

# CAPÍTULO XXI

## EL USO DEL RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA) PARA EL MEJORAMIENTO DE LA EFICIENCIA REPRODUCTIVA

- I. INTRODUCCIÓN
- II. TERMINOLOGÍA BÁSICA Y UBICACIÓN DEL RIA
- III. PRINCIPIOS BÁSICOS DEL RIA
- IV. EVENTOS FISIOLÓGICOS REPRODUCTIVOS DE LA HEMBRA
  1. Pubertad
  2. Ciclo estral
  3. Gestación
  4. Período periparturiento
  5. Posparto y periodo vacío
- V. DETECCIÓN DE LOS NIVELES DE PROGESTERONA PARA EL MEJORAMIENTO DE LA EFICIENCIA REPRODUCTIVA
  1. Progesterona
  2. El Cuerpo Lúteo
  3. Cuantificación de la progesterona en leche
  4. Factores que Afectan la concentración de progesterona en leche
  5. La cuantificación de Progesterona en leche descremada
- VI. EL USO DEL RIA EN HEMBRAS NO LACTANTES Y MACHOS
- VII. LITERATURA CITADA



## I. INTRODUCCIÓN

Desde que en la década del 30 se aisló el primer compuesto cristalino de progesterona ( $P_4$ ), los intentos realizados para estudiar la secreción y el metabolismo han sido generalmente poco exitosos, por la carencia de métodos químicos suficientemente sensibles y específicos para cuantificar la hormona en muestras pequeñas. Ciertos bioensayos eran extremadamente sensibles pero poco específicos y tenían un indefinido límite de error. La espectrofotometría era específica aunque con una baja sensibilidad de 0,1-0,5 microgramo (g) ( $1 \text{ g} = 10^{-3} \text{ g}$ ), mientras que la cromatografía de gases exhibía una sensibilidad de 0,01 g. Además otro de los problemas es que se necesitaban grandes volúmenes de sangre para su determinación, todo lo cual fue obviado con el desarrollo de las técnicas del radioinmunoanálisis, las que pueden medir las hormonas en nanogramos (ng) ( $10^{-9} \text{ g}$ ), picogramos (pg) ( $10^{-12} \text{ g}$ ) y aún en femtogramos (fg) ( $10^{-15} \text{ g}$ ), usando solo unos cuantos microlitros (l) de suero, plasma o leche. Esta técnica permite monitorear las concentraciones de hormonas usando fluidos o tejidos del cuerpo y estudiar las fases reproductivas del hombre y diversos animales domésticos. Adicionalmente, constituye una poderosa herramienta en el estudio del control endocrino de los procesos reproductores de las especies domésticas y favorece dilucidar los factores que afectan la eficiencia reproductiva.

El radioinmunoanálisis (RIA) es quizás el más importante medio en las mediciones biológicas de los últimos 40 años y un invaluable instrumento para la utilización pacífica de los radioisótopos. El éxito de esta técnica se puede atribuir a su alta sensibilidad, especificidad y facilidad ya que puede ser usado para medir sustancias que antes no se podían detectar, siendo aplicable a una amplia variedad de compuestos [4].

## II. TERMINOLOGÍA BÁSICA Y UBICACIÓN DEL RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA)

Todas las técnicas involucran la combinación de dos elementos, uno es el aglutinante (binder) y otro es el ligando (o sustancia medida). El término que mejor abarca todo el campo del radioinmunoanálisis es binding assay o ensayos de aglutinación; esto significa cualquier procedimiento en el cual la cuantificación de una sustancia, depende de la progresiva saturación de un aglutinante específico para ella, y la subsecuente determinación de su distribución de sus fases unidas (bound) y libres (free). Este principio general incluye diferentes aglutinantes y diferentes métodos para determinar la distribución entre fases unidas y libres.

La más corriente subdivisión de los ensayos de aglutinación están basados en la naturaleza del aglutinante empleado en los inmunoensayos, éste es un anticuerpo; en otros tipos de ensayos de aglutinación, el aglutinante puede ser una proteína de competencia, de origen natural, o células receptoras de origen natural. La reacción antígeno-anticuerpo en los inmunoensayos se puede revelar por la incorporación de un marcador en la molécula del ligando, el cual en el caso de RIA es un isótopo radiactivo. La separación de las fases unidas y libres, consiste en la

separación del antígeno marcado que se ha unido al anticuerpo de aquella que permanece libre. Los métodos para producir dicha separación pueden ser por 1) precipitación química del complejo hormona-anticuerpo, 2) adsorción de la hormona libre con carbón activado, 3) inmunológico mediante la utilización de un segundo anticuerpo preparado contra el primer anticuerpo y 4) separación en fase sólida usando anticuerpos fijados en las paredes de los tubos o pozos de plástico donde se realiza la reacción.

Como la distribución de las fases se sigue por la incorporación de un trazador o marcador, éste no tiene que ser necesariamente un radioisótopo, él puede ser cualquier sustancia que sea factible medirla en muy pequeñas cantidades, tales como un compuesto fluorescente, fluoroinmunoanálisis (FIA) o una enzima, enzimoimmunoanálisis (EIA o ELISA). Cuando el elemento marcado es el aglutinante en vez del ligando se denominan ensayos inmunométricos [4, 10].

### III. PRINCIPIOS BÁSICOS DEL RIA

La técnica se basa en la competencia entre una hormona marcada con una no marcada, por un limitado número de sitios de unión en la molécula del anticuerpo, para lo cual se ponen a reaccionar cantidades conocidas o iguales del anticuerpo con cantidades conocidas de la hormona marcada (los kits de RIA para progesterona en fase sólida utilizan  $^{125}\text{I}$  como isótopo marcador), variando solamente las concentraciones de la sustancia (hormona) presente en la muestra a analizar y en los valores conocidos de la curva estándar.

Una vez transcurrido el tiempo óptimo de incubación para el ensayo, se separan las partes unidas y libres y se realiza el conteo de la radiactividad residual en un equipo especialmente diseñado, de manera que, a mayor radiactividad residual la concentración de la hormona en la muestra estudiada es menor (Figura 1). La cuantificación de la concentración de la hormona presente en la muestra se determina contrastándola con los valores conocidos de la curva estándar.

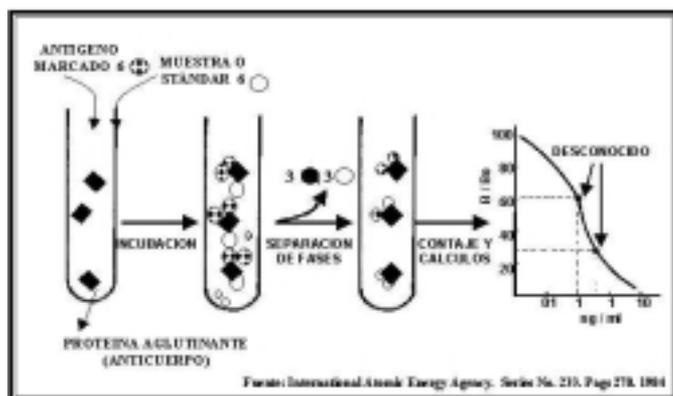


Figura 1. Principios básicos del radioinmunoanálisis.

En el mercado existe una amplia variedad de pruebas que pueden utilizarse en los bovinos, una de ellas ha sido validada y utilizada ampliamente en los programas de mejoramiento de la eficiencia reproductiva para los países en desarrollo, implementado por la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA) y Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) [5, 14].

En el campo de la reproducción de los animales domésticos la técnica de RIA se puede usar para:

- Determinación de hormonas hipotalámicas, gonadotróficas, uterinas y gonadales.
- Estudio de las interrelaciones de eje hipotálamo-hipófisis-gonadas.
- Estudio del ciclo estral, de los niveles hormonales durante la preñez, periodo periparturiento y las alteraciones durante estas etapas
- Comportamiento ovárico del postparto y pubertad y los factores que los afectan
- Eficiencia de la Inseminación Artificial.
- Las alteraciones ováricas y luteales
- Seguimiento del control reproductivo de los rebaños y de los resultados de los tratamientos hormonales
- Estudiar las alteraciones del aparato reproductivo

#### IV. EVENTOS FISIOLÓGICOS REPRODUCTIVOS DE LA HEMBRA

##### 1. Pubertad

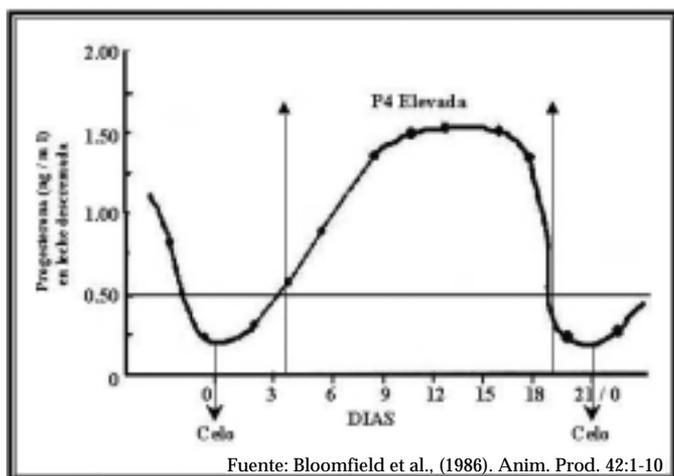
En la hembra el inicio de la función cíclica de aparato reproductor con la consecuente aparición de la conducta estral es definido como pubertad. Este evento fisiológico se alcanza luego de una serie de transformaciones del eje endocrino hipotálamo-hipófisis-ovario (H-H-O) que culminan con el inicio y establecimiento de la ciclicidad ovárica y en la consiguiente manifestación del celo. La conducta sexual es acompañada con variaciones cíclicas en las concentraciones sanguíneas de la hormonas ováricas, estrógenos y progesterona. Al inicio de la pubertad, la ciclicidad se puede presentar en forma irregular, con ovulaciones silentes o celos anovulatorios, pero con el incremento del peso, la edad y la madurez del eje H-H-O se regulariza. La estabilización de la actividad ovárica es resultante de un equilibrio cíclico del eje H-H-O, el cual puede ser detectado con las mediciones en suero o plasma sanguíneo de las hormonas involucradas en ese evento fisiológico.

El inicio de la pubertad está controlado por mecanismos neuroendocrinos, con un paulatino incremento en la frecuencia de la secreción de las hormonas liberadoras del hipotálamo (GnRH), las cuales estimulan la secreción pulsátil de las gonadotropinas hipofisarias, folículoestimulante (FSH) y luteinizante (LH), que actuando sobre el ovario estimulan la secreción de esteroides (estrógenos) los cuales inducen cambios en la sensibilidad y en el mecanismo de retroalimentación nega-

tiva del eje H-H-O. El período pre-puberal está caracterizado por niveles bajos de progesterona. El inicio de la pubertad, la ciclicidad ovárica regular y madurez sexual tardía, constituyen algunos de los eventos fisiológicos que afectan los indicadores aceptables de la eficiencia reproductiva de los rebaños mestizos de doble propósito en el trópico.

## 2. Ciclo estral

El ciclo estral de los bovinos tiene una duración en promedio de 21 días, de los cuales durante el proestro y el estro se pueden observar niveles ascendentes y elevados de los estrógenos, los cuales se asocian al momento en que la hembra acepta ser montada por un macho; por otro lado, los niveles elevados de progesterona se asocian al metaestro y diestro abarcando esta fase un período superior a los 16 días en las hembras bovinas con ciclo estral promedio. Un modelo de la secreción cíclica de progesterona por las células del cuerpo lúteo se observa en la Figura 2. En los bovinos mestizos de doble propósito el nivel de  $P_4$  indicativo de actividad luteal se detecta entre 5 y 7 días después del celo, por lo cual el nivel de  $P_4$  elevado varía entre 14 a 17 días [7].



Fuente: Bloomfield et al., (1986). Anim. Prod. 42:1-10

Figura 2. Perfil de progesterona durante el ciclo estral de bovinos.

## 3. Gestación

Luego de la inseminación artificial o de la monta natural, en la hembra bovina que ha quedado gestante se inician una serie de cambios en los perfiles endocrinos, los cuales son detectables tanto en el plasma como en la leche. Además de otras hormonas, ese estado fisiológico normal, puede ser caracterizado por la elevación de los niveles de progesterona, tal como se observa en el modelo de la Figura 3.

## 4. Período periparturiente

El período periparturiente es quizás el más crítico de la hembra; durante ese periodo se producen rápidamente una serie de cambios y transformaciones de los

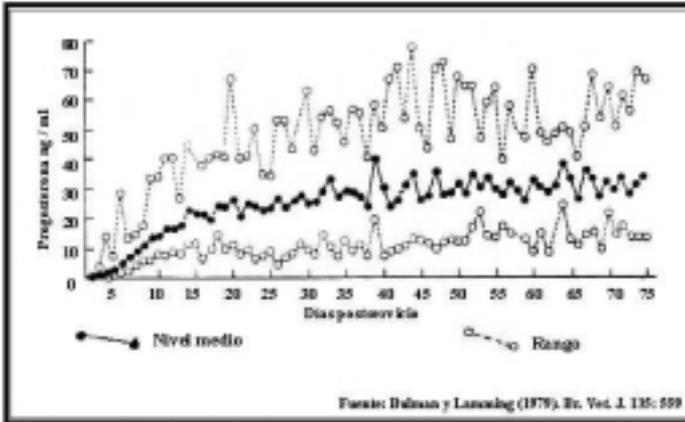


Figura 3. Niveles de progesterona en leche de vacas preñadas.

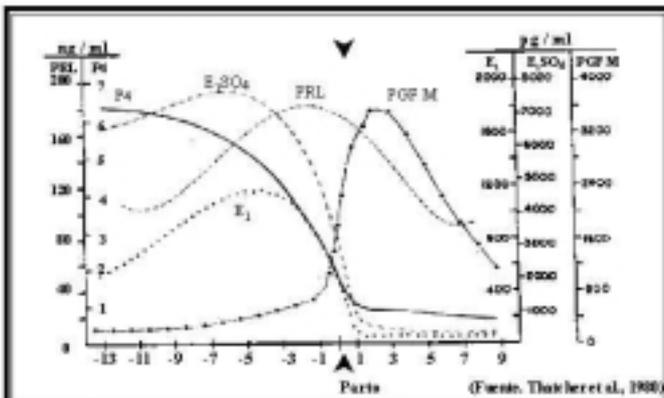


Figura 4. Hormonas del período periparturiente en la vaca. P<sub>4</sub>= Progesterona. E<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>=Sulfato de estrona. PRL= Prolactina. PGF M= Metabolito de la protaglandina PGF 2 $\alpha$  E= Estrona.

perfiles endocrinos que ocasionan un gran estrés al animal. Un modelo de los cambios hormonales que ocurren durante ese período se presenta en la Figura 4.

### 5. Posparto y periodo vacío

Luego del parto, la vaca debe volver a su actividad cíclica normal, actividad reproductora fundamental, para asegurar la obtención de una nueva cría y una nueva lactancia. Este período está signado por una serie de eventos fisiológicos que pueden ser observados visualmente y detectados, además de otras pruebas, por la determinación de cambios en la concentraciones hormonales de progesterona en la sangre periférica.

a. Descarga de progesterona antes del primer celo postparto. Este evento fisiológico está caracterizado por una ligera elevación (>2 nmol/l) de corta dura-

ción (<10 días) del nivel de progesterona, antes de la aparición del primer celo postparto. Este evento ha sido detectado y reportado en un porcentaje variable (30% a 70%) de animales lecheros y mestizos de doble propósito y refleja directamente la presencia de células luteales secretoras de progesterona e indica el reinicio de la actividad ovárica postparto [2, 18].

b. Primer celo postparto. Es la primera manifestación postparto evidente, del reflejo de tolerancia o aceptación a la monta por un macho o hembra, y detectado por el hombre. Refleja directamente la existencia de folículos desarrollados secretores de estrógenos que desencadenan la conducta estral e indican reinicio de la actividad ovárica postparto. Culmina con la concepción que es la unión del espermatozoide con el óvulo e inicio de una serie de fenómenos fisio-embriológicos, con perfiles hormonales definidos que deben conducir al desarrollo y terminación de una cría.

El período postparto desde el punto de vista reproductivo se extiende hasta la culminación de la involución uterina y el restablecimiento de la ciclicidad. La extensión del intervalo parto e inicio de laticicidad es variable y puede ser afectado por factores tales como: la involución uterina, la estación o época del parto, el amamantamiento o apoyo del becerro, la raza o grupo racial predominante, la producción láctea y el estado nutricional, el peso y la condición corporal al parto, el número de partos, la edad al primer parto, el peso y sexo de la cría, así como por factores ambientales, que condicionan un estado estresante con altas concentraciones sanguíneas de corticoides que alteran el eje H-H-O. Numerosas drogas y compuestos químicos, sustancias estrogénicas de origen natural o artificial, drogas administradas con intenciones terapéuticas, o como efectos de contaminación por la industria o por las prácticas agronómicas y pecuarias pueden causar un bloqueo a nivel central. Las anormalidades periparturientas, en la ganadería mestiza de doble propósito requieren una atención especial; vacas con problemas durante y después del parto tales como: distocias, retención de membranas fetales, infecciones uterinas, quistes ováricos o enfermedades metabólicas, pueden ver alterado el reinicio de su actividad cíclica ovárica postparto [17, 25]. El acortamiento de este intervalo merece una atención especial para el mantenimiento de indicadores aceptables de la eficiencia reproductiva de los rebaños tropicales.

## V. DETECCIÓN DE LOS NIVELES DE PROGESTERONA PARA EL MEJORAMIENTO DE LA EFICIENCIA REPRODUCTIVA

### 1. Progesterona

La progesterona bovina ( $^4 = \text{pregнено} - 3,20 - \text{dioeno}$ ) y el 20-hidroxi- $^4$ -(20-ol) son los más importantes esteroides progestágenos secretados por el cuerpo lúteo cíclico del estro y de la preñez. Los progestágenos, sin considerar su estado de pureza, han sido aislados en ovarios, adrenales y en sangre. Además de sus acciones sobre la glándula mamaria y otros tejidos; sus principales funciones biológicas sobre el aparato reproductor y la reproducción son:

- Esenciales para el desarrollo uterino, hipertrofia del endometrio y desarrollo de las glándulas tubo-alveolares y el epitelio vaginal.
- Necesarias para la implantación y desarrollo del blastocisto, mantenimiento del feto y tono uterino durante la preñez.
- Coadyuvan al transporte del espermatozoides y del cigoto.
- Esenciales en la función cíclica de ovario y secreción de gonadotropinas.
- Antagonizan la acción de estrógenos y corticoides.
- Responsable del mantenimiento de la preñez.
- Se le asigna un importante papel como agente condicionante del ciclo estral normal de los bovinos.

## 2. El Cuerpo Lúteo

El cuerpo lúteo es una glándula de secreción interna de carácter transitorio durante la preñez o cíclica en animales no gestantes. De color amarillo en la vaca, se forma en el ovario a partir de las células del folículo dominante después de la ovulación. Su principal secreción es la hormona progesterona. La regresión del cuerpo lúteo es inducida por la secreción a nivel del útero de prostaglandinas (PGF<sub>2</sub>), las que llegan al ovario por un mecanismo de contracorriente que involucra a la vena y arteria utero-ovárica. La concentración de progesterona en plasma u otros líquidos corporales de la vaca, refleja directamente la función del cuerpo lúteo y constituye un preciso indicador de la función ovárica.

## 3. Cuantificación de la progesterona en leche

La presencia de la progesterona en leche fue demostrada por Williams en 1962 [27]. La determinación de progesterona por RIA en muestras de vacas obtenidas a los 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 210 días de gestación mostraron un paralelismo entre los elevados niveles de la hormona en plasma sanguíneo y en la leche entera, encontrándose que los valores en leche son mayores que aquellos del plasma sanguíneo. Las fluctuaciones en los niveles de progesterona en leche, están alta y positivamente correlacionadas a un cuerpo lúteo funcional, ratificándose un paralelismo entre los valores encontrados en plasma y aquellos de la leche.

## 4. Factores que Afectan la concentración de progesterona en leche

La concentración de progesterona en leche entera es más alta que aquella del plasma. No se conoce si ello es debido a los mecanismos de transferencia de la hormona desde la sangre a la glándula mamaria o a mecanismos de síntesis en dicha glándula. Han sido reportadas variaciones en la concentración de progesterona en leche entera asociadas al porcentaje de grasa, momento del ordeño y a la fracción de leche analizada (leche entera, grasa o crema de leche).

Aproximadamente, el 80% de la progesterona presente en la leche entera se encuentra en la grasa de manera que, el tipo de leche analizada juega un importante papel sobre la concentración de la hormona y en la variabilidad de los resultados. En leche descremada se han reportado los más bajos valores en la concentración de progesterona tanto durante la fase luteal del ciclo ( $0,84 \pm 1$  ng/ml), el día del celo ( $0,17 \pm 0,4$  ng/ml) o al inicio de la gestación ( $1,1 \pm 0,1$

ng/ml). Se ha comunicado que los niveles de la hormona son menores al inicio del ordeño y que el almacenamiento de leche preservada y congelada por más de un año no altera la concentración del esteroide. Igualmente, no se han encontrado diferencias significativas en las concentraciones de progesterona entre cuartos y el momento del muestreo durante el ordeño. También se ha demostrado, que los valores de progesterona en el celo son más bajos en leche descremada ( $0,190 \pm 0,03$  ng/ml) que aquellos de leche completa sugiriéndose que la leche puede ser obtenida en cualquier momento del día y que el agregado de conservadores no afecta los niveles de progesterona. Sin embargo se han reportado variaciones debido al efecto individual y racial. Se concluye que el ciclo estral y la preñez son la principal fuente de variación en la concentración de progesterona en leche [11, 12].

La cuantificación de progesterona en leche descremada, implica la centrifugación para el descremado previa a la prueba pero ofrece la ventaja que elimina la gran variabilidad debido al contenido de grasa, recomendándose la centrifugación en frío ( $4^{\circ}\text{C}$ ) como la más adecuada.

Se han reportado resultados contradictorios en cuanto al efecto de la mastitis subclínica sobre niveles de progesterona, señalándose que la concentración de la hormona es menor en leche de cuartos con mastitis que la proveniente de aquellos sanos; las variaciones señaladas oscilan del 14,4 al 29,6% cuando el nivel de la hormona es alto mayor de  $5 \text{ nmol/l}$  ( $1,57 \text{ ng/ml}$ ), atribuyéndose esa disminución al proceso inflamatorio; no obstante, la inflamación de la ubre no altera la precisión del diagnóstico del estado reproductivo de acuerdo con los niveles de progesterona en leche descremada [19].

### **5. La cuantificación de Progesterona en leche descremada**

El uso del RIA para progesterona en leche descremada constituye una herramienta de gran valor para el estudio y el mejoramiento de la eficiencia reproductiva en los rebaños de doble propósito, particularmente el estudio de los perfiles hormonales involucrados en el reinicio de la actividad ovárica posparto (Figura 5), las alteraciones pre y posparto, la evaluación de la eficiencia en la detección del celo, los resultados de los tratamientos hormonales, el diagnóstico precoz de gestación, la mortalidad embrionaria y las relaciones nutrición-reproducción son algunos de los campos en los cuales la técnica ha mostrado su valor. Igualmente, en el seguimiento de tecnologías de manejo propias de acuerdo con las características reproductoras de los animales mestizos como, la implementación de los servicios tempranos, el manejo del efecto macho para el control del anestro posparto, la evaluación de la técnica de la inseminación artificial a nivel de fincas y el estudio de la dinámica folicular. Además, es una herramienta para el estudio, control y manejo de la eficiencia reproductiva en poblaciones de animales (Figura 6) [5, 8, 9, 13, 15, 21-25].

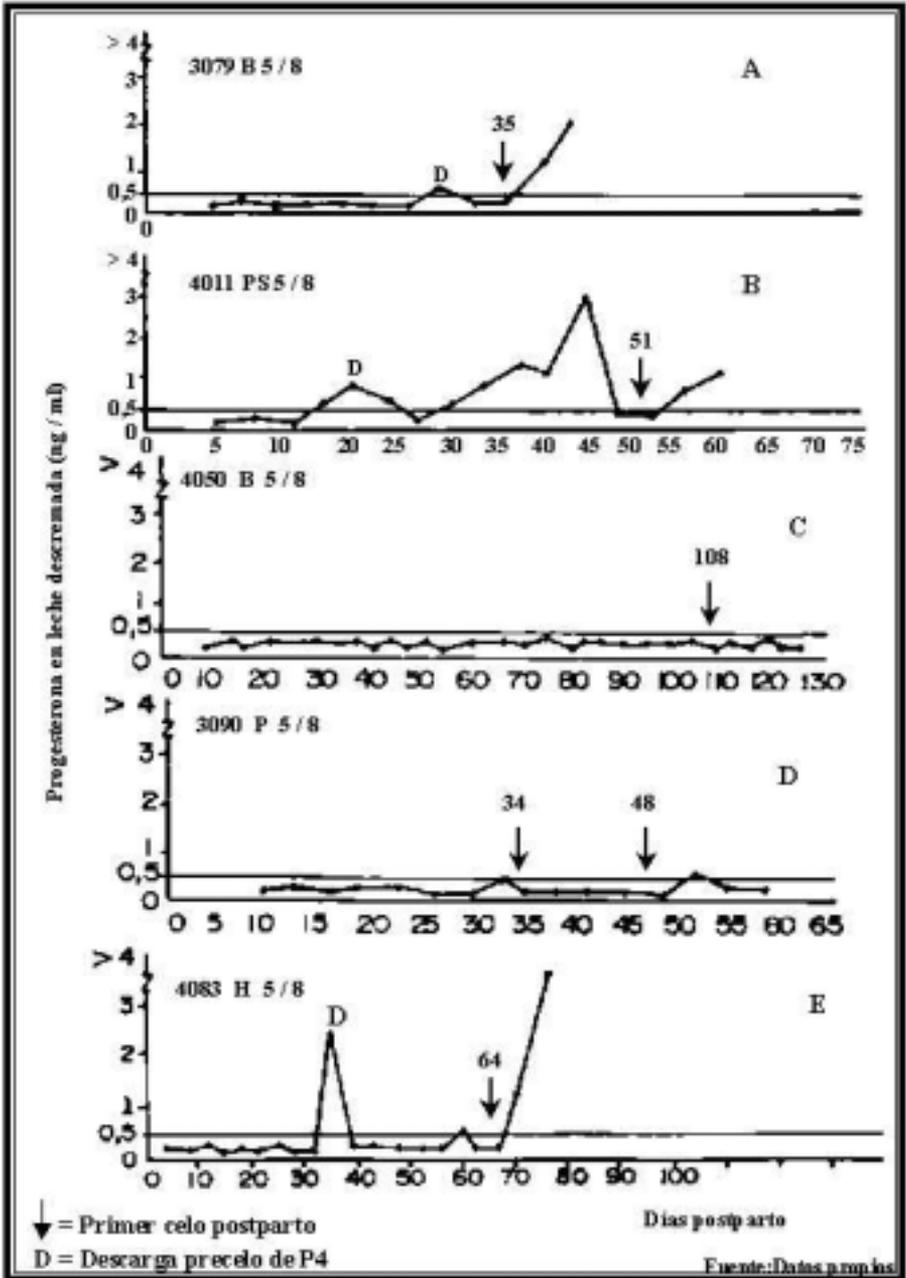


Figura 5. Perfiles postparto de progesterona en vacas mestizas.  
 A) celo ovulatorio temprano. B) Ovulaciones silenciosas. C) Anestro con celo anovulatorio.  
 D) Celos anovulatorios. E) Ovulación siguiente con subsiguiente inactividad ovárica.

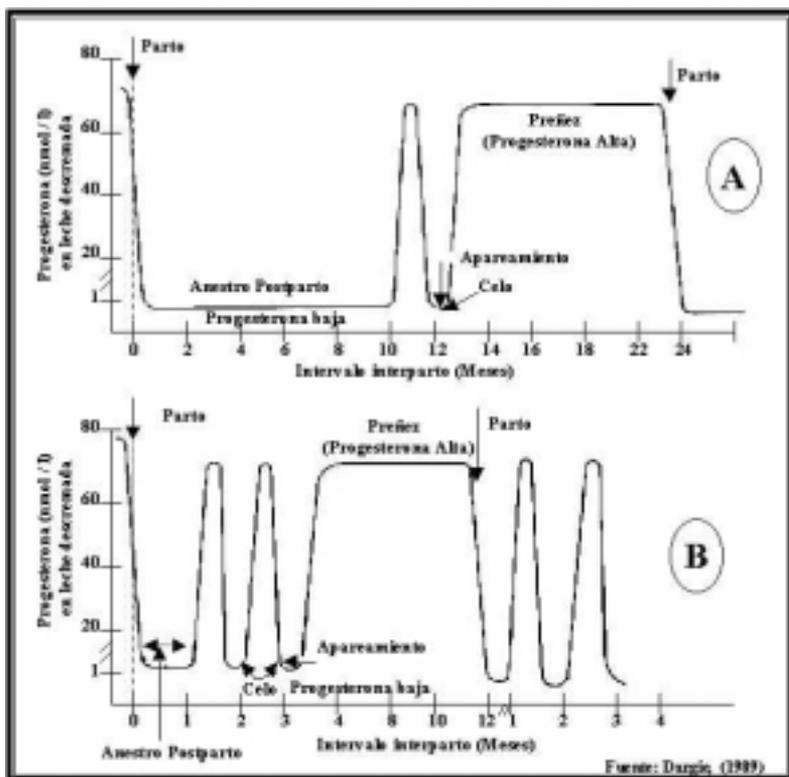


Figura 6. Eficiencia reproductiva y niveles de progesterona en vacas de países en desarrollo (A) y desarrollados (B).

## VII. EL USO DEL RIA EN HEMBRAS NO LACTANTES Y MACHOS

El estudio de la pubertad y de la ciclicidad ovárica en animales jóvenes también puede abordarse con la determinación de las concentraciones de progesterona en plasma o suero. Trabajos sobre la pubertad han reportado una edad más temprana en los animales mestizos con predominancia cebuína; encuestas sobre la ciclicidad peripuberal han detectado un alto porcentaje de novillas cíclicas a partir de 210 kg, de peso y edad de 13 meses. Se ha destacado el efecto que la nutrición tiene sobre el inicio de la actividad reproductiva y los factores que la afectan en la ganadería doble propósito [1, 7, 20]; igualmente, se están estudiando las relaciones existentes entre el estado reproductivo y los perfiles hematológicos. Por otro lado, ensayos de RIA para detectar testosterona, han permitido el estudio de la pubertad y las concentraciones del andrógeno en animales de doble propósito.

Con resultados confiables, se han venido utilizando otros inmunoensayos para el estudio y control de la eficiencia reproductiva en los rebaños bovinos, entre ellos el enzimoimmunoensayo o ELISA [6] pero también se encuentran disponibles pruebas para determinar hormonas reproductivas mediante la técnica de quimioluminiscencia.

**VIII. LITERATURA CITADA**

- [1] Aranguren-Méndez, J.A., Soto-Castillo, G., Quintero M., A., Rojas, N., y Hernández-Fernández, H. 1997. Pubertad en novillas cruzadas suplementadas con bloques multinutricionales. *Revista Científica, FCV-LUZ.* VII (3): 185-191.
- [2] Bloomfield, G.A., Morant, S.V. and Ducker, M.J. 1986. A survey of reproductive performance in dairy herds. Characteristics of the patterns of progesterone concentrations in milk. *Anim. Prod.* 42:1-10.
- [3] Bulman, D.C. y Lamming, G.E. 1979. The use of milk progesterone analysis in the study of oestrus detection, herd fertility and embryonic mortality in dairy cows. *Br. Vet. J.* 135: 559-567.
- [4] Chard, T. 1982. *An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques.* Editorial Elsevier Biomedical Press, Amsterdam. New York. Oxford. pp 292.
- [5] Dargie, J.D. 1990. Helping small farmers to improve their livestock. International Atomic Energy Agency (IAEA). pp 35-55.
- [6] Francos, G. 1999. Factors affecting the rate of true positive pregnancies based on routine milk progesterone examination. Israel Veterinary Medical Association *On Line.* Vol 54 (1): 1-14.
- [7] González-Stagnaro, C. 1992. Fisiología reproductiva en vacas mestizas de doble propósito. En: González-Stagnaro, C. (ed). *Ganadería Mestiza de Doble Propósito.* La Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía y Ciencias Veterinarias. Ediciones Astro Data, pp. 153-234.
- [8] González-Stagnaro, C., Madrid-Bury, N., Morales, J. y Marín, D. 1993. Efecto luteo-protector del tratamiento GnRH en vacas mestizas repetidoras con cuerpo lúteo sub-funcional. *Revista Científica, FCV-LUZ., III (1):* 14-20.
- [9] Hernández F., H., Soto B., E., Villamediana M., P., Cruz A., R., Aranguren M., J. y Castejón, O. 1995. Evaluación de tratamientos del anestro postparto en vacas mestizas. Factores que lo afectan. *Revista Científica, FCV-LUZ., V (1):* 47-53.
- [10] International Atomic Energy Agency (IAEA). 1984. Technical report Series No. 233. Laboratory training manual on radioimmunoassay in animal reproduction. Vienna. Pags 270.
- [11] Oltner, R. y Edquist, L.E. 1981. Progesterone in defatted milk: its relation to insemination and pregnancy in normal cows as compared with cows on problem farms and individual problem animals. *Br. Vet. J.* 137: 78-87.
- [12] Pennington, J.A.; Spahr, S.L. y Lodge, J.R. 1981. Influences on progesterone concentration in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 64: 259-266.
- [13] Perea, G., F., González F., R., Cruz A., R., Soto B., E., Rincón U., E., González S., C. y Villamediana, M., P. 1998. Evaluación ultrasonográfica de la dinámica folicular en vacas y en novillas mestizas. *Revista Científica, FCV-LUZ., VIII (1):* 14-24.
- [14] Plaizier, JCB. 1993. Validation of the FAO/IAEA RIA KIT for the measurement of progesterone in skim milk and blood plasma In: *Improving The Productivity of Indigenous African Livestock.* International Atomic Energy Agency. (IAEA). Tecdoc708. 151-156.
- [15] Portillo M., G., Soto B., E., y Castejón, O. Mortalidad embrionaria en vacas mestizas. *Revista Científica, FCV-LUZ., V (3):* 161-169.

- [16] Ramírez I., L., Soto B., E., González S., C., Soto C., G. y Rincón U., E. 1996. Postpartum ovarian activity and anovulatory estrus in primiparous crossbred cows in the Venezuelan Tropics. *Revista Científica, FCV-LUZ.*, 6 (3): 191-196.
- [17] Ramírez I., L., Soto B., E., González S., C., Soto C., G. y Rincón U., E. 1996. Actividad ovárica postparto en vacas mestizas primíparas con o sin alteraciones periparturientas. *Revista Científica, FCV-LUZ.* 6 (1):13-20.
- [18] Ramírez I., L.N., Soto B., E., González S., C., Soto C., G. and Rincón U., E. 1992. Factors affecting postpartum ovarian activity in crossbred primiparous tropical heifers. *Theriogenology* 38: 449-460. [19]
- [19] Ramírez I., L.N. Soto B., E., Pavesi, H. y Díaz de Ramírez, A. 1992. Relaciones entre mastitis subclínica, el nivel de progesterona en leche descremada y el diagnóstico reproductivo en vacas lecheras. *Revista Científica. FCV-LUZ.* II (2) 19-21.
- [20] Ramírez I., L.N., Soto B., E., Linares R., W., Perea G., F., Díaz de Ramírez, A. 1998. Panorama peripuberal en ganado mestizo lechero del piedemonte andino venezolano. *Revista Científica. FCV - LUZ,* VIII (1): 98-100.
- [21] Rojas N., Soto, E., Rincón, E., Ventura, M. y Ramírez, L. 1997. Intervalos postparto en vacas mestizas cebú suplementadas con bloques de melaza-urea. *Rev. Fac. Agron. (LUZ),* 14: 253-264.
- [22] Soto Belloso, E., Ramírez, L., Guevara, L and Soto Castillo, G. 1997. Bull effect on reproductive performance of mature and first calf suckled zebu cows in the tropics. *Theriogenology* 48:1185-1190.
- [23] Soto Belloso, E., Roman Bravo, R. y Ramírez Iglesia, L. N. 1994. Servicio temprano postparto en Vacas Mestizas Cebú en el Trópico. *Revista Científica, FCV-LUZ.* IV (1) 69-72.
- [24] Soto Belloso, E., Portillo M., G., De Ondiz S., Rojas, N., Soto C., G., Ramírez I., L., Aranguren, J., y Perea G., F. 2000. Evaluación del Comportamiento Reproductivo Mediante el Uso de la Progesterona por Radioinmunoanálisis en Vacas Mestizas Cebú Bajo Programas de Inseminación Artificial en Venezuela. *Revista Científica, FCV-LUZ Vol. X,* (5) 391-398. 2000.
- [25] Soto-Belloso, E. y Portillo, G. 1992. Alteraciones de la reproducción en la hembra. En: González-Stagnaro (ed). *Ganadería Mestiza de Doble Propósito.* La Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía y Ciencias Veterinarias. Ediciones Astro Data, Maracaibo, pp. 189-201.
- [26] Thatcher, W.W., Lewis, G.S., Eley, R.M., Bazer, F.W., Fields, M.J., Williams, W.F. and Wilcox, C.J. 1980. Contribution of the bovine conceptus to the endocrinological phenomenon existing at implantation, during gestation and around parturition. 9<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction & A.I. I. 9-22.
- [27] Williams, F.W. Excretion of progesterone and its metabolites in milk, urine and feces. *J. Dairy Science,* 45: 1541-1542. 1962.