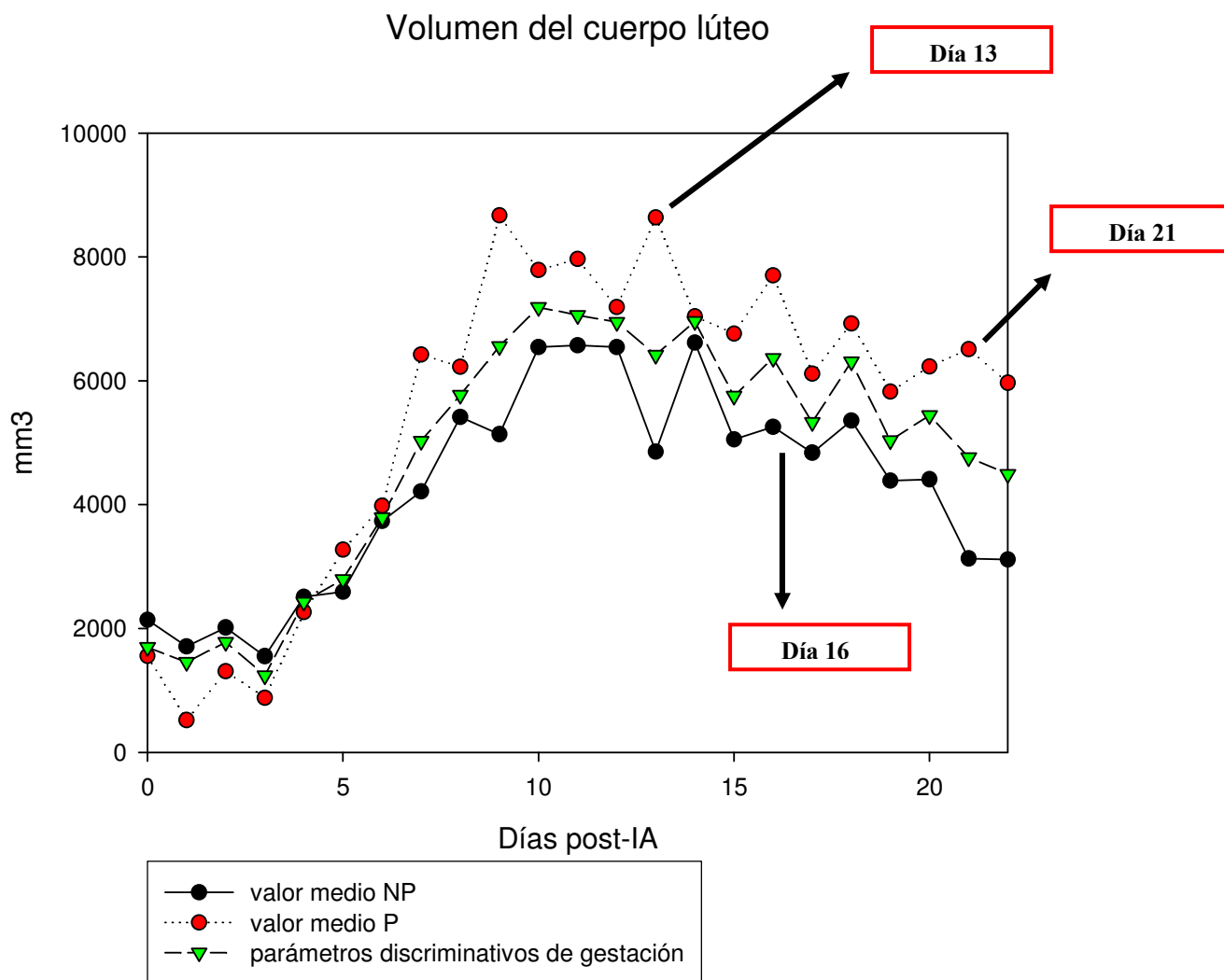
Gráfica n° 15. Parámetros discriminativos de gestación para el área del CL

- *Volumen.*

Día 13: Preñada (P) > 6416,84 mm³ > No Preñada (NP).

Día 16: Preñada (P) > 6495,54 mm³ > No Preñada (NP).

Día 21: Preñada (P) > 4761,51 mm³ > No Preñada (NP).



Gráfica n° 16. Parámetros discriminativos de gestación para el volumen del CL

V.A.3.-Seguimiento ecográfico del Cuerpo Lúteo tras la inseminación artificial para establecer un diagnóstico de gestación

En la tabla n° 67 del anexo, aparecen recogidos todos los datos individualizados del seguimiento ecográfico de las 302 vacas de la segunda fase experimental.

Para estimar los resultados de éste método de diagnóstico, tuvimos que tomar un método de referencia: el diagnóstico de gestación por palpación rectal (entre 30 y 40 días).

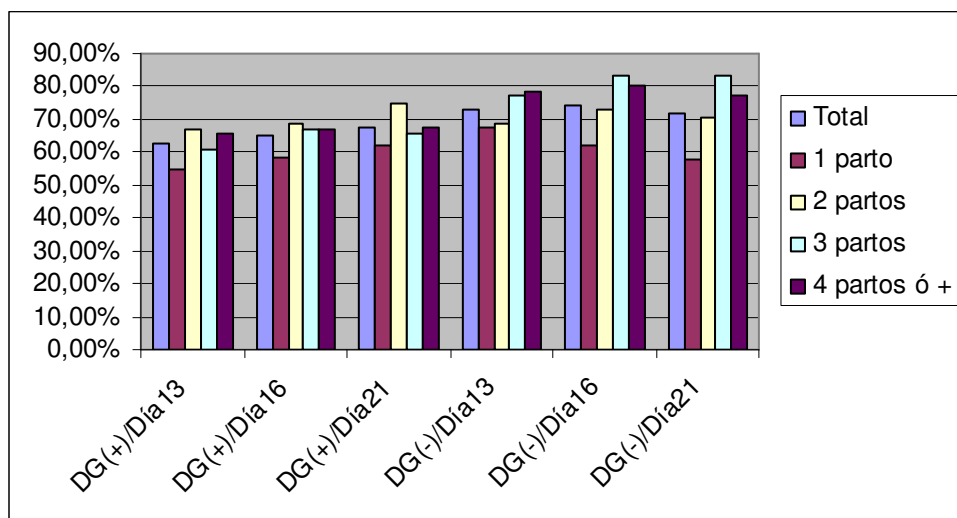
El siguiente paso fue calcular su exactitud y fiabilidad, tanto para el diagnóstico positivo como para el negativo.

En las dos siguientes tablas (n° 42 y n° 43), se reflejan los resultados del seguimiento ecográfico del CL tras la inseminación artificial, para establecer un posible diagnóstico de gestación. La primera tabla hace referencia a la exactitud del diagnóstico, y la segunda a su fiabilidad.

Seguimiento ecográfico del CL tras la IA para establecer un diagnóstico ultraprecoz de gestación

Vacas	DG(+)/Día13	DG(+)/Día16	DG(+)/Día21	DG(-)/Día13	DG(-)/Día16	DG(-)/Día21
Total	62,5%	64,9%	67,8%	72,7%	74,1%	71,6%
1 parto	54,5%	58,3%	62%	67,4%	61,9%	58%
2 partos	66,6%	68,6%	75%	68,5%	72,9%	70,8%
3 partos	60,7%	66,6%	65,4%	77,3%	83,3%	83,3%
4 partos ó +	65,6%	66,6%	67,7%	78,6%	80%	77,5%

Tabla n° 42. DG(+)= exactitud del diagnóstico positivo.
DG(-)= Exactitud del diagnóstico negativo.

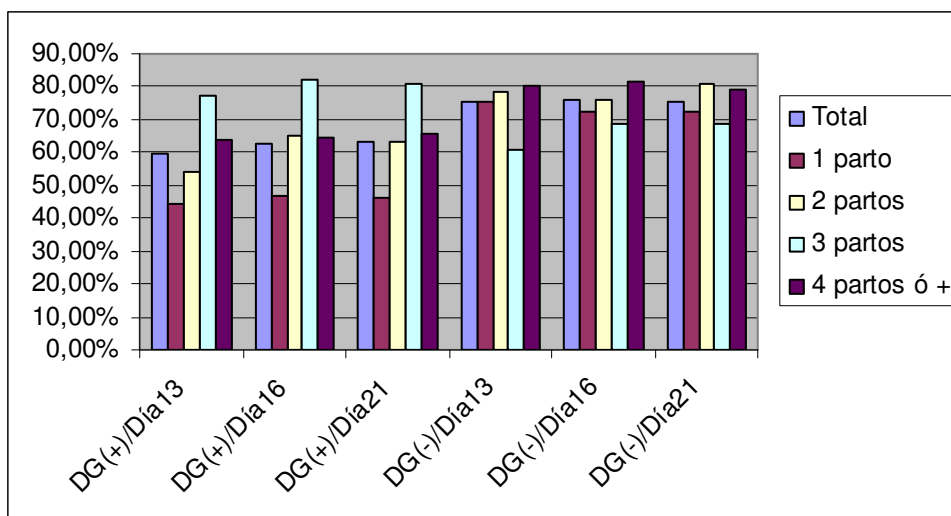


Gráfica n° 17. Exactitud positiva y negativa del diagnóstico ultraprecoz de gestación por ecografía

En esta tabla, los resultados para el diagnóstico negativo de gestación son mucho mejores que para el positivo. Los mejores resultados para la exactitud del diagnóstico negativo, corresponden a vacas de tercer y cuarto ó más partos para el día 16 post-IA, con exactitudes del 83,3% y del 80% respectivamente.

Vacas	DG(+)/Día13	DG(+)/Día16	DG(+)/Día21	DG(-)/Día13	DG(-)/Día16	DG(-)/Día21
Total	59,3%	62,7%	63,3%	75,3%	76%	75,5%
1 parto	44,4%	46,6%	46,4%	75,6%	72,2%	72,4%
2 partos	54%	64,9%	63,2%	78,7%	76,1%	81%
3 partos	77,3%	82%	81%	61%	69%	69%
4 partos ó +	63,6%	64,5%	65,6%	80%	81,5%	79,2%

Tabla n° 43. DG(+)= fiabilidad del diagnóstico positivo.
DG(-)= fiabilidad del diagnóstico negativo.



Gráfica nº 18. Sensibilidad y Especificidad del diagnóstico ultraprecoz de gestación por ecografía

Como se puede observar en esta última tabla, los resultados del diagnóstico negativo de gestación también son mucho mejores que los positivos, destacando los resultados para las vacas de segundo y cuarto ó más partos. Para estas últimas los resultados del diagnóstico de gestación negativo son mejores los días trece y dieciséis, con fiabilidades del 80% y 81,5% respectivamente, mientras que los resultados del diagnóstico de gestación negativo para las vacas de segundo parto son mejores el día veintiuno (81%).

Un dato a destacar es el diagnóstico positivo de gestación para las vacas de tercer parto, con resultados mucho mejores que para el diagnóstico negativo de gestación, e incluso con resultados mucho mayores que para el resto de vacas. Para el día 13 post-IA la fiabilidad del diagnóstico positivo de gestación es del 77,3% frente a la fiabilidad del diagnóstico negativo que es de un 61%; para el día 16 post-IA de un 82% frente a un 69% y por último, para el día 21 post-IA de un 81% frente a un 69%.

Lo más interesante sería poder diagnosticar las no preñadas lo antes posible, y según nuestros datos para las vacas de primer parto el día más apropiado es el día 13 post-IA con un 75,6%, para las vacas de segundo parto el día más apropiado es el día 21 post-IA con un 81%, para las vacas de tercer parto el día más apropiado es el día 16 post-IA con un 69% y para las vacas de cuarto o más partos el día más apropiado es el 16 post-IA con un 81,5%.

Una vez estudiados todos estos datos, debemos comprobar si existen ó no diferencias significativas para el diagnóstico negativo y positivo de gestación entre los diferentes grupos de vacas (nº de parto), y entre los días de exploración (tanto dentro del mismo parto, como entre partos).

Todas las diferencias encontradas, tanto significativas como no significativas, se verán reflejadas en las cuatro siguientes tablas (nº 44, nº 45, nº 46 y nº 47). En la primera tabla aparecerán las diferencias para la exactitud positiva, en la segunda tabla para la exactitud negativa, en la tercera tabla para la fiabilidad positiva y en la última tabla para la fiabilidad negativa.

Entre el día trece y el día dieciséis, no existen diferencias significativas para ningún parto y entre el día trece y el día veintiuno, existen diferencias entre significativas y muy significativas entre el primer y cuarto ó más partos.

Entre el día dieciséis y el día veintiuno existen diferencias significativas entre el primero y tercer parto y muy significativas entre el primero y cuarto ó más partos. Para el resto de partos no existen diferencias significativas.

En la tabla siguiente (nº 46) aparecen diferencias significativas y muy significativas que resumiremos a continuación:

- Para el día trece, solamente hemos constatado diferencias muy significativas entre el primero y tercer parto. Entre el resto de partos no existen diferencias significativas.
- Para el día dieciséis, existen diferencias muy significativas entre el primero y tercer parto.
- En el día veintiuno, al igual que en los días anteriores hemos comprobado que también existen diferencias muy significativas entre el primero y tercer parto. Para el resto de partos tan poco existen diferencias significativas.
- Dentro del mismo parto, no existen diferencias significativas entre días.
- Entre el día trece y el día dieciséis, existen diferencias entre muy significativas y altamente significativas para el primero y el tercer parto, y para el segundo y el tercer parto entre significativas y muy significativas. Para el resto de partos no existen diferencias significativas.
- Entre el día trece y el día veintiuno, existen diferencias muy significativas entre el primero y el tercer parto y significativas entre el segundo y tercer parto. Entre el resto de partos no existen diferencias significativas.
- Entre el día dieciséis y el día veintiuno, existen diferencias muy significativas entre el primero y el tercer parto. Para el resto de partos no existen diferencias significativas.

V. RESULTADOS.

V.A. Seguimiento ecográfico del cuerpo lúteo tras la inseminación artificial para establecer un posible diagnóstico ultraprecoz de gestación.

V.B. Predicción del sexo del feto por determinación de la testosterona en sangre periférica de la madre.

Predicción del sexo del feto por determinación de la testosterona en la sangre materna**V.B.-PREDICCIÓN DEL SEXO DEL FETO POR DETERMINACIÓN DE LA TESTOSTERONA EN SANGRE PERIFÉRICA DE LA MADRE****V.B.1.- Determinación de la testosterona plasmática en vacas no gestantes, recién paridas y gestantes.**

En la tabla n° 68 del anexo, se presentan los valores individualizados de testosterona plasmática (ng/dl ó nmol/L), en vacas vacías, recién paridas (de cero a diez días), y en vacas preñadas entre los siete y nueve meses de gestación.

Comprobamos a través del sistema de inmunoensayo de quimioluminiscencia, que la mayoría de las vacías y todas las recién paridas tenían niveles de testosterona plasmáticos tan bajos que el sistema nos reflejaba valores de 0 ng/dl, mientras que las preñadas nos daban niveles de testosterona plasmáticos elevados, comprendidos entre 0,964 ng/dl y 31,6 ng/dl.

V.B.2.-Estudio de la concentración de testosterona plasmática en vacas preñadas en relación con el sexo fetal

En tabla n° 69 del anexo, se recogen los valores individualizados obtenidos de las determinaciones de testosterona plasmática (ng/dl ó nmol/L), en el grupo de vacas preñadas (90-100 días de gestación) y el sexo del recién nacido.

Observamos que el número de vacas que parieron terneros (152), frente al número de vacas que parieron terneras (156) es prácticamente el mismo.

Clasificando los animales por número parto, vemos que 46 los partos son de novillas (25 terneros y 21 terneras), 85 son hembras de primera lactación que por lo tanto en su segundo parto parieron 40 terneros y 45 terneras, 70 son vacas de segunda lactación que en el tercer parto registran 31 terneros y 39 terneras, 48 vacas de tercera lactación que en el cuarto parto paren 25 terneros y 23 terneras; y finalmente 59 hembras de cuarta ó más lactación con 31 terneros y 28 terneras al parto.

Nuestro objetivo, es el estudio de una posible relación entre las cantidades de testosterona plasmática en las vacas preñadas de tres meses, con el sexo fetal. Estas concentraciones de testosterona en sangre periférica de la madre oscilan entre los 0 y los 66,4 ng/dl, con una media de 11,92 ng/dl para las gestaciones de hembras y de 17,46 ng/dl para las gestaciones de machos, siendo el punto medio de las medias de ambas muestras de 14,66 ng/dl. Determinado este punto medio de las medias de ambas muestras (14,66 ng/dl), se puede constatar que para el caso del sexo hembra el número de muestras que están por encima de este valor intermedio es de 47 de 156 (30,13%) y para el caso de los machos, el número de muestras que están por debajo de este valor intermedio es de 71 de 152 (46,7%).

En las siguientes tablas (n° 48, n° 49, n° 50, n° 51, n° 52, n° 53) se recogen los valores medios de las concentraciones de testosterona plasmática (ng/dl), desviaciones típicas y errores típicos de la media para el total de vacas, novillas y vacas de primera, segunda, tercera y cuarta ó más lactación:

Sexo	N	Media	Desviación típ	Error típ de la media
♀	156	11,92	9,98	0,81
♂	152	17,46	12,4	1,01

Tabla n° 48. Estadísticos de grupo para el total de hembras (media en ng/dl)

N- número de terneros ó de terneras

Sexo	N	Media	Desviación típ	Error típ de la media
♀	21	17,95	9,99	2,18
♂	25	27,29	11,17	2,23

Tabla n° 49. Estadísticos de grupo para las novillas (media en ng/dl)

N- número de terneros ó de terneras

Sexo	N	Media	Desviación típ	Error típ de la media
♀	45	12,08	11,25	1,67
♂	40	11,87	10,19	1,59

Tabla n° 50. Estadísticos de grupo para las vacas de primera lactación (media en ng/dl)

N- número de terneros ó de terneras

Sexo	N	Media	Desviación típ	Error típ de la media
♀	39	10,10	10,03	1,63
♂	31	16,13	9,26	1,66

Tabla n° 51. Estadísticos de grupo para las vacas de segunda lactación (media en ng/dl)

N- número de terneros ó de terneras

Sexo	N	Media	Desviación típ	Error típ de la media
♀	23	9,85	7,76	1,62
♂	25	17,72	15,25	2,99

Tabla n° 52. Estadísticos de grupo para las vacas de tercera lactación (media en ng/dl)

N- número de terneros ó de terneras

Sexo	N	Media	Desviación típ	Error típ de la media
♀	28	11,59	7,92	1,49
♂	31	17,48	11,83	2,19

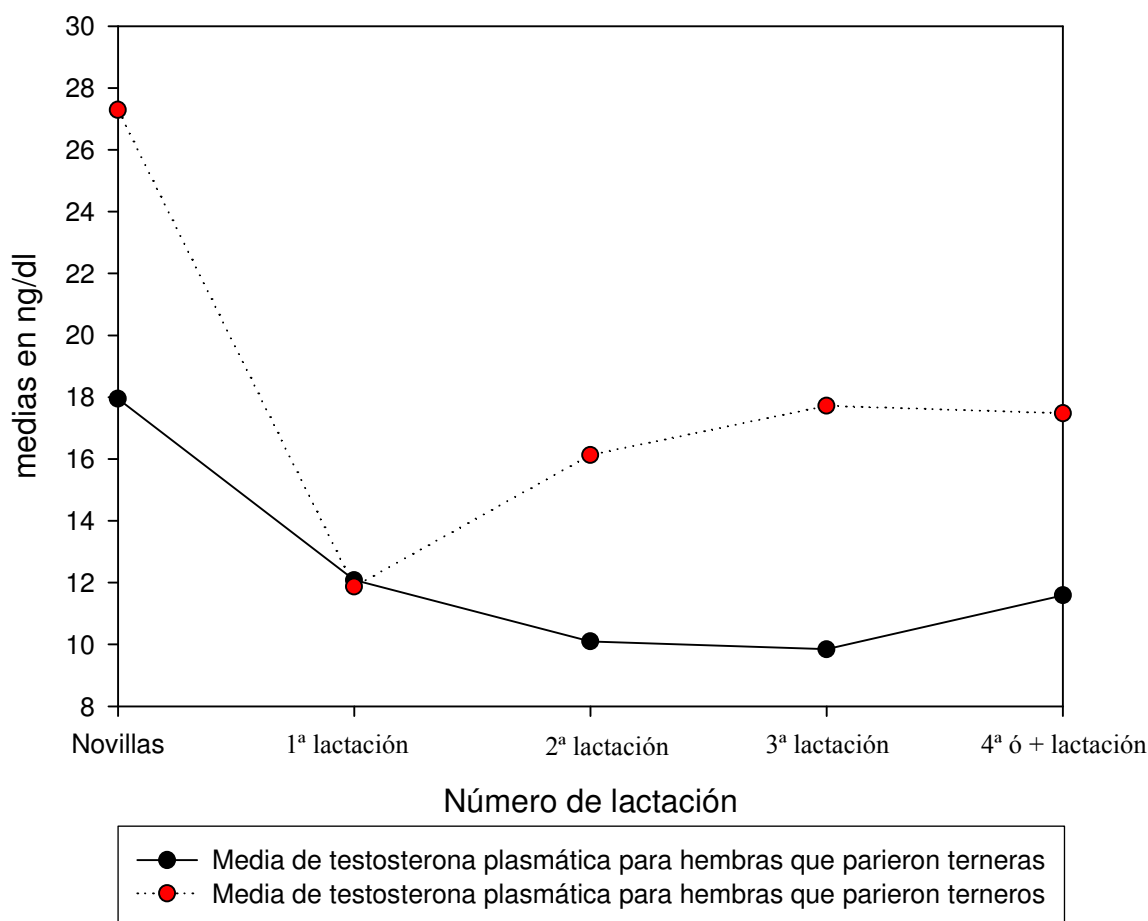
Tabla n° 53. Estadísticos de grupo para las vacas de cuarta ó más lactaciones (media en ng/dl)

N- número de terneros ó de terneras

Predicción del sexo del feto por determinación de la testosterona en la sangre materna

Los estudios de una posible relación entre las cantidades de testosterona plasmática en vacas preñadas de tres meses, con el sexo fetal fueron los siguientes: en primer lugar, se realizó la prueba estadística T de comparación de medias para muestras independientes y la prueba de Levenne para igualdad de varianzas, de cuyo resultado se infiere que existen diferencias significativas entre los niveles de testosterona en sangre periférica de la madre y el sexo fetal. Del análisis de estas dos variables obtenemos que el porcentaje global de acierto con este modelo es del 61% (69% para terneras y 52,6% para terneros).

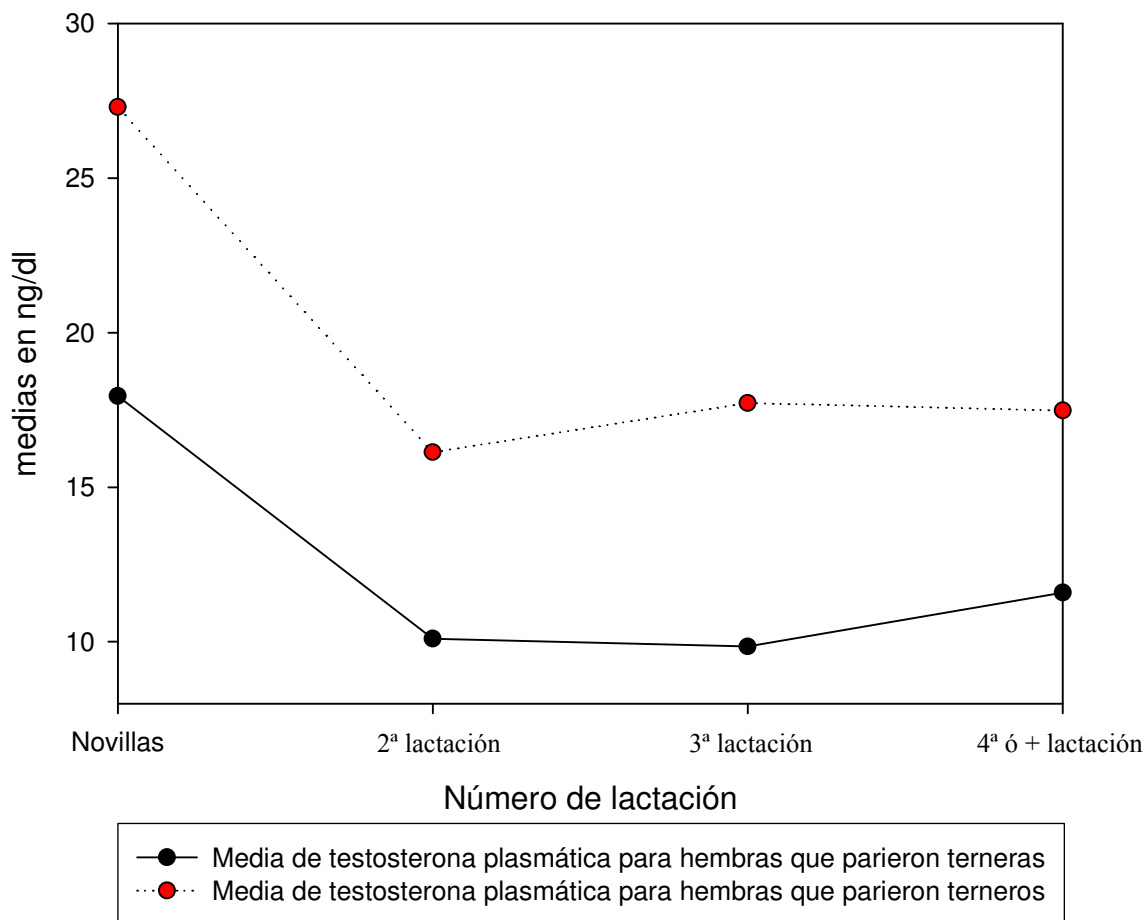
Analizando los datos por número de parto, podemos ver que no existen diferencias entre los porcentajes de acierto de terneras y terneros (50%) para las vacas de primera lactación, por lo que no las tendremos en cuenta en nuestro estudio.

Concentraciones medias de testosterona Plasmática

Gráfica n° 19. Gráfica de concentraciones medias de testosterona plasmática (ng/dl) para novillas, vacas de primera, segunda, tercera y cuarta ó más lactación, en el caso de parir un ternero ó una ternera

Al eliminar este grupo de vacas (primera lactación), el porcentaje global de acierto aumenta un poco más, llegando al 66,5% (73,6% para terneras y 59,5% para terneros).

Concentraciones medias de testosterona plasmática



Gráfica n° 20. Gráfica de concentraciones medias de testosterona plasmática (ng/dl) para novillas y vacas de segunda, tercera y cuarta ó más lactación, en el caso de parir un ternero ó una ternera

Para las novillas (hembras en su primera gestación), el porcentaje global de acierto es del 63% (57,1% para terneras y 68% para terneros).

En cuanto a las vacas de segunda lactación (hembras en su tercera gestación), vemos que el porcentaje de acierto global es del 66,7% (84,2% para terneras y 45,2% para terneros).

Para las vacas de tercera lactación (hembras en su cuarta gestación), el porcentaje global es de 59,2% (60,9% para terneras y 57,7% para terneros).

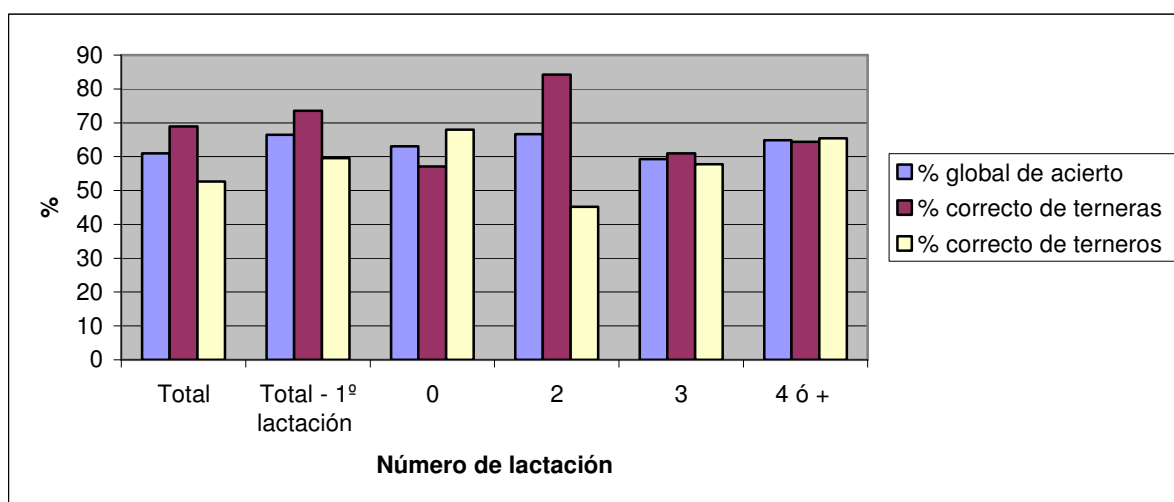
Por último, y para las vacas de cuarta ó más lactación este porcentaje global es del 64,9% (64,3% para terneras y 65,5% para terneros).

Predicción del sexo del feto por determinación de la testosterona en la sangre materna

Todos estos datos se resumen en la siguiente tabla (n° 54):

	% global de acierto	% correcto de terneras	% correcto de terneros
Total	60,9	69	52,6
Total - 1° lactación	66,5	73,6	59,5
0	63	57,1	68
2	66,7	84,2	45,2
3	59,2	60,9	57,7
4 ó +	64,9	64,3	65,5

Tabla n° 54. 0=novillas.
 2= segunda lactación.
 3=tercera lactación.
 4= cuatro ó + lactación.



Gráfica n° 21. Porcentajes de acierto del sexaje fetal en hembras preñadas entre 90 y 100 días de gestación

Como podemos observar, los porcentajes de aciertos globales son prácticamente iguales independientemente del n° de parto, siendo la única diferencia a destacar el porcentaje de aciertos en el caso de gestaciones de fetos hembras en las vacas de segunda lactación (84,2%).

V.B.3.-Comparación de la concentración de testosterona plasmática con la probabilidad de que el sexo fetal sea macho

En la tabla n° 70 del anexo, aparecen todas las concentraciones de testosterona plasmática (ng/dl) en relación con la probabilidad de que el sexo fetal sea macho (P(y=1)). Debido a que todos los cálculos se basan en un modelo de regresión logística, la probabilidad de hembra es la contraria a la de macho.

En la gráfica que se muestra a continuación (n° 22), tenemos la evolución de este parámetro (ng/dl) en relación con la probabilidad de macho.

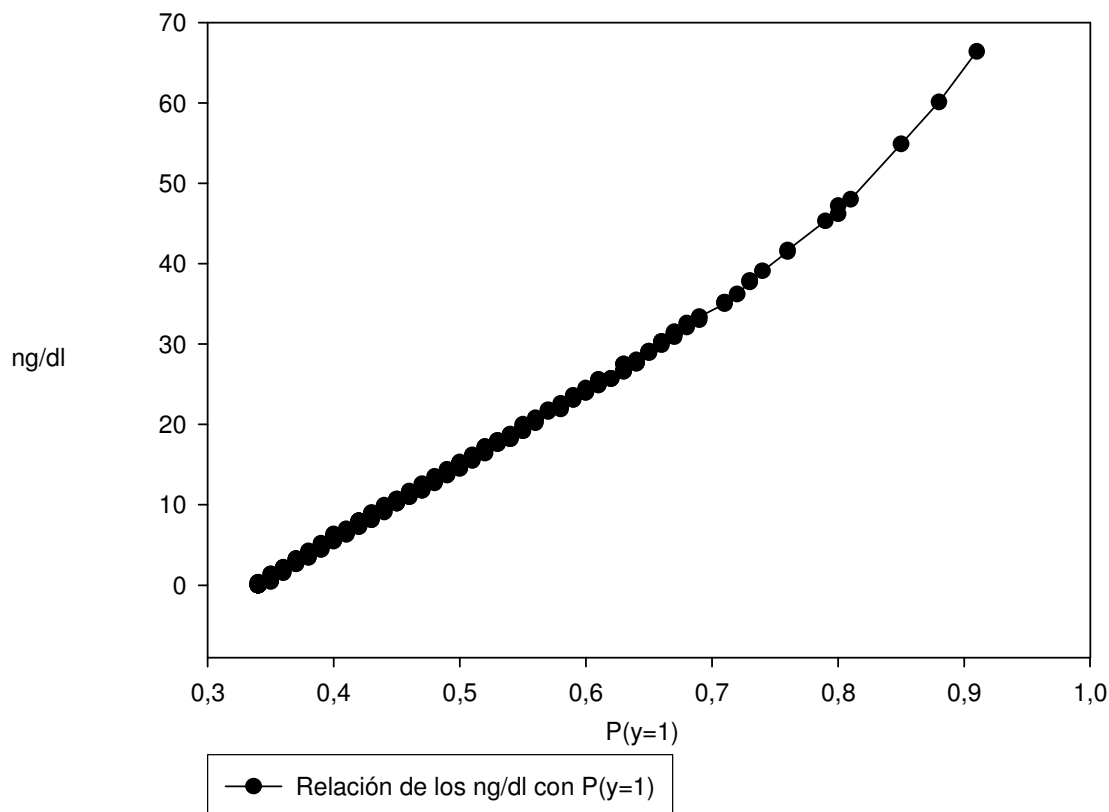


Gráfico n° 22. Relación de la concentración de testosterona plasmática (ng/dl) con la probabilidad de macho ($P(y=1)$).

Podemos ver que a medida que aumenta la concentración de testosterona plasmática, aumenta la probabilidad de macho y disminuye por tanto la probabilidad de hembra. Pero como observamos, diecisiete de nuestros resultados nos dan valores de 0 ng/dl, partiendo ya de una probabilidad de macho bastante alta (0,34).

Para concentraciones de testosterona mayores ó iguales de 35 ng/dl, las probabilidades de macho ya son elevadas ($> 0,70$).

Como ya hemos dicho al principio, nuestros cálculos se basan en un modelo de regresión logística, por lo que la curva de nuestra gráfica, debería ser una curva sigmoidea. Lo que vemos, es que nuestra curva, al principio, es casi una línea recta y esto se debe a que la mayoría de los casos se concentran para resultados de testosterona menores de 35 ng/dl y mayores de 5 ng/dl, por lo que este método funciona mejor para los casos extremos, donde las concentraciones de testosterona son mayores de 35 ng/dl y las probabilidades de macho son mayores de 0,70.

El problema de todo esto, es que el número de casos extremos es muy bajo (16 de un total de 311).

Predicción del sexo del feto por determinación de la testosterona en la sangre materna**V.B.4.-Comparación de la concentración de testosterona plasmática con la probabilidad de que el sexo fetal sea macho según el número de parto**

En las tablas n° 71, n° 72, n° 73 y n° 74 del anexo, se recogen los valores de las concentraciones plasmáticas de testosterona del grupo de novillas, vacas de segunda lactación, vacas de tercera lactación y vacas de cuarta ó más lactación respectivamente, junto a las probabilidades de que el sexo fetal sea macho.

La evolución de este parámetro (concentración de testosterona), con respecto a la probabilidad del sexo fetal macho se puede observar en las gráficas n° 23, n° 24, n° 25 y n° 26.

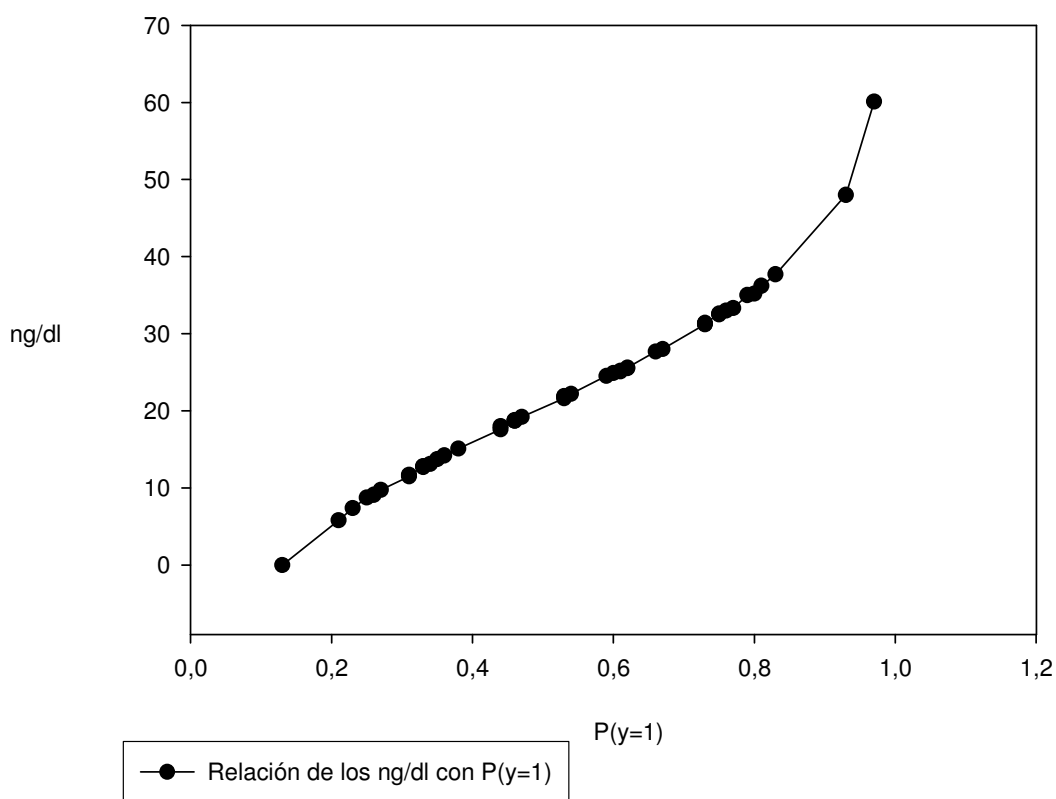


Gráfico n° 23. Relación de la concentración de testosterona plasmática (ng/dl) con la probabilidad de macho (P(y=1)) en novillas.

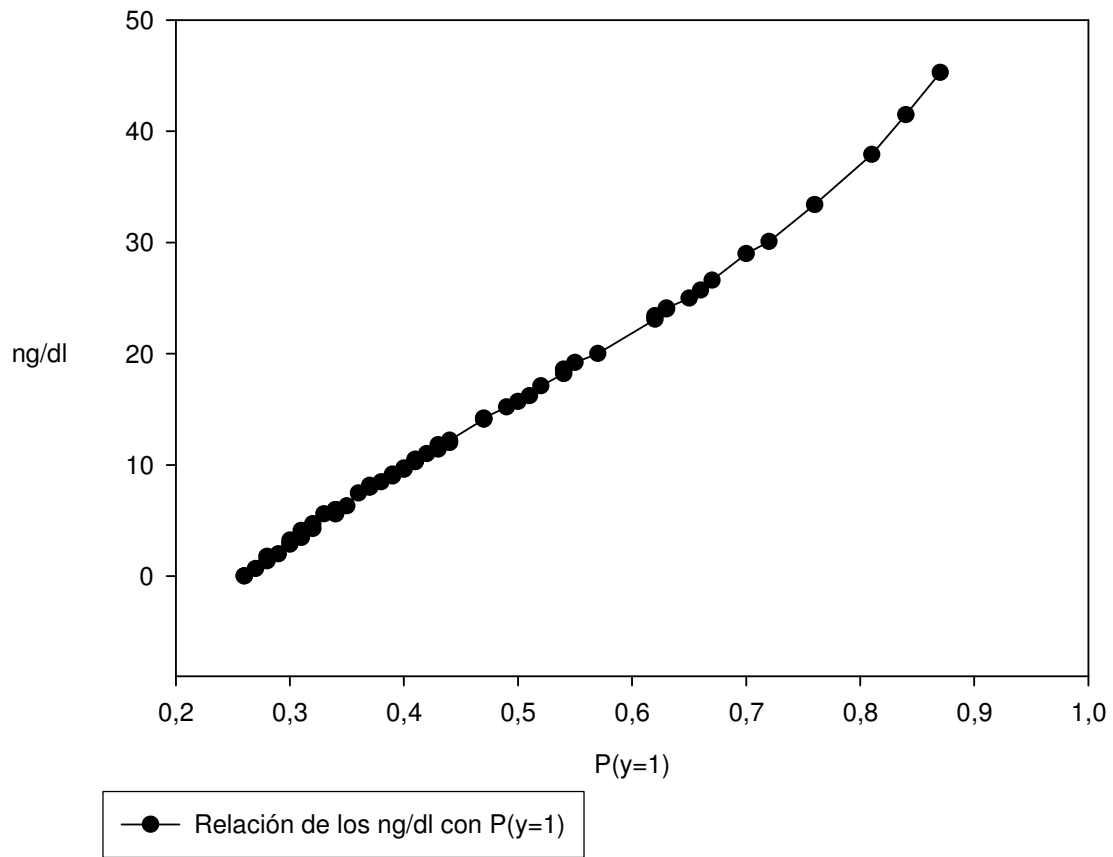


Gráfico n° 24. Relación de la concentración de testosterona plasmática (ng/dl) con la probabilidad de macho ($P(y=1)$) en vacas de segunda lactación.

Predicción del sexo del feto por determinación de la testosterona en la sangre materna

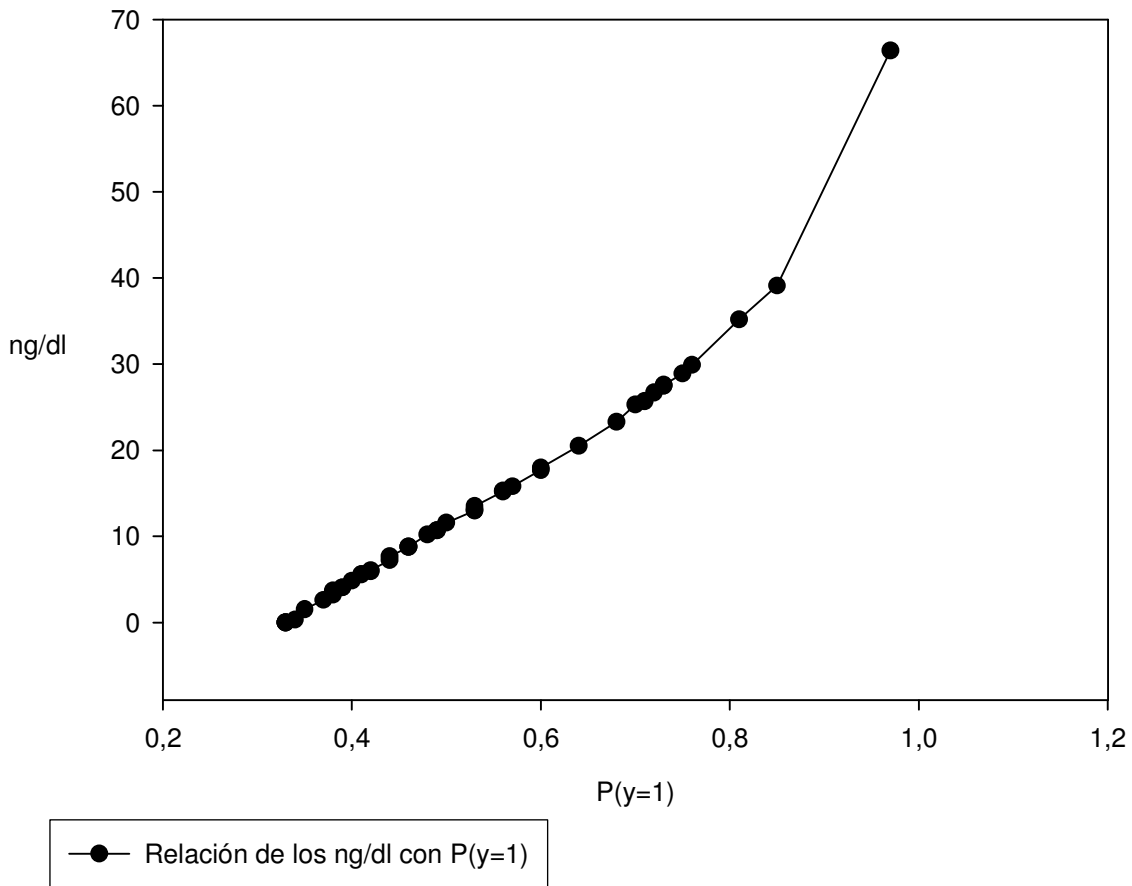


Gráfico n° 25. Relación de la concentración de testosterona plasmática (ng/dl) con la probabilidad de macho ($P(y=1)$) en vacas de tercera lactación.

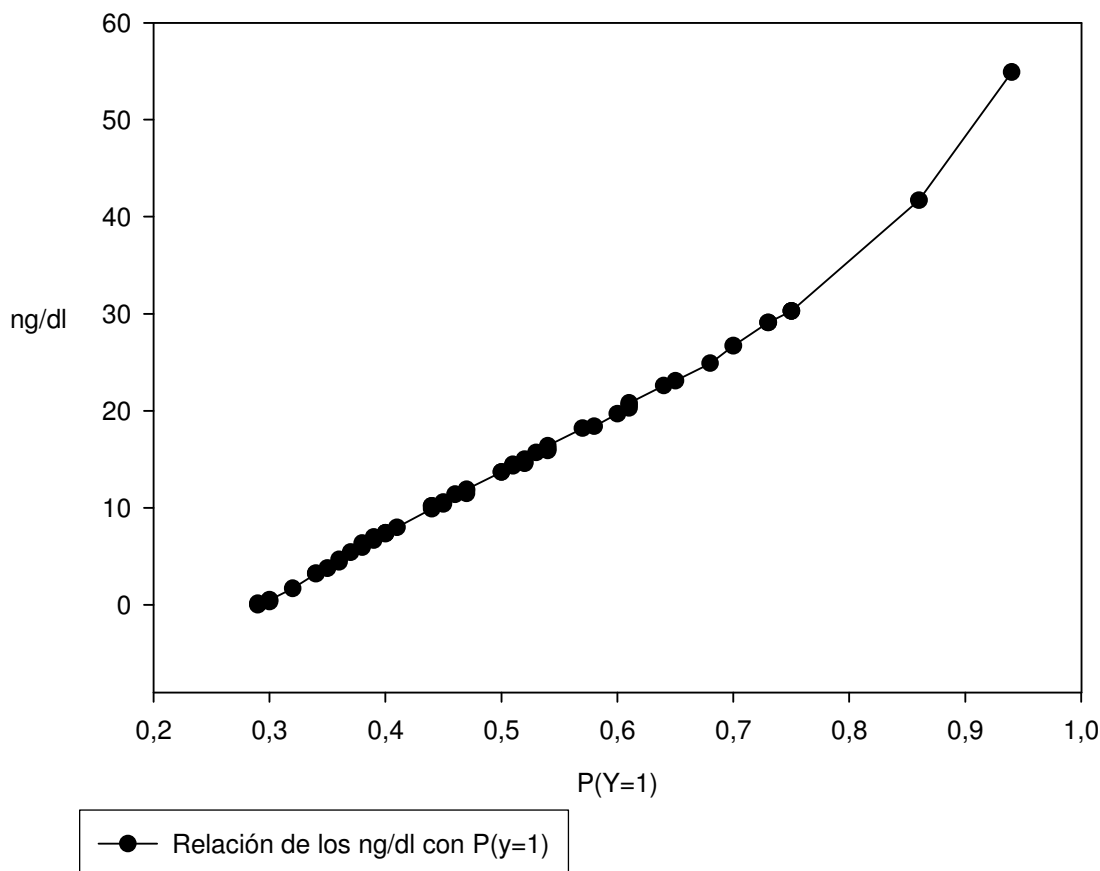


Gráfico n° 26. Relación de la concentración de testosterona plasmática (ng/dl) con la probabilidad de macho ($P(y=1)$) en vacas de cuarta ó más lactaciones.

Para todos estos casos, vemos que a medida que aumenta la concentración de testosterona plasmática, aumenta la probabilidad de macho y por tanto disminuye la de hembra.

Analizando cada una de las gráficas por separado, hemos podido comprobar que los resultados de las novillas son los que más se ajustan al modelo de regresión logística, dando lugar a una curva sigmoidea y siendo mucho más elevados los valores medios de concentración de testosterona que para el resto de vacas.

La mayoría de los resultados para las novillas se concentran entre los 11 y los 35 ng/dl, partiendo de probabilidades de macho bajas que van aumentando progresivamente ($P=0,3$ a $P=0,8$).

En el caso de las vacas de segunda y tercera lactación, más de la mitad de los resultados corresponden a concentraciones de testosterona bajas, con la diferencia de que para las vacas de tercera lactación, partimos ya de probabilidades de macho bastante altas ($P=0,33$).

Predicción del sexo del feto por determinación de la testosterona en la sangre materna

En cuanto a las vacas de cuatro ó más lactación, más de la mitad de los resultados (34 de 58) se encuentran dentro del rango de probabilidades comprendido entre $P=0,4$ y $P=0,7$. Únicamente 8 de los resultados superan la probabilidad de macho de $P=0,7$ con concentraciones de testosterona plasmática muy dispares.

Al realizar el cálculo de las probabilidades, vimos que para $P=0,5$, en las novillas alcanzábamos valores de 21,6 ng/dl, mientras que para el resto de vacas (segunda, tercera y cuarta ó más lactación) únicamente llegábamos a valores de 15,7, 11,6 y 13,7 ng/dl respectivamente. Por lo tanto, seguíamos afirmando que las concentraciones de testosterona plasmática en novillas preñadas de tres meses eran mucho mayores que para el resto de vacas.

Otra de las cosas que pudimos comprobar al estudiar las probabilidades de macho es que para probabilidades elevadas (de $P=0,7$ en adelante), las concentraciones de testosterona plasmática son muy similares para cada grupo de vacas.

En general, podríamos decir, que a la hora de determinar el sexo fetal a través de la concentración de testosterona en vacas preñadas de tres meses, las novillas dan mejores resultados para machos y las vacas de segunda lactación para hembras. En el caso de las novillas hablaríamos de un porcentaje del 68% frente a un porcentaje del 45,2%, 57,7% y 65,5% para vacas de segunda, tercera y cuarta ó más lactación respectivamente, y en el caso de las vacas de segunda lactación hablaríamos de un porcentaje del 84,2% frente a un porcentaje del 57,1%, 60,9% y 64,3% para novillas y para vacas de tercera y cuarta ó más lactaciones respectivamente.

V.B.5.-Cálculo de probabilidades de macho totales

El objetivo de nuestro estudio, sería poder aplicarlo a nivel de campo, es decir, poder contestar al ganadero con que probabilidad su vaca gestante de tres meses parirá una hembra ó un macho. Por lo tanto, deberíamos hacer el cálculo de probabilidades para cada una de las concentraciones de testosterona plasmáticas posibles.

Una vez comprobado que la mayor concentración es de 66,4 ng/dl, realizamos una tabla (n° 75 del anexo) en la que aparecen todas las probabilidades de macho correspondientes a concentraciones de testosterona de 0 a 70 ng/dl (a intervalos de 0,5 ng/dl) y para todos los grupos de vacas.

Una vez realizados todos los cálculos de esta tabla y analizados sus datos, podemos ver que no existen diferencias entre las probabilidades de acierto de terneras y terneros para las vacas de primera lactación. Para concentraciones de 0 ng/dl ya partimos de probabilidades de $P=0,48$. Un dato a destacar, es que, a diferencia del resto de lactaciones, para las vacas de primera lactación a medida que aumenta la concentración de testosterona plasmática, disminuye la probabilidad de macho: para una concentración de 70 ng/dl, $P=0,44$.

Observamos que para las vacas de segunda, tercera y cuarta ó más lactación, ya partimos de una probabilidad de macho cercana a 30% por lo que la de hembra será de un 70%.

Debido a esto, cogemos este 70% de probabilidad de hembra (30% de macho) como punto de referencia, para ver qué concentraciones de testosterona plasmática nos indicarían con más fiabilidad que el sexo fetal es una hembra.

Para novillas esta concentración sería $\leq 11,5$ ng/dl, para vacas de segunda lactación $\leq 3,5$ ng/dl, para las de tercera lactación de 0 ng/dl y para las de cuarta ó más lactaciones ≤ 1 ng/dl.

En cuanto a la probabilidad de macho, para igualarnos a la de hembra, también cogeremos este 70% (30% de hembra). En este caso, las concentraciones de testosterona plasmática para macho sería ≥ 30 ng/dl para novillas, ≥ 29 ng/dl para vacas de segunda lactación, ≥ 25 ng/dl para vacas de tercera lactación y ≥ 27 ng/dl para las vacas de cuarta ó más lactación.

El inconveniente de todo esto, es comprobar que el número de casos que cumplen estas condiciones es muy bajo, vemos que este método de sexaje fetal sólo es válido para casos extremos. En el caso de las novillas y para fetos hembras, sólo lo cumple un 13,04% de los casos (6 de 46) y para los fetos machos el 30,43% (14 de 46). En cuanto a las vacas de segunda lactación y para fetos hembras: 14,28% (10 de 70) y para fetos machos: 8,57% (6 de 70). Para las vacas de tercera y cuarta ó más lactación y para fetos hembras, sólo lo cumplen un 8,33% y un 6,78% de los casos (4 de 48 y 4 de 59), y para los fetos machos un 22,92% (11 de 48) y un 11,86% (7 de 59) respectivamente.

VI. DISCUSIÓN.

VI. A. Exploración ecográfica del cuerpo lúteo en ganado vacuno.

VI. B. Diagnóstico ultraprecoz de gestación por exploración del cuerpo lúteo los días 13, 16 y 21 post-IA.

VI. C. Sexaje fetal por determinación de los niveles de testosterona en sangre periférica de la madre.

Exploración ecográfica del CL en ganado vacuno**VI.A.- EXPLORACIÓN ECOGRÁFICA DEL CUERPO LÚTEO EN GANADO VACUNO****VI.A.1.-Detección ecográfica del Cuerpo Lúteo**

Tal como afirman Rajamahendran *et al.* 1994, normalmente con un buen ecógrafo y un explorador con suficiente experiencia no existe dificultad en detectar CLs a los tres días de su formación tras la ovulación. Hecho, que hemos podido constatar en el desarrollo de nuestra Tesis Doctoral.

Por ello, no estamos de acuerdo con las afirmaciones de Kastelic *et al.* 1990b, quienes aportan que un 73% de los CLs se pueden detectar el día cero. Esta detección es difícil como demuestran nuestros resultados trabajando con una sonda rectal de 5MHz igual que lo hicieron ellos. De 46 exploraciones, se detectaron 26 CL el día cero, por lo tanto, sólo un 56,52%.

Al igual que Kähn *et al.* (1986), Pieterse (1990) y Grygar *et al.* (1992), con nuestro trabajo se ha demostrado la alta veracidad de la imagen ecográfica a la hora de detectar grandes CLs.

En el trabajo realizado por Kastelic *et al.* 1990b, constatan (aunque no encuentran diferencias estadísticamente significativas), que la primera detección del CL para animales que no quedan gestantes es mas amplia (rango de 0 a 4 días), que en aquellos que quedan gestantes (rango de 0 a 1). Esta observación no concuerda con los resultados que nosotros hemos obtenido, toda vez que hemos encontrado mayor dificultad en la primera detección del CL en animales que quedaron gestantes (rango de 0 a 4 días post-IA) que en los que no concibieron (rango de 0 a 3 días).

VI.A.2.-Diámetros del Cuerpo Lúteo

No estamos de acuerdo con los valores medios que dan Bungartz *et al.* (1994), para el diámetro del CL el día tres del ciclo estral, ya que nuestros resultados difieren sensiblemente.

Para este autor, este diámetro medio el día tres del ciclo es de $22 \pm 5,4$ mm. Nosotros hemos obtenido los valores reflejados en la tabla nº 55, especificando el diámetro mayor y menor del CL, en las dos situaciones contempladas durante este trabajo (animales gestantes y no gestantes).

	Diámetro menor	Diámetro mayor
NP (animales no gestantes)	10,27 \pm 0,93 mm	17,81 \pm 1,42 mm
P (animales gestantes)	9,6 \pm 1,20 mm	13,6 \pm 1,12 mm

Tabla nº 55. Valores medios del diámetro del CL el día tres post-IA en P y NP.

Pierson *et al.* 1984, afirmaron que el día tres del ciclo los CLs reconocibles tienen como media 14 mm de ancho y de 18 a 21 mm de longitud. Por lo tanto, como puede observarse, nuestros resultados están más cercanos a los de estos autores.

En la tabla n° 55, también se refleja lo que habíamos expuesto con anterioridad. Los valores medios obtenidos durante los primeros días del ciclo para el diámetro del CL son menores en el grupo P. En este caso tenemos los valores medios del día tres.

1. Diámetros del Cuerpo Lúteo en animales no gestantes.

1. A. Valores máximos del diámetro del Cuerpo Lúteo.

Ya en 1984 Pierson *et al.*, afirman que en animales no gestantes el CL alcanza su tamaño máximo alrededor del día doce del ciclo estral.

En el caso del diámetro menor del CL en el grupo de animales no gestantes (NP), nuestros resultados coinciden con lo afirmado por estos autores. Nosotros hemos registrado este valor máximo (de $19,29 \pm 0,76$ mm) el día doce del ciclo (Tabla n° 24).

En el caso del diámetro mayor del CL (Tabla n° 28), el máximo valor registrado ha sido el día once del ciclo ($28 \pm 1,02$ mm).

Estos resultados están en la misma línea de los aportados por Jakowski *et al.* (1993). Ellos estudiaron nueve vacas durante el ciclo estral (con una sonda de 5 MHz, al igual que nosotros). Realizaron los exámenes el primer día del ciclo, el día cinco, el día doce y el día dieciocho. El diámetro máximo lo encontraron el día doce.

Valores muy similares los aportaron Lean *et al.* (1992). El diámetro máximo del CL en un ciclo estral de duración normal es de $25,8 \pm 0,8$ mm ($p < 0,002$).

1. B. Caída de los valores del diámetro del Cuerpo Lúteo.

En el caso del ganado vacuno lechero los procesos de involución luteal, en un ciclo estral comienzan a partir del día diecisiete. A nivel microscópico existen menores inclusiones mitocondriales, menores lípidos citoplasmáticos, etc. Son muchos los autores que afirman que sobre el día diecisiete comienza a disminuir el tamaño del CL: Pieterse (1989), Bungartz *et al.* (1994), Fields *et al.* (1996).

En nuestro trabajo, hemos observado también que los procesos de involución luteal, si no existe gestación, comienzan el día diecisiete. En el caso del diámetro menor, es en este día cuando comienza la caída continua de los valores para este parámetro (Gráfica n° 1 y Tabla n° 25).

Lo mismo ocurre cuando observamos la evolución del diámetro mayor. Aparece una meseta en los valores medios entre los días diecisiete y dieciocho del ciclo, produciéndose seguidamente la regresión del diámetro mayor del CL (Gráfica n° 4). Como ya se señaló en el apartado de resultados correspondiente al diámetro mayor en el grupo NP (vacas no gestantes), hay una fuerte caída de los valores entre los días veinte y veintiuno del ciclo (de $23,47 \pm 1,72$ mm a $19,84 \pm 1,21$ mm).

2. Evolución comparada del diámetro del Cuerpo Lúteo entre los grupos P y NP.

Jaskowski *et al.* (1993) realizaron un seguimiento (con una sonda de 5 MHz) durante todo el ciclo en nueve vacas que no quedaron gestantes, y en once inseminadas con éxito.

Exploración ecográfica del CL en ganado vacuno

Observaron, que el tamaño de dicho CL era significativamente mayor en las vacas preñadas que en las que no lo estaban. Este hecho lo observaron el día doce post-IA.

Nosotros, hemos hecho la diferenciación del diámetro mayor y menor del CL obteniendo en este caso los siguientes resultados:

- El día doce no encontramos diferencias significativas entre el tamaño del CL de vacas gestantes y no gestantes. Sin embargo, en el caso del día trece si hemos encontrado diferencias significativas (Tabla n° 27 y Tabla n° 33).
 - En el caso del diámetro menor las diferencias encontradas (3,97 mm) son muy significativas ($p < 0,01$).
 - Si nos referimos al diámetro mayor, las diferencias encontradas (4,76 mm) son estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

En el trabajo publicado por Lukaszewska *et al.* (1980), afirman que el embrión demuestra su presencia y causa el mantenimiento del CL en el día diecisiete o dieciocho después de la fecundación. Cuando nosotros hemos hecho una comparación de la evolución del diámetro menor del CL entre animales gestantes y no gestantes, observamos que:

- Los días diecisiete y dieciocho este diámetro tiene una evolución paralela, siendo mayores estos valores en el caso de existir gestación, aunque no aparecen diferencias significativas entre ambos grupos (P y NP).

	Día diecisiete	Día dieciocho
NP (animales no gestantes)	17 ± 0,92 mm	17,33 ± 0,93 mm
P (animales gestantes)	18 ± 1,27 mm	19,12 ± 0,60 mm

Tabla n° 56. Valores medios del diámetro menor del CL los días 17 y 18 post-IA en P y NP.

- El día diecinueve aparece ya un alejamiento en esta evolución. En el caso de no existir gestación tenemos un diámetro menor de 16,69 ± 0,98 mm. Cuando existe gestación el diámetro menor pasa a tener 18,72 ± 1,16 mm.
- Es el día veinte cuando, en el periodo de tiempo explorado por nosotros, aparece una gran diferencia entre los valores medios registrados, siendo esta diferencia altamente significativa ($p < 0,001$). Reflejamos en la tabla n° 57 los valores medios obtenidos.

	Día veinte
NP (animales no gestantes)	15,57 ± 0,80 mm***
P (animales gestantes)	19,30 ± 0,58 mm***

Tabla n° 57. Valores medios del diámetro menor del CL el día 20 post-IA en P y NP (las diferencias estadísticas entre ambos grupos son altamente significativas, $p < 0,001$ ***).

También Boyd *et al.* (1990), afirmaron que las imágenes ecográficas del CL de gestación, comienzan a ser diferentes entre vacas P y NP el día diecisiete. Este hecho, según apuntan estos autores, se puede tener en cuenta a la hora de mejorar la precisión del diagnóstico de gestación.

Nosotros hemos comprobado este hecho, tanto en el diámetro menor como en el mayor, ya que en ambos parámetros se observa una caída de los valores en el caso de no existir gestación a partir de este día diecisiete (Gráfica n° 3 y n° 6).

Pero podemos afirmar aún más, ya que estas diferencias son estadísticamente significativas los días veinte, veintiuno y veintidós post-IA.

- En el caso del diámetro menor las diferencias el día veinte ($15,57 \text{ mm} \pm 0,8068$ vs. $19,3 \text{ mm} \pm 0,5878$) y veintidós ($14,53 \text{ mm} \pm 0,6314$ vs. $18,34 \text{ mm} \pm 0,8611$) entre los valores de ambos grupos (preñadas y no preñadas), son altamente significativas ($p < 0,001$).
- Las diferencias en el día veintiuno son estadísticamente significativas a favor del grupo de las preñadas: $15,38 \text{ mm} \pm 1,0286$ vs. $18 \text{ mm} \pm 0,5962$ ($p < 0,05$).
- Si nos referimos al diámetro mayor del CL el día veintiuno, las diferencias entre ambos grupos (preñadas y no preñadas) son altamente significativas: $19,84 \text{ mm} \pm 1,2186$ vs. $28,70 \text{ mm} \pm 1,2023$ ($p < 0,001$) y el día veintidós son muy significativas: $20,93 \text{ mm} \pm 1,5628$ vs. $25,95 \text{ mm} \pm 1,0453$ ($p < 0,01$).

VI.A.3.-Crecimiento del Cuerpo Lúteo

En 1993, Assey *et al.* aportaron que durante la fase de desarrollo del CL, éste aumenta a razón de $0,87 \text{ mm/día}$ ($p < 0,001$) en el caso de vacas adultas.

Kähn (1994) afirma que el CL aumenta todos los días más ó menos 1 mm de anchura y unos 2 mm en longitud.

En nuestro trabajo, hemos comprobado que entre los días cero y nueve post-IA el diámetro menor en el grupo de animales no gestantes (NP), aumenta a razón de $0,395 \text{ mm/día}$ y el diámetro mayor en este mismo grupo aumenta $0,85 \text{ mm/día}$ (Tabla n° 58).

Si observamos el grupo de animales gestantes (Tabla n° 58), tenemos que el diámetro menor durante este periodo (del día cero al nueve), aumenta $1,073 \text{ mm/día}$ y en el caso del diámetro mayor este crecimiento diario es de $1,296 \text{ mm/día}$.

	Grupo NP	Grupo P
Diámetro menor	$+0,395 \text{ mm/día}$	$+1,073 \text{ mm/día}$
Diámetro mayor	$+0,85 \text{ mm/día}$	$+1,296 \text{ mm/día}$

Tabla n° 58. Crecimiento diario del CL entre los días cero y nueve post-IA.

Exploración ecográfica del CL en ganado vacuno

Entre los días nueve y dieciséis del ciclo, para ambos grupos (P y NP), el crecimiento que se produce es mínimo o incluso se puede apreciar una ligera disminución en los valores medios registrados en uno de los diámetros, manteniéndose por lo tanto estables los valores del tamaño del CL.

En la siguiente tabla (n° 59), se puede apreciar los valores medios de crecimiento diario del diámetro del CL (tanto diámetro mayor como menor), en los dos grupos experimentales estudiados:

	Grupo NP	Grupo P
Diámetro menor	+0,108 mm/día	-0,16 mm/día
Diámetro mayor	-0,14 mm/día	+0,32 mm/día

Tabla n° 59. Crecimiento medio diario del CL entre los días nueve y dieciséis post-IA.

Si observamos la evolución diaria de ambos diámetros del CL (tabla n° 60), en los dos grupos experimentales (P y NP) entre los días cero y dieciséis del ciclo, comprobamos que se produce un mayor crecimiento del CL en los animales que quedaron gestantes tras la inseminación artificial.

	Grupo NP	Grupo P
Diámetro menor	+0,283 mm/día	+0,555 mm/día
Diámetro mayor	+0,434 mm/día	+0,777 mm/día

Tabla n° 60. Crecimiento medio diario del CL entre los días cero y dieciséis post-IA.

VI.A.4.-Regresión del Cuerpo Lúteo

Fijándonos nuevamente en el trabajo realizado por Assey *et al.* (1993), afirman que el diámetro del CL en la fase de regresión disminuía 0,47 mm ($p < 0,05$) en el caso de las vacas adultas.

En nuestro caso, hemos diferenciado los dos grupos experimentales (P y NP), y dentro de cada grupo se ha seguido la evolución del diámetro mayor y menor del CL.

Considerando el periodo entre los días dieciséis y veintiuno post-IA, sí hemos comprobado que se produce una regresión del diámetro en el grupo NP (vacas no gestantes). Este hecho, se recoge en la Tabla n° 61:

	Crecimiento medio
Diámetro menor grupo NP	-0,324 mm/día
Diámetro mayor grupo NP	-0,866 mm/día

Tabla n° 61. Valores medios de la regresión diaria del CL entre los días 16 y 21 post-IA de vacas no gestantes.

Cuando hemos analizado los resultados obtenidos en el grupo experimental P (animales gestantes), comprobamos que el diámetro menor ni aumenta ni disminuye en sus valores durante este periodo, produciéndose un ligero incremento en el caso del diámetro mayor (tabla n° 62).

	Crecimiento medio
Diámetro menor grupo P	0 mm/día
Diámetro mayor grupo P	0,54 mm/día

Tabla n° 62. Valores medios de la evolución diaria del CL entre los días 16 y 21 en vacas gestantes.

VI.A.5.-Área del Cuerpo Lúteo

Al igual que en los trabajos de Kastelic *et al.* (1990b), nosotros hemos observado que la primera gran diferencia entre el grupo de animales que quedaron gestantes y los que no quedaron gestantes, se produce el día siete del ciclo estral, siendo esta diferencia de 96,01 mm² (p<0,05).

La segunda gran diferencia la encontramos el día nueve del ciclo: 142,39 mm² (p<0,05).

En ambos grupos, durante los días diez, once y doce post-IA permanecen estables siendo los valores del área, siendo superiores para el grupo P (preñadas) (Gráfica n° 9).

El día trece los valores para el grupo de animales que han quedado gestantes se incrementan notablemente, disminuyendo en el grupo de animales que no han quedado gestantes (491,59 mm² ± 44,98 a 333,69 mm² ± 26,22 respectivamente). Este diferente comportamiento es estadísticamente muy significativo (p<0,01).

Otro día en el que aparecen diferencias importantes (p<0,05) es el día dieciséis: 351,94 mm² ± 26,58 vs. 453,67mm² ± 30,22. A partir de este día empiezan a declinar los valores en el grupo NP (no preñadas) (Gráfica n° 9).

El día veinte del ciclo las diferencias entre los valores medios registrados para el grupo de las preñadas y no preñadas son acusadas (p<0,05), ya que caen los valores del área del CL en el grupo de animales que no han quedado gestantes: 302,50 mm² ± 33,25 vs. 399,73 mm² ± 20,05.

Al final del ciclo de exploraciones, los días veintiuno y veintidós, las diferencias incrementan sus valores siendo altamente significativas (p<0,001). Diferencias de 161,64 mm² el día veintiuno (247,94 mm² ± 27,10 vs. 409,58 mm² ± 26,74) y de 137,91 mm² el día veintidós (244,88 mm² ± 24,05 vs. 382,79 mm² ± 26,06).

VI.A.6.-Volumen del Cuerpo Lúteo

En un trabajo realizado por Kähn en 1994, aporta que el día tres del ciclo el CL tiene un volumen de 1329 mm³, pasando a tener 4000 mm³ entre los días ocho y trece del ciclo.

En el grupo NP (animales no gestantes), en el día tres del ciclo, nuestros resultados están en la misma línea de los aportados por Kähn.

Exploración ecográfica del CL en ganado vacuno

No así en el grupo P (animales gestantes tras la inseminación artificial). En este grupo, sorprendentemente, hay una caída en los valores el día tres del ciclo. Este hecho ya ha sido comentado en el apartado de resultados de nuestro trabajo, donde hemos visto el menor tamaño que se registra en el CL durante los primeros días del ciclo estral en el grupo P.

El día ocho post-IA nuestros resultados muestran valores superiores en ambos casos (tanto en el grupo P como en el NP), sobretodo en el grupo de animales que quedaron gestantes tras la inseminación artificial. Lo mismo ocurre el día trece post-IA como puede apreciarse en la siguiente tabla (n° 63):

	Grupo NP	Grupo P
Día tres	1552,42 mm ³	882,36 mm ³
Día ocho	5417,05 mm ³	6229,06 mm ³
Día trece	4856,5 mm ³	8637,72 mm ³

Tabla n° 63. Volumen del CL (mm³) en los dos grupos experimentales: P y NP.

Aun siendo grande la diferencia entre el volumen de ambos grupos el día dieciséis (2445,9 mm³), estas diferencias se reducen con respecto al día trece (3781,22 mm³).

El día diecinueve post-IA se observa claramente como termina la evolución del volumen del CL en ambos grupos. A partir de este momento, comienza una involución en ambos grupos pero de carácter drástico en aquellas hembras que no quedaron gestantes, con respecto a las gestantes en que la involución es mucho menos acusada. (Gráfica n° 12).

VI.A.7.- Determinación de los parámetros discriminativos de las características ecográficas del cuerpo lúteo de vacas preñadas y vacías.

A la vista de la evolución de las características ecográficas del CL de vacas gestantes (P) y no gestantes (NP), tras la inseminación artificial, cuyas diferencias evolutivas hemos estudiado exhaustivamente, nuestro objetivo en esta fase experimental es determinar los parámetros discriminativos más evidentes que nos permitan utilizar esta exploración como diagnóstico de gestación. Tal como hemos constatado en los gráficos n° 13, 14, 15 y 16 del apartado de resultados, aparecen tres momentos importantes que queremos resaltar. Cada momento presenta una serie de ventajas e inconvenientes que pasamos a detallar.

1. Día trece post-IA.

En este momento, nos aparecen diferencias significativas en los parámetros estudiados entre los dos grupos. Estas diferencias son significativas en el caso del diámetro mayor del CL, muy significativas en el área y volumen luteal, y altamente significativas en el caso del diámetro menor.

Jaskowski *et al* (1993), también encontraron que el tamaño del CL era significativamente mayor en las vacas preñadas que en las que no lo estaban. Este hecho lo constataron el día doce post-IA. Como ya hemos dicho, en nuestro trabajo estas diferencias se desvían hacia el día trece.

Durante el seguimiento ecográfico del CL vimos que no eran constantes las apariciones de estas diferencias en los días inmediatamente posteriores al día trece, por lo que pensamos que es arriesgado fijar en este momento, unos valores diferenciales de los parámetros ecográficos del CL para discernir entre gestación y no gestación.

Además, pensamos que nos encontrábamos en un momento crítico del ciclo en cuanto a reabsorciones embrionarias. Por ello, aunque podemos diferenciar un CL de gestación y uno de no gestación el día trece post-IA, tendríamos un número de animales que nuevamente saldrían en celo sin llegar a buen término la fase embrionaria de la gestación.

Aunque con estudios que expondremos mas adelante hemos demostrado que desde el punto de vista del manejo y beneficio económico, el día trece post-IA es el mejor día para realizar el diagnóstico de gestación mediante la exploración ecográfica del CL, hemos buscamos una segunda alternativa, también precoz, pero que nos aporta un mayor grado de seguridad en el diagnóstico positivo de gestación.

2. Día dieciséis del ciclo de exploraciones.

Sabemos que el embrión demuestra su presencia y causa el mantenimiento del CL muy precozmente. El día dieciséis después de la inseminación, como ya hemos señalado, hay algunos autores que apuntan la posibilidad de un estudio ecográfico diferencial del CL de gestación y de no gestación.

Así Omran (1989), indica que hay considerables diferencias en el aspecto ecográfico del CL de vacas preñadas y no preñadas entre los días dieciséis y diecinueve posinseminación artificial, no aportando nada más.

Por su parte Boyd *et al* (1990), observan que las imágenes ecográficas del CL de gestación, comenzaron a ser diferentes del CL de una vaca no gestante el día diecisiete, lo cual se puede tener en cuenta a la hora de mejorar la precisión del diagnóstico de gestación.

Nosotros, hemos considerado este día importante por ser el límite para el comienzo de la regresión luteal. Como afirman Fields *et al* (1996), la evidencia de un deterioro morfológico del CL se observa el día catorce del ciclo estral, y de forma atenuada el día veinte en el caso de existir gestación.

En nuestros resultados hemos comprobado que, en todos los parámetros (excepto en el diámetro menor del CL), nos aparecen diferencias significativas al comparar los datos recogidos entre los dos grupos experimentales el día dieciséis post-IA.

Por ello, aportamos que es posible el diferenciar la gestación o no gestación de una vaca estudiando ecográficamente el CL en este momento. Sin embargo, sigue siendo un momento demasiado precoz en la detección, y buscamos una tercera alternativa, nos podría aportar mayor grado de seguridad.

3. Día veintiuno post-IA.

Analizando nuestros resultados en este momento, las diferencias que nos aparecen en todos los parámetros estudiados (entre el grupo NP y P), son altamente significativas ($p < 0,001$).

Exploración ecográfica del CL en ganado vacuno

Sólo se sale de esta línea de comportamiento el diámetro menor del CL (diferencias significativas: $p < 0,05$).

Consideramos que se puede tomar este día como punto de referencia en el estudio ecográfico del CL, con el fin de diferenciar si existe ó no gestación.

Exponemos una serie de razones que apoyan esta utilización:

- Ya hemos superado el momento crítico de las reabsorciones embrionarias precoces.
- Nos permite un diagnóstico más precoz de lo que sería la visualización ecográfica del embrión que rondaría los veintiséis días con un operador experimentado.
- Nos permite adelantarnos unos días a la determinación de la progesterona plasmática como indicador precoz de gestación, ya que si bien es posible realizar el análisis entre el día dieciocho y veinticuatro después de la cubrición ó la inseminación, el momento óptimo es realizarlo el día veinticuatro para evitar falsos positivos. Este método de diagnóstico según numerosos estudios tiene una especificidad (exactitud en la detección de animales no gestantes) elevada, alcanzando incluso valores superiores al 90%. Sin embargo, la sensibilidad (exactitud en la detección de animales gestantes) baja mucho. Las causas más frecuentes de error son piómetra, CL persistente, ciclos cortos, quistes ováricos (quistes luteínicos) y un manejo incorrecto de las muestras y del test.
- El estudio ecográfico del CL este día del ciclo, ayuda de forma importante al ganadero en el control del celo (el factor limitante para un rendimiento reproductivo óptimo cuando se emplea inseminación artificial ó monta controlada). Como sabemos, hay numerosos factores que pueden dificultar la detección del celo:
 - La duración del ciclo estral varía entre los dieciocho y veinticuatro días.
 - La estabulación fija.
 - A menudo la actividad sexual aparece durante la noche.
 - Las vacas pueden presentar signos de celo sólo durante un breve periodo.

La utilización del ecógrafo de forma sistemática en este momento tras la IA, facilita el conocimiento del estado reproductivo del animal. Los ovarios contienen abundante información que puede ser usada como ayuda diagnóstica en el chequeo reproductivo y en la selección de las terapias o intervenciones apropiadas. Por ejemplo, la presencia o ausencia de CL y en su caso de un folículo este día del ciclo de exploraciones, nos ayudaría en el diagnóstico de la preñez ó en la detección de celo. En el caso de existir un CL, el tamaño y la ubicación (ovario derecho o izquierdo) indica la localización del “*conceptus*” dentro del útero si la vaca está preñada, y en el caso de existir un folículo preovulatorio nos ayudaría a detectar un posible celo, no detectado en muchos casos por el ganadero. Por otro lado, nos podría llevar a una posible detección de quistes foliculares ó luteinizados y por lo tanto a su correcto tratamiento.

- La identificación y la puesta a punto de un sistema radioinmunológico de identificación de proteína de gestación tales como la PSPB (Pregnancy Specific Protein B) y la bPAG (bovine Pregnancy Associated Glycoprotein), ha hecho posible la aplicación de un diagnóstico de gestación en la especie bovina (Hanzen *et al.*, 1991; Zoli *et al.*, 1991). Estos métodos aún son caros, y precisan el apoyo de un laboratorio y no son inmediatos, por lo que en este sentido podemos afirmar que nuestro método precoz de diagnóstico de gestación por exploración ecográfica del CL, tiene frente a los referidos métodos notables ventajas.

En conclusión, de los resultados obtenidos de esta primera fase experimental podemos afirmar que los mejores días post- IA para establecer un diagnóstico precoz de gestación mediante el estudio de las características ecográficas del CL, son los días 13, 16 y 21, siendo los valores discriminativos para la población vacuna estudiada los siguientes:

	Día 13			Día 16			Día 21		
	P	PD	NP	P	PD	NP	P	PD	NP
Dm (mm)	>	18,73	>	>	18,78	>	>	16,9	>
DM (mm)	>	26,96	>	>	26,82	>	>	24,28	>
Área (mm²)	>	403,26	>	>	400,98	>	>	328,94	>
Volumen (mm³)	>	6416,84	>	>	6495,54	>	>	4761,51	>

Tabla n° 64. Parámetros discriminativos para un posible diagnóstico ultraprecoz de gestación

Dm: diámetro menor del CL

DM: diámetro mayor del CL

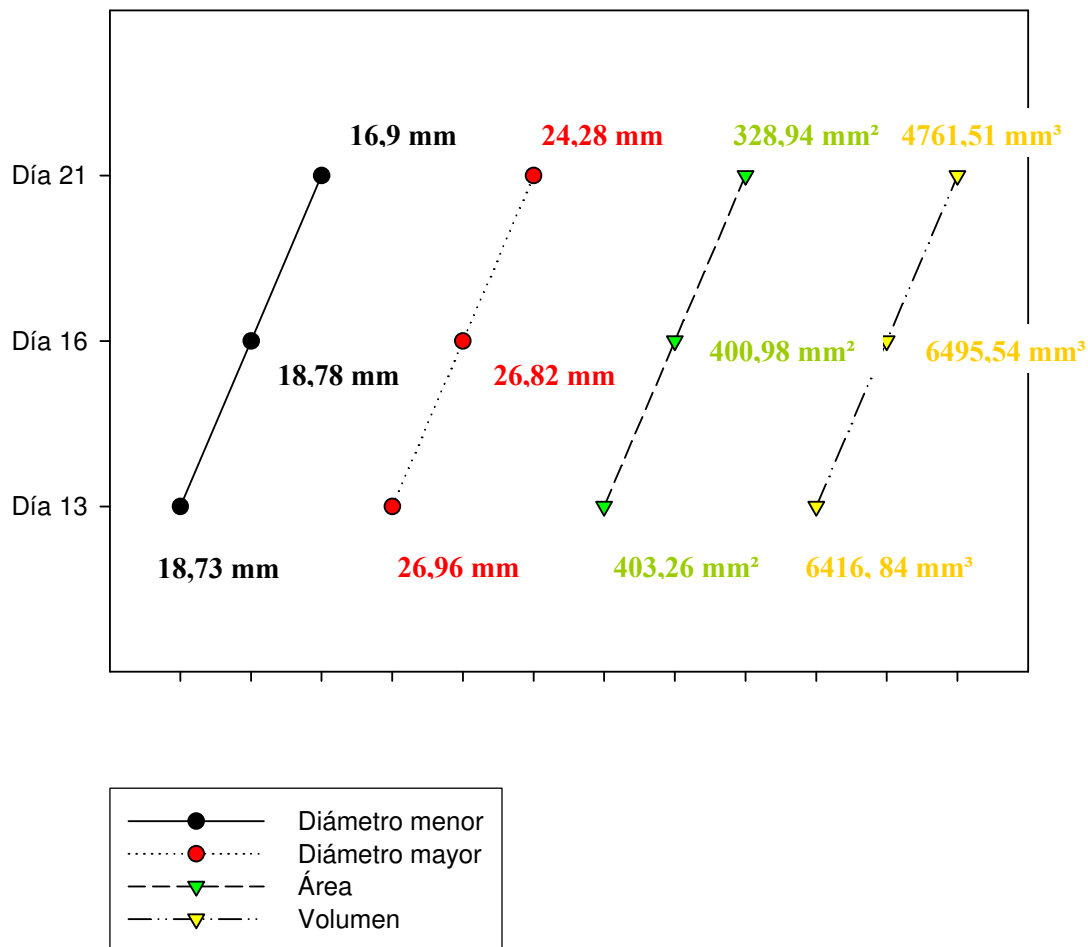
P: vacas preñadas

NP: vacas no preñadas

PD: parámetros discriminativos de gestación

Exploración ecográfica del CL en ganado vacuno

Parámetros discriminativos de gestación



Gráficas n° 27. Parámetros discriminativos de gestación para un posible diagnóstico ultraprecoz de gestación

VI. DISCUSIÓN.

VI. A. Exploración ecográfica del cuerpo lúteo en ganado vacuno.

VI. B. Diagnóstico ultraprecoz de gestación por exploración del cuerpo lúteo los días 13, 16 y 21 post-IA.

VI. C. Sexaje fetal por determinación de los niveles de testosterona en sangre periférica de la madre.

Diagnóstico ultraprecoz de gestación por exploración del CL los días 13, 16 y 21 post-IA**VI.B.-DIAGNOSTICO ULTRAPRECOZ DE GESTACIÓN POR EXPLORACIÓN DEL CUERPO LÚTEO LOS DÍAS 13, 16 y 21 POST-IA**

Como hemos podido observar y para estos tres días (13, 16 y 21 post-IA), los resultados del diagnóstico ultraprecoz de gestación negativo por ecografía son mucho mejores que los positivos (tablas n° 42 y n° 43), existiendo diferencias de hasta veinte puntos porcentuales entre ellos. Esto puede ser debido a la alta mortalidad embrionaria que sufren las vacas de alta producción (30%) (Ayalon, 1978; Bavera, 2000; Descôteaux *et al.*, 2002; Elli, 2005), es decir, cuando nosotros realizamos un diagnóstico de gestación positivo tan temprano, nos arriesgamos a que con nuestro método de diagnóstico de referencia (palpación rectal a los 30-40 días), muchas de esas vacas hayan perdido el embrión y sean declaradas vacías. Pero una de las ventajas de realizar un diagnóstico de gestación tan temprano y sobre todo para el diagnóstico de gestación negativo es que nos permite reducir el número de días abiertos, ya que para estas vacas vacías no debemos esperar hasta el día treinta post-IA para realizar el diagnóstico de gestación.

Hasta el momento, los métodos más utilizados para el diagnóstico de gestación en el ganado vacuno eran los siguientes:

- Determinación de la concentración de progesterona en sangre ó en leche.
- Determinación de la concentración de sulfato de estrona en la leche.
- Determinación de las proteínas de la gestación.
- Diagnóstico de gestación por palpación rectal.
- Diagnóstico de gestación por ecografía uterina.

Lo que pretendemos con nuestro estudio, es incluir este diagnóstico ultraprecoz de gestación por exploración ecografica del CL como un método de diagnóstico de gestación aceptable para el ganado vacuno. Por ello, analizaremos las ventajas e inconvenientes de este método frente a los métodos de diagnóstico ya utilizados.

1.- Determinación de la concentración de progesterona en sangre ó en leche.

Al igual que la evaluación de la concentración de progesterona en sangre ó leche, el diagnóstico ultraprecoz de gestación por exploración ecografica del CL es un método precoz. Ambos tienen el inconveniente de que se debe determinar en un periodo de tiempo muy preciso después de la inseminación, requiriendo el conocimiento exacto de la fecha de la cubrición ó inseminación artificial, ya que la determinación de progesterona debe realizarse necesariamente entre los días 20 a 24 post-IA (Hanzen *et al.*, 1991; Mialot *et al.*, 1991; Hanzen *et al.*, 1993), y nuestro método ecográfico los días 13, 16 ó 21 post-IA, siendo un método de diagnóstico de gestación más precoz, y por lo tanto, una de sus principales ventajas.

Llevar a cabo el análisis de progesterona a todos los animales resulta inviable económicamente, por lo que se debe reservar para los animales en los que se busque una mortalidad embrionaria tardía (Hanzen *et al.*, 1991; Mialot *et al.*, 1991). En el caso del diagnóstico ultraprecoz por ecografía del CL, lo único a tener en cuenta es la inversión que

hay que realizar a la hora de comprar el equipo, aunque hoy en día los precios son mucho más asequibles.

En cuanto a la exactitud positiva ó negativa de ambos métodos, podemos decir, que son mejores en el caso del diagnóstico de gestación por determinación de progesterona en sangre ó en leche con porcentajes del 80-88% para la exactitud positiva, y cercanos al 100% para la exactitud negativa (Arthur *et al.*, 1991; Mialot *et al.*, 1991). En el caso del diagnóstico de gestación por ecografía del CL, hablamos de porcentajes del 65% y 75% respectivamente. Lo que hay que tener en cuenta a la hora de analizar estos datos, es que cuanto antes se realice un diagnóstico de gestación, mayor número de muertes embrionarias tendremos y por lo tanto menor eficacia en el diagnóstico positivo. Lo que si que tenemos que reconocer claramente, es que la ecografía del CL está en desventaja para los diagnósticos negativos con respecto a la determinación de progesterona.

Además, de todas estas ventajas citadas anteriormente, no obstante una ventaja interesante del diagnóstico ultraprecoz de gestación por ecografía del CL es que nos proporciona diagnósticos inmediatos, en cambio las determinaciones de progesterona precisan de la recogida de muestras de sangre ó de leche y por tanto de un laboratorio y de unos días (2 a 5) para analizar estas muestras.

2.- Determinación de la concentración de sulfato de estrona en la leche.

Cuantitativamente, el sulfato de estrona es uno de los principales estrógenos en la leche de las vacas gestantes. Durante la gestación se incrementa gradualmente la concentración y aparece en la leche de los animales gestantes a partir del día 105, mientras que en las hembras no gestantes los niveles son bajos ó no se detectan. La fuente de este estrógeno es la unidad fetoplacentaria (Arthur, 1991).

Al igual que ocurría con la determinación de progesterona, este método de diagnóstico de gestación precisa de laboratorio para el análisis de la muestra, y de un tiempo para su procesamiento: de 3 a 7 días. La diferencia radica en el tiempo de recogida de la muestra, siendo más tardía la recogida para el análisis del sulfato de estrona (105 días post-IA frente a 20-24 días post-IA).

También en este caso, y por las explicaciones anteriores, podemos suponer que nuestro método de diagnóstico ultraprecoz de gestación por exploración ecográfica del CL tiene ventajas sobre este método: mucho más precoz y resultados inmediatos.

3.- Determinación de las proteínas de la gestación: PSPB y bPAG.

Este tipo de proteínas permite la posibilidad de realizar un diagnóstico de gestación desde el día 35 después de la inseminación fecundante. En este caso, podemos asegurar exactitudes para el diagnóstico positivo del 90-98% y exactitudes para el diagnóstico negativo del 100%.

Este método es caro, precisa el apoyo de un laboratorio y no es inmediato (de 3 a 7 días), por lo que seguimos pensando que la utilización del ecógrafo, aunque tiene unos porcentajes de exactitud más bajos, sin embargo, es mucho más precoz.

Diagnóstico ultraprecoz de gestación por exploración del CL los días 13, 16 y 21 post-IA**4.- Diagnóstico de gestación por palpación rectal.**

La palpación rectal suele ser el método de elección para un diagnóstico clínico de gestación en la vaca. Este método es simple, práctico, precoz y económico a diferencia del diagnóstico de gestación ultraprecoz por ecografía del CL, el cual requiere una inversión mucho más elevada.

Su aplicación al igual que la de la ecografía del CL, requiere un buen conocimiento de la disposición anatómica normal de los órganos genitales, su situación y los cambios que se producen en los individuos gestantes. La habilidad del Veterinario influye tanto en la precisión como en el daño que se causa tanto al animal como al feto. Ya en 1948, Bamet *et al.*, atribuyeron el 3% de las muertes fetales a daños en el alantoides durante la palpación rectal y Cassida *et al.*, (1955), encontraron que las pérdidas podían elevarse hasta un 10%. Por lo tanto, la palpación rectal entraña un cierto riesgo en la vida del feto, mientras que el examen ecográfico no causa daño fetal (Hughes *et al.*, 1989).

El periodo en el que el diagnóstico por palpación rectal tiene mayor interés, es el comprendido entre los 30 y 45 días posinseminación. Este procedimiento nos permite realizar diagnósticos certeros desde los 30 días en nulíparas y 35-45 días en múltiparas. Los signos apreciables en esta etapa son la asimetría del cuerno gestante (siendo esta más marcada a medida que aumentan los días de gestación), palpación de la vesícula amniótica y deslizamiento de las envolturas fetales (palpación del alantocorion). Por lo tanto, una de las grandes diferencias encontradas entre ambos métodos de diagnóstico de gestación, al igual que en los anteriores, es la precocidad del diagnóstico ultraprecoz de gestación por exploración ecográfica del CL, llegando incluso a reducirse en 9, 14, 17 ó más los días en los que la vaca está vacía.

5.- Diagnóstico de gestación por ecografía uterina.

Debido a la importancia que tiene económicamente un diagnóstico de gestación preciso, se ha desarrollado el uso de la ecografía modo- B, vía transrectal, en las granjas de ganado vacuno. En la vaca ha sido posible la visualización del embrión a partir del primer mes de gestación, pero actualmente lo que nos interesa es la realización de un diagnóstico ultraprecoz de gestación por exploración ecográfica del CL, reduciendo así, aún más, los días abiertos.

El diagnóstico de gestación por ecografía es sencillo y rápido, para no generar mucha manipulación sobre los cuernos uterinos, que en algunos casos puede ser una causa más de la propia pérdida embrionaria precoz (estimada entre el 5 y 15%). Con el diagnóstico ultraprecoz de gestación por exploración del CL, conseguimos disminuir esta manipulación de los cuernos uterinos, ya que un Veterinario con experiencia y entrenado, localizaría rápidamente el ovario para su manipulación y posterior exploración del CL.

Se dice que el examen ecográfico transrectal del útero entre los días 26 y 33, tiene una sensibilidad del 97% y una especificidad del 87% (Bellenda, 2003), pero en nuestro caso, con exploración del CL, estos valores disminuyen a unos porcentajes medios para los tres días analizados (13, 16 y 21 días post-IA) de 65% y 75% respectivamente (tabla nº 43), teniendo en cuenta que al realizar diagnósticos de gestación mucho más tempranos, los falsos negativos al igual que los falsos positivos (mayor número de muertes embrionarias) no se podrán evitar. Para ambos casos, los factores que influyen en la precisión del diagnóstico de gestación son los siguientes: tipo de sonda, días que han pasado tras la inseminación artificial (en nuestro

caso 13, 16 ó 21), la frecuencia de las exploraciones que se realicen, la disposición de los cuernos uterinos y por tanto de los ovarios, la experiencia del operador, número de parto de la vaca, temperamento de la hembra y luminosidad del ambiente.

El diagnóstico positivo por exploración ecográfica del útero, se basa en detectar la presencia de una zona de fluido de tamaño variable (vesícula amniótica) en la luz del cuerno uterino, junto con un CL palpable y visible ecográficamente en el ovario contiguo. Diagnóstico que se realiza normalmente entre los 28 y 30 días después de la inseminación. Aparte de que la exploración ecográfica precoz del CL se realiza como muy tarde el día 21 post-IA, también nos evita el inconveniente de la exploración uterina. Además, otra ventaja que presenta sobre todo referida al día 21, es que si el CL es excesivamente pequeño ó no existiera junto con una presencia de fluido en los cuernos uterinos, nos estará indicando que la vaca probablemente está próxima al celo.

Después de todos los pasos que hemos ido siguiendo para poder llegar hasta aquí, sería interesante saber si este método de diagnóstico ultraprecoz de gestación por exploración ecográfica del CL podría ser aplicable a nivel de campo, es decir, si sería rentable.

Para empezar, si tenemos en cuenta los costos evaluados por investigadores ingleses (Universidad de Reading), franceses y americanos y los cálculos aplicados a nuestras características productivas (precio de la leche, mano de obra, alimentos, pajuelas de semen congelado, prostanoides luteolíticos, etc) la ineficiencia reproductiva puede representar del orden de 9 €/vaca/día adicional en el intervalo entre partos superior a 375 días.

A continuación comentaremos nuestros resultados de exactitud negativa del diagnóstico (tabla nº 42), ya que nuestro objetivo es detectar lo más precozmente posible “las vacas no gestantes” para introducirlas en un programa de gestión, y recuperarlas lo antes posible hacia una nueva gestación; este programa de gestión puede ser mediante prostanoides luteolíticos, en cuyo caso haremos abortar a aquellas vacas con diagnóstico “falso negativo”, por lo que en la valoración económica de este sistema de recuperación tendremos que considerarlas como un fallo del método, y valorarlo desde el punto de vista económico como desfavorable.

Para las vacas de primer parto el mejor día para la realización del diagnóstico de gestación negativo por ecografía del CL es el día 13 post-IA con un 67,4% de exactitud negativa, por lo tanto de 100 vacas diagnosticadas vacías acierto 67,4 y fallo 32,6.

Como método de diagnóstico de gestación de referencia utilizamos la ultrasonografía uterina el día 30 de gestación, toda vez que este método de referencia tiene una exactitud próxima al 100%. Con nuestro método por ecografía del CL, el día 13 post-IA vemos las vacas vacías y las podemos aplicar una PGF2 α , de manera que dos ó tres días después volverán a presentar celo. En el caso de la ecografía uterina aplicada el día 30 post-IA, también podemos aplicar una prostaglandina en caso de diagnósticos negativos, que evidentemente supone un retraso de otros dos ó tres días hasta la salida en celo. Si los diagnósticos de gestación los realizamos el día 30, del día 16 en el que la vaca nos sale en celo con nuestro método de diagnóstico, al día 33 que nos sale en celo con el diagnóstico ultrasonográfico uterino, hemos ganado 17 días. A estos 17 días los multiplicaríamos por las 67,4 vacas diagnosticadas correctamente como vacías, con lo que ganaríamos 1145,8 días, pero a estos días hay que multiplicarlos por un factor de corrección, que sería la fertilidad: 0,6. Por lo tanto, ganaríamos 687,48 días de gestación. Ahora, a estos 687,48 días les restamos 521,6 días, que son los que pierdo al no acertar en el diagnóstico de las 32,6 vacas con diagnóstico falso negativo (32,6 vacas x 16 días perdidos). Al final de todos estos cálculos vemos que verdaderamente hemos ganado

Diagnóstico ultraprecoz de gestación por exploración del CL los días 13, 16 y 21 post-IA

165,88 días que multiplicados por 9 €, nos dan unas ganancias de 1492,92 € por cada 100 vacas.

Para las vacas de segundo parto, el mejor día para la realización del diagnóstico de gestación negativo es el día 16 post-IA, ganando 14 días con respecto a la ultrasonografía uterina. De 100 vacas diagnosticadas vacías acertaríamos 72,9 y fallaríamos 27,1. El día 16 post-IA vemos las vacas vacías, así para recuperarlas lo más rápido posible hacia una nueva gestación, las aplicamos una PGF2 α y el día 19 post-IA nos saldrían en celo. Si los diagnósticos de gestación los realizamos el día 30 post-IA, del día 19 en el que la vaca nos sale en celo al día 33 en que nos sale en celo con la ecografía uterina, hemos ganado 14 días. A estos 14 días los multiplicaríamos por las 72,9 vacas diagnosticadas correctamente como vacías, con lo que ganaríamos 1020,6 días, pero a estos días hay que multiplicarlos por un factor de corrección, que sería la fertilidad: 0,6. Por lo tanto, ganaríamos 612,36 días de gestación. Ahora, a estos 612,36 días les restamos 514,9 días, que son los que pierdo al no acertar en el diagnóstico de las 27,1 falsos negativos (27,1 vacas x 19 días perdidos). Al final de todos estos cálculos vemos que sólo hemos ganado 97,46 días que multiplicados por 9 €, nos darían unas ganancias de 877,14 € por cada 100 vacas.

Para este mismo grupo de vacas, hicimos los cálculos para el día 13 post-IA, teniendo un porcentaje de acierto en el diagnóstico negativo del 68,5 %, por lo tanto, de 100 vacas diagnosticadas como negativas acertaríamos 68,5 y fallaríamos 31,5 vacas. Al igual que en las vacas de primer parto, ganaríamos 17 días que multiplicados por 68,5 y por 0,6 (fertilidad), nos darían los 698,7 días de gestación ganados. A éstos les restaríamos los 504 días perdidos de los falsos diagnósticos negativos (31,5 vacas x 16 días perdidos), con lo que sólo ganaríamos 194,7 días de gestación, que multiplicados por 9 €, nos da unas ganancias de 1752,3 € por cada 100 vacas.

Por lo tanto, vemos que para este grupo de vacas es mucho mejor el día 13 post-IA aunque tengamos que disminuir el número de aciertos del diagnóstico negativo de gestación.

Para las vacas de tercer parto y al igual que para las vacas de segundo parto, el mejor día para el diagnóstico de gestación negativo por ecografía del CL es el día 16. En este caso, la exactitud negativa es del 83,3%, por lo tanto, de 100 vacas diagnosticadas como negativas acierto 83,3 y son falsos negativos 16,7. El día 16 post-IA vemos las vacas vacías, por lo que las aplicamos una PGF2 α y el día 19 post-IA nos saldrán en celo. Si los diagnósticos de gestación con el que vamos a comparar (ecografía uterina) lo realizamos el día 30, del día 19 en el que la vaca nos sale en celo al día 33 en que nos sale en celo con la ecografía uterina, hemos ganado 14 días. Estos 14 días ganados los multiplicamos por las 83,3 vacas diagnosticadas correctamente como vacías y por 0,6 (factor de corrección de la fertilidad), teniendo unas ganancias de 699,72 días. Pero a estos días ganados les tenemos que restar los días perdidos (317,3 días) al fallar en el diagnóstico de las 16,7 vacas restantes (16,7 vacas x 19 días perdidos). Por lo tanto, sólo hemos ganado 382,42 días de gestación que multiplicados por 9 €, nos dan unas ganancias de 3441,78 € por cada 100 vacas.

También en este caso, hemos realizado este estudio para el día 13 post-IA, teniendo una exactitud negativa del 77,3%, lo que hace ver que de 100 vacas diagnosticadas vacías 77,3 se diagnostican correctamente y 22,7 no. Como hemos visto en los dos casos anteriores, el diagnóstico de gestación negativo por ecografía del CL el día 13 post-IA, con respecto a la ecografía uterina el día 30, nos da unas ganancias de 17 días en el diagnóstico, que multiplicados por las 77,3 vacas diagnosticadas con acierto y por el factor de corrección

(fertilidad) 0,6, tenemos los días de gestación ganados (788,46 días). A estos días hay que restarles los días perdidos al errar en el diagnóstico negativo de las otras 22,7 vacas restantes (22,7 vacas x 16 días perdidos). Por lo tanto, a los 788,46 días ganados hay que restarles los 363,2 días perdidos y los días de gestación ganados verdaderamente son 425,26 días, que multiplicados por 9 €, nos dan unas ganancias de 3827,34 € por cada 100 vacas.

En este grupo de vacas también es mucho mejor el día 13 post-IA aunque tengamos que disminuir el número de aciertos del diagnóstico negativo de gestación.

Para las vacas de más de cuatro ó más partos, el mejor día para la realización del diagnóstico de gestación negativo es el día 16, ganando 14 días con respecto a la ultrasonografía (celo el día 19 al inyectar la PGF2 α con la ecografía del CL y celo el día 33 al inyectar la PGF2 α con la ecografía uterina). De 100 vacas, el día 16 acertamos 80 y fallamos 20. Las 80 vacas las multiplicamos por los 14 días que ganamos y por el factor de corrección que es la fertilidad (0,6), teniendo 672 días de ganancia, a los que restamos 380 días de pérdidas (20 falsos negativos x 19 días perdidos). Al final, tendremos 292 días de gestación ganados que multiplicados por 9 € obtenemos unas ganancias de 2628 € por cada 100 vacas.

Una forma de mejorar este resultado sería hacer el diagnóstico de gestación negativo el día 13 post-IA, aunque el número de aciertos disminuya a 78,6%. Todos los cálculos se realizarían igual que para los otros grupos de vacas y las ganancias en este caso ya serían mayores ya que ganaríamos 459,32 días de gestación que multiplicados por 9 € darían unas ganancias de 4133,88 € por cada 100 vacas.

Una vez analizados todos estos cálculos podemos llegar a la conclusión que el mejor día para la realización de este método de diagnóstico negativo de gestación es el día 13 post-IA, ya que a pesar de que los falsos negativos representan una cifra importante, el balance económico resulta favorable.

Cálculo por 100 vacas	Disminución de días abiertos// ganancia económica
Primer parto	165,88 días ; 1492,92 €
Segundo parto	194,7 días ; 1752,3 €
Tercer parto	425,26 días ; 3827,34 €
Cuarto ó más partos	459,32 días ; 4133,88 €

Tabla n° 65. Cálculo teórico de la disminución de días abiertos y mejora del rendimiento económico, del método de diagnóstico ultraprecoz de gestación por ecografía del CL el día 13 post-IA, frente al de la ecografía uterina el día 30 post-IA por cada 100 vacas diagnosticadas vacías, y tratadas inmediatamente con un progestanoide luteolítico en ambos casos.

VI. DISCUSIÓN.

VI. A. Exploración ecográfica del cuerpo lúteo en ganado vacuno.

VI. B. Diagnóstico ultraprecoz de gestación por exploración del cuerpo lúteo los días 13, 16 y 21 post-IA.

VI. C. Sexaje fetal por determinación de los niveles de testosterona en sangre periférica de la madre.

Sexaje fetal por determinación de los niveles de testosterona en sangre periférica de la madre**VI.C.- SEXAJE FETAL POR DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE TESTOSTERONA EN SANGRE PERIFÉRICA DE LA MADRE.**

Es bien sabido que el testículo fetal interviene en la diferenciación sexual estimulando, mediante la producción precoz de testosterona, el desarrollo de los conductos de Wolf e inhibiendo los de Müller. En ausencia de este estímulo androgénico, como ocurre en el caso de fetos hembra, la diferenciación sexual será a favor de un aparato genital femenino. Por otro lado, tal como reconocen numerosos autores como Smidt *et al.*, 1972; Rothe, 1974; Cole *et al.*, 1984; Illera, 1984; Alba, 1985 y Hafez *et al.*, 2000, otro lugar importante en la producción de testosterona durante la gestación es la placenta.

La importancia de la testosterona durante la vida fetal puede llegar a límites insospechados, tal como se ha publicado en la revista *Timesonline Movers & Shakers el 11 de septiembre de este año*, el autismo puede estar causado por una alteración cerebral durante la vida fetal promovida por un desequilibrio hormonal durante la vida intrauterina. El hecho de que el autismo sea más frecuente en niños que en niñas ha hecho pensar a científicos de la Universidad de Cambridge, a cuyo frente se encuentra el Profesor Simon Baron-Cohen (2007), que la exposición a altos niveles de testosterona antes del nacimiento podría ser una de las causas del problema del autismo. La testosterona durante la vida intrauterina es primariamente producida por el feto y mas abundante en los de sexo masculino; aunque se ha detectado notables variaciones (los niveles más altos llegan a ser incluso hasta 20 veces superiores a los más bajos). Tanto factores ambientales como fisiológicos de la madre pueden jugar también un papel relevante en esta variación. El más claro ejemplo de esta evidencia es que, madres que previamente han concebido varios hijos tienen fetos con niveles más altos de hormonas de tipo androgénico. Tal como señala Baron-Cohen (2007), se podría prevenir el autismo controlando los niveles fetales de testosterona, aunque esta medida puede afectar a otros aspectos del desarrollo fetal, particularmente el desarrollo sexual.

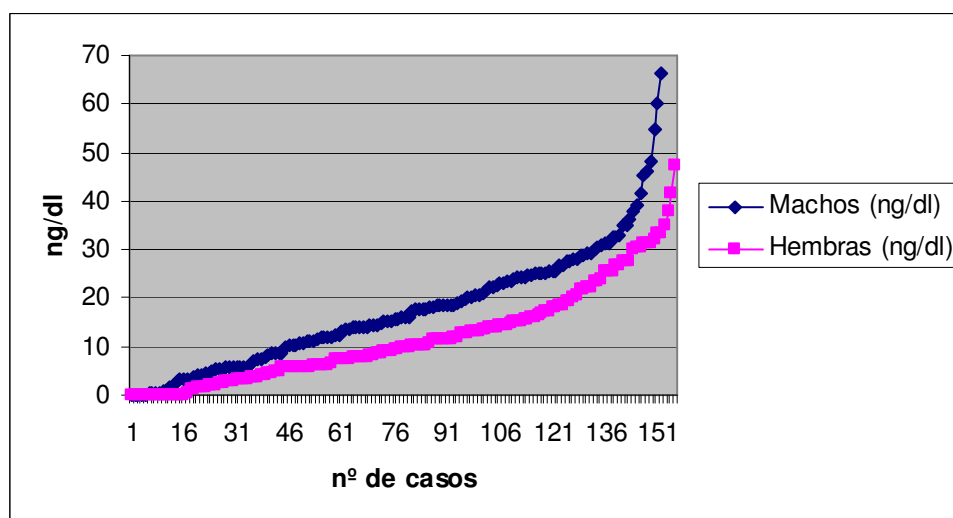
Tal como queda reflejado en el apartado correspondiente de los resultados, en un primer ensayo comprobamos, a través del sistema de inmunoensayo de quimioluminiscencia, que la mayoría de las vacas vacías y todas las recién paridas, tenían niveles de testosterona plasmáticos tan bajos que el sistema nos reflejaba valores de 0 ng/dl, mientras que en vacas preñadas tomadas al azar y sin tener en cuenta el momento de gestación, nos daban niveles de testosterona plasmáticos elevados, comprendidos entre 0,964 ng/dl y 31,6 ng/dl. De aquí y teniendo en cuenta las dificultades que se nos presentaron para sexar fetos mediante ecografía, pensamos que si encontrábamos diferencias en dichos niveles de acuerdo con el sexo del feto, podríamos estar en disposición de validar un método interesante para la determinación del sexo fetal durante la gestación. Teniendo en cuenta que Illera, y Cole *et al.*, en 1984, encontraron que en el suero sanguíneo de los fetos vacunos era mayor la concentración de testosterona en machos que en hembras, y que esta diferencia era mayor entre los tres y los siete meses de gestación, postulando además que dicha testosterona podría pasar a la sangre periférica de la madre, es por lo que diseñamos la segunda parte del experimento tercero de esta tesis Doctoral, tratando de comprobar si estas diferencias contrastadas por los autores anteriormente mencionados, también se reflejaban en la sangre periférica de la vaca entre los 90 y 100 días de gestación en concordancia con el sexo fetal.

Dada la escasez de publicaciones relacionadas con la determinación del sexo fetal mediante niveles hormonales en sangre periférica de la madre, la discusión de nuestros resultados con respecto a otros autores es justificadamente limitada. No obstante, antes de continuar comentaremos el trabajo de Lun *et al.*, publicado en 1998 (citado por Silván *et al.*, 2004)

quienes comprobaron que a los 100 días de gestación en sangre periférica de vacas que habían concebido hembras se constataba una concentración estadísticamente mas alta de sulfato de estrona (3,62 ng/ml), en comparación con las que correspondían con gestaciones de macho (0,91 ng/ml). Comentan estos autores que la fiabilidad del método es del 95% a los 100 días de gestación, pasando al 99% en el día 200. Estos mismos autores han comprobado la utilidad del sulfato de estrona en el diagnóstico de gestación, y en la valoración de la supervivencia fetal, en las especies equina, bovina, caprina y porcina.

Nuestros primeros resultados, tras realizar extracciones de sangre a vacas gestantes entre los 90 y 100 días de gestación determinando la concentración de testosterona, y correlacionándola con el sexo del feto en el momento del nacimiento, también demostraron que existían diferencias inferidas por el sexo, mientras que para los fetos que resultaron terneras la media del nivel de testosterona en la sangre de sus madres fue de 11,97 ng/dl, en el caso de los terneros ascendió a 17,35 ng/dl; si bien las desviaciones standard de las medias, en ambos casos, eran muy elevadas: $\pm 9,92$ para las hembras y $\pm 12,23$ para los machos.

En la siguiente gráfica (nº 27), se recogen todos los niveles de testosterona plasmática de la madre en el caso de gestar una ternera o un ternero.



Gráfica n° 28. Número de vacas que gestan hembra ó macho, ordenadas según el nivel de testosterona.

Tal como se recoge en la gráfica n° 28, los niveles de testosterona en la sangre periférica de la madre tienden a ser superiores cuando el feto es un ternero que cuando es una ternera; sin embargo, el valor predictivo es discutible dada la alta variabilidad que presentan en ambos casos, siendo el porcentaje global de acierto únicamente de un 61% (69% para las terneras y 52,6% para los terneros), y variando muy poco según el número de parto.

La única diferencia apreciable es el porcentaje de acierto para las terneras en vacas de segunda lactación, llegando a un 84,2%, pero aún así, no es estadísticamente significativo.

Tras el estudio de las probabilidades de macho según el número de parto, y partiendo de probabilidades por encima del 70%, comprobamos que este método de predicción del sexo fetal por determinación de la testosterona plasmática en vacas gestantes de tres meses, sólo es

Sexaje fetal por determinación de los niveles de testosterona en sangre periférica de la madre

fiable para resultados extremos y estos son muy escasos, por lo que este método no es aplicable a nivel de campo.

En el caso de las novillas y para hembras, sólo lo cumple un 13,04% de los casos (6 de 46) y para los machos el 30,43% (14 de 46). En cuanto a las vacas de segunda lactación y para las hembras: 14,28% (10 de 70) y para machos: 8,57% (6 de 70). Para las vacas de tercera y cuarta ó más lactación y para las hembras, sólo lo cumplen un 8,33% y un 6,78% de los casos (4 de 48 y 4 de 59) y para los machos un 22,92% (11 de 48) y un 11,86% (7 de 59) respectivamente.

Parecido a nuestros resultados, aunque resaltando la distancia entre especies, toda vez que están realizados en ratas y además la sangre no procedía de la madre sino de los propios fetos, los encontramos en el trabajo de Houtsmuller *et al* (1995), quienes constatan niveles mas altos de testosterona plasmáticos en fetos machos de rata el día 19 de gestación, en comparación con los correspondientes a fetos hembras. Además, señalan que las concentraciones plasmáticas de testosterona en fetos hembras adyacentes a machos situados mas caudalmente en el útero, eran más altos todavía que en hembras que carecían caudalmente de estos machos. Es importante para nosotros también, que en este trabajo se correlacionara los niveles plasmáticos de testosterona de los fetos, con los correspondientes a los encontrados en la sangre maternal. A pesar de ello, no encontraron correlación entre la testosterona maternal y el número de machos en la camada, sex-ratio, o tamaño de la misma. Estos resultados corroboran las primeras hipótesis surgidas al respecto, y asimismo plantean una nueva hipótesis: que las madres reciben andrógenos sobre todo de los fetos machos situados caudalmente en el útero, no evidenciándose que estos niveles de testosterona en la madre sean influenciados ni por el sex-ratio ni por el tamaño de la camada.

Nuestros resultados están en consonancia con los obtenidos por Duer *et al.* (2002) quienes estudian la utilidad del análisis de los niveles de testosterona sérica maternal en la determinación del sexo fetal en elefantes asiáticos (*Elephas maximus*). Este estudio corrobora que la testosterona maternal es en realidad un reflejo de la testosterona fetal. Semanalmente recogieron muestras de 17 elefantas asiáticas preñadas y analizaron por RIA los niveles séricos de testosterona total. Nueve elefantas habían concebido un feto macho y ocho un feto hembra. La testosterona sérica de las madres que habían concebido un feto macho era estadísticamente superior ($P < 0,01$) a las que tenían el feto hembra. Cuando los resultados se analizaron a lo largo de la gestación se constató que la significación estadística variaba a lo largo de la gestación, así en el primer trimestre las diferencias no eran significativas, en el segundo trimestre se elevaba notablemente la significación estadística ($P < 0,01$), y en el tercer trimestre la significación estadística descendía ($P < 0,05$). Desafortunadamente, nuestros resultados no son tan contundentes en el sentido que si bien hay diferencias significativas entre fetos machos y hembras, la alta variabilidad impide que el método pueda ser utilizado de forma práctica; serán necesarias nuevas investigaciones para poner en claro si la toma de muestras en otros momentos de la gestación, disminuye la variabilidad y permite un incremento en la fiabilidad del sexado.

VII. CONCLUSIONES.

Conclusiones**VII.-CONCLUSIONES.**

Teniendo en cuenta el planteamiento experimental y los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

PRIMERA:

Durante los primeros cuatro días después de la inseminación, los diámetros del CL de las vacas gestantes son menores, aunque sin significación estadística, en comparación con los correspondientes a las vacas no gestantes.

Sin embargo, a partir del día 7 tras la inseminación, tanto los valores del diámetro menor, como del diámetro mayor del CL, son superiores en las vacas gestantes. Estas diferencias son significativas el día 9 y 21, muy significativas el día 13, y altamente significativas los días 20 y 22 para el diámetro menor; y significativas los días 7, 13 y 16, muy significativas el día 22 y altamente significativas el día 21 para el diámetro mayor.

SEGUNDA:

Las vacas gestantes tienen un área y volumen luteal superior a las vacas no gestantes a partir del día 7 tras la inseminación, a excepción del día 14 en que los valores son prácticamente iguales. Las diferencias entre las vacas gestantes y no gestantes para el área y el volumen son significativas el día 7, 9 y 16 y muy significativas el día 13. A partir de este momento, en las vacas que no quedaron gestantes se observa una velocidad de disminución importante, mientras que los valores correspondientes a las vacas que comienzan una gestación se estabilizan, llegando a ser, en ambos parámetros ecográficos, las diferencias altamente significativas los días 21 y 22 tras la inseminación.

TERCERA:

Existen tres momentos importantes en cuanto a diferencias ecográficas del CL para vacas gestantes y no gestantes (13, 16 y 21 días post-IA), donde aparecen diferencias estadísticamente significativas para el caso del diámetro menor y mayor del CL, y para el área y el volumen luteal. Por ello, podemos afirmar, que cualquiera de los tres días anteriormente señalados, es idóneo para practicar el diagnóstico de gestación por exploración ecográfica del CL; resaltando, que tanto la exactitud como la fiabilidad del diagnóstico negativo de gestación son mucho mejores que las del diagnóstico positivo. Característica esta última de todos los métodos de diagnóstico precoz de gestación.

CUARTA:

Habida cuenta que no hemos encontrado diferencias para la exactitud del diagnóstico negativo de gestación, en los días 13, 16 y 21 posteriores a la inseminación artificial, podemos concluir que la realización de este diagnóstico el día 13, es un método utilizable en la práctica veterinaria, en combinación con prostanoides luteolíticos que induzcan nuevamente al celo a las vacas diagnosticadas vacías, toda vez que presenta un balance

económico muy favorable, incluso, teniendo en cuenta que los “ falsos negativos” representan una cifra aproximada del 25%.

QUINTA:

En cuanto al posible sexaje fetal, mediante la determinación de los niveles de testosterona plasmática en sangre periférica entre los 90 y 100 días de gestación, hemos podido comprobar fehacientemente ($P < 0,05$), que las concentraciones de testosterona son superiores cuando el feto es macho, en comparación con las vacas que gestaban un feto hembra. La “prueba T” de comparación de medias y la prueba de Levenne de comparación de varianzas así lo demuestran.

SEXTA:

A pesar de la conclusión anterior, realizados los análisis correspondientes mediante regresión logística para el cálculo de probabilidades de acierto en el sexaje, hemos podido comprobar que para probabilidades superiores al 70% el sistema sólo funciona en sus extremos, es decir, para el sexo fetal masculino por encima de los 35 ng/dl y para hembra solamente en niveles de 0 ng/dl. Dicho de otro modo, la alta variabilidad encontrada impide que este método sea viable en la práctica veterinaria. No obstante, los mejores resultados se constatan para el sexo fetal macho en las novillas, y para el sexo fetal hembra en las vacas de segunda lactación.

Conclusiones

VIII. RESUMEN.

Summary**VIII.-RESUMEN.**

En el presente trabajo de investigación se estudia la evolución de las características ecográficas de las estructuras ováricas, con especial referencia a los CLs de vacas cíclicas y vacas en los primeros 21 días de gestación, siguiendo y comparando su evolución estructural y ecogénica.

Así mismo, se realiza una valoración de la eficacia del método de la ultrasonografía del CL como técnica de diagnóstico precoz de gestación.

El tercer y último objetivo de esta tesis doctoral es establecer una posible predicción del sexo fetal, por determinación de la testosterona plasmática en vacas preñadas de 90-100 días de gestación.

Para el seguimiento de la evolución del CL a lo largo del ciclo estral, y compararlo con la evolución que tiene lugar durante los primeros 21 días de gestación, utilizamos 76 vacas de raza frisona pertenecientes a dos explotaciones intensivas de ganado vacuno, situadas en Toral de los Guzmanes (León). De estas 76 vacas inseminadas, 33 quedaron preñadas y 43 vacías. Las exploraciones ecográficas se realizaron cada 48 horas y los parámetros estudiados han sido: el diámetro menor y mayor del CL, el área y el volumen luteal.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que en los diferentes parámetros estudiados, aparecen diferencias estadísticamente significativas entre los CLs de vacas gestantes y no gestantes en determinados días. Realizado los análisis estadísticos (t-test prueba no pareada) encontramos estas diferencias en el día trece, el día dieciséis y el día veintiuno tras la inseminación.

El día trece post-IA, comparando las medias obtenidas en los dos grupos experimentales (animales no gestantes y gestantes), aparecen diferencias significativas ($P < 0,05$) en el caso del diámetro mayor del CL ($24,62 \text{ mm} \pm 1,2479$ vs. $29,38 \text{ mm} \pm 1,3278$), muy significativas ($P < 0,01$) en el área ($333,69 \text{ mm}^2 \pm 26,2258$ vs. $491,59 \text{ mm}^2 \pm 44,9831$) y volumen luteal ($4856,50 \text{ mm}^3 \pm 514,5766$ vs. $8637,72 \text{ mm}^3 \pm 1175,119$) y altamente significativas ($P < 0,001$) en el caso del diámetro menor ($16,87 \text{ mm} \pm 0,8209$ vs. $20,84 \text{ mm} \pm 1,0792$).

El día dieciséis, es importante esta diferenciación del CL de gestación ya que, representa el límite para el comienzo de la regresión luteal en las vacas no preñadas. En nuestro trabajo, en todos los parámetros (excepto en el diámetro menor del CL), nos aparecen diferencias significativas ($P < 0,05$) al comparar los datos recogidos entre los dos grupos experimentales planteados.

Analizando los resultados, el día veintiuno del ciclo de exploraciones las diferencias que nos aparecen en todos los parámetros estudiados (entre el grupo NP y P), son altamente significativas ($p < 0,001$). Sólo se sale de esta línea de comportamiento el diámetro menor del CL en que las diferencias son solamente significativas ($p < 0,05$).

Para el estudio de la eficacia del método de la ultrasonografía del CL como técnica de diagnóstico de gestación, y teniendo en cuenta los resultados anteriormente comentados, llegamos a la conclusión que los tres mejores días para poder diagnosticar una posible gestación son los días 13, 16 y 21 post-IA, para lo cual en primer lugar determinamos los

parámetros discriminativos, es decir, aquellas medidas de los diferentes parámetros del CL que nos permitan distinguir, por encima ó por debajo, si la vaca se encuentra gestante ó vacía.

Una vez determinados los parámetros discriminativos, pasamos al estudio ecográfico del CL de 302 vacas de raza frisona, pertenecientes a explotaciones de ganado vacuno de la cooperativa AFRIVEPA en Santa M^a del Páramo (León). De estas 302 vacas inseminadas, 124 quedaron gestantes y 178 vacías. La edad de estos animales estaba comprendida entre los 24 meses y los nueve años de edad, y todas ellas habían parido al menos una vez.

Registrados todos los valores de los diámetros menores y mayores del CL, áreas y volúmenes luteales de los días 13, 16 y 21, pasamos a compararlos con los parámetros discriminativos y así poder establecer o no una posible gestación. Para esto, tuvimos que escoger un método de referencia como diagnóstico de gestación: la palpación rectal uterina entre los 30 y 40 días post-IA.

Analizados los resultados, vimos que tanto la fiabilidad como la exactitud del diagnóstico negativo de gestación eran mucho mejores que para el diagnóstico positivo. Así mismo, constatamos que para las vacas de primer parto el mejor día para realizar el diagnóstico de gestación negativo por ecografía del CL es el día 13, con un 75,6% de fiabilidad, para las vacas de segundo parto el mejor día es el día 21 con un 81% de fiabilidad, para las vacas de tercer parto el mejor día es el 16 con un 69% de fiabilidad, y para las vacas con más de cuatro partos el mejor es también el 16 con un 81,5% de fiabilidad.

El siguiente paso fue comprobar si este método de diagnóstico de gestación era rentable a nivel económico, pudimos comprobar que el mejor día aunque con ello suponga disminuir el número de aciertos es el día 13 post-IA.

Por lo tanto, podemos concluir que a pesar no haber superado el momento crítico de las reabsorciones embrionarias, y sin dar oportunidad a un posible celo, el estudio ecográfico del CL el día 13 tras la inseminación es un método idóneo para realizar el diagnóstico de gestación y especialmente el de “no gestación”.

Por último, para poder llevar a cabo el estudio de la posible predicción del sexo fetal por determinación de la testosterona plasmática entre los 90-100 días de gestación, se utilizaron 351 vacas de raza frisona, pertenecientes a explotaciones de ganado vacuno de la cooperativa AFRIVEPA de Santa M^a del Páramo (León).

El análisis de testosterona en sangre se realizó mediante la técnica de inmunoensayo de quimioluminiscencia (IMMULITE/IMMULITE 1000), contrastándose posteriormente con el sexo de la cría determinado fehacientemente en el momento del parto.

A través de diferentes estudios (prueba T de comparación de medias para muestras independientes y prueba de Levene para igualdad de varianzas), vimos que existen diferencias significativas para los ng/dl de testosterona y el sexo fetal. A medida que aumenta la concentración de testosterona plasmática, aumenta la probabilidad de macho y por tanto disminuye la de hembra. Pero debido a la alta variabilidad en ambos casos, comprobamos que el porcentaje global de acierto con este modelo es sólo del 61% (69% para terneras y 52,6% para terneros).

Resumen

Realizando el mismo estudio, pero referido a la paridad (número de orden del parto), vimos que estos porcentajes no variaban mucho, con la excepción del porcentaje de acierto para terneras en vacas de segunda lactación, que ascendía al 84,2%, pero así todo estadísticamente no significativo.

Finalmente, calculamos todas las probabilidades de macho en relación con las concentraciones de testosterona. Aquí, pudimos ver que la mayoría del universo de resultados está entre 5 y 35 ng/dl, siendo por encima y por debajo donde el método se hace más eficaz para determinar el sexo del feto, masculino ó femenino respectivamente, aunque lamentablemente en esos extremos existen muy pocos casos. Es decir, este método de predicción del sexo fetal entre los 90 y 100 días de gestación sólo es eficaz a bajas concentraciones de testosterona (inferior a 5 ng/dl) para las terneras y por encima de 35 ng/dl para los terneros.

IX. SUMMARY.

Summary**IX. SUMMARY.**

This Doctoral Thesis analyses the development of the echographic characteristics of ovarian structures, with special reference to the Corpus Luteums (CLs) of cyclical cows and cows in their first twenty-one days of pregnancy, following and comparing their structural and echogenic evolution.

A study of the reliability of CL ultrasonography as a technique for the early diagnosis of pregnancy is also assessed.

The third and last aim of this doctoral thesis is to establish a possible prediction of the foetal sex, by determining the plasmatic testosterone in pregnant cows during days 90-100 of pregnancy.

For the monitoring of the development of the CLs following the estral cycle, and for its comparison with the development that takes place during the first twenty one days of gestation, we have used 76 Frisian Holstein cows belonging to two intensive cattle farms, situated in Toral de los Guzmanes (León). Of these 76 inseminated cows, 33 got pregnant and 23 remained non-pregnant. The echographic explorations were carried out every 48 hours and the studied parameters have been the smallest and biggest CL diameters and the luteal area and volume.

The results obtained show that in the different studied parameters there are significant statistical differences between the CLs of pregnant and non-pregnant cows on fixed days. After having done the statistical analyses (t-test), we find these differences on days 13, 16 and 21 after insemination.

On day 13 after AI, comparing the data obtained in the two experimental groups (pregnant and non-pregnant cows), there appear significant differences ($P < 0.05$) in the case of the big CL diameter ($24.62 \text{ mm} \pm 1.2479$ vs. $29.38 \text{ mm} \pm 1.3278$), very important differences in the luteal area ($333.69 \text{ mm}^2 \pm 26.2258$ vs. $491.59 \text{ mm}^2 \pm 44.9831$) and volume ($4856.50 \text{ mm}^3 \pm 514.5766$ vs. $8637.72 \text{ mm}^3 \pm 1175.119$), and extremely significant differences ($P < 0.001$) when analysing the small CL diameter ($16.87 \text{ mm} \pm 0.8209$ vs. $20.84 \text{ mm} \pm 1.0792$).

On day 16, this CL gestation difference is very important, as it means the limit for the beginning of the luteal regression in non-pregnant cows. In our research we have found significant differences ($P < 0.05$) in all parameters (except in the small CL diameter) when compared the two chosen experimental groups.

Analysing the results, on day 21 the differences found in all studied parameters (between NP and P groups) are highly significant ($P < 0.001$). Only the behaviour of the small CL diameter, in which the differences are only significant ($P < 0.05$), does not follow the pattern.

For the study of the efficiency of the method of the CL ultrasonography as a technique for the diagnosis of pregnancy, and taking into account the before-mentioned results, we have reached the conclusion that the best three days to be able to diagnose a possible pregnancy are days 13, 16 and 21 after AI. To reach this conclusion we have first determined the discriminative parameters, i.e., those measures of the different CL parameters that allow us to distinguish (above or below results), if the cow is pregnant or non-pregnant.

Once we have determined the discriminative parameters, we have moved on to the echographic study of CL of 302 Holstein Frisian cows, belonging to cattle farms of the AFRIVEPA Cooperative in Santa María del Páramo (León). Of these 302 inseminated cows, 124 got pregnant and 178 remained non-pregnant. The age of these animals was between 24 months and nine years of age, and all them had given birth at least once.

Having registered the data of all the smallest and biggest CL diameters, luteal areas and volumes of days 13, 16 and 21, we have turned to compare them to the discriminative parameters and thus be able to establish, or not, a possible pregnancy. For this purpose we had to choose a method of reference as a diagnosis of pregnancy: the uterine rectal palpation between days 30-40 after AI.

After having seen the results, we have observed that not only the reliability but also the accuracy of the negative diagnosis of pregnancy were much better than for the positive diagnosis. We have also checked that for first-birth cows the best day to get a diagnosis for negative pregnancy by CL ecography is day 13, with a 75.6% reliability; for second-birth cows the best day is day 21, with a 81% reliability; for third-birth cows the best day is day 16, with a 69% reliability, and for cows with more than 4 births, the best day is also day 16, with a 81.5% reliability.

The next step was to check if this method of diagnosis of gestation was worthwhile and profitable. We could see that the best day was day 13 after AI, though this means to reduce the number of right guesses.

Therefore, we can conclude that in spite of not having exceeded the critical moment of embryary reabsortions, and not giving the chance to a possible heat, the CL ecographic study on day 13 after insemination is a reliable and ideal method for the diagnosis of pregnancy, and specially, of non-pregnancy.

Finally, to carry out the study of the possible prediction of foetal sex by determining the plasmatic testosterone between days 90-100 of pregnancy, we used 351 Holstein Frisian cows, belonging to cattle farms of the AFRIEVA Cooperative in Santa María del Páramo in León.

The analysis of testosterone in blood was carried out by the technique of the immune-test of quimioluminescence (IMMULITE/IMMULITE 1000), contrasting it with the sex of the calf determined in situ at birth.

By means of different studies (T-test of comparison of measures for independent samples and Levenne Test for Equality of Variances) we have seen that there are significant differences for the ng/dl of testosterone and the foetal sex. The more concentration of plasmatic testosterone, the more probability for the calf to be male. However, due to the high variability in both cases, we have checked that the overall percentage of right results with this model is only of 61% (69% for female calves and 52.6% for male calves).

Summary

X. BIBLIOGRAFÍA.

Bibliografía**X.-BIBLIOGRAFÍA**

AARLE, P.; AGUER, D.; BAARS, J.; CALLÉN, A.; EVANS, J.; HUTTEN, J.; JANSZEN, B.; JOHN, E.; NELL, T.; PAREZ, V.; VALKS, M. (1995). Fisiología de la reproducción en los mamíferos: regulación de la reproducción en la hembra. En: *Compendium de Reproducción animal*. Ed. Laboratorios INTERVET S.A., Salamanca. Pp: 4-9.

A. D. A. M., INC. Editores. (2005). Testosterona. *Medline Plus Enciclopedia Médica*. Article, 003707. (www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003707.htm).

ALEGRE, B. (2000). “*Estudio ecográfico del CL y su relación con la capacidad de producción de progesterona en el ganado vacuno. Diagnóstico precoz de gestación por ecografía del CL*”. Tesis Doctoral. Universidad de León. Facultad de Veterinaria. Departamento de Patología animal: Sanidad Animal.

ARCHBALD, L. F.; TRAN, T.; MASSEY, R.; KLAPEIN, E. (1992). Conception rates in dairy cows after time-insemination and simultaneous treatment with gonadotropin in releasing hormone and/or prostaglandin F_{2α}. *Theriogenology*, 37 (3): 723-731.

ARTHUR, G. H.; NOAKES, D. E.; PEARSON, H. (1991). *Reproducción y Obstetricia en Veterinaria*. Ed. Interamericana, McGRAW-Hill. Sexta edición. London.

ASENSIO, V. M. (2002). Esteroides anabolizantes: una visión de conjunto. *Doyma Farma*, 28 (5): 245-248.

ASSEY, R. J.; PURWANTARA, B.; GREVE, T.; HYTTEL, P.; SCHMIDT, M. H. (1993). Corpus luteum size and plasma progesterone levels in cattle after Cloprostenol Induced luteolysis. *Theriogenology*, 39: 1331-1342.

AYALON, N. (1978). A review of embryonic mortality in cattle. *J.Reprod. Fert.* 54:483-493.

BADTRAM, G.A; GAINES, J.D; THOMAS, C.B; BOSU, W.T.K. (1991). Factors influencing the accuracy of early pregnancy detection in cattle by real-time ultrasound scanning of the uterus. *Theriogenology*, 35: 1153-1167.

BARON-COHEN, S. (2007). Testosterona may be the key to autism. *Timesonline Movers & Shakers*. (www.timesonline.co.uk/tol/news/uk/health/article2431720.ece).

BARR, F. (1992). ¿Cuál es el ecógrafo indicado para usted? Sugerencias para la elección del equipo diagnóstico para el clínico veterinario. *Vet. Rec.*, 3: 177-180.

BARRIOS. (2002). Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem. *Memorias XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal*. Valera 22 al 26 de octubre. ULA- Trujillo: Pp: 2-6.

BAVERA, G. A. (2000). Mortalidad embrionaria. *Curso de producción bovina de carne*. FAV. UNRC (Facultad de Veterinaria de Río Cuarto, Argentina). Capítulo V. Pp: 1-3.

BEAL, W.E.; EDWARDS, R.B.; KEARNAN, J.M. (1989). Use of B-mode, linear array ultrasonography for evaluating the technique of bovine artificial insemination. *J. Dairy Sci.*, 72: 2198-2202.

BELLEDA, O. G. (2002). La ultrasonografía aplicada a la calidad y capacidad carnicera en el animal vivo. *DMTV*. (www.Producción-animal.com.ar/portal.htm).

BELLEDA, O. G. (2003). La ecografía aplicada a la reproducción en especies de interés productivo. *Pie Medical*. (www.Producción-animal.com.ar/portal.htm).

BERTRAND, J. K. (2005). Evaluación de la res en ganado de carne. *Revista Angus, Bs. As*, 228: 84-88.

BOYD, J. S.; OMRAN, S. N.; AYLIFFE, T. R. (1990). Evaluation of real time B mode ultrasound scanning for detecting early pregnancy in cows. *Vet. Rec.*, 127: 350-352.

- BO, G. A. y CACCIA, M.** (2000). Ultrasonografía reproductiva en el ganado bovino. *Rev. Taurus*, 2 (5): 23-39.
- BRAD, K.** (1994). Clinical applications of bovine Reproductive Ultrasonography. *Food Animal*, 16 (8): 1085-1097.
- BUNGARTZ, L.; NIEMANN, H.** (1994). Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J. Reprod. Fert.*, 101 (3): 583-591.
- CALVÉ, O.** (2004). “Cambios hormonales de la testosterona y el cortisol en respuesta al entrenamiento de resistencia en atletismo”. Tesis Doctotal. Universidad de la Rioja.
- CARROLL, D.J.; PIERSON, R.A.; HAUSER, E.R.; GRUMMER, R.R.; COMBS, D.K.** (1990). Variability of ovarian structures and plasma progesterone profiles in dairy cows with ovarian cysts. *Theriogenology*, 34: 349-370.
- CELORRIO FERNÁNDEZ, I.** (1994). “Consideraciones sobre el empleo de la Ultrasonografía tipo-B como método de diagnóstico de gestación en la especie ovina”. Memoria de licenciatura. Unidad de Reproducción y Obstetricia. Facultad de Veterinaria. León. España.
- CHAFFAUX, S.F.; VALON, F.; MARTÍNEZ, J.** (1982). Evolution de l’image echographique du produit de conception chez la vache. *Bull. Acad. Vét. Fr.* 55: 213-221.
- CHAFFAUX, S.G.; REDDY, S.; VALON, F.; THIBIER, M.** (1986). Transrectal real-time ultrasound scanning for diagnosing pregnancy and for monitoring embrionic mortality in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 10: 193-200.
- CHAFFAUX, S.G.; BIANCHI, M.; BHAT, P.; HEDGE, G.V.; REDDY, G.N.J.; THIBIER, M.** (1988). L’échographie en temps réel par voie transrectale. Intérêt pour le diagnostic de gestation chez la vache. *Rev. Méd. Vét.*, 164 (2): 101-108.
- CHEN, K. L.; CHI, W. T.; CHIOUT, W. S.** (2005). Caponización y efectos de la implantación de testosterona en lípidos de sangre y perfiles lipoproteicos en pollos masculinos. *Poultry Science*, 84: 547-552.
- CLIMENT, S.; BASCUAS, J. A.** (1989). Anatomía y Embriología Veterinaria. Tomo I. *Embriología general. Aparato locomotor: generalidades*. Ed. Marban. Madrid. Pp:54-58.
- COLE, H. H.; CUPPS, P. T.** (1984). *Reproducción de los animales domésticos*. Ed Acribia. Zaragoza.
- CURRAN, S.; PIERSON, R. A.; GINTHER, O.J.** (1986a). Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 10 through 20. *J. Am. Vét. Méd. Ass.*, 189: 1289-1294.
- CURRAN, S.; PIERSON, R. A.; GINTHER, O.J.** (1986b). Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 20 through 60. *J. Am. Vét. Méd. Ass.*, 189: 1295-1302.
- CURRAN, S.; GINTHER, O. J.** (1991). Ultrasonic determination of fetal gender in horses and cattle under farm conditions. *Theriogenology*, 36: 809-814.
- DE ALBA, J.** (1985). Mecanismos hormonales reguladores de la reproducción. En: *Reproducción animal*. Ed. La prensa medica Mexicana, S. A. Pp: 26-35.
- DE LA RIERA DÍAZ.** (2004). La ecografía reproductiva, un campo en expansión. *Frisona Española* nº 14: 102-110.
- DEICHERT, U.; KÜHN, K; STURM, G.; DAUME, E.; GRUNERT, E.** (1998). In vitro investigations on bovine corporea lutea, Steroids and ultrasound. *Journal Reprod. Fert.*, Abstract series, 2:28.
- DESCÔTEAUX, L.; CARRIÈRE, P. D.; DUROCHER, J.** (2002). Evaluation échographique du tractus reproducteur bovin : diagnostic précoce de gestation, gemellité, mortalité embryonnaire et anomalies del’ utérus. *Le Médecin Vétérinaire du Québec* ; 32 :123-127.

Bibliografía

- DIAZ, C.; SUAREZ, J. L.; QUINTELA, L. A.; PEÑA, A. I.; BARRIO, F.; GARCIA, M. E.; BECERRA, J. J.; HERRADON, P. G.** (1995). Precisión de la técnica ecográfica en la determinación del sexo fetal bovino. *Arch. Zootec.*, 44: 55-62.
- DÍEZ BRU, N.** (1992). Principios básicos de la ecografía. *Clinica Veterinaria de Pequeños animales*, 12 (3): 138-147.
- DOBSON, H.; NANDA, A. S.** (1992). Reliability of cyst diagnosis and effect of energy status on LH released by estradiol or GnRH in cows with ovarian cysts. *Theriogenology*, 37 (2): 465-472.
- DRIANCOURT, M. A.; ANDRIEU, D.; THATCHER, W. W.** (1986). Croissance folliculaire au cours dy cycle et debut de gestation chez la vache. *Comunicación n° 2, S. F. A. U. M. B.*, Pp : 62.
- DRIANCOURT, M. A.; ANDRIEU, D.; THATCHER, W. W.** (1988). Suivi de la croissance folliculaire par échographie au cours de cycles naturels et stimulés chez la vache. *Reel. Méd. Vét. Éc. Alfort*, 164 : 109-114.
- DUER, C.; CARDEN, M.; SCHMITT, D. and TOMASI, T.** (2002). Utility of maternal serum total testosterone análisis for fetal gender determination in Asian elephants (*Elephas maximus*). *Anim. Reprod. Sci.* Jan 23 ; 69 (1-2): 47-52.
- EDMONDSON, A. J.; FISSORE, R. A.; PASHEN, R. L.; BONDURANT, R.H.** (1986a). The use of ultrasonography for the study of the bovine reproductive tract I. Normal and pathological ovarian structures. *Anim. Reprod. Sci.*, 12: 157-165.
- EDMONDSON, A. J.; FISSORE, R. A.; PASHEN, R. L.; BONDURANT, R. H.** (1986b). The use of ultrasonography for the study of the bovine reproductive tract II. No pregnant, pregnant, and pathological conditions of the uterus. *Anim. Reprod. Sci.*, 12: 167-177.
- ELLI, M.** (2005). *Manual de reproducción en ganado vacuno*. Ed. Servet. Zaragoza. España.
- EVANS, A. C. O.; ADAMS, G. P.; RAWLINGS, N. C.** (1994). Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepuberal heifers. *J. Reprod. Fert.*, 100: 187-194.
- FARIN, P. W.; YOUNGQUIST, R. S.; PARFET, J. R.; GARVERICK, H. A.** (1990). Diagnosis of luteal and follicular ovarian cysts in dairy cows by sector scan ultrasonography. *Theriogenology*, 34: 633-642.
- FARIN, P. W.; YOUNGQUIST, R. S.; PARFET, J. R.; GARVERICK, H. A.** (1992). Diagnosis of luteal and follicular ovarian cysts by palpation per rectum and linear-array ultrasonography in dairy cows. *J. Am. Vét. Méd. Ass.*, 200(8): 1085-1089.
- FIELDS, M. J.; FIELDS, P. A.** (1996). Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. *Theriogenology*, 45: 1295-1325.
- FISSORE, R. A.; EDMONDSON, A. J.; PASHEN, R. L.; BONDURANT, R. H.** (1986a) The use of ultrasonography for the study of the bovine reproductive tract I. Normal and pathological ovarian structures. *Anim. Reprod. Sci.*, 12: 157.
- FISSORE, R. A.; PASHEN, R. L.; BONDURANT, R. H.** (1986b). The use of ultrasonography for the study of the bovine reproductive tract II. No pregnant, pregnant, and pathological conditions of the uterus. *Anim. Reprod. Sci.*, 12: 167-177.
- FOGWELL, R. L.; COWLEY, J. L.; WORTMAN, A.; AMES, N. K.; IRELAND, J. J.** (1985). Luteal function in cows following destruction of ovarian follicles at midcycle. *Theriogenology*, 23 (2): 389-398.
- FOLEY, G. L.** (1996) Pathology of the corpus luteum of cows. *Theriogenology*, 45: 1413-1428.
- FOOTE, R.H.; OLTENDCU, E.A.B.; KUMMERFELD, E. A.** (1979). Milk progesterone as a diagnosis aid. *Br. Vet. J.*, 135: 50-55.
- FREIRE, E.** (2004). Fundamento biofísico de la exploración ecográfica. *MEPEVA*. (www.Producción-animal.com.ar/portal.htm).

- FRICKE, P. M.** (2004). Aplicaciones prácticas del ultrasonido para el manejo reproductivo en ganado lechero. (www.wisc.edu/dysci/uwex/rep-phys/45pubs/ultrasound/502spanish.pdf).
- GABILONDO, F.; ZEPEDA, S.** (1998). Fisiología y Endocrinología de la glándula prostática. En: *PAC Urología 1 (programa de actualización continua para el urólogo)*. A3 Hiperplasia prostática obstructiva. Ed. Intersistema S.A. México. Pp:11. (www.drscope.com/pac/urologia/a3/a3_pag11.htm).
- GARCÍA ALONSO, C.** (1962). "Diagnóstico clínico de gestación". Obstetricia Veterinaria y Patología de la Reproducción. Impta, Biosca. Madrid. Pp: 242-271.
- GARDÓN, J.C.** (2005). Principios básicos de la ultrasonografía. *Albéitar*. n° 79: 6-7.
- GARDÓN, J.C.** (2004). Aplicaciones de la ultrasonografía en porcino, ovino y caprino. *Albéitar*. n° 79: 14-15.
- GINTHER, O. J.; KASTELIC, J. P.; KNOPF, L.** (1989a). Inteoovarian relationships among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers. *Theriogenology*, 32 (5): 787-795.
- GINTHER, O. J.; KASTELIC, J. P.; KNOPF, L.** (1989b). Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J. Reprod. Fert.*, 87:223-230.
- GLEEN, R.; CUNNINGHAM, MD.; ALVIN, M.; MATSUMOTO, MD.; RONALD SWERDLOFF, MD.** Editors (2004). Low Testosterone and Men's Health. The Hormone Foundation. *The hormone foundation*. Patient information Page (www.hormone.org).
- GNEMMI, G.** (2004). La ultrasonografía en ginecología buiátrica. *Rev. Taurus, Bs. As.*, 3 (12): 26-32 y 4 (13): 22-30.
- GONZÁLEZ, J.; GONZÁLEZ, R.** (1961). *Anatomía comparada de los animales domésticos*. Impta. Juan Pueyo. Madrid. Pp: 554.
- GRASSO, F.; GUIBAULT, L. A.; ROY, G. L.; LUSSIER, J. G.** (1989). Ultrasonic determination of ovarian follicular development in superovulated heifers pretreated with FSH-P at the beginning of the estrous cycle. *Theriogenology*, 31: 1209-1220.
- GRIFFIN, P. G.; GINTHER, O. J.** (1992). Research applications of ultrasonic imagin in Reproductive Biology. *J. Anim. Sci.*, 70: 953-972.
- GRYGAR, I.; VANATKA, F.; VIKLER, A.; KUDLAC, E.** (1992). Comparision of the accuracy of the diagnostics of physiological and phatological conditions in bovine ovaries by means of rectal palpation and ultrasonography. *Acta Veterinaria Brno* 61 (4): 219-230.
- GRYGAR, I.; KUDLAC, E.** (1994). Ultrasonic examination of cattle. Ocurrence and morphological features of corpora lutea with cavities in cycling and pregnant cows. *Veterinarstvi*, 44: 12, 564, 566-569.
- GUIBAULT, L. A; DUFOUR, J. J.; THATCHER, W. W.; DROST, M.; HAIBEL, G. K.** (1986). Ovarian follicular development during early pregnancy in cattle. *J. Reprod. Fert.*, 78: 127-135.
- HAFEZ, E. S. E.** (1996). Anatomía funcional de la reproducción. En: *Reproducción e inseminación artificial en animales*, 6ª edición. Ed.Interamericana. México. Pp: 3-52.
- HAFEZ, E. S. E.** (2000). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7ª edición. Ed.Interamericana. México.
- HANSEL, W.; BLAIR, R. M.** (1996). Bovine corpus luteum: a historic overview and implications for future research. *Theriogenology*, 45: 1267-1294.
- HANZEN, Ch. ; DELSAUX, B.** (1987). Use of transrectal B-mode ultrasound imaging in bovine pregnancy diagnosis. *Vet. Rec.*, 121: 200-202.

Bibliografía

- HANZEN, Ch.; LAURENT, Y.** (1991). Application de l'échographie bidimensionnelle au diagnostic de gestation et a l'évaluation de l'incidence de la mortalité embryonnaire dans l'espèce bovine. *Ann. Méd. Vét.*, 135 : 481-487.
- HANZEN, Ch.; LAURENT, Y.; JAKOVLJEVIC, S.** (1992). Applications de l'échographie en reproduction bovine. 1. L'examen des ovaries. *Ann. Méd. Vét.*, 137 : 13-18.
- HANZEN, Ch.; LAURENT, Y.; JAKOVLJEVIC, S.** (1993). Applications de l'échographie en reproduction bovine. 2. L'utérus gestant et le non-gestant. *Ann. Méd. Vét.*, 137 : 93-101.
- HARM, M. D.** (2005). Anabolic steroid. *Department of Physiology University of Limburg*, Article: 129 (www.musculación.net).
- HARVEY, M. J. ; RENTON, J. P.; SALAHEDDINE, M.; ROBERTSON, L** (1994). Ovarian and clinical response of cattle to busserelin. *Vet. Rec.*, 134 (7): 168-171.
- HOSPES, R.; SEEH, C.** (1999). *Ecografía y Endoscopia de la ubre de la vaca*. Volumen I. Ed. Boehringer Ingelheim, Stuttgart. Alemania.
- HOUTSMULLER, E. J.; DE JONG, F. H. ; ROWLAND, D. L. and SLOB, A. K.** (1995). Plasma testosterone in fetal rats and their mothers on day 19 of gestation. *Physiol behave*. Vol 57 n° 3: 495-499.
- HOWELL, J. L.; FUQUAY, J. W.; SMITH, A. E.** (1994). Corpus luteum growth and function in lactating Holstein cows during spring and summer. *J. Dairy Sci.*, 77 (3): 735-739.
- HUGHES, E. A.; DAVIES, D. A. R.** (1989). Practical uses of ultrasound in early pregnancy in cattle. *Vet. Rec.*, 124: 456-458.
- ILLERA, M.** (1984). Testículo y hormogénesis testicular. En: *Endocrinología Veterinaria y Fisiología de la Reproducción*. Imprenta Fareso S.A. Madrid. Pp: 209-227.
- JASKOWSKI, J. M.; WIESE, M.; WALLENBURG, J.** (1993). Ultrasonographic evaluation of functional structures on the surface of ovaries during oestrus and early pregnancy in cows. *Medycyna-Weterynaryjna*, 49 (8):356-358.
- JEFFCOATE, I.A.; AYLIFFE, T. R.** (1995). An ultrasonographic study of bovine cystic ovarian disease and its treatment. *Vet. Rec.*, 136(16): 406-410.
- JONES, A. L.; MOORE, K.; WILSON, J. M.** (1989). Ultrasonic observations of ovarian activity under influence of Sincro-Mate-B in the cow. *Theriogenology*, 31(1): 208.
- JONES, A.; MAREK, D.; WILSON, J.; LOONEY, C.** (1990). The use of ultrasonography to increase recipient efficiency through early pregnancy diagnosis. *Theriogenology*, 33(1): 259.
- KÄHN, W.** (1986). Ultrasonic diagnosis of pregnancy and ovarian function in cattle. In *Proceedings. 14th World Cong Dis. Cattle*, Dublin. 2: 935-940.
- KÄHN, W.; LEIDL, W.** (1986). Diagnosis of ovarian function in the cow by sonography. *Tierärztliche Umschau*, 41:3.
- KÄHN, W.; LEIDL, W.** (1989a). Ultrasonic characteristics of pathological conditions of the bovine uterus and ovaries. En: *Diagnostic Ultrasound and Animal Reproduction*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. Pp:53-65.
- KÄHN, W.** (1989b). Sonographic fetometry in the bovine. *Theriogenology*, 31: 1105-1121.
- KÄHN, W.** (1990). Sonographic imaging of the bovine fetus. *Theriogenology*, 33: 385-396.

- KÄHN, W.** (1994). Examen échographique des bovins. Technique de l'examen échographique des bovins. En : *Atlas de diagnostics échographiques. Examen Gynecologique and Reproduction. Equin, bovin, ovin, caprin, porcin, chien, chat.* Ed. MALOINE (Maloine 27, Rue de l'école de Médecine, 75006 PARIS).
- KAMIMURA, S. ; OHGI, T. ; TAKAHASHI, M. ; TSUKAMOTO, T.** (1993). Postpartum resumption of ovarian and uterine involution monitored by ultrasonography in Holstein cow. *J. Vet. Med. Sci.*, 55 (4): 643-647.
- KASTELIC, J. P.; GINTHER, O. J.** (1989a). Fate of conceptus and corpus luteum after induced embryonic loss in heifers. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 194: 922-928.
- KASTELIC, J. P.; CURRAN, S.; GINTHER, O. J.** (1989b). Accuracy of ultrasonography for pregnancy diagnosis on days 10 to 22 in heifers. *Theriogenology*, 31: 813-820.
- KASTELIC, J. P.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J.** (1990a). Relationship between ultrasonic assesment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology*, 33 (6): 1269-1278.
- KASTELIC, J. P.; PIERSON, R. A. ; GINTHER, O. J.** (1990b). Ultrasonic morphology of corpora lutea and central luteal cavities during the estrous cycle and early pregnancy in heifers. *Theriogenology*, 34 (3): 487-498.
- KASTELIC, J. P.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J.** (1991). Ultrasonic detection of the conceptus and characterization of intrauterine fluid on days 10 to 22 in heifers. *Theriogenology*, 35(3): 569-581.
- KELTON, D. F.** (1989). Accuracy of palpation of bovine corpora lutea. *Cornell-Vet.*, 79 (4): 301-305.
- KITO, S.; OKUDA, K.; MIYAZAWA, K.; SATO, K.** (1986). Study on the appearance of the cavity in the corpus luteum of cows by using ultrasonic scanging. *Theriogenology*, 25 (2): 325-333.
- LAING, J. A.; EASTMAN, S. A. K.; BOUTFLOWER, J. C.** (1979). The use of progesterone concentration in milk and plasma for pregnancy diagnosis in cattle. *Br. Vet. J.*, 136: 204-209.
- LAITINEN, J.; REMES, E.; TENHUNEN, M.; HANNINEN, O. ; ALANKA, M.** (1985). Milk progesterone in Finnish dairy cows, a field study on the control of artificial insemination and early pregnancy. *Br. Vet. J.*, 141: 297-307.
- LARSSON, B.** (1987). Determination of ovulation by ultrasound examination and its relation to LH-peak in heifers. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 34: 749-754.
- LEAN, I. J.; ABE, N.; DUGGAN, S.; KINGSFORD, N.** (1992). Within and between observer agreement on ultrasonic evaluation of bovine ovarian structures. *Aust-Vet-1*, 69 (11): 279-282.
- LORIOT, N.; MARTINOT, S.; FRANCK, M.** (1997a). Nociones básicas. En: *Ecografía abdominal del perro y gato.* Ed. Masson, S. A. Barcelona. Pp: 1-15.
- LORIOT, N.; MARTINOT, S.; FRANCK, M.** (1997b). Glosario. En: *Ecografía abdominal del perro y gato.* Ed. Masson, S. A. Barcelona. Pp: 131-133.
- LOS LAZOS S. A.** (2004). Medición por ecografía de las características de la carcasa. Cabaña el Volcán. *Catálogo de genética.* Rosario, Argentina. (www.Producción-animal.com.ar/portal.htm).
- LUKASZEWSKA, J.; HANSEL, W.** (1980). Corpus Luteum maintenance during early pregnancy in the cow. *J. Reprod. Fert.*, 59: 485-493.
- LULAI, C.; DOBRINSKI, Y.; KASTELIC, J. P ; MAPLETOFT, R. J.** (1994). Induction of luteal regression, ovulation and development of new luteal tissue during early pregnancy in heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, 35: 3-4.
- MACIEL, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; GUSTAFSSON, H.** (1992). Fine structure of corpora lutea in superovulated heifers. *Zentralbl-Veterinarmed-A:* 39 (2): 89-97.
- MALGOR, L. A.; BARRIOS LILIAN.; BLANC, C.** (1975). Effects of testosterone on bone marrow erythroid cells of normal and nephrectomized rats. *Acta Physiol, et Pharmacol. Latinoam.* 25: 179-187.

Bibliografía

- MALGOR, L. A.; VALSECIA, M.** (2005). Hormonas sexuales masculinas. *Acta Phisiol, et Pharmacol. Latinoam.* Sección IV. Capítulo 27: 211-219.
- MANUAL MERCK DE VETERINARIA.** (2000). Esteroides Anabolizantes y Testosterona. 5ª edición. Océano Grupo Editorial, S. A. Pp: 1889, 1893 y 1939.
- MARINA, S.** (2003). Advances in the knowledges of spermatogenesis. *Revista Iveroamericana de Fertilidad:* Vol. 20- n° 4- Julio-Agosto: 213-225.
- MARRODÁN, M. V.; REQUENA, J. H.; TRUFFER, R.** (2002). Ecografía bovina. (www.Producción-animal.com.ar/portal.htm).
- MARTÍN, E.; GARCÍA, C.** (1985). Bioquímica testicular y ovárica. En: *Fisiopatología de la Reproducción con sus bases sinópticas*. Ed. Ins Experimental de Cirugía y Reproducción de la Universidad de Zaragoza. Pp: 67-70.
- Mc DONALD, L. E.** (1969). Reproducción en el macho. Función esteroide. En: *Reproducción y Endocrinología Veterinaria*. Ed. Interamericana. Mc Graw Hill. México Df .Pp: 171-183.
- MIALOT, J. P.; LEVY, I.; GRIMARD, B.** (1991). L'échographie dans la gestion de la reproduction chez les bovins. *Rec. Méd. Vét.*, 167(1): 21-31.
- MILVAE, R. A.; HINCKLEY, S. T.; CARLSON, J. C.** (1996). Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. *Theriogenology*, 45: 1327-1349.
- MUNAR, C. J.** (2004). *Dos décadas de transferencias embrionarias en bovinos y nuevas biotecnologías disponibles para el futuro.* Parte IV: 1-5. (www.munar.com.ar/recursos/dostep4.htm).
- OKANO, A.; TOMIKUZA, T.** (1987). Ultrasonic observation of postpartum uterine involution in the cow. *Theriogenology*, 27: 369-377.
- OKUDA, K; KITO, S; SUMI, N.; SATO, K.** (1988). A study of the central cavity in the bovine corpus luteum. *Vet. Rec.*, 123(7): 180-183.
- OMRAN, S. N.; AYLIFFE, T. R.; BOYDS, J. S.** (1988). Preliminary observations of bovine ovarian structures using B-mode real time ultrasound. *Vet. Rec.*, 122 (19): 465-466.
- OMRAN, S. N.** (1989). " *Use of a high frecuency transducer with real time B-mode ultrasound scanning to identify early pregnancy in cows*". PhD Thesis. Glasgow University.
- PASCUALINI, R. Q.** (1973). *Endocrinología.* Vols. I y II. Ed. Científico Médica. Barcelona.
- PAZ Y MIÑO, N.; VALENCIA, I.** (2003). *Factor masculino de infertilidad.* Red Latinoamericana de Reproducción Asistida. (www.redlara.com/PECDAT LIVRO IVAN07.ASP).
- PECHMAN, R. D.; EILTS, B. E.** (1987). B-mode ultrasonography of the bull testicle. *Theriogenology*, 27: 431-441.
- PENNINTONG, J. A.; SCHULZ, L. H.; HOFFMAN, W. F.** (1985). Comparison of pregnancy diagnosis by milk progesterone on day 21 and day 24 postbreeding. Field study in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 68: 2740-2745.
- PÉREZ-CUADRADO, R. F.** (2005). Ecografía 3D-4D y sus aplicaciones obstétricas. *Medimar, Hospital Internacional.* (www.hospitalmedimar.com/articulo.asp?cod_articulo_39).
- PÉREZ MARÍN, C. C.; RODRÍGUEZ ARTELES, I.; DORADO MARTÍN, J.; HIDALGO PRIETO, M.; CORRAL PEÑA, S.; SANZ PAREJO, J.** (2002). Utilidad del perfil de progesterona plasmática y ecografía en el diagnóstico de quistes ováricos en vacas repetidoras de celos. *Rev. Col. Cienc. Pec.* Vol. 15, 1:51-62.
- PÉREZ MARÍN, C. C.; RODRÍGUEZ ARTELES, I.; DORADO MARTÍN, J.; HIDALGO PRIETO, M.; CORRAL PEÑA, S.; SANZ PAREJO, J.** (2005). Dinámica folicular ovárica en vacas repetidoras: estudio

ecográfico y perfil de progesterona. *Fac. de Veterinaria. Univ. de Córdoba. España. Ctro. De Invest. Y Form. Agraria, Andalucía*. (www.engormix.com/dinámica_folicular_ovarica_vacas_articulos_483_GDC).

PETER, A. T.; JAKOVLJEVIC, S.; PIERSON, R. A. (1992). Use of real-time ultrasonography in bovine and equine reproduction. *Compendium Contin. Educ. Pract. Vet.*, 14 (8): 1116-1124.

PETERS, A. R.; BALL, P. J. H. (1987). The ovarian cycle. In: *Reproduction in cattle, chapter 3*. Butterworths publishers (Borough Green, Sevenoaks. Kent TN158PH, England). Pp: 20-39.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. (1984). Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology*, 21 (3): 495-504.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. (1986). Ovarian follicular populations during early pregnancy in heifers. *Theriogenology*, 26(5): 649-659.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. (1987a). Intraovarian effect of the corpus luteum on ovarian follicles during early pregnancy in heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, 15: 53-60.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. (1987b). Reliability of diagnostic ultrasonography for identification and measurement of follicles and detecting the corpus luteum in heifers. *Theriogenology*, 28: 929-936.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. (1987c). Follicular populations during the estrous cycle in heifers. I. Influence of day. *Anim. Reprod. Sci.*, 14: 165-176.

PIERSON, R. A.; KASTELIC, J. P.; GINTHER, O. J. (1988a). Basic principles and techniques for transrectal ultrasonography in cattle and horses. *Theriogenology*, 29(1): 3-20.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. (1988b). Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology*, 29(1): 21-37.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. (1988c). Follicular populations during the estrous cycle in heifers. II. Time of selection of the ovulatory follicle. *Anim. Reprod. Sci.*, 16: 81-95.

PIETERSE, M. C.; KAPPEN, K. A.; KRUIP, Th.A.M.; TAVERNE, M. A. M. (1988). Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30: 751-762.

PIETERSE, M. C. (1989). Ultrasonic characteristics of physiological structures on bovine ovaries. In: M.A.M. Taverne and A. H. Willemsse. *Diagnostic Ultrasound and Animal Reproduction*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. Pp: 37-51.

PIETERSE, M. C.; TAVERNE, M.A.M.; KRUIP, Th.A.M.; WILLEMSE, A. H. (1990a). The usefulness of ultrasonography in comparison with rectal palpation for the detection of bovine corpora lutea. *Theriogenology*, 33 (1): 297.

PIETERSE, M. C.; TAVERNE, M.A.M.; KRUIP, Th.A.M.; WILLEMSE, A. H. (1990b). Detection of corpora lutea and follicles in cows: a comparison of transvaginal ultrasonography and rectal palpation. *Vet. Rec.*, 126 (22): 552-554.

PIETERSE, M. C.; TAVERNE, M. A. M.; VOS, P. L. A. M. (1995). *Manual de "Observación ecográfica durante la gestación y el ciclo estral bovino"*. Ed. Laboratorios Hoechst, Ámsterdam.

PIETERSE, M. C. (1999). El ultrasonido en la reproducción bovina: aplicaciones en diagnóstico y tratamiento. *Rev.Taurus*, 1(1): 18-26.

POMBO, I.; GARCÍA-MANERO, M.; MAZAIRA, J.; ROYO, P.; ALCÁZAR, J. L. (2005). Papel de la ecografía tridimensional en obstetricia. *Rev. Med, Univ Navarra*. Vol 49, nº 4: 17-22.

PURWANTARA, B.; SCHMIDT, M.; GREVE, T.; CALLENSSEN, H. (1993). Follicular dynamics prior to and during superovulation in heifers. *Theriogenology*, 40 (5): 913-921.

Bibliografía

- QUINTELA, L. A.; DÍAZ, C.; REY, C.; DEIROS, J.; BARRIO, M.; GONZÁLEZ, M.; PEÑA, A. I.; BECERRA, J. J.; HERRADÓN, P. G.** (2004). La ecografía en la vaca gestante. *Albéitar*, n° 79: 8-12.
- QUIRK, S. M.; HICKEY, G. J.; FORTUNE, J. E.** (1986). Growth and regression of ovarian follicles during the follicular phase of the oestrus cycle in heifers undergoing spontaneous and PGF-2 induced luteolysis. *J. Reprod. Fert.*, 77: 211-219.
- RAJAMAHENDRAN, R.; ROBINSON, J.; DESBOTTES, S.** (1988). The use of ultrasonography to determine the onset of ovulation in dairy cows. *Proc. Annu. Meet. West. Sec. Am. Soc. Anim. Sci.*, 39: 309-311.
- RAJAMAHENDRAN, R.; TAYLOR, C.** (1990). Characterization of ovarian activity in postpartum dairy cows using ultrasound imaging and progesterone profiles. *Anim. Reprod. Sci.*, 22: 171-180.
- RAJAMAHENDRAN, R.; AMBROSE, D. J.; BURTON, B.** (1994). Clinical and research applications of real-time ultrasonography in bovine reproduction : a review. *Can. Vet. J.*, 35(9): 563-572.
- REEVES, J. J.; RANTANEN, N. W.; HAUSER, M.** (1984). Transrectal real-time ultrasound scanning of the cow reproductive tract. *Theriogenology*, 21(3): 485-494.
- RIBADU, A. Y.; WARD, W. R.; DOBSON, H.** (1993). Ultrasound and hormone study of cystic ovaries in postpartum cows. *J. Reprod. Fert. Abstract series*, 11: 78.
- RIBADU, A. Y.; WARD, W. R.; DOBSON, H.** (1994a). Comparative evaluation of ovarian structures in cattle by palpation per rectum, ultrasonography and plasma progesterone concentration. *Vet. Rec.*, 135 (19): 452-457.
- RIBADU, A. Y.; DOBSON, H.; WARD, W. R.** (1994b). Ultrasound and progesterone monitoring of ovarian follicular cysts in cows treated with GnRH. *Br. Vet. J.*, 150: 489-497.
- RIBERA, V.; VILLANUEVA, C. A.** (2000). *Capacitación Espermática. Revista del Instituto Nacional Perinatología*: 1-26.
- RIVERA, M. M.** (2005). Ecografía tridimensional en ginecología y obstetricia. *MedUNAB*, 8: 125-129.
- ROCHE, A.; ECHEGOYEN, E.; ALABART, J. L.; FOLCH, J.** (2004). Aplicación de la ecografía en la transferencia de embriones. *Albéitar*, n° 79: 13.
- ROTHER, K.** (1974). Fundamentos fisiológicos de la reproducción. En: *Control de la reproducción en los animales domésticos*. Ed. Acribia. Zaragoza. Pp: 34-35.
- RUPEREZ, R.** (1997). Diagnóstico del sexo fetal por ecografía en la vaca. *Albéitar*, n° 9: 17-18.
- RUPEREZ, R.** (2004). Aplicación de la ecografía en la reproducción bovina. *Artículos del Colegio de Veterinarios de la provincia de Buenos Aires*. (www.veterinariospba.org.ar/Articulos/Art31.htm).
- RUSBRIDGE, S. M.; WEBB, R.** (1991). Control of the lifespan of corpora lutea induced during the early luteal phase of the Oestrus cycle in heifers. *J. Reprod. Fert.*, Abstract Series 7, Abstract 54: 32.
- S. A. A.** (2005). Testosterona. *Sociedad Argentina de Andrología*. (www.saa.org.ar/vernovedades.asp?i=29).
- SALGUEIRO, M. J.; WEILL, R.; HERNÁNDEZ-TRIANA, M.; ZUBILLAGA, M.; LYSIONEK, A.; CARO, R.** (2004). Deficiencia de Zinc en relación con el desarrollo intelectual y sexual. *Rev Cubana de Salud Pública*; 30 (2).
- SAVIO, D. J.; KEENAN, L.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F.** (1988). Pattern of growth of dominant follicles during the estrous cycle in heifers. *J. Reprod. Fert.*, 83: 663-671.
- SAVIO, D. J.; BOLAND, M. P.; HYNES, N.; ROCHE, J. F.** (1990). Resumption of follicular activity in the early postpartum period of dairy cows. *J. Reprod. Fert.*, 88: 569-576.

- SHEMESH, M.; AYALON, N.; SHALEN, E.; NEYRA, A.; SCHINDLER, H.; MILGUIR, F.** (1978). Milk progesterone measurement in dairy cows, correlation with estrus and pregnancy determination. *Theriogenology*, 9: 343-352.
- SIBIDE, M.; FRANCO, L. A.; FREDRIKSSON, G.; MADES, A.; MALMGREN, L.** (1992). Effects of testosterone, LH and cortisol concentrations, and on testicular ultrasonic appearance of induced testicular degenerations in bulls. *Proc. 12th Int. Congr. Anim. Reprod. And AI*, 1: 162-164.
- SILVAN, G; ILLERA, J. C.** (2004). *El sulfato de estrona y su utilización para el diagnóstico de la función reproductora en especies de interés veterinario*. Real Academia de las Ciencias. Conferencia impartida el 10-3-2004. (www.racve.es/actividades/ciencias-basicas/2004-03-10GemaSilvan.htm).
- SINGH, J.; PIERSON, R. A.; ADAMS, G. P.** (1997). Ultrasound image attributes of the bovine corpus luteum: structural and functional correlates. *J. Reprod. Fert.*, 109: 35-44.
- SIROIS, J.; FORTUNE, J. E.** (1988). Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.*, 39: 308-317.
- SISSON, S; GROSSMAN, J. D.** (1963). *Anatomía de los animales domésticos*. Impta. Hispano Americana. Barcelona. Pp: 576-581.
- SMIDT, D.; ELLENDORFF, F.** (1972). Fundamentos generales de la biología de la reproducción. En: *Endocrinología y Fisiología de la Reproducción de los animales domésticos*. Ed. Acribia. Zaragoza. Pp: 70-83.
- SORENSEN, A. M.** (1982). Hormonas y pubertad del macho. *Reproducción Animal: Principios y Prácticas*. Ed. Mc Graw Hill. Pp: 73-85.
- SPRECHER, D. J.; NEBEL, R. L.; WHITMAN, S. S.** (1989). The predictive value, sensitivity and specificity of palpation per rectum and transrectal ultrasonography for the determination of bovine luteal status. *Theriogenology*, 31 (6): 1165-1172.
- TAMAYO, M.** (2000). La ecografía como medio de diagnóstico y evaluación de los procesos reproductivos en el bovino. (www.esaote-piemedical.com).
- TAVERNE, M. A. M.; SZENCI, O.; SZETAG, J.; PIROS, A.** (1985). Pregnancy Diagnosis in cows with linear-array real time ultrasound scanning : a preliminary note. *The Veterinary Quarterly*, 7: 264-270.
- TAVERNE, M. A. M.** (1991). Applications of two-dimensional ultrasound in animal reproduction. *Wien. Tierärztl. Mschr.*, 78: 341-345.
- THATCHER, W. W.; MACMILLAN, K. L.; HANSEN, P. J.; DROST, M.** (1989). Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology*, 31 (1): 149-164.
- TORRES CUERVO, A.** (2002). Predicción de la composición de la carcasa en ganado de carne usando el ultrasonido. *Trabajo presentado a la Asociación Nacional de Jueces de Ganado Cebú (Colombia), para optar por el título de Juez Nacional*. (www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/ecografi.../30-prediccion_carcasa.htm).
- VALSECIA, M.; MALGOR, L. A.; VERGES, E.; E. de MARKOWSKY, E.; BARRIOS, L.** (1988). Direct effects of erythropoietic hormones on CFU-E/BFU-E erythroid colony growths. *Acta Physiol, et Pharmacol. Latinoam.* 38: 259.
- WATSON, E. D.; MUNRO, C. D.** (1980). A re-assessment of the technique of rectal palpation of corpora lutea in cows. *Br. Vet. J.*, 136: 555-560.
- WEBERWE, J. A.; HILT, C. J.; WOODS, G. L.** (1988). Ultrasonic appearance of bull accessory sex glands. *Theriogenology*, 29: 1347-1353.

Bibliografía

WILSON, J. M; ZALESKY, D. D. (1988). Early pregnancy determination in the bovine utilizing ultrasonography. *Theriogenology*, 29(1): 330.

ZAIED, D.; BIRSCHWAL, C.; ELMORE, R.; YOUNGQUIST, R.; SHARP, A.; GARVERICK, H. (1979). Concentration of progesterone in milk as a monitor of early pregnancy diagnosis in dairy cows. *Theriogenology*, 12: 3-11.

ZEMJANIS, R. (1970) Diagnostic and therapeutic Techniques. *In Animal Reproduction*, 2nd ed., Williams and Wilkins, Baltimore, Pp. 57.

ZOLI, A. P.; BECKERS, J. F.; WOUTERS-BALLMAN, P.; CLOSSET, J.; FALMAGNE, P.; ECTORS, F. (1991). Purification and characterization of a bovine Pregnancy-Associated-Glycoprotein. *Biol. Reprod.*, 45: 1-10.

XI. ANEXO.

Anexo

Continuación tabla n° 66

XI.-ANEXO.**♦ Tabla n° 66: Valores individualizados del diámetro menor y mayor del cuerpo lúteo, área y volumen luteal para el grupo de vacas pertenecientes a la primera fase experimental**

VACA	DIA	Dm	DM	AREA	VOLUMEN	OVARIO	GEST
D76	0					OD	NP
D76	3					OD	NP
D76	5	18	23	325,155	4443,7828	OD	NP
D76	7	15	20	235,619	2748,8936	OD	NP
D76	9	17	26	347,146	4975,7592	OD	NP
D76	11	17	27	360,498	5287,3004	OD	NP
D76	13	18	20	282,743	3581,4156	OD	NP
D76	15	20	22	345,575	4838,0527	OD	NP
D76	17	18	23	325,155	4443,7828	OD	NP
D76	19	17	22	293,739	3818,6059	OD	NP
D76	21	19	22	328,296	4486,7179	OD	NP
D76	0	19	22	328,296	4486,7179	OD	NP
D76	2	15	17	200,277	2136,2830	OD	NP
D76	4	10	16	125,664	1089,0855	OD	NP
D76	6	18	31	438,252	7158,1189	OD	NP
D76	8					OD	NP
D34	0					OD	NP
D34	2					OD	NP
D34	4	10	17	133,518	1201,6592	OD	NP
D34	6	11	17	146,869	1370,7816	OD	NP
D34	8	23	24	433,540	6792,1233	OD	NP
D34	10	18	21	296,881	3859,4466	OD	NP
D34	12	23	25	451,604	7225,6631	OD	NP
D34	14	19	30	447,677	7312,0569	OD	NP
D34	16	21	27	445,321	7125,1321	OD	NP
D34	18	22	28	483,805	8063,4211	OD	NP
D34	20	20	37	581,195	11042,698	OD	NP
D34	22	13	31	316,515	4642,2267	OD	NP
D34	1	18	19	268,606	3312,8095	OD	NP
D73	0					OD?	NP
D73	2					OD	NP
D73	4	15	20	235,619	2748,8936	OD	NP
D73	6	15	19	223,838	2536,8361	OD	NP
D73	8	17	19	253,684	3044,2033	OD	NP
D73	10	20	30	471,239	7853,9816	OD	NP
D73	12	17	25	333,794	4673,1191	OD	NP
D73	14	30	16	376,991	5780,5305	OD	NP
D73	16	15	26	306,305	4186,1722	OD	NP
D73	18	12	29	273,319	3735,3537	OD	NP
D73	20	15	32	376,991	5906,1942	OD	NP
D73	22	16	26	326,726	4574,1589	OD	NP
D73	0	14	23	252,898	3119,0779	OD	NP

D73	2	14	27	296,881	4057,3669	OD	NP
D73	4	15	24	282,743	3675,6634	OD	NP
D73	6	10	19	149,226	1442,5146	OD	NP
D73	8	16	19	238,761	2785,5455	OD	NP
D73	10	14	15	164,934	1594,3583	OD	NP
D73	12	10	18	141,372	1319,4689	OD	NP
D73	14	20	21	329,867	4508,1855	OD	NP
D73	16	14	16	175,929	1759,2919	OD	NP
D73	18	12	17	160,221	1548,8052	OD	NP
D73	20	16	18	226,195	2563,5396	OD	NP
D73	22	17	18	240,332	2803,8714	OD	NP
D57	0					OI?	NP
D57	2	8	12	75,3982	502,65482	OI	NP
D57	4	19	23	343,219	4805,0660	OI	NP
D57	6	12	33	311,018	4665,2651	OI	NP
D57	8	23	30	541,925	9574,0036	OI	NP
D57	10	25	36	706,858	14372,786	OI	NP
D57	12	22	42	725,708	15481,769	OI	NP
D57	14	21	48	791,681	18208,671	OI	NP
D57	16	18	32	452,389	7539,8224	OI	NP
D57	18	25	33	647,953	12527,101	OI	NP
D57	20	19	31	462,600	7709,9920	OI	NP
D57	0	17	19	253,684	3044,2033	OI	NP
D57	2	16	30	376,991	5780,5305	OI	NP
D57	4	16	26	326,726	4574,1589	OI	NP
D57	6	20	24	376,991	5529,2031	OI	NP
D57	8	15	23	270,962	3432,1900	OI	NP
D57	10	17	20	267,035	3293,4363	OI	NP
D57	12	14	19	208,916	2298,0750	OI	NP
D57	14	15	17	200,277	2136,2830	OI	NP
D57	17	20	26	408,407	6262,2414	OD	NP
D57	19	23	28	505,796	8598,5391	OD	NP
D57	21	22	25	431,969	6767,5142	OD	NP
D57	23	17	27	360,498	5287,3004	OD	NP
D92	1					OD?	NP
D92	3	15	23	270,962	3432,1900	OI	NP
D92	5	14	18	197,920	2111,1503	OI	NP
D92	7	15	28	329,867	4728,0969	OI	NP
D92	9	14	26	285,885	3811,7991	OI	NP
D92	11	23	36	650,310	12789,424	OI	NP
D92	13	17	26	347,146	4975,7592	OI	NP
D92	15	15	25	294,524	3926,9908	OI	NP
D92	17	18	24	339,292	4750,0881	OI	NP
D92	19	14	19	208,916	2298,0750	OI	NP
D92	21	15	17	200,277	2136,2830	OI	NP
D92	1	8	12	75,3982	502,65482	OI	NP
D92	3	13	16	163,363	1579,1739	OI	NP
D92	5	13	19	193,993	2069,2624	OI	NP
D92	7	17	19	253,684	3044,2033	OI	NP
D92	9	14	29	318,872	4570,4937	OI	NP
D77	0	16	26	326,726	4574,1589	OD	NP

Anexo**Continuación tabla n° 66**

D77	2	15	20	235,619	2748,8936	OD	NP
D77	4	14	20	219,911	2492,3302	OD	NP
D77	6	12	17	160,221	1548,8052	OD	NP
D77	8	15	16	188,496	1947,7874	OD	NP
D77	10	11	16	138,230	1244,0707	OD	NP
D77	12					OD	NP
T339	1					OD	NP
T339	3					OD	NP
T339	5	10	18	141,372	1319,4689	OD	NP
T339	7	20	22	345,575	4838,0527	OD	NP
T339	9	13	22	224,624	2620,6119	OD	NP
T339	11	13	30	306,305	4390,3757	OD	NP
T339	13	19	24	358,142	5133,3624	OD	NP
T339	15	17	29	387,201	5937,0865	OD	NP
T339	17	17	18	240,332	2803,8714	OD	NP
T339	0	18	21	296,881	3859,4466	OD	NP
T339	2	12	17	160,221	1548,8052	OD	NP
T339	4	19	23	343,219	4805,0660	OD	NP
T339	6	16	20	251,327	3015,9289	OD	NP
T339	8	17	27	360,498	5287,3004	OD	NP
T339	10	18	31	438,252	7158,1189	OD	NP
T339	12	17	27	360,498	5287,3004	OD	NP
T339	14	13	22	224,624	2620,6119	OD	NP
T339	16						NP
T349	0					OI	NP
T349	3	10	21	164,934	1704,3140	OI	NP
T349	5	14	20	219,911	2492,3302	OI	NP
T349	7	26	23	469,668	7671,2457	OI	NP
T349	9	21	26	428,827	6718,2959	OI	NP
T349	11	21	31	511,294	8862,4329	OI	NP
T349	13	20	31	486,947	8278,0966	OI	NP
T349	15	24	26	490,088	8168,1409	OI	NP
T349	17	19	25	373,064	5471,6072	OI	NP
T349	19	15	24	282,743	3675,6634	OI	NP
T349	21	15	17	200,277	2136,2830	OI	NP
T390	2						NP
T390	4	8	15	94,2478	722,56631	OD	NP
T390	6	17	19	253,684	3044,2033	OD	NP
T390	8	20	30	471,239	7853,9816	OD	NP
T390	10	17	28	373,850	5607,7429	OD	NP
T390	12	23	30	541,925	9574,0036	OD	NP
T390	14	22	35	604,757	11490,375	OD	NP
T390	16	20	31	486,947	8278,0966	OD	NP
T390	18	19	24	358,142	5133,3624	OD	NP
T390	20	16	28	351,858	5160,5895	OD	NP
T390	22	15	28	329,867	4728,0969	OD	NP
T396	4	10	16	125,664	1089,0855	OD	NP
T396	6	15	16	188,496	1947,7874	OD	NP
T396	8	13	15	153,153	1429,4247	OD	NP
T396	12	19	36	537,212	9848,8930	OD	NP
T396	14	12	23	216,770	2528,9821	OD	NP
T396	16	16	20	251,327	3015,9289	OD	NP

T396	18	15	26	306,305	4186,1722	OD	NP
T396	20	16	20	251,327	3015,9289	OD	NP
T396	22	15	20	235,619	2748,8936	OD	NP
T340	0					OI	NP
T340	2	15	17	200,277	2136,2830	OI	NP
T340	4	23	31	559,989	10079,800	OI	NP
T340	6	23	28	505,796	8598,5391	OI	NP
T340	8	22	35	604,757	11490,375	OI	NP
T340	10	28	29	637,743	12117,123	OI	NP
T340	12	24	29	546,637	9657,2558	OI	NP
T340	14	22	35	604,757	11490,375	OI	NP
T340	16	22	27	466,527	7619,9330	OI	NP
T340	18	20	30	471,239	7853,9816	OI	NP
T340	20	15	17	200,277	2136,2830	OI	NP
T340	22	12	15	141,372	1272,3450	OI	NP
T340	0	12	15	141,372	1272,3450	OI	NP
T340	4	9	13	91,8916	673,87162	OI	NP
T340	6	16	21	263,894	3254,6900	OI	NP
T340	8	15	25	294,524	3926,9908	OI	NP
T340	10	16	38	477,522	8595,3975	OI	NP
T340	14	9	17	120,166	1041,4380	OI	NP
T340	17	12	13	122,522	1021,0176	OI	NP
T363	0	10	17	133,518	1201,6592	OI	NP
T363	4	8	10	62,8319	376,99112	OI	NP
T363	6	20	23	361,283	5178,3919	OI	NP
T363	8	16	26	326,726	4574,1589	OI	NP
T363	10	19	29	432,754	6924,0702	OI	NP
T363	12	19	29	432,754	6924,0702	OI	NP
T363	14	18	27	381,704	5725,5526	OI	NP
T363	16	13	29	296,095	4145,3315	OI	NP
T363	18	15	17	200,277	2136,2830	OI	NP
T363	0					OD	NP
T363	4	12	15	141,372	1272,3450	OD	NP
T363	6	12	17	160,221	1548,8052	OD	NP
T363	8	19	26	387,987	5819,8004	OD	NP
T363	11	17	28	373,850	5607,7429	OD	NP
T363	13	18	30	424,115	6785,8401	OD	NP
T363	15	19	27	402,909	6177,9420	OD	NP
T363	17	21	32	527,788	9324,2470	OD	NP
T363	0	8	10	62,8319	376,99112	OI	NP
T363	4	13	16	163,363	1579,1739	OI	NP
T363	6	15	25	294,524	3926,9908	OI	NP
T363	8	22	26	449,248	7187,9640	OI	NP
T363	10	30	36	848,23	18661,060	OI	NP
T363	12	23	29	523,861	9080,2500	OI	NP
T363	14	25	31	608,684	11362,093	OI	NP
T363	18	19	24	358,142	5133,3624	OI	NP
T363	20	14	21	230,907	2693,9157	OI	NP
T363	22	12	18	169,646	1696,4600	OI	NP
T393	0					OD	NP
T393	2	8	12	75,3982	502,65482	OD	NP

Anexo**Continuación tabla n° 66**

T393	4	12	16	150,796	1407,4335	OD	NP
T393	6	13	15	153,153	1429,4247	OD	NP
T393	8	16	22	276,460	3501,8286	OD	NP
T393	10	17	18	240,332	2803,8714	OD	NP
T393	12	16	24	301,593	4021,2386	OD	NP
T393	14	12	28	263,894	3518,5838	OD	NP
T393	16	15	16	188,496	1947,7874	OD	NP
T393	18	12	15	141,372	1272,3450	OD	NP
T393	20	9	18	127,235	1145,1105	OD	NP
T393	22	14	20	219,911	2492,3302	OD	NP
T393	0	14	20	219,911	2492,3302	OD	NP
T393	4	15	19	223,838	2536,8361	OD	NP
T393	6	15	26	306,305	4186,1722	OD	NP
T393	8	15	32	376,991	5906,1942	OD	NP
T393	11	23	30	541,925	9574,0036	OD	NP
T393	13	15	27	318,086	4453,2076	OD	NP
T393	15	9	11	77,7544	518,36279	OD	NP
							NP
T383	0	11	19	164,148	1641,4822	OI	NP
T383	6	11	19	164,148	1641,4822	OI	NP
T383	8	12	15	141,372	1272,3450	OI	NP
T383	11	9	16	113,097	942,47780	OI	NP
T383	13	12	19	179,071	1850,3981	OI	NP
T383	15	13	14	142,942	1286,4822	OI	NP
T383	17	10	13	102,102	782,78017	OI	NP
T382	3						NP
T382	17	15	22	259,181	3196,5705	OD	NP
T382	19	17	24	320,442	4379,3802	OD	NP
T382	21	12	22	207,345	2349,9113	OD	NP
T382	0	12	22	207,345	2349,9113	OD	NP
T382	4	12	16	150,796	1407,4335	OD	NP
T382	6	15	18	212,058	2332,6325	OD	NP
T382	8	15	17	200,277	2136,2830	OD	NP
T382	10	12	23	216,770	2528,9821	OD	NP
T382	12	15	22	259,181	3196,5705	OD	NP
T382	14	15	21	247,400	2968,8051	OD	NP
T382	16	16	22	276,460	3501,8286	OD	NP
T382	18	15	23	270,962	3432,1900	OD	NP
T382	20	15	24	282,743	3675,6634	OD	NP
T382	22	14	13	142,942	1286,4822	OD	NP
D90	1					OD	NP
D90	3	9	23	162,577	1734,1591	OD	NP
D90	5	13	22	224,624	2620,6119	OD	NP
D90	7	17	20	267,035	3293,4363	OD	NP
D90	9	16	25	314,159	4293,5100	OD	NP
D90	11	17	29	387,201	5937,0865	OD	NP
D90	13	15	28	329,867	4728,0969	OD	NP
D90	15	17	32	427,257	6978,5245	OD	NP
D90	17	13	31	316,515	4642,2267	OD	NP
D90	19	18	28	395,841	6069,5570	OD	NP
D90	21	18	24	339,292	4750,0881	OD	NP
D74	1					OI	NP

D74	3	8	19	119,381	1074,4247	OI	NP
D74	5	12	16	150,796	1407,4335	OI	NP
D74	7	12	26	245,044	3103,8935	OI	NP
D74	9	13	24	245,044	3022,2121	OI	NP
D74	11	19	30	447,677	7312,0569	OI	NP
D74	13	14	25	274,889	3573,5616	OI	NP
D74	15	16	34	427,257	7120,9433	OI	NP
D74	17	16	25	314,159	4293,5100	OI	NP
D74	19	12	19	179,071	1850,3981	OI	NP
D74	21	16	18	226,195	2563,5396	OI	NP
D74	0	16	18	226,195	2563,5396	OI	NP
D74	5	12	19	179,071	1850,3981	OI	NP
D74	7	14	23	252,898	3119,0779	OI	NP
D74	9	15	35	412,334	6872,2339	OI	NP
D74	11	17	28	373,85	5607,7429	OI	NP
T400	0	16	18	226,195	2563,5396	OI	NP
T400	2	17	19	253,684	3044,2033	OI	NP
T400	4	15	17	200,277	2136,2830	OI	NP
T400	6	11	19	164,148	1641,4822	OI	NP
T400	10	20	22	345,575	4838,0527	OI	NP
T400	12	19	21	313,374	4178,3182	OI	NP
T400	14	18	19	268,606	3312,8095	OI	NP
T400	18	15	25	294,524	3926,9908	OI	NP
T400	20	13	17	173,573	1735,7299	OI	NP
T400	22	17	23	307,091	4094,5424	OI	NP
T384	5	15	21	247,400	2968,8051	OI	NP
T384	7	14	29	318,872	4570,4937	OI	NP
T384	9	25	32	628,319	11938,052	OI	NP
T384	11	18	32	452,389	7539,8224	OI	NP
T384	13	21	27	445,321	7125,1321	OI	NP
T384	15	20	30	471,239	7853,9816	OI	NP
T384	17	17	29	387,201	5937,0865	OI	NP
T384	19	20	25	392,699	5890,4862	OI	NP
T384	21	20	21	329,867	4508,1855	OI	NP
T384	0	13	16	163,363	1579,1739	OI	NP
T384	2	15	16	188,496	1947,7874	OI	NP
T384	4	12	16	150,796	1407,4335	OI	NP
T384	6	11	12	103,673	794,82294	OI	NP
T384	10	12	16	150,796	1407,4335	OI	NP
T384	12	14	15	164,934	1594,3583	OI	NP
T384	14	25	33	647,953	12527,101	OI	NP
T384	18	23	41	740,630	15800,117	OI	NP
T384	20	21	35	577,268	10775,663	OI	NP
T384	22	17	30	400,553	6275,3313	OI	NP
T363	1	17	29	387,201	5937,0865	OI	NP
T363	3	14	23	252,898	3119,0779	OI	NP
T363	5	16	30	376,991	5780,5305	OI	NP
T363	7	16	27	339,292	4863,1854	OI	NP
T363	11	20	23	361,283	5178,3919	OI	NP
T363	13	18	27	381,704	5725,5526	OI	NP
T363	15	8	16	100,531	804,24772	OI	NP

Anexo**Continuación tabla n° 66**

T384	0	14	18	197,920	2111,1503	OI	NP
T384	2	20	26	408,407	6262,2414	OI	NP
T384	4	17	29	387,201	5937,0865	OI	NP
T384	6	25	27	530,144	9189,1585	OI	NP
T384	8	20	26	408,407	6262,2414	OI	NP
T384	10	20	26	408,407	6262,2414	OI	NP
T384	12	23	27	487,732	8128,8710	OI	NP
T384	14	17	23	307,091	4094,5424	OI	NP
T384	16	14	17	186,925	1931,5559	OI	NP
T384	18	12	16	150,796	1407,4335	OI	NP
T384	20	14	15	164,934	1594,3583	OI	NP
T384	22	10	11	86,3938	604,75659	OI	NP
T363	1	8	15	94,2478	722,56631	OI	NP
T363	3	11	13	112,312	898,49550	OI	NP
T363	5	18	19	268,606	3312,8095	OI	NP
T363	7	22	23	397,411	5961,1721	OI	NP
T363	9	18	30	424,115	6785,8401	OI	NP
T363	11	20	26	408,407	6262,2414	OI	NP
T363	13	14	25	274,889	3573,5616	OI	NP
T363	15	20	25	392,699	5890,4862	OI	NP
T363	17	20	26	408,407	6262,2414	OI	NP
T363	19	18	25	353,429	5065,8182	OI	NP
T363	21	13	22	224,624	2620,6119	OI	NP
T402	3	10	15	117,810	981,74770	OI	NP
T402	5	13	16	163,363	1579,1739	OI	NP
T402	7	13	21	214,414	2430,0219	OI	NP
T402	9	18	22	311,018	4146,9023	OI	NP
T402	11	18	28	395,841	6069,5570	OI	NP
T402	13	10	11	86,3938	604,75659	OI	NP
T402	15	15	24	282,743	3675,6634	OI	NP
T402	17	22	24	414,690	6358,5835	OI	NP
T402	19	18	24	339,292	4750,0881	OI	NP
T402	21	14	21	230,907	2693,9157	OI	NP
T399	0	7	10	54,9779	311,54127	OI	NP
T399	2	10	12	94,2478	691,15038	OI	NP
T399	4	14	20	219,911	2492,3302	OI	NP
T399	6	15	20	235,619	2748,8936	OI	NP
T399	8	15	24	282,743	3675,6634	OI	NP
T399	10	19	31	462,600	7709,9920	OI	NP
T399	12	21	27	445,321	7125,1321	OI	NP
T399	14	21	23	379,347	5563,7606	OI	NP
T399	16	21	24	395,841	5937,6101	OI	NP
T399	18	21	24	395,841	5937,6101	OI	NP
T399	20	20	23	361,283	5178,3919	OI	NP
T399	22	15	21	247,400	2968,8051	OI	NP
D84	0	10	12			OI	NP
D84	2	10	12	94,2478	691,15038	OI	NP
D84	4	7	14	76,969	538,78314	OI	NP
D84	6	13	14	142,942	1286,4822	OI	NP
D84	8	15	25	294,524	3926,9908	OI	NP
D84	10	15	25	294,524	3926,9908	OI	NP
D84	12	18	23	325,155	4443,7828	OI	NP

D84	14	19	27	402,909	6177,9420	OI	NP
D84	16	19	25	373,064	5471,6072	OI	NP
D84	18	14	16	175,929	1759,2919	OI	NP
D84	20	7	9	49,4801	263,89378	OI	NP
D74	0	12	18	169,646	1696,4600	OI	NP
D74	2	10	13	102,102	782,78017	OI	NP
D74	4	14	18	197,920	2111,1503	OI	NP
D74	6	21	22	362,854	5200,9066	OI	NP
D74	8	21	26	428,827	6718,2959	OI	NP
D74	10	25	26	510,509	8678,6497	OI	NP
D74	12	23	27	487,732	8128,8710	OI	NP
D74	14	27	27	572,555	10305,995	OI	NP
D74	16	25	27	530,144	9189,1585	OI	NP
D74	18	23	26	469,668	7671,2457	OI	NP
D74	20	14	18	197,920	2111,1503	OI	NP
D74	22	12	16	150,796	1407,4335	OI	NP
D74	4	18	23	325,155	4443,7828	OD	NP
D74	6	22	29	501,084	8518,4285	OD	NP
D74	8	23	33	596,117	11127,521	OD	NP
D74	10	25	30	589,049	10799,225	OD	NP
D74	12	23	27	487,732	8128,8710	OD	NP
T358	0	10	13	102,102	782,78017	OD	NP
T358	2	9	17	120,166	1041,4380	OD	NP
T358	4	9	19	134,303	1253,4955	OD	NP
T358	6	19	25	373,064	5471,6072	OD	NP
T358	8	19	26	387,987	5819,8004	OD	NP
T358	10	16	28	351,858	5160,5895	OD	NP
T358	12	19	31	462,600	7709,9920	OD	NP
T358	14	21	26	428,827	6718,2959	OD	NP
T358	16	17	19	253,684	3044,2033	OD	NP
T358	18	12	14	131,947	1143,5397	OD	NP
D29	0					OD	NP
D29	2	10	12	94,2478	691,15038	OD	NP
D29	4	12	19	179,071	1850,3981	OD	NP
D29	6	17	18	240,332	2803,8714	OD	NP
D29	8	16	26	326,726	4574,1589	OD	NP
D29	10	21	24	395,841	5937,6101	OD	NP
D29	12	20	25	392,699	5890,4862	OD	NP
D29	14	18	27	381,704	5725,5526	OD	NP
D29	16	18	28	395,841	6069,5570	OD	NP
D29	18	17	28	373,85	5607,7429	OD	NP
D29	20	18	30	424,115	6785,8401	OD	NP
D29	22	19	24	358,142	5133,3624	OD	NP
T352	0					OD	NP
T352	2	12	15	141,372	1272,3450	OD	NP
T352	4	13	22	224,624	2620,6119	OD	NP
T352	6	17	31	413,905	6622,4773	OD	NP
T352	8	23	33	596,117	11127,521	OD	NP
T352	10	18	29	409,978	6422,9862	OD	NP
T352	12	24	26	490,088	8168,1409	OD	NP
T352	14	21	30	494,801	8411,6143	OD	NP
T352	16	18	33	466,527	7930,9507	OD	NP

Anexo**Continuación tabla n° 66**

T352	18	21	29	478,307	7971,7914	OD	NP
T352	20	17	24	320,442	4379,3802	OD	NP
T29	1	8	10	62,8319	376,99112	OI	NP
T29	3	4	9	28,2743	122,52211	OI	NP
T29	5	15	20	235,619	2748,8936	OI	NP
T29	7	23	26	469,668	7671,2457	OI	NP
T29	9	21	22	362,854	5200,9066	OI	NP
T29	11	22	28	483,805	8063,4211	OI	NP
T29	13	22	26	449,248	7187,9640	OI	NP
T29	15	23	28	505,796	8598,5391	OI	NP
T29	17	24	28	527,788	9148,3178	OI	NP
T29	19	18	23	325,155	4443,7828	OI	NP
T29	21	11	13	112,312	898,49550	OI	NP
T399	0	9	13	91,8916	673,87162	OD	NP
T399	2	6	14	65,9734	439,82297	OD	NP
T399	4	10	19	149,226	1442,5146	OD	NP
T399	6	15	23	270,962	3432,1900	OD	NP
T399	8	18	25	353,429	5065,8182	OD	NP
T399	10	17	29	387,201	5937,0865	OD	NP
T399	12	17	26	347,146	4975,7592	OD	NP
T399	14	15	30	353,429	5301,4376	OD	NP
T399	16	17	29	387,201	5937,0865	OD	NP
T399	18	20	26	408,407	6262,2414	OD	NP
T399	20	17	29	387,201	5937,0865	OD	NP
T402	1	11	12	103,673	794,82294	OD	NP
T402	3	11	20	172,788	1785,4718	OD	NP
T402	5	13	21	214,414	2430,0219	OD	NP
T402	7	15	23	270,962	3432,1900	OD	NP
T402	9	13	23	234,834	2818,0086	OD	NP
T402	11	18	29	409,978	6422,9862	OD	NP
T402	13	19	28	417,832	6546,0319	OD	NP
T402	15	17	30	400,553	6275,3313	OD	NP
T402	17	14	31	340,863	5112,9420	OD	NP
T402	19	18	25	353,429	5065,8182	OD	NP
T402	21	16	25	314,159	4293,5100	OD	NP
D97	1	7	10	54,9779	311,54127	OI	NP
D97	3	8	14	87,9646	645,07369	OI	NP
D97	5	14	16	175,929	1759,2919	OI	NP
D97	7	14	16	175,929	1759,2919	OI	NP
D97	9	18	22	311,018	4146,9023	OI	NP
D97	11	20	25	392,699	5890,4862	OI	NP
D97	13	18	20	282,743	3581,4156	OI	NP
D97	15	13	23	234,834	2818,0086	OI	NP
D97	17	13	21	214,414	2430,0219	OI	NP
D97	19	9	18	127,235	1145,1105	OI	NP
D97	21	9	11	77,7544	518,36279	OI	NP
D77	2					OI	P
D77	5					OI	P
D77	6					OI	P
D77	9	16	20	251,327	3015,9289	OI	P
D77	11	17	26	347,146	4975,7592	OI	P
D77	13	19	29	432,754	6924,0702	OI	P

D77	15	21	24	395,841	5937,6101	OI	P
D77	17	21	33	544,281	9797,0567	OI	P
D77	19	20	32	502,655	8712,6836	OI	P
D77	21	20	32	502,655	8712,6836	OI	P
D77	23	22	29	501,084	8518,4285	OI	P
D77	25	25	28	549,779	9712,7573	OI	P
D77	27	20	33	518,363	9157,7426	OI	P
D77	29	19	28	417,832	6546,0319	OI	P
D77	31	22	33	570,199	10453,650	OI	P
D83	0					OD	P
D83	3					OD	P
D83	5	22	27	466,527	7619,9330	OD	P
D83	7	18	28	395,841	6069,5570	OD	P
D83	9	19	26	387,987	5819,8004	OD	P
D83	11	14	29	318,872	4570,4937	OD	P
D83	13	22	34	587,478	10966,253	OD	P
D83	15	15	26	306,305	4186,1722	OD	P
D83	17	17	27	360,498	5287,3004	OD	P
D83	19	17	27	360,498	5287,3004	OD	P
D83	21	17	27	360,498	5287,3004	OD	P
D83	23	18	27	381,704	5725,5526	OD	P
D83	25	14	34	373,850	5981,5924	OD	P
D83	27	19	22	328,296	4486,7179	OD	P
D83	29					OD	P
D73	9	17	33	440,608	7343,4728	OI	P
D73	11	18	34	480,664	8331,5037	OI	P
D73	13	24	31	584,336	10712,831	OI	P
D73	15	23	24	433,540	6792,1233	OI	P
D73	17	18	27	381,704	5725,5526	OI	P
D73	19	20	22	345,575	4838,0527	OI	P
D73	21	17	28	373,850	5607,7429	OI	P
D73	23	23	25	451,604	7225,6631	OI	P
D73	25	20	33	518,363	9157,7426	OI	P
D73	27	23	26	469,668	7671,2457	OI	P
D73	29	18	35	494,801	8741,4816	OI	P
D73	31	19	36	537,212	9848,8930	OI	P
D79	0					OI?	P
D79	2	17	20	267,035	3293,4363	OI	P
D79	4	14	21	230,907	2693,9157	OI	P
D79	6	11	20	172,788	1785,4718	OI	P
D79	8	11	20	172,788	1785,4718	OI	P
D79	6	12	24	226,195	2714,3361	OD	P
D79	8	15	20	235,619	2748,8936	OD	P
D79	10	18	27	381,704	5725,5526	OD	P
D79	12	20	34	534,071	9613,2735	OD	P
D79	14	22	29	501,084	8518,4285	OD	P
D79	16	18	33	466,527	7930,9507	OD	P
D79	18	13	46	469,668	9236,8060	OD	P
D79	20	15	28	329,867	4728,0969	OD	P
D79	22	15	26	306,305	4186,1722	OD	P
D79	24	13	28	285,885	3907,0941	OD	P
D79	26	17	29	387,201	5937,0865	OD	P

Anexo**Continuación tabla n° 66**

D79	28	17	38	507,367	9301,7322	OD	P
D79	30	16	35	439,823	7476,9905	OD	P
D68	0					OI?	P
D68	2	15	16	188,496	1947,7874	OI	P
D68	4	12	19	179,071	1850,3981	OI	P
D68	6	19	22	328,296	4486,7179	OI	P
D68	8	26	27	551,350	9740,5080	OI	P
D68	10	18	25	353,429	5065,8182	OI	P
D68	12	18	25	353,429	5065,8182	OI	P
D68	14	18	32	452,389	7539,8224	OI	P
D68	14	12	14	131,947	1143,5397	OI	P
D68	16	21	46	758,695	16944,180	OI	P
D68	18	19	24	358,142	5133,3624	OI	P
D68	18	22	22	380,133	5575,2798	OI	P
D68	20	19	25	373,064	5471,6072	OI	P
D68	20	17	21	280,387	3551,5705	OI	P
D68	22	12	26	245,044	3103,8935	OI	P
D68	22	18	24	339,292	4750,0881	OI	P
D68	24	17	34	453,960	7717,3224	OI	P
D68	26	22	25	431,969	6767,5142	OI	P
D68	26	18	21	296,881	3859,4466	OI	P
D68	28	22	24	414,690	6358,5835	OI	P
D68	28	23	24	433,540	6792,1233	OI	P
D68	30	17	22	293,739	3818,6059	OI	P
D68	30	17	24	320,442	4379,3802	OI	P
D58	2	11	14	120,951	1007,9276	OI	P
D58	2	9	16	113,097	942,47780	OD	P
D58	4	15	16	188,496	1947,7874	OI	P
D58	4	12	18	169,646	1696,4600	OD	P
D58	6	11	31	267,821	3749,4908	OD	P
D58	8	18	28	395,841	6069,5570	OD	P
D58	10	17	33	440,608	7343,4728	OD	P
D58	12	18	30	424,115	6785,8401	OD	P
D58	14	22	28	483,805	8063,4211	OD	P
D58	16	21	24	395,841	5937,6101	OD	P
D58	18	18	27	381,704	5725,5526	OD	P
D58	20	18	26	367,566	5390,9730	OD	P
D58	22	14	25	274,889	3573,5616	OD	P
D58	24	18	30	424,115	6785,8401	OD	P
D58	26	18	28	395,841	6069,5570	OD	P
D58	28	18	22	311,018	4146,9023	OD	P
D58	30	17	23	307,091	4094,5424	OD	P
D92	12	20	28	439,823	7037,1675	OD	P
D92	14	21	30	494,801	8411,6143	OD	P
D92	16	20	24	376,991	5529,2031	OD	P
D92	18	19	31	462,600	7709,9920	OD	P
D92	20	15	17	200,277	2136,2830	OD	P
D92	22	22	26	449,248	7187,9640	OD	P
D92	24	19	22	328,296	4486,7179	OD	P
D92	26	15	29	341,648	5010,8403	OD	P
D92	28	22	27	466,527	7619,9330	OD	P
D92	30	16	32	402,124	6433,9818	OD	P

D77	0	16	26	326,726	4574,1589	OD	P
D77	2	15	20	235,619	2748,8936	OD	P
D77	4	14	17	186,925	1931,5559	OI	P
D77	6	14	17	186,925	1931,5559	OI	P
D77	8	22	28	483,805	8063,4211	OI	P
D77	10	21	23	379,347	5563,7606	OI	P
D77	12	20	27	424,115	6644,4685	OI	P
D77	15	20	34	534,071	9613,2735	OI	P
D77	17	25	29	569,414	10249,446	OI	P
D77	19	18	30	424,115	6785,8401	OI	P
D77	21	18	30	424,115	6785,8401	OI	P
D77	23	25	28	549,779	9712,7573	OI	P
D601	1					OI?	P
D601	3	8	13	81,6814	571,76986	OI	P
D601	5	16	23	289,027	3757,3448	OI	P
D601	7	20	33	518,363	9157,7426	OI	P
D601	9	31	33	803,462	17140,53	OI	P
D601	11	24	32	603,186	11259,468	OI	P
D601	13	23	30	541,925	9574,0036	OI	P
D601	15	23	34	614,181	11669,446	OI	P
D601	18	20	36	565,487	10555,751	OI	P
D601	20	23	33	596,117	11127,521	OI	P
D601	22	20	30	471,239	7853,9816	OI	P
D601	24	20	23	361,283	5178,3919	OI	P
D601	26	19	31	462,600	7709,992	OI	P
D91	0					OD	P
D91	2	9	12	84,823	593,76101	OD	P
D91	4	16	17	213,628	2349,9113	OD	P
D91	6	20	24	376,991	5529,2031	OD	P
D91	8	24	31	584,336	10712,831	OD	P
D91	10	20	27	424,115	6644,4685	OD	P
D91	12	21	31	511,294	8862,4329	OD	P
D91	14	19	28	417,832	6546,0319	OD	P
D91	16	17	28	373,85	5607,7429	OD	P
D91	18	17	30	400,553	6275,3313	OD	P
D91	20	19	32	477,522	8117,8754	OD	P
D91	22	22	26	449,248	7187,9640	OD	P
D91	24	18	29	409,978	6422,9862	OD	P
D91	26	17	27	360,498	5287,3004	OD	P
D91	28	19	26	387,987	5819,8004	OD	P
D91	32	17	27	360,498	5287,3004	OD	P
T392	0					OD	P
T392	3					OD	P
T392	5	14	16	175,929	1759,2919	OD	P
T392	7	13	26	265,465	3451,0395	OD	P
T392	9	17	26	347,146	4975,7592	OD	P
T392	11	21	24	395,841	5937,6101	OD	P
T392	13	20	27	424,115	6644,4685	OD	P
T392	15	15	28	329,867	4728,0969	OD	P
T392	17	20	29	455,531	7440,3386	OD	P
T392	19	20	26	408,407	6262,2414	OD	P
T392	21	18	30	424,115	6785,8401	OD	P

Anexo**Continuación tabla n° 66**

T392	23	20	25	392,699	5890,4862	OD	P
T392	25	22	37	639,314	12573,177	OD	P
T392	27	23	30	541,925	9574,0036	OD	P
T392	29					OD	P
T359	0					OD	P
T359	3	13	16	163,363	1579,1739	OD	P
T359	5	19	20	298,451	3879,8669	OD	P
T359	7	19	20	298,451	3879,8669	OD	P
T359	9	18	33	466,527	7930,9507	OD	P
T359	11	15	34	400,553	6542,3667	OD	P
T359	13	20	22	345,575	4838,0527	OD	P
T359	15	18	35	494,801	8741,4816	OD	P
T359	17	17	27	360,498	5287,3004	OD	P
T359	19	16	22	276,460	3501,8286	OD	P
T359	21	18	34	480,664	8331,5037	OD	P
T359	23	19	35	522,290	9401,2160	OD	P
T359	25	13	36	367,566	6003,5836	OD	P
T359	27	14	29	318,872	4570,4937	OD	P
T359	29					OD	P
T336	0					OI	P
T336	2					OI	P
T336	5	14	20	219,911	2492,3302	OD	P
T336	7	17	25	333,794	4673,1191	OI	P
T336	9	22	32	552,920	9952,5655	OI	P
T336	11	17	34	453,960	7717,3224	OI	P
T336	13	22	31	535,642	9463,0007	OI	P
T336	15	18	27	381,704	5725,5526	OI	P
T336	17	15	29	341,648	5010,8403	OI	P
T336	19	15	28	329,867	4728,0969	OI	P
T336	21					OI	P
T329	3					OI	P
T329	5	12	17	160,221	1548,8052	OI	P
T329	7	28	30	659,734	12754,866	OI	P
T329	9	27	33	699,790	13995,795	OI	P
T329	11	19	31	462,600	7709,9920	OI	P
T329	13	27	39	827,024	18194,534	OI	P
T329	15	22	26	449,248	7187,9640	OI	P
T329	17	20	28	439,823	7037,1675	OI	P
T329	19					OI	P
T329	15	10	12	94,2478	691,15038	OI	P
T329	15	9	13	91,8916	673,87162	OD	P
T329	17	10	12	94,2478	691,15038	OI	P
T329	17	10	16	125,664	1089,0855	OD	P
T390	0	9	13	91,8916	673,87162	OD	P
T390	2	10	16	125,664	1089,0855	OD	P
T390	4						P
T390	18	13	17	173,573	1735,7299	OD	P
T390	22	8	13	81,6814	571,76986	OD	P
T390	24	13	16	163,363	1579,1739	OD	P
T390	28	17	19	253,684	3044,2033	OD	P
T390	30	15	25	294,524	3926,9908	OD	P
T396	2						P

T396	6	15	20	235,619	2748,8936	OI	P
T396	8	15	24	282,743	3675,6634	OI	P
T396	10	16	28	351,858	5160,5895	OI	P
T396	12	15	19	223,838	2536,8361	OI	P
T396	14	20	32	502,655	8712,6836	OI	P
T396	16	19	31	462,600	7709,9920	OI	P
T396	18	16	26	326,726	4574,1589	OI	P
T396	20	17	20	267,035	3293,4363	OI	P
T396	22	15	10	117,810	981,74770	OI	P
T396	24	16	25	314,159	4293,5100	OI	P
T396	26	16	22	276,460	3501,8286	OI	P
T396	28	11	23	198,706	2251,9983	OI	P
T396	30	12	18	169,646	1696,4600	OI	P
T340	0	9	10	70,6858	447,67695	OI	P
T340	2	15	16	188,496	1947,7874	OI	P
T340	4	11	16	138,230	1244,0707	OI	P
T340	6	16	19	238,761	2785,5455	OI	P
T340	8	23	29	523,861	9080,2500	OI	P
T340	10	28	30	659,734	12754,866	OI	P
T340	12	22	26	449,248	7187,9640	OI	P
T340	14	22	27	466,527	7619,9330	OI	P
T340	16	26	34	694,292	13885,840	OI	P
T340	18	23	31	559,989	10079,800	OI	P
T340	20	24	26	490,088	8168,1409	OI	P
T340	22	20	27	424,115	6644,4685	OI	P
T340	24	26	32	653,451	12633,391	OI	P
T340	26	23	27	487,732	8128,8710	OI	P
T340	30	17	29	387,201	5937,0865	OI	P
T347	2	8	14	87,9646	645,07369	OD	P
T347	4	12	13	122,522	1021,0176	OD	P
T347	6	14	18	197,920	2111,1503	OD	P
T347	8	15	22	259,181	3196,5705	OD	P
T347	10	26	30	612,611	11435,397	OD	P
T347	12	15	32	376,991	5906,1942	OD	P
T347	14	12	28	263,894	3518,5838	OD	P
T347	16	16	28	351,858	5160,5895	OD	P
T347	18	18	28	395,841	6069,5570	OD	P
T347	20	20	27	424,115	6644,4685	OD	P
T347	22	18	28	395,841	6069,5570	OD	P
T347	24	20	27	424,115	6644,4685	OD	P
T347	26	18	26	367,566	5390,9730	OD	P
T347	28	21	25	412,334	6322,4552	OD	P
T347	30	22	25	431,969	6767,5142	OD	P
T364	10	19	24	358,142	5133,3624	OI	P
T364	12	25	31	608,684	11362,093	OI	P
T364	14	25	36	706,858	14372,786	OI	P
T364	16	17	34	453,960	7717,3224	OI	P
T364	18	18	37	523,075	9589,7116	OI	P
T364	20	17	34	453,960	7717,3224	OI	P
T364	22	16	29	364,425	5466,3712	OI	P
T364	24	18	27	381,704	5725,5526	OI	P
T364	26	18	25	353,429	5065,8182	OI	P

Anexo**Continuación tabla n° 66**

T364	28	17	24	320,442	4379,3802	OI	P
T364	30	18	23	325,155	4443,7828	OI	P
T326	2	8	15	94,2478	722,56631	OD	P
T326	4	15	19	223,838	2536,8361	OD	P
T326	6	12	20	188,496	2010,6193	OD	P
T326	8	19	30	447,677	7312,0569	OD	P
T326	10	20	31	486,947	8278,0966	OD	P
T326	12	15	30	353,429	5301,4376	OD	P
T326	14	18	31	438,252	7158,1189	OD	P
T326	16	17	30	400,553	6275,3313	OD	P
T326	18	21	25	412,334	6322,4552	OD	P
T326	20	19	26	387,987	5819,8004	OD	P
T326	22	20	27	424,115	6644,4685	OD	P
T326	24	20	29	455,531	7440,3386	OD	P
T326	26	19	32	477,522	8117,8754	OD	P
T326	28	22	27	466,527	7619,9330	OD	P
T326	30	20	30	471,239	7853,9816	OD	P
T393	0						P
T393	2	10	12	94,2478	691,15038	OI	P
T393	4						P
T393	18	18	27	381,704	5725,5526	OI	P
T393	20	18	27	381,704	5725,5526	OI	P
T393	22	18	28	395,841	6069,5570	OI	P
T393	24	23	24	433,540	6792,1233	OI	P
T393	26	16	28	351,858	5160,5895	OI	P
T393	28	17	23	307,091	4094,5424	OI	P
T393	30	18	28	395,841	6069,5570	OI	P
T400	1	10	12	94,2478	691,15038	OD	P
T400	5	15	21	247,400	2968,8051	OD	P
T400	9	15	18	212,058	2332,6325	OD	P
T400	11	17	22	293,739	3818,6059	OD	P
T400	13	15	23	270,962	3432,1900	OD	P
T400	17	12	22	207,345	2349,9113	OD	P
T400	19	11	16	138,230	1244,0707	OD	P
T400	21	14	20	219,911	2492,3302	OD	P
T400	23	17	18	240,332	2803,8714	OD	P
T400	25	14	22	241,903	2902,8316	OD	P
T400	29	14	18	197,920	2111,1503	OD	P
T400	31	20	23	361,283	5178,3919	OD	P
T357	0						P
T357	2	15	20	235,619	2748,8936	OI	P
T357	4	20	26	408,407	6262,2414	OI	P
T357	6	25	32	628,319	11938,052	OI	P
T357	8	25	31	608,684	11362,093	OI	P
T357	10	33	33	855,299	18816,569	OI	P
T357	14	19	29	432,754	6924,0702	OI	P
T357	16	20	29	455,531	7440,3386	OI	P
T357	18	27	30	636,173	12087,278	OI	P
T357	22	28	29	637,743	12117,123	OI	P
T357	24	19	26	387,987	5819,8004	OI	P
T357	26	21	27	445,321	7125,1321	OI	P
T357	28	23	26	469,668	7671,2457	OI	P

T357	30	20	25	392,699	5890,4862	OI	P
T382	0	8	11	69,1150	437,72858	OD	P
T382	4	12	15	141,372	1272,3450	OI	P
T382	6	13	19	193,993	2069,2624	OI	P
T382	8	13	19	193,993	2069,2624	OI	P
T382	12						P
T382	14	14	23	252,898	3119,0779	OI	P
T382	16	17	17	226,980	2572,4408	OI	P
T382	18	16	20	251,327	3015,9289	OI	P
T382	20	15	21	247,400	2968,8051	OI	P
T382	24	20	23	361,283	5178,3919	OI	P
T382	26	16	17	213,628	2349,9113	OI	P
T382	28	17	23	307,091	4094,5424	OI	P
T382	30	18	21	296,881	3859,4466	OI	P
D90	2	12	19	179,071	1850,3981	OI	P
D90	4	9	10	70,6858	447,67695	OI	P
D90	4	11	13	112,312	898,49550	OD	P
D90	6	9	13	91,8916	673,87162	OI	P
D90	6	17	19	253,684	3044,2033	OD	P
D90	8	11	12	103,673	794,82294	OI	P
D90	8	17	25	333,794	4673,1191	OD	P
D90	10	17	23	307,091	4094,5424	OD	P
D90	14	16	29	364,425	5466,3712	OD	P
D90	16	18	28	395,841	6069,5570	OD	P
D90	18	17	29	387,201	5937,0865	OD	P
D90	20	19	26	387,987	5819,8004	OD	P
D90	22	23	30	541,925	9574,0036	OD	P
D90	24	20	30	471,239	7853,9816	OD	P
D90	26	15	26	306,305	4186,1722	OD	P
D90	28	21	30	494,801	8411,6143	OD	P
D90	30	22	22	380,133	5575,2798	OD	P
D91	1					OD	P
D91	3	7	13	71,4712	476,47489	OD	P
D91	5	14	19	208,916	2298,0750	OD	P
D91	7	15	23	270,962	3432,1900	OD	P
D91	9	24	27	508,938	8651,9462	OD	P
D91	11	19	30	447,677	7312,0569	OD	P
D91	13	17	24	320,442	4379,3802	OD	P
D91	15	29	30	683,296	13438,163	OD	P
D91	17	22	25	431,969	6767,5142	OD	P
D91	19	22	25	431,969	6767,5142	OD	P
D91	21	19	27	402,909	6177,9420	OD	P
D91	23	23	26	469,668	7671,2457	OD	P
D91	25	21	26	428,827	6718,2959	OD	P
D91	27	22	28	483,805	8063,4211	OD	P
D78	2	7	8	43,9823	219,91149	OD	P
D78	4	12	17	160,221	1548,8052	OD	P
D78	6	16	25	314,159	4293,5100	OD	P
D78	8	14	26	285,885	3811,7991	OD	P
D78	10	21	30	494,801	8411,6143	OD	P
D78	12	17	26	347,146	4975,7592	OD	P
D78	14	19	26	387,987	5819,8004	OD	P

Anexo**Continuación tabla n° 66**

D78	16	21	25	412,334	6322,4552	OD	P
D78	18	20	26	408,407	6262,2414	OD	P
D78	20	19	24	358,142	5133,3624	OD	P
D78	22	19	24	358,142	5133,3624	OD	P
D78	24	16	25	314,159	4293,5100	OD	P
D78	26	19	31	462,600	7709,9920	OD	P
D78	28	21	28	461,814	7542,9640	OD	P
D78	30	18	26	367,566	5390,9730	OD	P
D73	2	8	15	94,2478	722,56631	OD	P
D73	4	14	31	340,863	5112,9420	OD	P
D73	6	24	25	471,239	7696,9020	OD	P
D73	8	20	37	581,195	11042,698	OD	P
D73	10	22	33	570,199	10453,650	OD	P
D73	12	21	32	527,788	9324,2470	OD	P
D73	14	24	29	546,637	9657,2558	OD	P
D73	16	30	30	706,858	14137,167	OD	P
D73	18	22	30	518,363	8984,9550	OD	P
D73	20	23	30	541,925	9574,0036	OD	P
D73	22	18	32	452,389	7539,8224	OD	P
D73	24	22	27	466,527	7619,9330	OD	P
D73	26	22	28	483,805	8063,4211	OD	P
D73	28	23	28	505,796	8598,5391	OD	P
D73	30	21	27	445,321	7125,1321	OD	P
T384	0	14	17	186,925	1931,5559	OI	P
T384	2	8	16	100,531	804,24772	OD	P
T384	4	15	20	235,619	2748,8936	OD	P
T384	6	17	24	320,442	4379,3802	OD	P
T384	8	19	30	447,677	7312,0569	OD	P
T384	10	22	30	518,363	8984,9550	OD	P
T384	12	22	32	552,920	9952,5655	OD	P
T384	14	24	30	565,487	10178,760	OD	P
T384	16	29	30	683,296	13438,163	OD	P
T384	18	22	33	570,199	10453,650	OD	P
T384	20	24	29	546,637	9657,2558	OD	P
T384	22	23	29	523,861	9080,2500	OD	P
T384	24	20	29	455,531	7440,3386	OD	P
T384	26	25	27	530,144	9189,1585	OD	P
T363	0					OD	P
T363	2	9	15	106,029	848,23002	OD	P
T363	4	13	20	204,204	2246,2387	OD	P
T363	6	24	28	527,788	9148,3178	OD	P
T363	8	21	30	494,801	8411,6143	OD	P
T363	10	22	31	535,642	9463,0007	OD	P
T363	12	23	30	541,925	9574,0036	OD	P
T363	14	18	29	409,978	6422,9862	OD	P
T363	16	25	27	530,144	9189,1585	OD	P
T363	18	19	32	477,522	8117,8754	OD	P
T363	20	24	25	471,239	7696,9020	OD	P
T363	22	20	26	408,407	6262,2414	OD	P
T363	24	18	26	367,566	5390,9730	OD	P
T363	26	22	26	449,248	7187,9640	OD	P
D84	0	7	9	49,4801	263,89378	OI	P

D84	2	12	15	141,372	1272,3450	OD	P
D84	4	14	18	197,920	2111,1503	OD	P
D84	6	11	19	164,148	1641,4822	OD	P
D84	8	18	29	409,978	6422,9862	OD	P
D84	10	18	29	409,978	6422,9862	OD	P
D84	12	20	28	439,823	7037,1675	OD	P
D84	14	20	27	424,115	6644,4685	OD	P
D84	16	15	24	282,743	3675,6634	OD	P
D84	18	20	24	376,991	5529,2031	OD	P
D84	20	21	23	379,347	5563,7606	OD	P
D84	22	16	25	314,159	4293,5100	OD	P
D84	24	22	25	431,969	6767,5142	OD	P
D84	26	21	31	511,294	8862,4329	OD	P
T380	0	6	14	65,9734	439,82297	OD	P
T380	2	9	13	91,8916	673,87162	OD	P
T380	4	17	23	307,091	4094,5424	OD	P
T380	6	16	24	301,593	4021,2386	OD	P
T380	8	20	27	424,115	6644,4685	OD	P
T380	10	18	33	466,527	7930,9507	OD	P
T380	12	20	26	408,407	6262,2414	OD	P
T380	14	20	31	486,947	8278,0966	OD	P
T380	16	19	24	358,142	5133,3624	OD	P
T380	18	21	27	445,321	7125,1321	OD	P
T380	20	20	28	439,823	7037,1675	OD	P
T380	28	21	27	445,321	7125,1321	OD	P
D34	1	5	12	47,1239	267,03538	OD	P
D34	3	8	10	62,8319	376,99112	OD	P
D34	5	13	17	173,573	1735,7299	OD	P
D34	7	21	27	445,321	7125,1321	OD	P
D34	9	26	30	612,611	11435,397	OD	P
D34	11	27	29	614,967	11479,380	OD	P
D34	13	20	32	502,655	8712,6836	OD	P
D34	15	24	26	490,088	8168,1409	OD	P
D34	17	22	26	449,248	7187,9640	OD	P
D34	19	22	25	431,969	6767,5142	OD	P
D34	21	18	28	395,841	6069,5570	OD	P
D34	29	16	23	289,027	3757,3448	OD	P
D90	0	15	24	282,743	3675,6634	OD	P
D90	2	11	20	172,788	1785,4718	OD	P
D90	4	16	19	238,761	2785,5455	OD	P
D90	7	12	28	263,894	3518,5838	OD	P
D90	9	17	23	307,091	4094,5424	OD	P
D90	11	17	30	400,553	6275,3313	OD	P
D90	13	15	27	318,086	4453,2076	OD	P
D90	16	17	28	373,850	5607,7429	OD	P
D90	4	15	18	212,058	2332,6325	OI	P
D90	6	18	23	325,155	4443,7828	OI	P
D90	8	21	26	428,827	6718,2959	OI	P
D90	10	12	22	207,345	2349,9113	OI	P
D90	12	19	30	447,677	7312,0569	OI	P
D90	14	18	29	409,978	6422,9862	OI	P
D90	16	18	23	325,155	4443,7828	OI	P

Anexo**Continuación tabla n° 66**

D90	18	20	24	376,991	5529,2031	OI	P
D90	20	20	27	424,115	6644,4685	OI	P
D90	22	18	28	395,841	6069,5570	OI	P
D74	1	10	11	86,3938	604,75659	OD	P
D74	3	12	16	150,796	1407,4335	OD	P
D74	5	17	25	333,794	4673,1191	OD	P
D74	7	24	30	565,487	10178,760	OD	P
D74	9	27	36	763,407	16031,547	OD	P
D74	11	28	37	813,672	17629,571	OD	P
D74	13	27	33	699,790	13995,795	OD	P
D74	15	21	27	445,321	7125,1321	OD	P
D74	17	23	34	614,181	11669,446	OD	P
D74	19	25	27	530,144	9189,1585	OD	P
D74	21	21	31	511,294	8862,4329	OD	P
D74	25	25	30	589,049	10799,225	OD	P
D74	27	23	25	451,604	7225,6631	OD	P
D74	29	23	26	469,668	7671,2457	OD	P
T383	2	8	17	106,814	890,11792	OD	P
T383	4	9	13	91,8916	673,87162	OD	P
T383	6	17	24	320,442	4379,3802	OD	P
T383	8	18	26	367,566	5390,9730	OD	P
T383	10	18	27	381,704	5725,5526	OD	P
T383	12	20	25	392,699	5890,4862	OD	P
T383	14	17	24	320,442	4379,3802	OD	P
T383	16	18	35	494,801	8741,4816	OD	P
T383	18	19	26	387,987	5819,8004	OD	P
T383	20	18	26	367,566	5390,9730	OD	P
T383	22	19	29	432,754	6924,0702	OD	P
T383	24	21	27	445,321	7125,1321	OD	P
T383	26	19	29	432,754	6924,0702	OD	P
T383	28	18	25	353,429	5065,8182	OD	P
T383	30	21	31	511,294	8862,4329	OD	P

♦ Tabla n° 67: Parámetros individualizados de los diámetros menor y mayor, área y volumen luteal del seguimiento ecográfico del CL tanto de las vacas gestantes como de las no gestantes tras la inseminación artificial.

n	Dm-Día13	Dm-Día16	Dm-Día21	DM-Día13	DM-Día16	DM-Día21	A-Día13	A-Día16	A-Día21	V-Día13	V-Día16	V-Día21	PA	P/NP
1	12 ^º	14 ^º	16 ^º	15 ^º	17 ^º	20 ^º	125,00 ^º	137,00 ^º	201,00 ^º	1125,00 ^º	1415,66 ^º	2412,00 ^º	2	0
2	17 ^º	22 ¹	22 ¹	30 ¹	35 ¹	26 ¹	259,00 ^º	517,00 ¹	436,00 ¹	4057,66 ^º	9823,00 ¹	6976,00 ¹	1	1
3	16 ^º	14 ^º	17 ¹	18 ^º	22 ^º	19 ^º	165,00 ^º	218,00 ^º	260,00 ^º	1870,00 ^º	2616,00 ^º	3120,00 ^º	2	0
4	21 ¹	23 ¹	15 ^º	27 ¹	37 ¹	23 ^º	444,00 ¹	741,00 ¹	252,00 ^º	7104,00 ¹	14820,00 ¹	3192,00 ^º	4	1
5	31 ¹	31 ¹	31 ¹	37 ¹	39 ¹	35 ¹	673,00 ¹	752,00 ¹	794,00 ¹	15254,66 ¹	17546,66 ¹	17468,00 ¹	3	0
6	19 ¹	27 ¹	23 ¹	30 ¹	28 ¹	31 ¹	444,00 ¹	598,00 ¹	487,00 ¹	7252,00 ¹	10963,33 ¹	8766,00 ¹	1	0
7	18 ^º	18 ^º	12 ^º	24 ^º	26 ^º	18 ^º	292,00 ^º	367,00 ^º	169,64 ^º	4088,00 ^º	5382,66 ^º	1696,46 ^º	6	0
8	16 ^º	20 ¹	***	21 ^º	22 ^º	***	249,00 ^º	315,00 ^º	***	3071,00 ^º	4410,00 ^º	***	3	0
9	21 ¹	24 ¹	13 ^º	32 ¹	35 ¹	18 ^º	403,00 ¹	660,00 ¹	183,78 ^º	7119,66 ¹	12980,00 ¹	1899,09 ^º	1	1
10	14 ^º	16 ^º	14 ^º	22 ^º	20 ^º	15 ^º	174,00 ^º	215,00 ^º	164,93 ^º	2146,00 ^º	2580,00 ^º	1594,36 ^º	6	0
11	17 ^º	14 ^º	11 ^º	23 ^º	18 ^º	13 ^º	307,00 ^º	188,00 ^º	112,31 ^º	4093,33 ^º	2005,33 ^º	898,49 ^º	3	0
12	26 ¹	20 ¹	16 ^º	42 ¹	22 ^º	19 ^º	827,00 ¹	346,00 ^º	238,76 ^º	18745,33 ¹	4844,00 ^º	2785,54 ^º	5	0
13	11 ^º	19 ¹	18 ¹	15 ^º	29 ¹	23 ^º	129,59 ^º	432,75 ¹	325,15 ^º	1123,12 ^º	6924,07 ¹	4443,78 ^º	3	0
14	22 ¹	19 ¹	16 ^º	31 ¹	28 ¹	18 ^º	535,64 ¹	417,83 ¹	226,98 ^º	9463,00 ¹	6546,03 ¹	2563,54 ^º	3	0
15	16 ^º	18 ^º	10 ^º	23 ^º	19 ^º	13 ^º	289,60 ^º	268,60 ^º	102,10 ^º	3757,34 ^º	3312,81 ^º	782,78 ^º	5	0
16	18 ^º	18 ^º	17 ¹	19 ^º	18 ^º	17 ^º	268,60 ^º	254,47 ^º	226,98 ^º	3312,81 ^º	3053,63 ^º	2572,44 ^º	4	0
17	19 ¹	25 ¹	17 ¹	28 ¹	36 ¹	23 ^º	417,83 ¹	706,86 ¹	325,15 ^º	6546,03 ¹	14372,78 ¹	4443,78 ^º	4	1
18	23 ¹	18 ^º	13 ^º	30 ¹	21 ^º	16 ^º	541,92 ¹	296,88 ^º	163,36 ^º	9574,00 ¹	3859,44 ^º	1579,17 ^º	1	1
19	23 ¹	17 ^º	14 ^º	27 ¹	20 ^º	21 ^º	487,73 ¹	267,03 ^º	252,90 ^º	8128,87 ¹	3293,43 ^º	3119,08 ^º	3	0
20	22 ¹	16 ^º	17 ¹	23 ^º	18 ^º	17 ^º	397,41 ^º	226,19 ^º	226,98 ^º	5961,17 ^º	2563,54 ^º	2572,44 ^º	1	1
21	17 ^º	14 ^º	15 ^º	18 ^º	15 ^º	16 ^º	240,33 ^º	164,93 ^º	188,49 ^º	2803,87 ^º	1594,36 ^º	1947,79 ^º	3	1
22	30 ¹	21 ¹	***	34 ¹	37 ¹	***	801,10 ¹	445,32 ¹	***	17090,26 ¹	7125,13 ¹	***	2	0
23	18 ^º	17 ^º	***	23 ^º	21 ^º	***	325,15 ^º	280,39 ^º	***	4443,78 ^º	3551,57 ^º	***	2	0
24	12 ^º	14 ^º	12 ^º	20 ^º	17 ^º	19 ^º	188,49 ^º	186,92 ^º	179,09 ^º	2010,62 ^º	1931,55 ^º	1850,40 ^º	1	1
25	20 ¹	19 ¹	***	28 ¹	29 ¹	***	439,82 ¹	432,75 ¹	***	7037,17 ¹	6924,07 ¹	***	1	0
26	16 ^º	25 ¹	16 ^º	16 ^º	30 ¹	17 ^º	201,06 ^º	589,05 ¹	213,63 ^º	2144,66 ^º	10799,22 ¹	2349,91 ^º	2	1
27	15 ^º	13 ^º	14 ^º	15 ^º	17 ^º	18 ^º	176,71 ^º	173,57 ^º	197,92 ^º	3534,29 ^º	1735,73 ^º	2111,15 ^º	2	0
28	18 ^º	20 ^º	18 ^º	22 ^º	22 ^º	22 ^º	311,02 ^º	345,57 ^º	311,02 ^º	4146,90 ^º	4838,05 ^º	4146,90 ^º	2	0
29	30 ¹	25 ¹	22 ¹	31 ¹	30 ¹	32 ¹	730,42 ¹	589,05 ¹	552,92 ¹	14851,88 ¹	10799,22 ¹	9952,56 ¹	3	1
30	18 ^º	14 ^º	17 ^º	18 ^º	18 ^º	23 ^º	254,47 ^º	197,92 ^º	307,09 ^º	3053,63 ^º	2111,15 ^º	4094,54 ^º	4	0
31	16 ^º	14 ^º	14 ^º	26 ^º	15 ^º	17 ^º	326,72 ^º	164,93 ^º	186,92 ^º	4574,16 ^º	1594,36 ^º	1931,55 ^º	1	0
32	15 ^º	15 ^º	***	21 ^º	18 ^º	***	247,40 ^º	212,06 ^º	***	2968,80 ^º	2332,63 ^º	***	2	0
33	20 ^º	18 ^º	14 ^º	22 ^º	20 ^º	16 ^º	345,57 ^º	282,74 ^º	175,93 ^º	4838,05 ^º	3581,41 ^º	1759,29 ^º	1	0
34	14 ^º	16 ^º	14 ^º	17 ^º	17 ^º	18 ^º	186,92 ^º	213,63 ^º	197,92 ^º	1931,55 ^º	2349,91 ^º	2111,15 ^º	3	0
35	15 ^º	16 ^º	13 ^º	18 ^º	17 ^º	17 ^º	212,06 ^º	213,63 ^º	173,57 ^º	2332,63 ^º	2349,91 ^º	1735,73 ^º	3	0
36	18 ^º	15 ^º	9 ^º	20 ^º	16 ^º	15 ^º	282,74 ^º	188,49 ^º	106,03 ^º	3581,41 ^º	1947,79 ^º	848,23 ^º	1	1
37	12 ^º	15 ^º	27 ¹	22 ^º	15 ^º	18 ^º	207,34 ^º	318,08 ^º	212,06 ^º	2349,91 ^º	4453,21 ^º	2332,63 ^º	1	1
38	18 ^º	19 ¹	18 ¹	19 ^º	22 ^º	24 ^º	268,60 ^º	328,29 ^º	339,90 ¹	3312,81 ^º	4486,72 ^º	4750,09 ^º	4	1
39	16 ^º	12 ^º	***	17 ^º	15 ^º	***	213,63 ^º	141,37 ^º	***	2349,91 ^º	1272,34 ^º	***	1	0
40	17 ^º	12 ^º	16 ^º	20 ^º	18 ^º	25 ¹	267,03 ^º	169,64 ^º	314,16 ^º	3293,43 ^º	1696,46 ^º	4293,51 ^º	2	0
41	17 ^º	18 ^º	18 ¹	21 ^º	23 ^º	20 ^º	280,39 ^º	325,15 ^º	282,74 ^º	3551,57 ^º	4443,78 ^º	3581,41 ^º	3	0
42	17 ^º	11 ^º	20 ¹	29 ¹	15 ^º	21 ^º	387,20 ^º	129,59 ^º	329,87 ¹	5937,08 ^º	1123,12 ^º	4508,18 ^º	4	0
43	20 ¹	20 ¹	17 ¹	24 ^º	22 ^º	20 ^º	376,99 ^º	345,57 ^º	267,03 ^º	5529,20 ^º	4838,05 ^º	3293,43 ^º	4	0

Anexo**Continuación tabla n° 67**

44	16º	15º	15º	16º	20º	19º	201,06º	235,62º	223,84º	2144,66º	2748,89º	2536,83º	1	0
45	20¹	20¹	17¹	20º	22º	21º	314,16º	345,57º	280,39º	4188,79º	4838,05º	3551,57º	3	1
46	18º	19¹	17¹	18º	21º	21º	254,47º	313,37º	280,39º	3053,63º	4178,32º	3551,57º	2	0
47	14º	18º	16º	20º	21º	20º	219,91º	296,88º	251,33º	2492,33º	3859,44º	3015,93º	2	0
48	16º	16º	***	24º	17º	***	301,59º	213,63º	***	4021,24º	2349,91º	***	5	0
49	20¹	17º	15º	21º	18º	20º	329,87º	240,33º	235,62º	4508,18º	2803,87º	2748,89º	5	1
50	13º	12º	***	16º	19º	***	163,36º	179,07º	***	1579,17º	1850,40º	***	1	0
51	16º	16º	15º	21º	16º	16º	263,89º	201,06º	188,49º	3254,69º	2144,66º	1947,79º	4	1
52	19¹	18º	19¹	32¹	37¹	25¹	477,52¹	523,07¹	373,06¹	8117,87¹	9589,71¹	5471,61¹	1	0
53	15º	15º	***	20º	23º	***	235,62º	270,96º	***	2748,89º	3432,19º	***	2	0
54	21¹	18º	17¹	23º	24º	23º	379,35º	339,29º	307,09º	5563,76º	4750,09º	4094,54º	4	1
55	19¹	16º	19¹	19º	19º	21º	283,53º	238,76º	313,37º	3591,36º	2785,54º	4178,32º	2	1
56	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	2	0
57	***	***	17¹	***	***	27¹	***	***	360,50¹	***	***	5287,30¹	3	0
58	***	***	19¹	***	***	27¹	***	***	402,91¹	***	***	6177,94¹	2	1
59	***	***	15º	***	***	22º	***	***	259,18º	***	***	3196,57º	2	0
60	***	***	17¹	***	***	31¹	***	***	413,90¹	***	***	6622,48¹	3	0
61	***	***	23¹	***	***	32¹	***	***	578,05¹	***	***	10597,64¹	2	1
62	16º	17º	22¹	20º	23º	30¹	251,33º	307,09º	518,36¹	3015,93º	4094,54º	8984,95¹	2	0
63	15º	19¹	17¹	17º	34¹	32¹	200,27º	507,37¹	427,25¹	2136,28º	8964,49¹	6978,52¹	2	1
64	16º	13º	16º	21º	23º	22º	263,89º	307,09º	276,46º	3254,69º	4094,53º	3501,83º	2	0
65	12º	13º	17¹	13º	13º	27¹	122,52º	132,73º	360,50¹	1021,02º	1150,34º	5287,30¹	1	0
66	18º	18º	17¹	18º	22º	18º	254,47º	311,02º	240,33º	3053,63º	4146,90º	2803,87º	2	1
67	18º	17º	17¹	26º	21º	18¹	367,56º	280,39º	240,33¹	5390,97º	3551,57º	2803,87¹	3	0
68	14º	14º	18¹	21º	24º	22º	230,90º	263,89º	311,02º	2693,91º	3342,65º	4146,90º	6	0
69	10º	12º	12º	26º	18º	13º	204,20º	169,64º	122,52º	2450,44º	1696,46º	1021,02º	2	0
70	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	2	0
71	19¹	20¹	18¹	29¹	38¹	33¹	432,75¹	596,90¹	466,52¹	6924,07¹	11540,12¹	7930,95¹	1	1
72	17º	19¹	16º	23º	21º	33¹	307,09º	313,37º	414,69¹	4094,54º	4178,32º	6773,27¹	4	0
73	19¹	19¹	18¹	42¹	39¹	28¹	626,75¹	581,98¹	395,84¹	12743,87¹	11251,61¹	6069,55¹	1	1
74	13º	15º	7º	17º	30¹	22º	173,57º	353,43º	120,95º	1735,73º	5301,44º	1169,19º	1	1
75	16º	17º	21¹	33¹	31¹	21º	414,69¹	413,90¹	346,36¹	6773,27¹	6622,48¹	4849,05¹	1	0
76	20¹	13º	19¹	24º	18º	27¹	376,99º	183,78º	381,70¹	5529,20º	1899,09º	5725,55¹	4	1
77	16º	17º	***	18º	18º	***	226,19º	240,33º	***	2563,54º	2803,87º	***	1	0
78	19¹	23¹	24¹	35¹	35¹	35¹	522,29¹	632,24¹	659,73¹	9401,21¹	12223,41¹	12974,78¹	2	0
79	23¹	14º	21¹	36¹	26º	26¹	650,31¹	285,88º	428,83¹	12789,42¹	3811,80º	6718,29¹	3	0
80	15º	15º	13º	34¹	25º	19º	400,55º	294,52º	193,99º	6542,36¹	3926,99º	2069,26º	1	1
81	17º	13º	12º	21º	34¹	15º	280,39º	347,14º	141,37º	3551,57º	5438,62º	1272,34º	2	0
82	18º	16º	18¹	28¹	28¹	21º	395,84º	351,85º	296,88º	6069,55º	5160,58º	3859,44º	2	0
83	18º	19¹	13º	27¹	27¹	21º	381,70º	402,91¹	214,41º	5725,55º	6177,94º	2430,02º	2	1
84	19¹	22¹	19¹	33¹	36¹	24º	492,44¹	622,03¹	358,14¹	8535,71¹	12026,01¹	5133,36¹	2	1
85	17º	11º	13º	23º	17º	9º	307,09º	146,87º	91,890º	4310,26º	1370,78º	673,87º	1	1
86	14º	12º	17¹	28¹	28¹	23º	307,87º	263,89º	307,09º	4310,26º	3518,58º	4094,54º	2	0
87	15º	13º	17¹	27¹	21º	33¹	318,08º	214,41º	440,61¹	4453,21º	2430,02º	7343,47¹	1	0
88	19¹	22¹	17¹	30¹	31¹	26¹	447,67¹	535,64¹	347,14¹	7312,05¹	9463,00¹	4975,76¹	3	1
89	22¹	20¹	16º	38¹	23º	29¹	656,59¹	361,28º	364,42¹	13131,86¹	5178,39º	5466,37¹	1	1
90	18º	15º	19¹	26º	24º	20º	367,56º	282,74º	298,45º	5390,97º	3675,66º	3879,86º	2	0
91	25¹	21¹	17¹	31¹	30¹	23º	608,68¹	494,80¹	307,09º	11362,09¹	8411,61¹	4094,54º	2	1
92	19¹	19¹	20¹	22º	22º	26¹	328,29º	328,29º	408,41¹	4486,72º	4486,72º	6262,24¹	2	1
93	19¹	19¹	17¹	22º	32¹	24º	328,29º	477,52¹	320,44º	4486,72º	8117,87¹	4379,38º	1	0
94	19¹	24¹	18¹	26º	33¹	28¹	387,98º	622,03¹	395,84¹	5819,80º	11818,67¹	6069,55¹	1	1

95	13 ^º	14 ^º	12 ^º	32 ¹	26 ^º	23 ^º	326,72 ^º	285,88 ^º	216,77 ^º	4900,88 ^º	3811,80 ^º	2528,92 ^º	3	0
96	18 ^º	18 ^º	12 ^º	35 ¹	32 ¹	19 ^º	494,80 ¹	452,39 ¹	179,07 ^º	8741,48 ¹	7539,82 ¹	1850,40 ^º	1	0
97	26 ¹	17 ^º	20 ¹	27 ¹	35 ¹	24 ^º	551,35 ¹	467,31 ¹	376,99 ¹	9740,51 ¹	8100,07 ¹	5529,20 ¹	4	0
98	16 ^º	17 ^º	19 ¹	20 ^º	28 ^º	25 ¹	251,33 ^º	373,85 ^º	373,06 ¹	3015,96 ^º	5607,74 ^º	5471,61 ¹	4	0
99	11 ^º	17 ^º	14 ^º	23 ^º	21 ^º	19 ^º	198,70 ^º	280,39 ^º	208,91 ^º	2251,93 ^º	3551,57 ^º	2298,07 ^º	4	0
100	10 ^º	11 ^º	7 ^º	22 ^º	12 ^º	19 ^º	172,79 ^º	103,67 ^º	104,46 ^º	1843,09 ^º	794,82 ^º	905,300 ^º	2	0
101	16 ^º	10 ^º	***	19 ^º	10 ^º	***	238,76 ^º	78,540 ^º	***	2785,53 ^º	523,60 ^º	***	2	1
102	12 ^º	7 ^º	12 ^º	15 ^º	24 ^º	15 ^º	141,37 ^º	131,94 ^º	141,37 ^º	1272,33 ^º	1363,45 ^º	1272,34 ^º	4	0
103	20 ¹	18 ^º	20 ¹	34 ¹	31 ¹	31 ¹	534,07 ¹	438,25 ¹	486,95 ¹	9613,26 ¹	7158,08 ¹	8278,09 ¹	3	1
104	23 ¹	18 ^º	16 ^º	30 ¹	31 ¹	23 ^º	541,92 ¹	438,25 ¹	289,02 ^º	9573,92 ¹	7158,12 ¹	3757,34 ^º	5	1
105	12 ^º	12 ^º	13 ^º	17 ^º	17 ^º	15 ^º	160,22 ^º	160,20 ^º	153,15 ^º	1548,79 ^º	1548,80 ^º	1429,42 ^º	4	0
106	20 ¹	23 ¹	25 ¹	34 ¹	35 ¹	30 ¹	534,07 ¹	632,24 ¹	589,05 ¹	9613,26 ¹	12223,41 ¹	10799,22 ¹	1	1
107	20 ¹	21 ¹	20 ¹	30 ¹	30 ¹	26 ¹	471,24 ¹	494,80 ¹	408,41 ¹	7854,00 ¹	8411,61 ¹	6262,24 ¹	3	1
108	11 ^º	16 ^º	13 ^º	15 ^º	24 ^º	16 ^º	129,59 ^º	301,59 ^º	163,36 ^º	1123,11 ^º	4021,24 ^º	1579,17 ^º	1	0
109	19 ¹	18 ¹	18 ¹	34 ¹	34 ¹	22 ^º	507,37 ¹	480,66 ¹	311,02 ^º	8963,54 ¹	8331,50 ¹	4146,90 ^º	2	1
110	17 ^º	18 ^º	18 ¹	18 ^º	21 ^º	22 ^º	240,33 ^º	296,88 ^º	311,02 ^º	2803,87 ^º	3859,44 ^º	4146,90 ^º	1	1
111	17 ^º	22 ¹	19 ¹	26 ^º	30 ¹	23 ^º	347,14 ^º	518,36 ¹	343,22 ¹	4975,76 ^º	8984,95 ¹	4085,06 ¹	2	1
112	20 ¹	21 ¹	19 ¹	29 ¹	25 ^º	25 ¹	455,53 ¹	412,33 ¹	373,06 ¹	7440,34 ¹	6322,45 ^º	5471,61 ¹	4	1
113	20 ¹	12 ^º	18 ^º	26 ^º	17 ^º	22 ^º	408,41 ¹	160,22 ^º	311,02 ^º	6262,24 ^º	1548,80 ^º	4146,90 ^º	3	0
114	18 ^º	23 ¹	19 ¹	29 ¹	25 ^º	22 ^º	409,98 ¹	451,60 ¹	328,29 ^º	6422,98 ¹	7225,66 ¹	4486,72 ^º	2	0
115	11 ^º	15 ^º	18 ^º	21 ^º	19 ^º	21 ^º	181,42 ^º	223,84 ^º	296,88 ^º	1935,22 ^º	2536,83 ^º	3859,44 ^º	6	0
116	13 ^º	15 ^º	19 ¹	30 ¹	24 ^º	23 ^º	306,30 ^º	282,74 ^º	343,22 ¹	4390,37 ^º	3675,66 ^º	4805,06 ¹	2	1
117	18 ^º	16 ^º	20 ¹	24 ^º	17 ^º	20 ^º	339,29 ^º	213,63 ^º	314,16 ^º	4750,09 ^º	2349,91 ^º	4188,79 ^º	2	1
118	17 ^º	23 ¹	19 ¹	24 ^º	31 ¹	24 ^º	320,44 ^º	559,99 ¹	358,14 ¹	4379,38 ^º	10079,80 ¹	5133,36 ¹	4	1
119	20 ¹	8 ^º	17 ¹	28 ¹	18 ^º	18 ^º	439,82 ¹	113,10 ^º	240,33 ^º	7037,17 ¹	980,17 ^º	2803,87 ^º	3	0
120	15 ^º	10 ^º	***	17 ^º	19 ^º	***	200,27 ^º	149,22 ^º	***	2136,28 ^º	1442,51 ^º	***	4	0
121	18 ^º	18 ^º	21 ¹	26 ^º	21 ^º	25 ¹	367,56 ^º	296,88 ^º	412,33 ¹	5390,97 ^º	3859,44 ^º	6322,45 ¹	2	0
122	23 ¹	21 ¹	13 ^º	29 ¹	23 ^º	21 ^º	523,86 ¹	379,35 ^º	214,41 ^º	9080,25 ¹	5563,76 ^º	2430,02 ^º	4	0
123	23 ¹	22 ¹	19 ^º	24 ¹	30 ¹	21 ^º	433,54 ¹	518,36 ¹	313,37 ^º	6792,12 ¹	8984,95 ¹	4178,32 ^º	2	0
124	23 ¹	19 ¹	22 ¹	29 ¹	29 ¹	28 ¹	523,86 ¹	432,75 ¹	483,80 ¹	9080,25 ¹	6924,07 ¹	8063,42 ¹	1	1
125	21 ¹	23 ¹	10 ^º	29 ¹	25 ^º	24 ^º	478,31 ¹	451,60 ¹	188,49 ^º	7971,79 ¹	7225,66 ¹	2136,28 ^º	5	0
126	21 ¹	22 ¹	19 ¹	26 ^º	26 ¹	21 ^º	428,83 ¹	429,25 ¹	313,37 ^º	6718,29 ¹	7187,96 ¹	4178,32 ^º	1	1
127	14 ^º	27 ¹	24 ¹	20 ^º	36 ¹	33 ¹	219,91 ^º	763,41 ¹	622,03 ¹	2492,33 ^º	16031,55 ¹	11818,67 ¹	3	1
128	18 ^º	15 ^º	***	26 ^º	21 ^º	***	367,56 ^º	247,40 ^º	***	5390,97 ^º	2968,80 ^º	***	4	0
129	14 ^º	13 ^º	13 ^º	14 ^º	24 ^º	14 ^º	153,94 ^º	245,04 ^º	142,94 ^º	1436,75 ^º	3022,21 ^º	1286,48 ^º	1	1
130	20 ¹	17 ^º	13 ^º	30 ¹	35 ¹	13 ^º	471,24 ¹	467,31 ¹	132,73 ^º	7853,98 ¹	8100,07 ¹	1150,34 ^º	3	0
131	13 ^º	15 ^º	12 ^º	17 ^º	22 ^º	17 ^º	173,57 ^º	259,18 ^º	160,22 ^º	1735,73 ^º	3196,57 ^º	1548,80 ^º	2	0
132	15 ^º	19 ¹	10 ^º	23 ^º	21 ^º	27 ¹	270,96 ^º	313,37 ^º	212,06 ^º	3432,19 ^º	4178,32 ^º	2615,37 ^º	2	0
133	22 ¹	22 ¹	22 ¹	30 ¹	31 ¹	22 ^º	518,36 ¹	535,64 ¹	380,13 ¹	8984,95 ¹	9463,00 ¹	5575,28 ¹	2	0
134	20 ¹	22 ¹	19 ¹	30 ¹	33 ¹	29 ¹	471,24 ¹	570,20 ¹	432,75 ¹	7853,98 ¹	10453,65 ¹	6924,07 ¹	1	0
135	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	1	0
136	20 ¹	24 ¹	25 ¹	33 ¹	34 ¹	26 ¹	518,36 ¹	640,88 ¹	510,51 ¹	9157,74 ¹	12390,44 ¹	8678,65 ¹	7	1
137	20 ¹	22 ¹	21 ¹	31 ¹	24 ^º	28 ¹	486,95 ¹	414,69 ¹	461,81 ¹	8278,09 ¹	6358,58 ^º	7542,96 ¹	2	1
138	16 ^º	18 ^º	20 ¹	24 ^º	21 ^º	21 ^º	301,59 ^º	296,88 ^º	329,87 ¹	4021,24 ^º	3859,45 ^º	4508,18 ^º	1	1
139	17 ^º	14 ^º	17 ¹	25 ^º	23 ^º	20 ^º	333,79 ^º	252,90 ^º	267,03 ^º	4673,12 ^º	3119,08 ^º	3293,44 ^º	1	1
140	17 ^º	23 ¹	19 ¹	29 ¹	34 ¹	26 ¹	387,20 ^º	614,18 ¹	387,99 ¹	5937,09 ^º	11669,42 ¹	5819,80 ¹	3	0
141	20 ¹	25 ¹	16 ^º	33 ¹	28 ¹	30 ¹	518,36 ¹	549,78 ¹	376,99 ¹	9157,74 ¹	9712,76 ¹	5780,53 ¹	2	1
142	20 ¹	18 ^º	19 ¹	24 ^º	26 ^º	24 ^º	376,99 ^º	367,57 ^º	358,14 ¹	5529,20 ^º	5390,97 ^º	5133,36 ¹	7	1
143	19 ¹	22 ¹	18 ¹	30 ¹	28 ¹	25 ¹	447,68 ¹	483,81 ¹	353,43 ¹	7312,06 ¹	8063,42 ¹	5065,82 ¹	4	1
144	24 ¹	23 ¹	22 ¹	29 ¹	29 ¹	26 ¹	546,64 ¹	523,86 ¹	449,25 ¹	9657,25 ¹	9080,25 ¹	7187,96 ¹	3	0
145	***	20 ¹	17 ¹	***	31 ¹	27 ¹	***	486,95 ¹	360,50 ¹	***	8278,10 ¹	5287,30 ¹	4	0

Anexo**Continuación tabla n° 67**

146	19 ¹	23 ¹	19 ¹	28 ¹	26 ⁰	26 ¹	417,83 ¹	469,67 ¹	387,99 ¹	6546,03 ¹	7671,24 ¹	4508,18 ¹	4	1
147	22 ¹	24 ¹	19 ¹	28 ¹	30 ¹	28 ¹	483,80 ¹	565,49 ¹	417,83 ¹	8063,42 ¹	10178,76 ¹	6546,03 ¹	4	1
148	26 ¹	21 ¹	27 ¹	29 ¹	37 ¹	29 ¹	592,19 ¹	610,25 ¹	614,97 ¹	10856,90 ¹	11798,25 ¹	11479,38 ¹	2	1
149	24 ¹	29 ¹	24 ¹	28 ¹	37 ¹	29 ¹	527,79 ¹	842,73 ¹	546,64 ¹	9148,32 ¹	18540,11 ¹	9657,25 ¹	3	1
150	17 ⁰	17 ⁰	***	25 ⁰	25 ⁰	***	333,79 ⁰	333,79 ⁰	***	4673,12 ⁰	4673,12 ⁰	***	1	0
151	20 ¹	20 ¹	18 ¹	27 ¹	28 ¹	28 ¹	424,11 ¹	439,82 ¹	395,84 ¹	6644,47 ¹	7037,17 ¹	6069,56 ¹	4	0
152	26 ¹	20 ¹	18 ¹	30 ¹	27 ¹	26 ¹	612,61 ¹	424,11 ¹	367,57 ¹	11435,40 ¹	6644,47 ¹	5390,97 ¹	1	1
153	19 ¹	26 ¹	19 ¹	29 ¹	29 ¹	30 ¹	432,75 ¹	592,19 ¹	447,68 ¹	6924,07 ¹	10856,82 ¹	7312,06 ¹	2	1
154	27 ¹	19 ¹	21 ¹	30 ¹	30 ¹	25 ¹	636,17 ¹	447,68 ¹	412,33 ¹	12087,30 ¹	7312,06 ¹	6322,45 ¹	2	1
155	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	1	0
156	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	2	0
157	19 ¹	18 ⁰	14 ⁰	26 ⁰	24 ⁰	18 ⁰	388,00 ⁰	339,29 ⁰	197,92 ⁰	5819,80 ⁰	4750,09 ⁰	2111,15 ⁰	3	0
158	15 ⁰	20 ¹	17 ¹	31 ¹	25 ⁰	23 ⁰	365,21 ⁰	392,70 ⁰	307,10 ⁰	5599,90 ⁰	5890,48 ⁰	4094,54 ⁰	1	0
159	27 ¹	30 ¹	26 ¹	28 ¹	38 ¹	28 ¹	593,76 ¹	895,35 ¹	571,77 ¹	10885,60 ¹	20294,70 ¹	10291,86 ¹	4	0
160	22 ¹	20 ¹	16 ⁰	27 ¹	29 ¹	26 ¹	466,52 ¹	455,53 ¹	326,72 ⁰	7619,93 ¹	7440,34 ¹	4574,60 ⁰	4	1
161	17 ⁰	24 ¹	18 ¹	23 ⁰	29 ¹	34 ¹	307,09 ⁰	546,64 ¹	480,66 ¹	4094,53 ⁰	9657,25 ¹	8331,50 ¹	2	1
162	17 ⁰	16 ⁰	***	25 ⁰	22 ⁰	***	333,79 ⁰	276,46 ⁰	***	4673,12 ⁰	3501,83 ⁰	***	1	0
163	27 ¹	23 ¹	20 ¹	32 ¹	34 ¹	31 ¹	678,58 ¹	614,18 ¹	486,95 ¹	13345,50 ¹	11669,44 ¹	8278,10 ¹	3	1
164	23 ¹	21 ¹	***	34 ¹	29 ¹	***	614,18 ¹	478,31 ¹	***	11669,40 ¹	7971,79 ¹	***	4	0
165	20 ¹	20 ⁰	***	26 ⁰	24 ⁰	***	408,41 ¹	377,00 ⁰	***	6262,30 ⁰	5529,20 ⁰	***	2	0
166	21 ¹	21 ¹	***	30 ¹	26 ⁰	***	494,80 ¹	428,83 ¹	***	8411,61 ¹	6718,29 ¹	***	7	0
167	19 ¹	20 ¹	***	23 ⁰	26 ⁰	***	343,22 ⁰	408,41 ¹	***	4805,06 ⁰	6262,24 ⁰	***	5	0
168	18 ¹	19 ¹	***	31 ¹	28 ¹	***	438,25 ¹	417,83 ¹	***	7158,12 ¹	6546,03 ¹	***	2	0
169	14 ⁰	17 ⁰	***	27 ¹	26 ⁰	***	296,88 ⁰	347,14 ⁰	***	4057,36 ⁰	4975,76 ⁰	***	5	0
170	21 ¹	20 ¹	***	32 ¹	30 ¹	***	527,79 ¹	471,24 ¹	***	8972,40 ¹	7853,98 ¹	***	2	0
171	17 ⁰	17 ⁰	***	27 ¹	24 ⁰	***	360,50 ⁰	320,44 ⁰	***	5287,30 ⁰	4379,38 ⁰	***	3	0
172	25 ¹	24 ¹	***	28 ¹	28 ¹	***	549,78 ¹	527,79 ¹	***	9712,76 ¹	9148,32 ¹	***	2	1
173	16 ⁰	18 ⁰	***	24 ⁰	26 ⁰	***	301,60 ⁰	367,56 ⁰	***	4021,24 ⁰	5390,97 ⁰	***	2	1
174	29 ¹	30 ¹	24 ¹	39 ¹	36 ¹	34 ¹	888,28 ¹	848,23 ¹	640,90 ¹	20134,50 ¹	18661,06 ¹	12390,44 ¹	1	0
175	23 ¹	23 ¹	18 ¹	27 ¹	27 ¹	25 ¹	487,73 ¹	487,73 ¹	353,43 ¹	8128,87 ¹	8128,87 ¹	5065,82 ¹	1	1
176	19 ¹	20 ¹	17 ¹	27 ¹	23 ⁰	24 ⁰	402,91 ⁰	361,28 ⁰	320,44 ⁰	6177,94 ⁰	5660,10 ⁰	4379,40 ⁰	4	0
177	13 ⁰	13 ⁰	12 ⁰	23 ⁰	16 ⁰	16 ⁰	234,83 ⁰	163,36 ⁰	150,79 ⁰	2818,00 ⁰	1579,17 ⁰	1407,43 ⁰	2	0
178	24 ¹	24 ¹	18 ¹	24 ⁰	24 ⁰	22 ⁰	452,39 ¹	452,39 ¹	311,02 ⁰	7238,23 ¹	7238,23 ¹	4146,90 ⁰	2	1
179	18 ⁰	17 ⁰	11 ⁰	26 ⁰	27 ¹	23 ⁰	367,56 ⁰	360,50 ⁰	198,70 ⁰	5390,97 ⁰	5287,30 ⁰	2252,00 ⁰	1	0
180	18 ⁰	19 ¹	15 ⁰	28 ¹	24 ⁰	21 ⁰	395,84 ⁰	358,14 ⁰	247,40 ⁰	6069,55 ⁰	5133,36 ⁰	2968,80 ⁰	2	0
181	19 ¹	13 ⁰	21 ¹	23 ⁰	26 ⁰	22 ⁰	343,22 ⁰	265,46 ⁰	362,85 ¹	4805,06 ⁰	3451,04 ⁰	5201,00 ¹	4	1
182	16 ⁰	22 ¹	17 ¹	27 ¹	22 ⁰	23 ⁰	339,29 ⁰	380,13 ⁰	307,10 ⁰	4863,18 ⁰	5575,28 ⁰	4094,54 ⁰	1	0
183	16 ⁰	17 ⁰	15 ⁰	29 ¹	25 ⁰	18 ⁰	364,42 ⁰	333,80 ⁰	212,06 ⁰	5466,37 ⁰	4673,12 ⁰	2332,63 ⁰	4	1
184	19 ¹	17 ⁰	17 ¹	20 ⁰	28 ¹	21 ⁰	298,45 ⁰	373,85 ⁰	280,40 ⁰	3879,86 ⁰	5607,74 ⁰	3551,60 ⁰	4	1
185	23 ¹	22 ¹	19 ¹	28 ¹	32 ¹	28 ¹	505,80 ¹	552,92 ¹	417,83 ¹	8598,54 ¹	9952,56 ¹	6546,03 ¹	6	1
186	17 ⁰	13 ⁰	18 ¹	27 ¹	23 ⁰	27 ¹	360,50 ⁰	234,83 ⁰	381,70 ¹	5287,30 ⁰	2818,00 ⁰	5725,55 ¹	1	1
187	13 ⁰	16 ⁰	14 ⁰	20 ⁰	18 ⁰	14 ⁰	204,20 ⁰	226,20 ⁰	154,00 ⁰	2246,24 ⁰	2563,54 ⁰	1436,75 ⁰	1	1
188	16 ⁰	18 ⁰	15 ⁰	28 ¹	26 ⁰	35 ¹	351,86 ⁰	367,56 ⁰	412,33 ¹	5160,60 ⁰	5391,00 ⁰	6872,23 ¹	6	0
189	26 ¹	31 ¹	24 ¹	35 ¹	32 ¹	31 ¹	714,71 ¹	779,11 ¹	584,33 ¹	14532,50 ¹	16361,41 ¹	10712,83 ¹	2	1
190	19 ¹	13 ⁰	***	27 ¹	22 ⁰	***	402,90 ⁰	224,62 ⁰	***	6177,94 ⁰	2620,61 ⁰	***	4	0
191	25 ¹	17 ⁰	15 ⁰	25 ⁰	22 ⁰	27 ¹	490,90 ¹	294,00 ⁰	306,30 ⁰	8181,23 ¹	3818,60 ⁰	4288,30 ⁰	4	1
192	17 ⁰	20 ¹	14 ⁰	25 ⁰	25 ⁰	18 ⁰	333,80 ⁰	392,70 ⁰	197,92 ⁰	4673,12 ⁰	5890,50 ⁰	2111,15 ⁰	2	1
193	16 ⁰	15 ⁰	15 ⁰	17 ⁰	18 ⁰	18 ⁰	213,63 ⁰	212,06 ⁰	212,06 ⁰	2349,91 ⁰	2332,63 ⁰	2332,63 ⁰	3	0
194	18 ⁰	19 ¹	16 ⁰	26 ⁰	22 ⁰	18 ⁰	367,56 ⁰	328,30 ⁰	226,19 ⁰	5390,97 ⁰	4486,72 ⁰	2563,54 ⁰	2	0
195	22 ¹	17 ⁰	17 ¹	27 ¹	17 ⁰	23 ⁰	466,52 ¹	226,98 ⁰	307,10 ⁰	7619,93 ¹	2572,44 ⁰	4094,54 ⁰	4	1
196	22 ¹	25 ¹	17 ¹	31 ¹	33 ¹	26 ¹	535,64 ¹	647,95 ¹	347,14 ¹	9463,00 ¹	12517,10 ¹	4975,76 ¹	5	1

197	20 ¹	19 ¹	18 ¹	26 ⁰	27 ¹	27 ¹	408,41 ¹	402,91 ¹	381,70 ¹	6262,24 ⁰	6177,94 ¹	5725,55 ¹	2	1
198	20 ¹	20 ¹	20 ⁰	33 ¹	27 ¹	20 ⁰	518,36 ¹	424,11 ¹	314,16 ⁰	9157,74 ¹	6644,47 ¹	4188,80 ⁰	3	0
199	25 ¹	27 ¹	17 ¹	28 ¹	29 ¹	26 ¹	549,78 ¹	614,97 ¹	347,14 ¹	9712,76 ¹	11479,38 ¹	4975,76 ¹	4	1
200	30 ¹	20 ¹	13 ⁰	34 ¹	28 ¹	15 ⁰	801,11 ¹	439,82 ¹	153,15 ⁰	17090,26 ¹¹	7037,17 ¹	1429,42 ⁰	1	0
201	14 ⁰	***	***	12 ⁰	***	***	197,20 ⁰	***	***	2111,15 ⁰	***	***	1	0
202	22 ¹	17 ⁰	10 ⁰	27 ¹	26 ⁰	16 ⁰	466,52 ¹	347,14 ⁰	125,66 ⁰	7619,93 ¹	4975,76 ⁰	1089,10 ⁰	1	0
203	14 ⁰	17 ⁰	14 ⁰	28 ¹	26 ⁰	28 ¹	307,87 ⁰	347,14 ⁰	307,88 ⁰	4310,26 ⁰	4975,76 ⁰	4310,26 ⁰	1	0
204	27 ¹	28 ¹	24 ¹	28 ¹	31 ¹	32 ¹	593,76 ¹	681,72 ¹	603,18 ¹	10885,60 ¹	13407,27 ¹	11259,47 ¹	2	1
205	17 ⁰	16 ⁰	***	24 ⁰	20 ⁰	***	320,44 ⁰	251,33 ⁰	***	4379,38 ⁰	3015,93 ⁰	***	4	0
206	17 ⁰	23 ¹	20 ¹	17 ⁰	26 ⁰	26 ¹	226,98 ⁰	469,67 ¹	408,41 ¹	2572,44 ⁰	7671,24 ¹	6262,24 ¹	2	0
207	12 ⁰	13 ⁰	14 ⁰	17 ⁰	18 ⁰	17 ⁰	160,22 ⁰	183,78 ⁰	186,92 ⁰	1548,80 ⁰	1899,10 ⁰	1931,55 ⁰	1	0
208	15 ⁰	21 ¹	12 ⁰	19 ⁰	22 ⁰	25 ¹	223,84 ⁰	362,85 ⁰	235,62 ⁰	2536,83 ⁰	5200,91 ⁰	2905,97 ⁰	4	0
209	16 ⁰	16 ⁰	8 ⁰	25 ⁰	25 ⁰	20 ⁰	314,16 ⁰	314,16 ⁰	125,66 ⁰	4293,51 ⁰	4293,51 ⁰	1172,86 ⁰	2	0
210	21 ¹	23 ¹	16 ¹	28 ¹	28 ¹	29 ¹	461,81 ¹	505,80 ¹	364,42 ¹	7542,96 ¹	8598,54 ¹	5466,37 ¹	3	1
211	22 ¹	22 ¹	15 ⁰	27 ¹	27 ¹	31 ¹	466,53 ¹	466,53 ¹	365,21 ¹	7619,93 ¹	7619,93 ¹	5599,90 ¹	2	0
212	18 ⁰	19 ¹	17 ¹	33 ¹	38 ¹	25 ¹	466,52 ¹	567,06 ¹	333,79 ¹	7930,95 ¹	10774,09 ¹	4673,12 ⁰	3	1
213	21 ¹	17 ⁰	10 ⁰	27 ¹	26 ⁰	18 ⁰	445,32 ¹	347,14 ⁰	141,37 ⁰	7125,13 ¹	4975,76 ⁰	1319,47 ⁰	5	0
214	15 ⁰	14 ⁰	12 ⁰	17 ⁰	24 ⁰	14 ⁰	200,27 ⁰	263,90 ⁰	131,95 ⁰	2136,28 ⁰	3342,65 ⁰	1143,54 ⁰	2	0
215	19 ⁰	14 ⁰	***	24 ⁰	23 ⁰	***	358,14 ⁰	252,90 ⁰	***	5133,36 ⁰	3119,08 ⁰	***	1	0
216	19 ⁰	19 ⁰	17 ⁰	21 ⁰	21 ⁰	20 ⁰	313,37 ⁰	313,37 ⁰	267,03 ⁰	4178,32 ⁰	4178,32 ⁰	3293,44 ⁰	5	0
217	22 ¹	21 ¹	19 ¹	27 ¹	30 ¹	23 ⁰	466,53 ¹	494,80 ¹	343,22 ¹	7619,93 ¹	8411,61 ¹	4805,06 ¹	5	1
218	13 ⁰	13 ⁰	16 ¹	16 ⁰	16 ⁰	28 ¹	163,36 ⁰	163,36 ⁰	351,86 ¹	1579,17 ⁰	1579,17 ⁰	5160,59 ¹	2	1
219	21 ¹	19 ¹	16 ⁰	27 ¹	28 ¹	25 ¹	445,32 ¹	417,83 ¹	314,16 ⁰	7125,13 ¹	6546,03 ¹	4293,51 ⁰	3	0
220	19 ⁰	16 ⁰	***	21 ⁰	19 ⁰	***	313,37 ⁰	238,76 ⁰	***	4178,32 ⁰	2785,54 ⁰	***	4	0
221	24 ¹	26 ¹	***	27 ¹	32 ¹	***	508,94 ¹	653,45 ¹	***	8312,65 ¹	12633,39 ¹	***	1	0
222	13 ⁰	16 ⁰	12 ⁰	22 ⁰	32 ¹	23 ⁰	224,62 ⁰	402,12 ¹	216,77 ⁰	2620,61 ⁰	6433,98 ⁰	2528,98 ⁰	1	0
223	20 ¹	22 ¹	20 ¹	33 ¹	29 ¹	27 ¹	518,36 ¹	501,1 ¹	424,11 ¹	9157,74 ¹	8518,43 ¹	6644,47 ¹	2	0
224	8 ⁰	8 ⁰	8 ⁰	16 ⁰	16 ⁰	16 ⁰	100,53 ⁰	100,53 ⁰	100,53 ⁰	804,25 ⁰	804,25 ⁰	804,25 ⁰	2	0
225	20 ¹	18 ⁰	17 ¹	20 ⁰	24 ⁰	24 ⁰	314,16 ⁰	339,30 ⁰	320,44 ⁰	4188,79 ⁰	4750,10 ⁰	4379,38 ⁰	1	0
226	13 ⁰	16 ⁰	12 ⁰	33 ¹	25 ⁰	31 ¹	336,93 ⁰	314,16 ⁰	292,17 ⁰	5166,35 ⁰	4293,51 ⁰	4187,74 ⁰	4	0
227	18 ⁰	18 ⁰	21 ¹	27 ¹	25 ⁰	23 ⁰	381,70 ⁰	353,43 ⁰	379,35 ¹	5725,55 ⁰	5065,82 ⁰	5563,76 ¹	2	1
228	22 ¹	22 ¹	22 ¹	32 ¹	30 ¹	26 ¹	552,92 ¹	518,36 ¹	449,25 ¹	9952,56 ¹	8984,95 ¹	7187,96 ¹	2	1
229	7 ⁰	11 ⁰	13 ⁰	11 ⁰	16 ⁰	14 ⁰	60,47 ⁰	138,23 ⁰	142,94 ⁰	362,85 ⁰	1244,10 ⁰	1286,48 ⁰	2	0
230	17 ⁰	12 ⁰	16 ⁰	21 ⁰	12 ⁰	16 ⁰	280,39 ⁰	113,10 ⁰	201,06 ⁰	3551,57 ⁰	904,78 ⁰	2144,66 ⁰	6	0
231	20 ¹	20 ¹	13 ⁰	26 ⁰	26 ⁰	14 ⁰	408,41 ¹	408,41 ¹	142,94 ⁰	6262,24 ⁰	6262,24 ⁰	1286,50 ⁰	2	0
232	15 ⁰	15 ⁰	16 ⁰	23 ⁰	23 ⁰	20 ⁰	270,96 ⁰	270,96 ⁰	251,33 ⁰	3432,16 ⁰	3432,16 ⁰	3015,93 ⁰	3	0
233	20 ¹	20 ¹	20 ¹	28 ¹	28 ¹	24 ⁰	439,82 ¹	439,82 ¹	377,00 ¹	7037,17 ¹	7037,17 ¹	5529,20 ¹	3	1
234	15 ⁰	15 ⁰	22 ¹	16 ⁰	16 ⁰	27 ¹	188,49 ⁰	188,49 ⁰	466,53 ¹	1947,79 ⁰	1947,80 ⁰	7619,93 ¹	3	0
235	22 ¹	22 ¹	11 ⁰	22 ⁰	22 ⁰	25 ¹	380,13 ⁰	380,13 ⁰	216,00 ⁰	5575,30 ⁰	5575,30 ⁰	2592,00 ⁰	5	0
236	12 ⁰	12 ⁰	11 ⁰	32 ¹	32 ¹	19 ⁰	301,60 ⁰	301,60 ⁰	164,15 ⁰	4423,36 ⁰	4423,36 ⁰	1641,48 ⁰	5	0
237	12 ⁰	12 ⁰	19 ¹	14 ⁰	14 ⁰	20 ⁰	131,95 ⁰	132,00 ⁰	298,45 ⁰	1143,54 ⁰	1143,50 ⁰	3879,87 ⁰	5	0
238	25 ¹	24 ¹	19 ¹	27 ¹	26 ¹	25 ¹	530,14 ¹	490,10 ¹	373,06 ¹	9189,16 ¹	8168,14 ¹	5471,61 ¹	4	1
239	13 ⁰	14 ⁰	13 ⁰	21 ⁰	22 ⁰	21 ⁰	214,41 ⁰	241,90 ⁰	214,41 ⁰	2430,02 ⁰	2902,83 ⁰	2430,02 ⁰	3	0
240	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	2	0
241	23 ¹	21 ¹	21 ¹	26 ⁰	30 ¹	30 ¹	469,67 ¹	494,80 ¹	494,80 ¹	7671,24 ¹	8411,61 ¹	8411,61 ¹	3	1
242	16 ⁰	17 ⁰	14 ⁰	21 ⁰	18 ⁰	17 ⁰	263,90 ⁰	240,33 ⁰	186,92 ⁰	3254,70 ⁰	2803,90 ⁰	1931,55 ⁰	1	0
243	19 ¹	20 ¹	18 ¹	28 ¹	28 ¹	27 ¹	417,84 ¹	439,82 ¹	381,70 ¹	6546,03 ¹	7037,17 ¹	5725,55 ¹	1	0
244	23 ¹	23 ¹	20 ¹	30 ¹	28 ¹	26 ¹	541,92 ¹	505,80 ¹	408,41 ¹	9574,00 ¹	8598,54 ¹	6262,24 ¹	2	1
245	14 ⁰	18 ⁰	15 ⁰	21 ⁰	25 ⁰	24 ⁰	230,91 ⁰	353,43 ⁰	282,74 ⁰	2693,91 ⁰	5065,82 ⁰	3675,66 ⁰	3	1
246	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	2	0
247	11 ⁰	13 ⁰	13 ⁰	28 ¹	22 ⁰	20 ⁰	241,90 ⁰	224,62 ⁰	204,20 ⁰	3144,73 ⁰	2620,61 ⁰	2246,24 ⁰	6	0

Anexo**Continuación tabla n° 67**

248	20 ¹	23 ¹	22 ¹	25 ⁰	28 ¹	27 ¹	392,70 ⁰	505,80 ¹	466,53 ¹	5890,5 ⁰	8598,54 ¹	7619,93 ¹	1	1
249	21 ¹	19 ¹	20 ¹	25 ⁰	27 ¹	26 ¹	412,33 ¹	402,91 ¹	408,41 ¹	6322,45 ⁰	6177,94 ⁰	6262,24 ¹	1	1
250	20 ¹	20 ¹	18 ¹	29 ¹	29 ¹	29 ¹	455,53 ¹	455,53 ¹	410,00 ¹	7440,34 ¹	7440,34 ¹	6423,00 ¹	5	1
251	24 ¹	24 ¹	19 ¹	29 ¹	29 ¹	26 ¹	546,64 ¹	546,64 ¹	388,00 ¹	9657,25 ¹	9657,25 ¹	5819,80 ¹	2	0
252	17 ⁰	19 ¹	21 ¹	27 ¹	26 ⁰	25 ¹	360,50 ⁰	388,00 ⁰	412,33 ¹	5287,3 ⁰	5819,80 ⁰	6322,45 ¹	1	0
253	24 ¹	23 ¹	19 ¹	28 ¹	28 ¹	28 ¹	527,79 ¹	505,80 ¹	417,83 ¹	9148,32 ¹	8598,54 ¹	6546,03 ¹	3	0
254	19 ¹	15 ⁰	21 ¹	30 ¹	29 ¹	26 ¹	447,68 ¹	341,65 ⁰	428,83 ¹	7312,06 ¹	5010,84 ⁰	6718,30 ¹	3	0
255	20 ¹	20 ¹	20 ¹	31 ¹	31 ¹	25 ¹	486,95 ¹	486,95 ¹	392,70 ¹	8278,10 ¹	8278,10 ¹	5890,50 ¹	4	0
256	17 ⁰	17 ⁰	17 ¹	27 ¹	29 ¹	26 ¹	360,50 ⁰	387,20 ⁰	347,14 ¹	5287,30 ⁰	5937,10 ⁰	4975,76 ¹	3	1
257	18 ⁰	16 ⁰	20 ¹	33 ¹	33 ¹	29 ¹	466,53 ¹	414,70 ¹	455,53 ¹	7930,95 ¹	6773,30 ¹	7440,34 ¹	1	1
258	12 ⁰	9 ⁰	16 ⁰	25 ⁰	26 ⁰	18 ⁰	235,62 ⁰	183,80 ⁰	226,20 ⁰	2905,97 ⁰	2144,14 ⁰	2563,54 ⁰	1	1
259	18 ⁰	19 ¹	14 ⁰	24 ⁰	26 ⁰	26 ¹	339,30 ⁰	388,00 ⁰	285,88 ⁰	4750,10 ⁰	5819,80 ⁰	3811,80 ⁰	4	0
260	21 ¹	18 ⁰	17 ¹	31 ¹	29 ¹	27 ¹	511,30 ¹	410,00 ¹	360,50 ¹	8862,40 ¹	6423,00 ⁰	5287,30 ¹	4	1
261	19 ¹	20 ¹	19 ¹	29 ¹	27 ¹	25 ¹	432,75 ¹	424,11 ¹	373,10 ¹	6924,10 ¹	6644,47 ¹	5471,60 ¹	3	1
262	17 ⁰	21 ⁰	16 ⁰	25 ⁰	21 ⁰	18 ⁰	333,80 ⁰	346,36 ⁰	226,20 ⁰	4673,11 ⁰	4849,05 ⁰	2563,54 ⁰	5	0
263	20 ⁰	20 ⁰	16 ⁰	22 ⁰	22 ⁰	20 ⁰	345,60 ⁰	345,60 ⁰	251,30 ⁰	4838,05 ⁰	4838,05 ⁰	3016,00 ⁰	1	0
264	18 ⁰	20 ¹	16 ⁰	20 ⁰	28 ¹	22 ⁰	282,74 ⁰	439,82 ¹	276,50 ⁰	3581,41 ⁰	7037,17 ¹	3501,80 ⁰	8	0
265	21 ¹	22 ¹	22 ¹	27 ¹	35 ¹	26 ¹	445,32 ¹	604,70 ¹	449,25 ¹	7125,13 ¹	11490,40 ¹	7188,00 ¹	3	1
266	21 ¹	23 ¹	15 ⁰	27 ¹	37 ¹	23 ⁰	445,32 ¹	668,40 ¹	271,00 ⁰	7125,13 ¹	13367,50 ¹	3432,20 ⁰	4	1
267	14 ⁰	16 ⁰	14 ⁰	17 ⁰	17 ⁰	18 ⁰	187,00 ⁰	213,60 ⁰	198,00 ⁰	1931,00 ⁰	2350,00 ⁰	2111,15 ⁰	4	0
268	15 ⁰	15 ⁰	17 ⁰	21 ⁰	18 ⁰	23 ⁰	247,40 ⁰	212,10 ⁰	307,10 ⁰	2969,00 ⁰	2332,63 ⁰	4094,54 ⁰	3	0
269	20 ¹	18 ⁰	14 ⁰	22 ⁰	20 ⁰	16 ⁰	345,60 ⁰	282,74 ⁰	175,93 ⁰	4832,10 ⁰	3511,41 ⁰	1759,30 ⁰	2	0
270	30 ¹	25 ¹	22 ¹	31 ¹	30 ¹	32 ¹	730,42 ¹	589,05 ¹	552,92 ¹	14852,00 ¹	10799,22 ¹	9952,56 ¹	4	1
271	22 ¹	25 ¹	18 ¹	27 ¹	33 ¹	27 ¹	466,52 ¹	647,95 ¹	381,70 ¹	7619,93 ¹	12517,10 ¹	5725,55 ¹	2	1
272	17 ⁰	20 ¹	14 ⁰	25 ⁰	25 ⁰	18 ⁰	333,80 ⁰	392,70 ⁰	197,92 ⁰	4673,12 ⁰	5890,50 ⁰	2111,15 ⁰	2	1
273	16 ⁰	14 ⁰	14 ⁰	26 ⁰	15 ⁰	17 ⁰	326,72 ⁰	165,00 ⁰	187,00 ⁰	4574,16 ⁰	1594,36 ⁰	1931,55 ⁰	2	0
274	18 ⁰	18 ⁰	13 ⁰	27 ¹	25 ⁰	14 ⁰	381,70 ⁰	353,43 ⁰	142,94 ⁰	5725,55 ⁰	5065,82 ⁰	1286,48 ⁰	2	0
275	19 ¹	20 ¹	18 ¹	29 ¹	38 ¹	33 ¹	432,75 ¹	596,90 ¹	466,53 ¹	6924,07 ¹	11540,12 ¹	7930,95 ¹	6	1
276	19 ¹	19 ¹	18 ¹	42 ¹	39 ¹	28 ¹	626,75 ¹	582,00 ¹	395,84 ¹	12743,90 ¹	11251,61 ¹	6069,55 ¹	4	1
277	10 ⁰	12 ⁰	12 ⁰	26 ⁰	18 ⁰	13 ⁰	204,20 ⁰	169,65 ⁰	122,52 ⁰	2450,44 ⁰	1696,46 ⁰	1021,02 ⁰	2	0
278	22 ¹	20 ¹	16 ⁰	27 ¹	29 ¹	26 ¹	466,52 ¹	455,53 ¹	326,72 ⁰	7619,93 ¹	7440,34 ¹	4574,60 ⁰	3	1
279	27 ¹	23 ¹	20 ¹	32 ¹	34 ¹	31 ¹	678,58 ¹	614,18 ¹	486,95 ¹	13345,48 ¹	11669,44 ¹	8278,10 ¹	2	1
280	26 ¹	20 ¹	18 ¹	30 ¹	27 ¹	26 ¹	612,61 ¹	424,11 ¹	367,57 ¹	11435,40 ¹	6644,47 ¹	5390,97 ¹	2	1
281	19 ¹	26 ¹	19 ¹	29 ¹	29 ¹	30 ¹	432,75 ¹	592,19 ¹	447,68 ¹	6924,07 ¹	10856,00 ¹	7312,06 ¹	3	1
282	27 ¹	19 ¹	21 ¹	30 ¹	30 ¹	25 ¹	636,17 ¹	447,68 ¹	412,33 ¹	12087,28 ¹	7312,06 ¹	6322,45 ¹	3	1
283	18 ⁰	18 ⁰	10 ⁰	19 ⁰	19 ⁰	13 ⁰	268,61 ⁰	268,61 ⁰	102,10 ⁰	3312,81 ⁰	3312,81 ⁰	782,800 ⁰	4	0
284	17 ⁰	19 ¹	21 ¹	27 ¹	26 ⁰	25 ¹	360,50 ⁰	388,00 ⁰	412,33 ¹	5287,30 ⁰	5819,80 ⁰	6322,45 ¹	1	0
285	16 ⁰	17 ⁰	14 ⁰	20 ⁰	23 ⁰	24 ⁰	251,33 ⁰	307,10 ⁰	263,90 ⁰	3016,00 ⁰	4094,54 ⁰	3342,65 ⁰	4	0
286	15 ⁰	19 ¹	17 ¹	17 ⁰	34 ¹	32 ¹	200,30 ⁰	507,37 ¹	427,26 ¹	2136,30 ⁰	8963,50 ¹	6978,52 ¹	4	1
287	16 ⁰	17 ⁰	16 ⁰	21 ⁰	23 ⁰	22 ⁰	263,90 ⁰	307,10 ⁰	276,46 ⁰	3254,70 ⁰	4094,53 ⁰	3501,83 ⁰	4	0
288	12 ⁰	13 ⁰	14 ⁰	13 ⁰	13 ⁰	21 ⁰	122,52 ⁰	132,73 ⁰	230,91 ⁰	1021,02 ⁰	1150,35 ⁰	2693,91 ⁰	3	0
289	18 ⁰	18 ⁰	17 ¹	18 ⁰	22 ⁰	18 ⁰	254,50 ⁰	311,02 ⁰	240,33 ⁰	3053,63 ⁰	4146,90 ⁰	2803,87 ⁰	4	1
290	18 ⁰	17 ⁰	17 ¹	26 ⁰	21 ⁰	18 ⁰	367,57 ⁰	280,39 ⁰	240,33 ⁰	5390,97 ⁰	3551,60 ⁰	2803,87 ⁰	5	0
291	16 ⁰	17 ⁰	19 ¹	20 ⁰	28 ¹	25 ¹	251,33 ⁰	373,85 ⁰	373,06 ¹	3015,96 ⁰	5607,74 ⁰	5471,61 ¹	4	0
292	11 ⁰	17 ⁰	14 ⁰	23 ⁰	21 ⁰	19 ⁰	198,70 ⁰	280,39 ⁰	208,91 ⁰	2251,93 ⁰	3551,57 ⁰	2298,07 ⁰	4	0
293	10 ⁰	11 ⁰	7 ⁰	22 ⁰	12 ⁰	19 ⁰	172,79 ⁰	103,67 ⁰	104,46 ⁰	1843,09 ⁰	794,82 ⁰	905,300 ⁰	2	0
294	16 ⁰	10 ⁰	10 ⁰	19 ⁰	10 ⁰	10 ⁰	238,76 ⁰	78,54 ⁰	78,54 ⁰	2785,53 ⁰	523,60 ⁰	523,60 ⁰	2	1
295	12 ⁰	7 ⁰	12 ⁰	15 ⁰	24 ⁰	15 ⁰	141,37 ⁰	131,94 ⁰	141,37 ⁰	1272,33 ⁰	1363,45 ⁰	1272,33 ⁰	4	0
296	20 ¹	18 ⁰	20 ¹	34 ¹	31 ¹	31 ¹	534,07 ¹	438,25 ¹	486,95 ¹	9613,26 ¹	7158,08 ¹	8278,09 ¹	3	1
297	23 ¹	18 ⁰	18 ¹	30 ¹	31 ¹	26 ¹	541,92 ¹	438,25 ¹	367,57 ¹	9573,92 ¹	7158,08 ¹	5390,97 ¹	5	1
298	12 ⁰	12 ⁰	13 ⁰	17 ⁰	17 ⁰	15 ⁰	160,22 ⁰	160,22 ⁰	153,15 ⁰	1548,79 ⁰	1548,80 ⁰	1429,42 ⁰	4	0

299	20 ¹	23 ¹	25 ¹	34 ¹	35 ¹	30 ¹	534,07 ¹	632,24 ¹	589,05 ¹	9613,26 ¹	12223,41 ¹	10799,22 ¹	1	1
300	20 ¹	21 ¹	20 ¹	30 ¹	30 ¹	26 ¹	471,24 ¹	494,80 ¹	408,41 ¹	7854,00 ¹	8411,61 ¹	6262,24 ¹	3	1
301	11 ⁰	16 ⁰	13 ⁰	15 ⁰	24 ⁰	16 ⁰	129,59 ⁰	301,59 ⁰	163,36 ⁰	1123,11 ⁰	4021,24 ⁰	1579,17 ⁰	1	0
302	19 ¹	18 ⁰	17 ¹	34 ¹	34 ¹	32 ¹	507,37 ¹	480,66 ¹	427,26 ¹	8963,54 ¹	8331,50 ¹	6978,52 ¹	2	1

- **n**: número de vacas.
- **Dm**: diámetro menor del CL (mm).
- **DM**: diámetro mayor del CL (mm).
- **A**: área del tejido luteal (mm²).
- **V**: volumen luteal.
- **PA**: número de partos (lactaciones) de cada hembra.
- **P**: preñada (1).
- **NP**: no preñada (0).
- ⁰: En comparación con el parámetro discriminativo correspondiente indica que la vaca está no preñada.
- ¹: En comparación con el parámetro discriminativo correspondiente indica que la vaca está preñada.
- *******: no se realizó ningún seguimiento ecográfico.

Observaciones:

- Las vacas n° 23, 25, 32, 39, 48, 50, 53, 56, 77, 190 y 215, mostraron celo el día 21 post-IA, por lo que ese día no se las exploró.
- Las vacas n° 8, 150 y 221 (mostraron celo el día 20 post-IA), las vacas n° 22, 120 y 220 (presentaron celo el día 19 post-IA) y la vaca n° 205 (mostró celo el día 18 post-IA), por lo que no se exploraron el día 21.
- A las vacas 56, 57, 58, 59, 60 y 61, no se les hizo un seguimiento ecográfico los días 13 y 16, por una mala calidad de la imagen debido a una alta luminosidad ambiental.
- Las vacas n° 70 y n° 155 comprobamos un folículo de 22 mm de diámetro menor y 24 mm de diámetro mayor el día 13. El día 14 mostraron síntomas de celo, por lo que no se recogió ningún dato posterior.
- A la vaca n° 101 no se le realizó ninguna exploración ecográfica el día 21 post-IA, porque se interpretó (erróneamente) que la imagen ecográfica correspondía a un quiste luteínico y no a un CL.
- Vaca n° 128: presenta un folículo de 11mm de diámetro menor y 19 mm de diámetro mayor el día 21.
- Las vacas n° 135 y n° 156: se detecta un quiste folicular de 23 mm de diámetro menor y de 39mm de diámetro mayor el día 13 post-IA, por lo que no se siguió con la exploración ecográfica el resto de días.
- Vaca n° 145: se aprecia una estructura ecográfica dudosa de 17 mm de diámetro menor y de 21 mm de diámetro mayor el día 13 compatible con un diagnóstico de presencia folicular; por lo tanto, se aprecia un CL que no corresponde a la fecha de evolución anotada.
- Vaca n° 162: presenta un folículo de 12 mm de diámetro menor y 13 mm de diámetro mayor el día 21 post-IA.
- De las vacas n° 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172 y 173 no se recogieron los datos del día 21 post-IA por inclemencia ambiental.
- Vaca n° 201: muestra celo el día 16 post-IA, por lo que no se hicieron las exploraciones correspondientes a este día, ni el día 21.
- Vaca n° 240: se detecta un quiste folicular de 23 mm de diámetro menor y 43 mm de diámetro mayor el día 13 del ciclo, por lo que no se siguió con la exploración ecográfica.
- Vaca n° 246: diagnosticamos un quiste folicular de 24 mm de diámetro menor y 26 mm de diámetro mayor el día 13 del ciclo, por lo que no se siguió con las siguientes exploraciones ecográficas.

Anexo

Continuación tabla n° 67

♦ Tabla n° 68: Concentraciones de testosterona en sangre periférica de la madre en vacas vacías (muestras 1-20), preñadas entre 90 y 100 de gestación (muestras 21-30) y de 0 a 10 días paridas (muestras 31-40)

Muestra	ng/dl	nmol/L
1	0,000	0,000
2	0,000	0,000
3	0,000	0,000
4	0,000	0,000
5	0,000	0,000
6	0,000	0,000
7	0,000	0,000
8	0,000	0,000
9	0,000	0,000
10	0,000	0,000
11	0,000	0,000
12	0,000	0,000
13	0,000	0,000
14	0,000	0,000
15	3,830	0,130
16	0,000	0,000
17	0,161	0,005
18	0,000	0,000
19	1,110	0,030
20	0,068	0,002
21	26,20	0,910
22	13,30	0,460
23	18,00	0,620
24	23,40	0,810
25	23,00	0,800
26	7,380	0,250
27	27,20	0,940
28	31,60	1,090
29	13,30	0,460
30	0,964	0,030
31	0,000	0,000
32	0,000	0,000
33	0,000	0,000
34	0,000	0,000
35	0,000	0,000
36	0,000	0,000
37	0,000	0,000
38	0,000	0,000
39	0,000	0,000
40	0,000	0,000

♦ Tabla n° 69: Valores individualizados de la concentración de testosterona plasmática (ng/dl ó nmol/L) en relación con el sexo fetal y el n° de parto.

Muestra	ng/dL	nmol/L	Sexo	Nº de parto						
					46	18,0	0,6246	+	0	3
1	17,7	0,6142	♂	3	47	27,5	0,9543	♂	+	3
2	11,9	0,4129	♂	4	48	30,3	1,0514	+	+	5
3	8,6	0,2984	♂♀	1	49	24,0	0,8328	+	+	1
4	25,3	0,8779	♂	3	50	22,3	0,7738	♂	+	1
5	39,1	1,3568	♂	3	51	31,3	1,0861	+	+	0
6	46,2	1,6031	♂	1	52	66,4	2,3041	♂	+	3
7	13,9	0,4823	♂	1	53	23,4	0,8120	♂	+	2
8	20,7	0,7183	♀	1	54	41,5	1,4401	+	+	2
9	6,0	0,2082	♀	1	55	18,7	0,6489	+	+	1
10	25,0	0,8675	♂	2	56	8,8	0,3054	♂	+	1
11	26,7	0,9265	♂	3	57	5,9	0,2047	♂	+	1
12	14,5	0,5032	♂	4	58	27,9	0,9681	♂	+	1
13	7,4	0,2568	♀	6	59	14,7	0,5101	♂	+	6
14	20,6	0,7148	♂	4	60	15,9	0,5517	+	+	4
15	14,2	0,4927	♂	0	61	15,1	0,5240	+	+	1
16	36,2	1,2561	♂	0	62	10,2	0,3539	+	+	4
17	31,3	1,0861	+	0	63	23,3	0,8085	♂	+	3
18	14,6	0,5066	+	4	64	16,7	0,5795	+	+	1
19	11,0	0,3817	♂	2	65	21,6	0,7495	♂	+	0
20	25,7	0,8918	♂	3	66	11,4	0,3956	♂	+	2
21	20,5	0,7114	♂	3	67	11,0	0,3817	♂	+	1
22	20,0	0,6940	♂	2	68	13,8	0,4789	♂	+	1
23	8,8	0,3054	+	3	69	23,4	0,8120	+	+	1
24	5,8	0,2013	+	2	70	14,1	0,4893	♂	+	2
25	24,3	0,8432	♂	1	71	24,9	0,8640	♂	+	0
26	5,7	0,1978	♂	1	72	24,7	0,8571	♂	+	3
27	2,2	0,0763	+	1	73	10,7	0,3713	+	+	3
28	3,7	0,1284	♂	3	74	15,7	0,5448	♂	+	4
29	30,3	1,0514	♂	6	75	10,2	0,3539	+	+	7
30	18,7	0,6489	♂	1	76	31,5	1,0931	+	+	1
31	20,2	0,7009	+	1	77	22,6	0,7842	♂	+	5
32	21,8	0,7565	+	0	78	25,7	0,8918	+	+	1
33	15,1	0,5240	♂	0	79	27,6	0,9577	♂	+	1
34	32,1	1,1139	+	1	80	16,4	0,5691	+	+	4
35	9,60	0,3331	+	2	81	22,2	0,7703	♂	+	1
36	45,3	1,5719	♂	2	82	8,0	0,2776	+	+	4
37	11,5	0,3991	+	2	83	24,9	0,8640	♂	+	4
38	27,5	0,9543	+	3	84	29,1	1,0098	♂	+	4
39	17,2	0,5968	+	1	85	28,9	1,0028	♂	+	3
40	24,1	0,8363	♂	2	86	3,9	0,1353	+	+	1
41	37,9	1,3151	+	2	87	12,0	0,4164	♂	+	2
42	5,6	0,1943	+	2	88	14,0	0,4858	♂	+	1
43	7,7	0,2672	+	3	89	18,6	0,6454	♂	+	2
44	26,6	0,9230	+	1	90	11,9	0,4129	♂	+	1
45	4,7	0,1631	♂	4	91	12,6	0,4372	+	+	1

Anexo

92	15,2	0,5274	♀	3	144	13,2	0,4576	♂	3
93	31,4	1,0896	♂	0	145	17,6	0,6102	♂	0
94	18,2	0,6315	♀	7	146	11,7	0,4056	♀	0
95	5,6	0,1943	♀	2	147	0,29	0,0101	♂	1
96	5,7	0,1978	♂	2	148	4,26	0,1477	♀	2
97	14,6	0,5066	♀	1	149	33,0	1,1441	♂	0
98	6,1	0,2117	♀	4	150	14,4	0,4992	♂	6
99	7,0	0,2429	♂	4	151	10,3	0,3571	♂	2
100	26,7	0,9265	♀	5	152	0,0	0,0000	♀	5
101	12,2	0,4233	♂	1	153	13,5	0,4680	♂	3
102	9,70	0,3366	♀	1	154	4,7	0,1629	♀	2
103	23,1	0,8016	♂	5	155	3,5	0,1213	♂	1
104	5,7	0,1978	♂	2	156	2,6	0,0905	♀	3
105	5,9	0,2047	♀	2	157	4,09	0,1418	♂	2
106	19,5	0,6767	♂	1	158	30,9	1,0713	♂	1
107	15,8	0,5483	♀	3	159	13,0	0,4507	♀	3
108	8,0	0,2776	♂	1	160	22,3	0,7731	♀	1
109	2,7	0,0937	♀	1	161	15,5	0,5374	♀	1
110	3,2	0,1110	♀	4	162	60,1	2,0837	♂	0
111	9,0	0,3123	♀	2	163	7,4	0,2566	♂	4
112	15,2	0,5274	♂	2	164	5,97	0,2070	♀	2
113	11,8	0,4095	♂	2	165	2,05	0,0711	♀	1
114	5,2	0,1810	♂	1	166	4,4	0,1539	♂	1
115	30,1	1,0436	♀	2	167	37,7	1,3071	♂	0
116	10,3	0,3571	♀	2	168	14,1	0,4888	♀	2
117	16,1	0,5582	♂	1	169	4,05	0,1404	♂	3
118	25,5	0,8841	♀	1	170	30,3	1,0505	♀	4
119	15,3	0,5305	♀	3	171	10,6	0,3675	♂	4
120	8,08	0,2801	♂	3	172	11,8	0,4091	♀	4
121	48,0	1,6642	♂	0	173	8,73	0,3027	♂	0
122	32,5	1,1268	♂	0	174	17,1	0,5929	♀	2
123	33,3	1,1545	♀	0	175	14,2	0,4923	♀	2
124	25,1	0,8702	♂	0	176	3,77	0,1307	♀	2
125	24,0	0,8321	♂	2	177	23,1	0,8009	♂	2
126	2,91	0,1009	♀	2	178	11,4	0,3952	♀	4
127	14,6	0,5062	♀	1	179	6,64	0,2302	♀	4
128	41,7	1,4457	♂	4	180	23,6	0,8182	♀	1
129	0,0	0,0000	♀	1	181	5,96	0,2066	♀	2
130	8,0	0,2774	♀	2	182	27,6	0,9569	♀	3
131	0,0	0,0000	♀	1	183	15,0	0,5201	♀	5
132	4,05	0,1404	♀	3	184	10,5	0,3640	♂	2
133	20,8	0,7211	♂	4	185	18,2	0,6310	♂	2
134	9,9	0,3436	♂	4	186	27,7	0,9604	♀	0
135	14,0	0,4854	♀	1	187	35,2	1,2204	♀	0
136	0,06	0,0021	♂	1	188	32,6	1,1302	♂	0
137	16,0	0,5547	♀	1	189	29,9	1,0366	♂	3
138	5,5	0,1924	♂	3	190	29,0	1,0054	♂	2
139	13,7	0,4750	♀	6	191	4,8	0,1675	♀	3
140	0,16	0,0055	♂	3	192	6,3	0,2184	♀	2
141	2,65	0,0919	♀	1	193	0,4	0,0149	♂	1
142	0,67	0,0232	♂	2	194	3,1	0,1082	♀	1
143	14,3	0,4958	♂	4	195	18,4	0,6379	♀	4

196	17,6	0,6102	♂	1	248	0,0	0,0000	♂	1
197	8,42	0,2919	♂	1	249	7,38	0,2559	♂	4
198	11,6	0,4022	+	3	250	16,2	0,5616	♂	2
199	47,2	1,6364	+	1	251	26,6	0,9222	♂	2
200	0,52	0,0180	♂	4	252	7,37	0,2555	+	0
201	33,4	1,1580	+	2	253	25,6	0,8875	+	0
202	0,0	0,0000	♂	1	254	13,7	0,4750	+	0
203	8,46	0,2933	+	2	255	18,7	0,6483	♂	0
204	0,0	0,0000	+	1	256	5,79	0,2007	+	0
205	5,94	0,2059	+	5	257	18,8	0,6518	♂	0
206	20,3	0,7038	♂	6	258	12,8	0,4438	+	0
207	3,22	0,1116	+	2	259	9,09	0,3151	+	0
208	0,0	0,0000	+	3	260	13,1	0,4542	+	0
209	5,45	0,1890	♂	5	261	9,75	0,3380	+	0
210	1,53	0,0530	+	3	262	11,5	0,3987	+	0
211	19,7	0,6830	♂	6	263	19,2	0,6657	+	2
212	7,97	0,2763	+	1	264	22,2	0,7697	+	0
213	5,84	0,2025	♂	2	265	2,84	0,0985	+	2
214	0,0	0,0000	+	1	266	13,7	0,4750	♂	6
215	0,096	0,0033	+	3	267	16,1	0,5582	♂	5
216	1,70	0,0589	♂	4	268	6,06	0,2101	+	3
217	18,5	0,6414	♂	2	269	17,2	0,5963	♂	1
218	9,59	0,3325	+	1	270	28,0	0,9708	♂	0
219	0,048	0,0017	+	1	271	29,1	1,0089	♂	6
220	0,086	0,0030	+	1	272	19,2	0,6657	+	0
221	13,0	0,4507	+	3	273	25,7	0,8910	♂	2
222	10,4	0,3606	+	4	274	4,79	0,1661	+	1
223	4,95	0,1716	♂	1	275	11,5	0,3987	+	5
224	9,14	0,3169	+	2	276	25,2	0,8737	♂	0
225	3,79	0,1314	+	4	277	18,0	0,6241	♂	0
226	3,05	0,1057	♂	1	278	2,14	0,0742	♂	1
227	7,34	0,2545	♂	4	279	6,36	0,2205	+	5
228	0,0	0,0000	+	3	280	2,0	0,0693	+	2
229	0,0	0,0000	+	2	281	8,77	0,3041	♂	3
230	35,2	1,2204	♂	3	282	0,346	0,0120	+	4
231	18,5	0,6414	♂	1	283	1,37	0,0475	+	2
232	0,0	0,0000	+	1	284	9,69	0,3360	+	2
233	1,36	0,0472	+	1	285	3,21	0,1113	♂	3
234	11,2	0,3883	♂	1	286	1,55	0,5337	+	1
235	5,92	0,2052	+	3	287	5,59	0,1938	♂	2
236	10,2	0,3536	+	3	288	7,45	0,2583	+	2
237	0,33	0,0114	♂	3	289	10,7	0,3710	♂	3
238	0,0	0,0000	+	2	290	6,44	0,2233	♂	1
239	24,5	0,8494	♂	0	291	0,0	0,0000	♂	3
240	12,7	0,4403	+	0	292	17,8	0,6171	♂	3
241	25,5	0,8841	♂	0	293	8,14	0,2822	+	2
242	0,0	0,0000	+	0	294	54,9	1,9034	♂	4
243	10,5	0,3640	♂	2	295	8,14	0,2822	+	1
244	12,2	0,4230	♂	2	296	0,0	0,0000	+	1
245	0,731	0,0253	♂	1	297	3,28	0,1137	♂	1
246	1,77	0,0614	+	2	298	4,45	0,1543	+	5
247	3,30	0,1144	♂	1	299	0,0	0,0000	+	1

Anexo

300	0,0	0,0000	♀	3	306	12,0	0,4160	♀	2
301	15,2	0,5270	♂	1	307	7,98	0,2767	♀	2
302	35,0	1,2134	♂	0	308	3,44	0,1193	♀	2
303	21,9	0,7593	♀	0	309	15,7	0,5443	♂	2
304	7,24	0,2510	♀	3	310	31,2	1,0817	♂	0
305	5,62	0,1948	♂	3	311	18,7	0,6483	♂	0

♦ Tabla n° 70: Concentración (ng/dl) de la testosterona plasmática entre el día 90 y 100 de gestación para todas las hembras y su relación con la probabilidad de que el sexo fetal sea macho.

ng/dl	p(y=1)	3,12	0,37
0,00	0,34	3,20	0,37
0,00	0,34	3,21	0,37
0,00	0,34	3,22	0,37
0,00	0,34	3,28	0,37
0,00	0,34	3,30	0,37
0,00	0,34	3,44	0,38
0,00	0,34	3,50	0,38
0,00	0,34	3,70	0,38
0,00	0,34	3,77	0,38
0,00	0,34	3,79	0,38
0,00	0,34	3,90	0,38
0,00	0,34	4,05	0,38
0,00	0,34	4,05	0,38
0,00	0,34	4,09	0,38
0,00	0,34	4,26	0,38
0,00	0,34	4,44	0,39
0,00	0,34	4,45	0,39
0,04	0,34	4,70	0,39
0,06	0,34	4,70	0,39
0,08	0,34	4,79	0,39
0,16	0,34	4,83	0,39
0,29	0,34	4,95	0,39
0,33	0,34	5,22	0,39
0,34	0,34	5,45	0,40
0,43	0,35	5,55	0,40
0,52	0,35	5,59	0,40
0,67	0,35	5,60	0,40
0,73	0,35	5,60	0,40
1,36	0,35	5,62	0,40
1,37	0,35	5,70	0,40
1,53	0,36	5,70	0,40
1,55	0,36	5,70	0,40
1,70	0,36	5,79	0,40
1,77	0,36	5,80	0,40
2,00	0,36	5,84	0,40
2,05	0,36	5,90	0,40
2,19	0,36	5,90	0,40
2,20	0,36	5,92	0,40
2,61	0,37	5,94	0,40
2,65	0,37	5,96	0,40
2,70	0,37	5,97	0,40
2,84	0,37	6,00	0,40
2,91	0,37	6,06	0,40
3,05	0,37	6,10	0,40

Anexo

6,30	0,41	11,50	0,46
6,36	0,40	11,50	0,46
6,44	0,41	11,50	0,46
6,64	0,41	11,60	0,46
7,00	0,41	11,70	0,46
7,24	0,42	11,80	0,47
7,34	0,42	11,80	0,47
7,37	0,42	11,90	0,47
7,38	0,42	11,90	0,47
7,40	0,42	12,00	0,47
7,40	0,42	12,00	0,47
7,45	0,42	12,20	0,47
7,70	0,42	12,20	0,47
7,97	0,42	12,60	0,47
7,98	0,42	12,70	0,48
8,00	0,42	12,80	0,48
8,00	0,42	13,00	0,48
8,00	0,42	13,00	0,48
8,14	0,43	13,10	0,48
8,14	0,43	13,20	0,48
8,42	0,43	13,50	0,48
8,46	0,43	13,70	0,49
8,73	0,43	13,70	0,49
8,77	0,43	13,70	0,49
8,80	0,43	13,80	0,49
8,80	0,43	13,90	0,49
8,80	0,43	14,00	0,49
9,00	0,43	14,00	0,49
9,09	0,44	14,10	0,49
9,14	0,44	14,10	0,49
9,59	0,44	14,00	0,49
9,60	0,44	14,20	0,49
9,69	0,44	14,30	0,49
9,70	0,44	14,40	0,49
9,75	0,44	14,50	0,50
9,91	0,44	14,60	0,50
10,20	0,45	14,60	0,50
10,20	0,45	14,60	0,50
10,20	0,45	14,70	0,50
10,30	0,45	15,00	0,50
10,30	0,45	15,10	0,50
10,40	0,45	15,10	0,50
10,50	0,45	15,20	0,50
10,50	0,45	15,20	0,50
10,60	0,45	15,20	0,50
10,70	0,45	15,30	0,50
10,70	0,45	15,50	0,51
11,00	0,46	15,70	0,51
11,00	0,46	15,70	0,51
11,20	0,46	15,80	0,51
11,40	0,46	15,90	0,51
11,40	0,46	16,00	0,51

16,10	0,51	24,10	0,60
16,10	0,51	24,30	0,60
16,20	0,51	24,50	0,60
16,40	0,52	24,90	0,61
16,70	0,52	24,90	0,61
17,10	0,52	25,00	0,61
17,20	0,52	25,10	0,61
17,20	0,52	25,20	0,61
17,60	0,53	25,30	0,61
17,60	0,53	25,50	0,61
17,70	0,53	25,50	0,61
17,80	0,53	25,60	0,61
18,00	0,53	25,70	0,62
18,00	0,53	25,70	0,62
18,20	0,54	25,70	0,62
18,20	0,54	26,60	0,63
18,40	0,54	26,60	0,63
18,50	0,54	26,70	0,63
18,50	0,54	26,70	0,63
18,60	0,54	27,50	0,63
18,70	0,54	27,50	0,63
18,70	0,54	27,60	0,64
18,70	0,54	27,60	0,64
18,70	0,54	27,70	0,64
18,80	0,54	27,90	0,64
19,20	0,55	28,00	0,64
19,20	0,55	28,90	0,65
19,50	0,55	29,00	0,65
19,70	0,55	29,10	0,65
20,00	0,55	29,10	0,65
20,20	0,56	29,90	0,66
20,30	0,56	30,10	0,66
20,50	0,56	30,30	0,66
20,60	0,56	30,30	0,66
20,70	0,56	30,30	0,66
20,80	0,56	30,90	0,67
21,60	0,57	31,20	0,67
21,80	0,57	31,30	0,67
21,90	0,58	31,30	0,67
22,20	0,58	31,40	0,67
22,20	0,58	31,50	0,67
22,30	0,58	32,10	0,68
22,30	0,58	32,50	0,68
22,60	0,58	32,60	0,68
23,10	0,59	33,00	0,69
23,10	0,59	33,30	0,69
23,30	0,59	33,40	0,69
23,40	0,59	35,00	0,71
23,40	0,59	35,20	0,71
23,60	0,59	35,20	0,71
24,00	0,60	36,20	0,72
24,00	0,60	37,70	0,73

Anexo

37,90	0,73	47,20	0,80
39,10	0,74	48,00	0,81
41,50	0,76	54,90	0,85
41,70	0,76	60,10	0,88
45,30	0,79	66,40	0,91
46,20	0,80		

♦ Tabla n° 71: Concentración (ng/dl) de la testosterona plasmática entre el día 90 y 100 de gestación para las novillas y su relación con la probabilidad de que el sexo fetal sea macho.

ng/dl	P(y=1)
0,00	0,13
5,79	0,21
7,37	0,23
8,73	0,25
9,09	0,26
9,75	0,27
11,50	0,31
11,70	0,31
12,70	0,33
12,80	0,33
13,10	0,34
13,70	0,35
14,20	0,36
15,10	0,38
17,60	0,44
18,00	0,44
18,70	0,46
18,70	0,46
18,80	0,46
19,20	0,47
21,60	0,53
21,80	0,53
21,90	0,53
22,20	0,54
24,50	0,59
24,90	0,60
25,10	0,61
25,20	0,61
25,50	0,62
25,60	0,62
27,70	0,66
28,00	0,67
31,20	0,73
31,30	0,73
31,30	0,73
31,40	0,73
32,50	0,75
32,60	0,75
330	0,76
33,30	0,77
350	0,79
35,20	0,80
36,20	0,81
37,70	0,83
48,00	0,93
60,10	0,97

Anexo**◆ Tabla n° 72: Concentración (ng/dl) de la testosterona plasmática entre el día 90 y 100 de gestación para las vacas de segunda lactación y su relación con la probabilidad de que el sexo fetal sea macho**

ng/dl	P(y=1)	10,30	0,41
0,00	0,26	10,50	0,41
0,00	0,26	10,50	0,41
0,67	0,27	11,00	0,42
1,37	0,28	11,40	0,43
1,77	0,28	11,50	0,43
2,00	0,29	11,80	0,43
2,84	0,30	12,00	0,44
2,91	0,30	12,00	0,44
3,22	0,30	12,20	0,44
3,44	0,31	14,10	0,47
3,77	0,31	14,10	0,47
4,09	0,31	14,20	0,47
4,26	0,32	15,20	0,49
4,70	0,32	15,70	0,50
5,59	0,27	16,20	0,51
5,60	0,34	17,10	0,52
5,60	0,34	18,20	0,54
5,70	0,34	18,50	0,54
5,70	0,34	18,60	0,54
5,80	0,34	19,20	0,55
5,84	0,34	20,00	0,57
5,90	0,34	23,10	0,62
5,96	0,34	23,40	0,62
5,97	0,34	24,00	0,63
6,30	0,35	24,10	0,63
7,45	0,36	25,00	0,65
7,98	0,37	25,70	0,66
8,00	0,37	26,60	0,67
8,14	0,37	29,00	0,70
8,46	0,38	30,10	0,72
9,00	0,39	33,40	0,76
9,14	0,39	37,90	0,81
9,60	0,40	41,50	0,84
9,69	0,40	45,30	0,87
10,3	0,41		

♦ Tabla n° 73: Concentración (ng/dl) de la testosterona plasmática entre el día 90 y 100 de gestación para las vacas de tercera lactación y su relación con la probabilidad de que el sexo fetal sea macho.

ng/dl	P(y=1)
0,00	0,33
0,00	0,33
0,00	0,33
0,00	0,33
0,33	0,34
1,53	0,35
2,61	0,37
3,21	0,38
3,70	0,38
4,05	0,39
4,05	0,39
4,83	0,40
5,55	0,41
5,62	0,41
5,92	0,42
6,06	0,42
7,24	0,44
7,70	0,44
8,77	0,46
8,80	0,46
8,80	0,46
10,20	0,48
10,70	0,49
10,70	0,49
11,60	0,50
13,00	0,53
13,00	0,53
13,20	0,53
13,50	0,53
15,20	0,56
15,30	0,56
15,80	0,57
17,70	0,60
17,80	0,60
18,00	0,60
20,50	0,64
23,30	0,68
25,30	0,70
25,70	0,71
26,70	0,72
27,50	0,73
27,50	0,73
27,60	0,73
28,90	0,75

Anexo

29,90	0,76
35,20	0,81
39,10	0,85
66,40	0,97

♦ **Tabla n° 74: Concentración (ng/dl) de la testosterona plasmática entre el día 90 y 100 de gestación para las vacas de cuarta ó más lactación y su relación con la probabilidad de que el sexo fetal sea macho.**

ng/dl	P(y=1)		
		11,90	0,47
0,00	0,29	13,70	0,50
0,16	0,29	13,70	0,50
0,34	0,30	14,30	0,51
0,52	0,30	14,40	0,51
1,70	0,32	14,50	0,51
3,20	0,34	14,60	0,52
3,28	0,34	14,70	0,52
3,79	0,35	15,00	0,52
4,45	0,36	15,70	0,53
4,70	0,36	15,90	0,54
5,45	0,37	16,10	0,54
5,94	0,38	16,40	0,54
6,10	0,38	18,20	0,57
6,36	0,38	18,40	0,58
6,64	0,39	19,70	0,60
7,00	0,39	20,30	0,61
7,34	0,40	20,60	0,61
7,38	0,40	20,80	0,61
7,40	0,40	22,60	0,64
7,40	0,40	23,10	0,65
8,00	0,41	24,90	0,68
9,91	0,44	26,70	0,70
10,20	0,44	29,10	0,73
10,20	0,44	29,10	0,73
10,40	0,45	30,30	0,75
10,60	0,45	30,30	0,75
11,40	0,46	30,30	0,75
11,50	0,47	41,70	0,86
11,80	0,47	54,90	0,94

Anexo

♦ Tabla n° 75: Probabilidad de sexo macho para el feto según la concentración de testosterona en la sangre periférica de la madre (90 y 100 días de gestación), en tramos de 0,5 ng/dl entre valores de 0 y 70 ng/dl de acuerdo con el n° de parto.

ng/dl	P(y=1)1p	P(y=1)Total	P(y=1)0p	P(y=1)2p	P(y=1)3p	P(y=1)4ó+p
0	0,48224625	0,34199571	0,13305840	0,26005931	0,33215796	0,29264812
0,5	0,48199641	0,34696669	0,13845828	0,26646362	0,33907446	0,29942514
1	0,48174658	0,35197128	0,14404089	0,27296747	0,34606035	0,30629115
1,5	0,48149676	0,35700858	0,14980945	0,27956955	0,35311328	0,31324400
2	0,48124695	0,36207770	0,15576700	0,28626845	0,36023077	0,32028221
2,5	0,48099715	0,36717770	0,16191634	0,29306256	0,36741023	0,32740297
3	0,48074736	0,37230760	0,16826005	0,29995016	0,37464900	0,33460411
3,5	0,48049758	0,37746642	0,17480047	0,30692935	0,38194427	0,34188313
4	0,48024781	0,38265315	0,18153963	0,31399809	0,38929316	0,34923739
4,5	0,47999804	0,38786675	0,18847927	0,32115419	0,39669270	0,35666411
5	0,47974829	0,39310615	0,19562078	0,32839531	0,40413981	0,36416039
5,5	0,47949855	0,39837026	0,20296520	0,33571896	0,41163134	0,37172318
6	0,47924882	0,40365798	0,21051321	0,34312248	0,41916405	0,37934933
6,5	0,47899909	0,40896817	0,21826504	0,35060311	0,42673463	0,38703556
7	0,47874938	0,41429969	0,22622053	0,35815790	0,43433969	0,39477846
7,5	0,47849968	0,41965137	0,23437905	0,36578378	0,44197579	0,40257453
8	0,47824999	0,42502200	0,24273950	0,37347756	0,44963943	0,41042016
8,5	0,47800031	0,43041040	0,25130029	0,38123588	0,45732705	0,41831162
9	0,47775064	0,43581533	0,26005931	0,38905529	0,46503505	0,42624512
9,5	0,47750099	0,44123556	0,26901393	0,39693220	0,47275978	0,43421677
10	0,47725134	0,44666982	0,27816097	0,40486291	0,48049758	0,44222260
10,5	0,47700171	0,45211686	0,28749671	0,41284359	0,48824474	0,45025856
11	0,47675208	0,45757540	0,29701685	0,42087034	0,49599756	0,45832056
11,5	0,47650247	0,46304414	0,30671653	0,42893915	0,50375230	0,46640445
12	0,47625287	0,46852178	0,31659032	0,43704590	0,51150524	0,47450601
12,5	0,47600328	0,47400702	0,32663222	0,44518643	0,51925264	0,48262102
13	0,47575371	0,47949855	0,33683564	0,45335648	0,52699080	0,49074521
13,5	0,47550415	0,48499503	0,34719345	0,46155173	0,53471601	0,49887429
14	0,47525459	0,49049514	0,35769798	0,46976781	0,54242460	0,50700396
14,5	0,47500505	0,49599756	0,36834099	0,47800031	0,55011293	0,51512994
15	0,47475553	0,50150094	0,37911377	0,48624478	0,55777740	0,52324792
15,5	0,47450601	0,50700396	0,39000708	0,49449675	0,56541445	0,53135363
16	0,47425651	0,51250529	0,40101124	0,50275171	0,57302057	0,53944284
16,5	0,47400702	0,51800359	0,41211611	0,51100517	0,58059231	0,54751132
17	0,47375755	0,52349753	0,42331118	0,51925264	0,58812629	0,55555490
17,5	0,47350809	0,52898579	0,43458555	0,52748963	0,59561920	0,56356948
18	0,47325864	0,53446705	0,44592800	0,53571168	0,60306780	0,57155099
18,5	0,47300920	0,53994000	0,45732705	0,54391436	0,61046892	0,57949545
19	0,47275978	0,54540333	0,46877096	0,55209329	0,61781949	0,58739894
19,5	0,47251037	0,55085576	0,48024781	0,56024413	0,62511654	0,59525764
20	0,47226098	0,55629599	0,49174554	0,56836261	0,63235717	0,60306780
20,5	0,47201160	0,56172275	0,50325201	0,57644453	0,63953859	0,61082578
21	0,47176223	0,56713479	0,51475503	0,58448575	0,64665812	0,61852804
21,5	0,47151288	0,57253085	0,52624245	0,59248223	0,65371317	0,62617117
22	0,47126354	0,57790971	0,53770215	0,60043002	0,66070126	0,63375183
22,5	0,47101421	0,58327016	0,54912216	0,60832528	0,66762004	0,64126683

23	0,47076490	0,58861098	0,56049064	0,61616426	0,67446724	0,64871311
23,5	0,47051561	0,59393101	0,57179601	0,62394334	0,68124074	0,65608772
24	0,47026633	0,59922909	0,58302692	0,63165901	0,68793851	0,66338785
24,5	0,47001706	0,60450407	0,59417232	0,63930789	0,69455864	0,67061081
25	0,46976781	0,60975484	0,60522154	0,64688672	0,70109935	0,67775407
25,5	0,46951857	0,61498030	0,61616426	0,65439240	0,70755897	0,68481523
26	0,46926935	0,62017937	0,62699060	0,66182194	0,71393595	0,69179202
26,5	0,46902015	0,62535100	0,63769114	0,66917251	0,72022886	0,69868233
27	0,46877096	0,63049418	0,64825692	0,67644143	0,72643638	0,70548418
27,5	0,46852178	0,63560789	0,65867950	0,68362613	0,73255732	0,71219573
28	0,46827262	0,64069116	0,66895096	0,69072425	0,73859058	0,71881530
28,5	0,46802348	0,64574304	0,67906392	0,69773352	0,74453520	0,72534133
29	0,46777435	0,65076261	0,68901157	0,70465187	0,75039032	0,73177242
29,5	0,46752524	0,65574897	0,69878765	0,71147734	0,75615519	0,73810730
30	0,46727615	0,66070126	0,70838648	0,71820816	0,76182919	0,74434483
30,5	0,46702707	0,66561864	0,71780296	0,72484269	0,76741176	0,75048402
31	0,46677801	0,67050028	0,72703253	0,73137943	0,77290249	0,75652401
31,5	0,46652896	0,67534543	0,73607124	0,73781705	0,77830105	0,76246406
32	0,46627994	0,68015331	0,74491566	0,74415436	0,78360720	0,76830359
32,5	0,46603092	0,68492321	0,75356292	0,75039032	0,78882081	0,77404209
33	0,46578193	0,68965443	0,76201070	0,75652401	0,79394184	0,77967923
33,5	0,46553295	0,69434632	0,77025718	0,76255467	0,79897034	0,78521476
34	0,46528399	0,69899823	0,77830105	0,76848166	0,80390643	0,79064855
34,5	0,46503505	0,70360956	0,78614148	0,77430450	0,80875034	0,79598059
35	0,46478612	0,70817974	0,79377809	0,78002281	0,81350234	0,80121097
35,5	0,46453721	0,71270822	0,80121097	0,78563635	0,81816282	0,80633989
36	0,46428832	0,71719449	0,80844060	0,79114500	0,82273222	0,81136763
36,5	0,46403945	0,72163807	0,81546786	0,79654875	0,82721104	0,81629458
37	0,46379059	0,72603850	0,82229399	0,80184770	0,83159986	0,82112122
37,5	0,46354176	0,73039535	0,82892058	0,80704207	0,83589932	0,82584809
38	0,46329294	0,73470824	0,83534955	0,81213217	0,84011012	0,83047585
38,5	0,46304414	0,73897678	0,84158310	0,81711844	0,84423300	0,83500520
39	0,46279536	0,74320066	0,84762370	0,82200136	0,84826877	0,83943693
39,5	0,46254659	0,74737954	0,85347407	0,82678155	0,85221829	0,84377189
40	0,46229785	0,75151316	0,85913714	0,83145969	0,85608244	0,84801101
40,5	0,46204912	0,75560127	0,86461607	0,83603654	0,85986216	0,85215526
41	0,46180041	0,75964362	0,86991415	0,84051294	0,86355844	0,85620568
41,5	0,46155173	0,76364003	0,87503487	0,84488980	0,86717229	0,86016333
42	0,46130306	0,76759032	0,87998183	0,84916811	0,87070475	0,86402935
42,5	0,46105441	0,77149434	0,88475874	0,85334889	0,87415690	0,86780492
43	0,46080578	0,77535198	0,88936943	0,85743324	0,87752984	0,87149125
43,5	0,46055716	0,77916313	0,89381778	0,86142232	0,88082470	0,87508957
44	0,46030857	0,78292773	0,89810777	0,86531731	0,88404264	0,87860117
44,5	0,46006000	0,78664573	0,90224338	0,86911945	0,88718481	0,88202737
45	0,45981145	0,79031710	0,90622867	0,87283004	0,89025241	0,88536948
45,5	0,45956292	0,79394184	0,91006768	0,87645038	0,89324663	0,88862886
46	0,45931441	0,79751998	0,91376447	0,87998183	0,89616869	0,89180690
46,5	0,45906591	0,80105155	0,91732311	0,88342576	0,89901981	0,89490497
47	0,45881744	0,80453663	0,92074764	0,88678358	0,90180121	0,89792448
47,5	0,45856899	0,80797528	0,92404206	0,89005672	0,90451415	0,90086685
48	0,45832056	0,81136763	0,92721036	0,89324663	0,90715985	0,90373350
48,5	0,45807215	0,81471379	0,93025649	0,89635476	0,90973955	0,90652586
49	0,45782377	0,81801391	0,93318432	0,89938259	0,91225451	0,90924535
49,5	0,45757540	0,82126814	0,93599770	0,90233160	0,91470597	0,91189341
50	0,45732705	0,82447667	0,93870041	0,90520329	0,91709516	0,91447147
50,5	0,45707873	0,82763969	0,94129613	0,90799916	0,91942332	0,91698097

Anexo

51	0,45683042	0,83075741	0,94378853	0,91072070	0,92169168	0,91942332
51,5	0,45658214	0,83383006	0,94618115	0,91336941	0,92390147	0,92179995
52	0,45633388	0,83685787	0,94847750	0,91594680	0,92605391	0,92411226
52,5	0,45608564	0,83984112	0,95068097	0,91845435	0,92815020	0,92636166
53	0,45583742	0,84278006	0,95279489	0,92089355	0,93019154	0,92854955
53,5	0,45558923	0,84567498	0,95482251	0,92326588	0,93217912	0,93067729
54	0,45534105	0,84852618	0,95676699	0,92557283	0,93411412	0,93274626
54,5	0,45509290	0,85133396	0,95863141	0,92781583	0,93599770	0,93475781
55	0,45484477	0,85409864	0,96041875	0,92999636	0,93783102	0,93671328
55,5	0,45459667	0,85682055	0,96213191	0,93211583	0,93961521	0,93861398
56	0,45434858	0,85950004	0,96377373	0,93417568	0,94135140	0,94046123
56,5	0,45410052	0,86213746	0,96534692	0,93617730	0,94304070	0,94225631
57	0,45385248	0,86473315	0,96685415	0,93812209	0,94468419	0,94400049
57,5	0,45360447	0,86728750	0,96829797	0,94001141	0,94628297	0,94569503
58	0,45335648	0,86980088	0,96968087	0,94184662	0,94783809	0,94734115
58,5	0,45310851	0,87227366	0,97100525	0,94362906	0,94935060	0,94894006
59	0,45286056	0,87470625	0,97227344	0,94536003	0,95082153	0,95049296
59,5	0,45261264	0,87709903	0,97348767	0,94704084	0,95225188	0,95200103
60	0,45236474	0,87945242	0,97465012	0,94867274	0,95364267	0,95346540
60,5	0,45211686	0,88176681	0,97576286	0,95025700	0,95499485	0,95488722
61	0,45186901	0,88404264	0,97682792	0,95179485	0,95630941	0,95626758
61,5	0,45162118	0,88628030	0,97784725	0,95328749	0,95758727	0,95760759
62	0,45137338	0,88848023	0,97882270	0,95473611	0,95882937	0,95890829
62,5	0,45112560	0,89064285	0,97975609	0,95614187	0,96003660	0,96017075
63	0,45087784	0,89276860	0,98064916	0,95750592	0,96120987	0,96139599
63,5	0,45063011	0,89485791	0,98150357	0,95882937	0,96235005	0,96258500
64	0,45038240	0,89691120	0,98232094	0,96011331	0,96345799	0,96373878
64,5	0,45013472	0,89892893	0,98310281	0,96135884	0,96453452	0,96485827
65	0,44988707	0,90091153	0,98385066	0,96256698	0,96558047	0,96594442
65,5	0,44963943	0,90285944	0,98456594	0,96373878	0,96659665	0,96699815
66	0,44939182	0,90477310	0,98525001	0,96487523	0,96758383	0,96802035
66,5	0,44914424	0,90665296	0,98590420	0,96597732	0,96854278	0,96901191
67	0,44889668	0,90849947	0,98652977	0,96704601	0,96947426	0,96997368
67,5	0,44864915	0,91031306	0,98712794	0,96808225	0,97037901	0,97090649
68	0,44840165	0,91209419	0,98769988	0,96908694	0,97125773	0,97181117
68,5	0,44815417	0,91384329	0,98824670	0,97006098	0,97211113	0,97268880
69	0,44790671	0,91556081	0,98876950	0,97100525	0,97293990	0,97353928
69,5	0,44765928	0,91724719	0,98926929	0,97192061	0,97374471	0,97436425
70	0,44741188	0,91890288	0,98974707	0,97280787	0,97452621	0,97516415

- **ng/dl**: concentración de testosterona plasmática.
- **P(y=1) Total**: Probabilidad de macho para el total de hembras.
- **P(y=1) 1**: Probabilidad de macho para vacas de primera lactación.
- **P(y=1) 0**: Probabilidad de macho para el grupo de novillas.
- **P(y=1) 2**: Probabilidad de macho para vacas de segunda lactación.
- **P(y=1) 3**: Probabilidad de macho para vacas de tercera lactación.
- **P(y=1) 4 ó +**: Probabilidad de macho para vacas de cuarta ó más lactación .