

**ESTAGIO “PASANTIA”
DEPARTAMENTO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL (VRA)
LABORATORIO DE FISIOLÓGÍA Y ENDOCRINOLOGÍA MOLECULAR (LFEM).
(USP, CAMPUS FERNANDO COSTA- PIRASSUNUNGA, SAO PAULO-BRASIL)**

INFORME FINAL DE PASANTÍA

FABIÁN DAVID CUELLAR CUADROS
Cód. 121002508

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS ANIMALES
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA
2016**

**ESTAGIO “PASANTIA”
DEPARTAMENTO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL (VRA)
LABORATORIO DE FISIOLÓGÍA Y ENDOCRINOLOGÍA MOLECULAR (LFEM).
(USP, CAMPUS FERNANDO COSTA- PIRASSUNUNGA, SAO PAULO-BRASIL)**

**Presentado por:
FABIÁN DAVID CUELLAR CUADROS
Cód. 121002508**

**Pasantía como opción de Grado, para aspirar al título de Médico Veterinario
Zootecnista.**

**DIRECTOR
Prof. MARIO BINELLI.
IA, Msc, PhD Laboratorio de Fisiología y Endocrinología
Molecular/FMVZ/USP**

**COORDIRECTOR
Prof. AGUSTÍN GÓNGORA ORJUELA.
MV, Msc, Dr, Sci Director Del Grupo De Investigación
(GIRGA)/MVZ/UNILLANOS**

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS ANIMALES
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA
2016**

CONTENIDO

1. AGRADECIMIENTOS.....	5
2. OBJETIVOS.....	6
2.1. Objetivo principal	6
2.2. Objetivos específicos	6
3. INTRODUCCIÓN.	7
3.1. Contexto:	7
3.2. Justificación	8
4. REVISIÓN DE LITERATURA.	11
5. ACTIVIDADES DESARROLLADAS.....	15
5.1. Rutina del Laboratorio de Biología Molecular:	15
5.2. Actividades en campo.....	15
5.3. Jornal Club semanal	16
Discusión crítica de artículos científicos “Discusión y delineamientos experimentales de los ensayos desarrollados en el Laboratorio.	16
5.4. Congresos y Simposios	16
5.5. Conversatorios, Seminarios y Aulas con invitados internacionales.	17
5.6. Capacitaciones y cursos.....	17
5.7. Proyecto de asistencia técnica veterinaria al productor de leche de la región de Pirassununga. Ciclo de Seminarios teórico prácticos-Hospital Veterinario ZMV-USP.	17
6. ANÁLISIS DE RESULTADOS.	19
7. CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES.....	20
8. APRECIACIÓN PERSONAL	21
9. PUBLICACIONES Y CITACIONES:	22
10. BIBLIOGRAFIA	26
11. ANEXOS	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación Laboratorio de Fisiología y Endocrinología Molecular.....	7
Figura 2. Instalaciones del Laboratorio de Fisiología y Endocrinología Molecular (LFEM).....	7
Figura 3. Transcripción y traducción en células eucariotas.....	11
Figura 4. Técnicas acompañadas en rutina de laboratorio.....	15
Figura 5. Actividades desarrolladas y acompañadas a Campo.....	16
Figura 6. Equipo de trabajo LFEM.....	16

1. AGRADECIMIENTOS.

A mis señores padres Licimaco y Marleny, a quienes les debo la realización de mis sueños, por todo su amor incondicional, dedicación y cariño

“Papá, a su lado aprendí que con humildad, disciplina y constancia se puede llegar lejos”.

Al Profesor Agustín Góngora Orjuela y el grupo de investigación GIRGA; Por su orientación y gran colaboración en pro de realizar mi pasantía en el Laboratorio de Fisiología y Endocrinología Molecular (LFEM); mis respetos y gran admiración por su calidad humana y vocación docente.

Al Profesor Mario Binelli, por la oportunidad de desarrollar esta pasantía en su Laboratorio. Ejemplo a seguir como investigador, orientador, docente y persona.

Al grupo de trabajo del LFEM, Emiliana, Guilherme, Angela, Everton, Mariana, Thiago, Moana, Milena, Beatriz, Barbara, Maressa, Kauê y Natalia; gran equipo de trabajo que se convirtió en mi familia, “Muchas gracias por las enseñanzas y el cariño brindado.

A todo el personal del Centro de Biotecnología en Reproducción Animal (CBRA), amigos y colegas, grandes historias quedan de esta bonita experiencia.

Al profesor Miguel Angel Peña; orientador y amigo. Sus consejos, enseñanzas y respeto por la profesión han marcado, encaminado y dado un gran impulso a mis aspiraciones personales. Gracias por ayudar a formar un pensamiento crítico constructivo, a ver el mundo con otros ojos y generar un cariño “vocación” por el área de trabajo.

A la Oficina de Internacionalización y Relaciones interinstitucionales de la Universidad de los Llanos, por el apoyo y el acompañamiento permanente en este proceso.

A todos los profesores del Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Los Llanos, los cuales con su experiencia y vocación, uno a uno fueron colocando un granito de arena en mi formación como profesional.

A mi novia Maira Alejandra por ser un gran apoyo, gracias por todo el amor y cariño incondicional.

2. OBJETIVOS.

2.1. Objetivo principal

Adquirir conocimiento y obtener experiencia, habilidades prácticas y técnicas en el trabajo de campo y laboratorio e iniciación en actividades de investigación en el Laboratorio de Fisiología y endocrinología Molecular.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Adquirir experiencia en procesos de manejo reproductivo, colecta de muestras biológicas y exámenes del tracto reproductivo de hembras bovinas.
- ✓ Desarrollar habilidades prácticas, mediante el aprendizaje y ejecución de técnicas analíticas de laboratorio, que incluyen extracción, purificación y cuantificación de ácidos nucleicos y proteínas de tejidos reproductivos.
- ✓ Organizar, compilar, analizar datos experimentales y desarrollar habilidades en la presentación de resultados de forma oral y escrita.

3. INTRODUCCIÓN.

3.1. Contexto:

La pasantía fue desarrollada en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad de Sao Paulo (USP). Creada en 1919, actualmente constituida en seis departamentos: Departamento de Cirugía, Clínica médica, Medicina Veterinaria Preventiva y Salud Animal, Patología, Nutrición y Producción animal y Reproducción Animal

Esta práctica se llevó a cabo en el Centro de Biotecnología en Reproducción Animal, perteneciente al Departamento de Reproducción Animal (VRA), ubicado en el Campus Fernando Costa de Pirassununga/SP, el cual funciona desde 1990, específicamente en el Laboratorio Fisiología y Endocrinología Molecular (LFEM), creado y coordinado por el profesor Dr. Mario Binelli en el año 2000.



Figura 1. Ubicación Laboratorio de Fisiología y Endocrinología Molecular (LFEM). Centro de Biotecnología en reproducción Animal (CBRA-VRA) Campus Fernando Costa-Pirassununga SP.

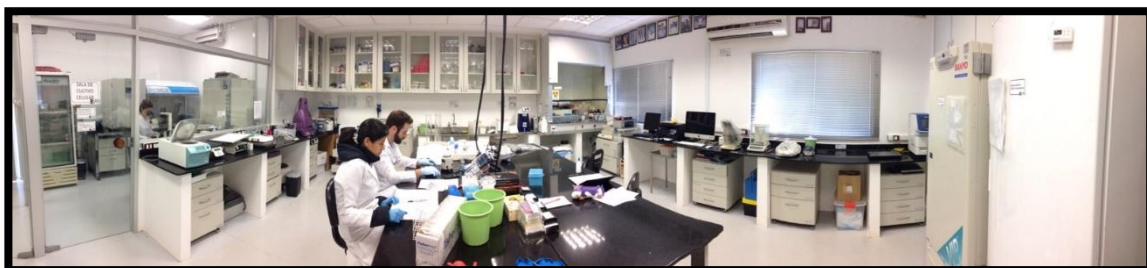


Figura 2. Instalaciones del Laboratorio de Fisiología y Endocrinología Molecular (LFEM).

La misión de este laboratorio es formar en competencias y realizar investigación de excelencia para aplicar conocimiento sobre la biología de la reproducción animal. Para esto el LFEM actúa en la elucidación de los mecanismos endocrinos, celulares y moleculares que controlan procesos reproductivos en hembras de especies domésticas.

Son objetivos específicos del LFEM investigar los efectos de los esteroides sexuales en el tracto reproductivo durante el ciclo estral e inicio de la gestación, estudiar la composición molecular (proteica, lipídica y metabolitos) del ambiente oviductal y uterino, su relación con fertilidad con miras a elaborar y probar estrategias y productos para aumentar las tasas de concepción y fertilidad en rebaños bovinos.

El LFEM utiliza modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* para estudiar mecanismos endocrinos, celulares y moleculares que controlan los procesos reproductivos. Para esto se buscan abordajes integrados y multidisciplinarios además de colaboraciones en Brasil y el exterior.

Especialmente, el plasma, tejidos, células y secreciones son analizadas (exudados y trasudados) en la búsqueda de alteraciones en las concentraciones relativas de moléculas de diversas naturalezas bioquímicas de acuerdo con el ciclo reproductivo o tratamientos administrados.

Entre las diversas herramientas biotecnológicas, se utilizan la Ultrasonografía Ovarica (Escala de grises-Color Doppler), la sincronización de la ovulación, la aspiración folicular, la colecta seriada de plasma, lavados uterinos, análisis globales y puntuales de transcritos, proteínas, lípidos y metabolitos, inmuno-histoquímica, Western Blotting, electroforesis uni y bidimensional. Además de fuerte apoyo en el componente de estadística uni- y multivariada.

3.2. Justificación

La rentabilidad de las explotaciones ganaderas bovinas está determinada fundamentalmente por la obtención de un ternero al año; la subfertilidad, principalmente debido a las altas tasas de muerte embrionaria temprana, es una amenaza a los conceptos de eficiencia y sostenibilidad ganadera; un ambiente uterino no receptivo puede ser un factor determinante en las bajas tasas de fertilidad. Por lo tanto la generación de estrategias que optimicen el rendimiento reproductivo, con el objetivo de aumentar las tasas de supervivencia embrionaria, dependen de la identificación de los factores que determinan que un endometrio sea receptivo^{1,2}

Mientras que los procesos que llevan a la muerte fetal (después del día 42 de gestación en bovinos) han sido bien descritos; ya sea directamente por agentes infecciosos, toxinas o indirectamente por placentitis, que terminan en momificación, maceración, o aborto³; las pérdidas gestacionales tempranas no tienen una explicación muy definida.

Teniendo en cuenta que el porcentaje de fertilización (oocito fecundado / ovulación) es de aproximadamente 90% a 95% en los bovinos ⁴. La gran duda, surge cuando se estima el porcentaje de gestaciones que se pierden en estadios tempranos y que pueden estar relacionadas con la receptividad endometrial. A pesar de que varias moléculas se han presentado como factores claves que contribuyen al útero receptivo, tales como moléculas de adhesión, citoquinas y factores de crecimiento, entre otras⁵, ninguno de estos marcadores moleculares ha demostrado todavía ser clínicamente útil en la evaluación de la receptividad funcional ¹. Cabe recordar que es el útero quien tiene el papel central entre los tejidos reproductivos en el contexto de la comunicación temprana embrión-madre, y una preñez exitosa depende de una compleja serie de eventos moleculares y celulares a nivel endometrial y los factores responsables de la interacción inicial entre los tejidos maternos y embrionarios, siguen siendo poco conocidos⁶.

Investigaciones recientes han indicado que un folículo preovulatorio más grande^{7,8}, una mayor duración del proestro ^{7,9}, así como concentraciones de estradiol (E₂) preovulatorio más altas ¹⁰ y niveles altos de progesterona (P₄) después de la ovulación ^{8,11} tienen efectos positivos sobre la fertilidad en el ganado bovino de carne; sin embargo, los mecanismos por los que el tiempo y la prominencia de estas hormonas actúan alrededor de la ovulación para mejorar la fertilidad “siguen siendo desconocidos”¹². Para su estudio se utilizan herramientas de última tecnología como la secuenciación; metodología que se está utilizando para determinar la firma del transcriptoma uterino “más favorable” para el desarrollo de una preñez⁶. Aquí nace la hipótesis global del grupo de trabajo del LFEM, donde se estudia el tiempo en cual las hormonas reproductivas modulan el oviducto y la función uterina, para apoyar el desarrollo del embrión preimplantatorio.

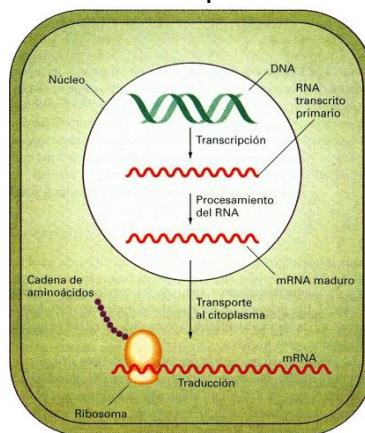
Continuando con este enfoque, surge la necesidad de crear hipótesis para desarrollar investigaciones que lleven a explicar los procesos fisiológicos básicos y que a su vez contribuyan al mejoramiento de las producciones animales. Ejemplo de ello, son los macro-proyectos de investigación: **“Efeitos do crescimento do folículo pré-ovulatório sobre a função luteal e do ambiente endócrino Peri-ovulatório na fertilidade de fêmeas bovinas, Assinaturas da Receptividade y Controle da luteólise precoce em vacas *Bos indicus* (Nelore) suplementadas com progesterona injetável de longa ação no início da fase luteínica”** del Laboratorio de Fisiología y Endocrinología Molecular.

La justificación para desarrollar esta pasantía, nace del interés de adquirir conocimientos, experiencia, trabajo en campo, y apropiar manejo de técnicas analíticas de laboratorio que están a la vanguardia, y lo más importante, ser parte de una escuela de pensamiento crítico.

4. REVISIÓN DE LITERATURA.

Todos los organismos vivos eucariotas presentan un conjunto de informaciones de carácter hereditario conocido como genoma, el cual consiste en una secuencia de ácidos nucleicos presentes en el núcleo de las células. De forma simple y resumida, esta secuencia tiene la función de organizar la producción de todas las proteínas del organismo, las cuales son responsables por la estructuración y participación de procesos metabólicos esenciales^{13,14}

La función primaria de todo gen es producir una cadena polipeptídica, esto es una proteína; pero la síntesis de esta ocurre en el ribosoma que está en el citoplasma celular^{15,16}, ya la información necesaria para la producción de proteínas viene del DNA, que está en el núcleo de las células, de esta forma, el DNA transfiere sus informaciones para moléculas de RNA, las cuales atraviesan la membrana nuclear para comandar la síntesis proteica, este proceso de transferencia de informaciones del DNA para el RNA es llamado "Transcripción"¹⁷ demostrado en la Figura 3.



Fuente: Griffiths et al., 2008.

Figura 3. Transcripción y traducción en células eucariotas. El mRNA es transcrito del DNA en el núcleo, transportado para el citoplasma para su traducción en una cadena polipeptídica.

El término expresión génica se refiere al proceso por el cual la información genética contenida en un gen específico es traducida en una proteína específica que ejercerá su función en la célula o fuera de ella¹⁸

La expresión génica se da por una cascada de eventos, regulados por ligaciones de proteínas a una secuencia de DNA, que activan señales bioquímicas en cadena que resultan en la activación o represión de diversos genes que coordinan el ciclo celular, la división y diferenciación a través de factores de crecimiento y sus receptores, hormonas, citoquinas, factores de transcripción y enzimas de control de replicación de DNA¹⁹.

La expresión génica resulta en el genoma funcional; de esta forma converge sobre la regulación transcripcional, esencial para la comprensión de mecanismos moleculares detallados de eventos complejos a nivel celular y de los tejidos²⁰.

La regulación génica, o el control de la expresión génica, conducen a una expresión diferenciada en las células y puede ocurrir en cualquier etapa de la síntesis proteica²¹. Así, el control génico realizado por el 1. Control transcripcional, cuando y con qué frecuencia cierto gen es activado o reprimido; 2. Control del procesamiento de mRNA, a través del *splicing* de los mRNAs transcritos; 3. Control del transporte de RNA por la selección de los RNAs que serán transportados al citoplasma; 4. Control de la traducción por la selección de los mRNAs a ser transcritos “Traducidos”; 5. Control de la degradación de RNA por la desestabilización de determinadas moléculas de mRNA en el citoplasma y 6. Control de la actividad proteica con la activación o inactivación selectiva de proteínas sintetizadas¹⁴.

Aunque cualquiera de esos controles puede llevar a una producción inicial de proteínas en diferentes tipos celulares y estadios de desarrollo, o en respuesta al ambiente, el control transcripcional es el más importante mecanismo para determinar la expresión de genes y la codificación de mRNA con la producción de proteínas²².

El análisis de la expresión génica es hecha por la investigación cuantitativa de proteínas (ELISA, Elispot, Ensayos Biológicos, Electroforesis bidimensional), de moléculas de mRNA (Northern Blots, hibridización *in situ*, ensayo de ribonucleasas y RT-PCR)²³, y se ha tornando una herramienta importante para un mejor entendimiento del funcionamiento genómico en las células, permitiendo la comprensión y entendimiento de los procesos moleculares envueltos en la expresión, en el ciclo celular y su diferenciación, ayudando en el diagnóstico de enfermedades genéticas degenerativas, la comprensión de mecanismos inmunológicos y endocrinos, el análisis del desarrollo celular, de tejidos y embrionario, entre otros beneficios.

Esta pequeña parte de la revisión está encaminada al acompañamiento del proyecto “Controle da luteólise precoce em vacas Bos indicus (Nelore) suplementadas com progesterona injetável de longa ação no início da fase luteínica” (experimentos 229, 230, 232) del Laboratorio de Fisiología y Endocrinología Molecular).

Efectos paradójicos de la suplementación de Progesterona en el inicio del diestro.

En bovinos la baja eficiencia reproductiva es uno de los mayores problemas para producción de carne y leche en el mundo. En este contexto, se conoce que la tasa de concepción es menor en Novillas²⁴ y vacas^{25,26}, con reducida concentración de P₄ durante el inicio del diestro. Bajas concentraciones de P₄ en este periodo reducen el tamaño del conceptus (Conceptus= Embrión y membranas asociadas) en el día 16, y consecuentemente pueden resultar en baja secreción de interferón Tao, comprometiendo la manutención de la preñez^{21,27}. Por otro lado, el aumento de las concentraciones de P₄ en la primera semana post-concepción están relacionadas con las alteraciones en la expresión génica del endometrio²⁸ que estimulan el alargamiento del conceptus^{29,30}, y el aumento de la concentración de interferón-Tao^{27,30} Variables altamente relacionadas con el éxito gestacional.

Recientemente el grupo de investigación del LFEM utilizó la suplementación de P₄ inyectable de larga acción post-IA (150 mg, 4,5 días post inducción de la ovulación) en un experimento de fertilidad en campo con vacas de carne post-parto. El aumento de las concentraciones de P₄ durante el inicio del diestro por la suplementación de P₄ de larga acción aumento la proporción de vacas preñadas sobre el total de vacas inseminadas (P/IA). Hubo incremento de la P/IA del grupo suplementado (57,9%, 22/48), comparado con el grupo placebo (40,4%, 21/52) en vacas con CL <0.9 cm², como también en vacas con anestro (55,6%, 105/189 vs. 46,0%, 86/187)⁴

Las estrategias de suplementación con P₄ en el inicio del diestro incluyen aplicaciones intramusculares (i.m.) diarias³¹⁻³³, y con única aplicación (i.m.) de P₄ de larga acción³⁴, o con la inserción de dispositivos intravaginales de P₄^{30,35,36}. Pero paradójicamente en algunos estudios se encontró que la suplementación de P₄ en el inicio del diestro comprometió el desarrollo del CL e indujo anticipadamente la luteólisis, lo que resulto en un acortamiento del ciclo estral^{30,31,34}.

Otro punto importante cuando se habla en incremento de las tasas de preñez es que un folículo preovulatorio mayor, lleva al desarrollo de un cuerpo lúteo mayor y así favoreciendo el progreso del embrión. En este contexto, los efectos de la P₄ y estradiol (E₂) en el oviducto y ambiente uterino asociados a un folículo preovulatorio de mayor tamaño son también probablemente importantes en las tasas de preñez^{37,38} “El aumento de los niveles de E₂ durante el proestro tiene un efecto positivo en la tasa de preñez de vacas de carne lactantes³⁹. Esto ocurre porque el

E₂ está envuelto en el control de varios procesos fisiológicos que contribuyen al establecimiento y la manutención de la preñez, incluyendo el efecto en las células foliculares, oocito, transporte de gametos y preparación del ambiente uterino⁴⁰. En un estudio reciente, vacas ovariectomizadas, pero recibiendo suplementación de P₄ para simular el diestro, fueron tratadas o no con E₂ en el proestro. La tasa de pérdida embrionaria aumentó en el grupo que no recibió E₂, concluyendo así que ocurrió una posible falla en la receptividad uterina y que esta fue asociada a la ausencia de un estímulo estrogénico⁴¹. De esta forma, estrategias para aumentar la cantidad de E₂ durante el proestro-estro, así como el estímulo al crecimiento del folículo pre-ovulatorio o la suplementación exógena de E₂, aliado a la suplementación con P₄ en el inicio del diestro, pueden resultar en mejores tasas de P/IA.

El proyecto tiene como desafío científico evaluar el proceso luteolítico anticipado a través de la relación temporal entre el momento de la expresión de genes endometriales relacionados a la producción de PGF2 α luteolítica y el aumento de la concentración circulante de P₄ y la evaluación del comprometimiento en el desarrollo y funcionalidad del CL después del tratamiento.

Así, los objetivos de los proyectos acompañados buscan comprender los mecanismos endocrinos, moleculares endometriales y luteolíticos asociados a la luteolisis precoz causada por la suplementación de P₄ durante el inicio del diestro con miras a buscar estrategias para manipular este proceso; y la posible asociación, suministro o inhibición de E₂ en el proestro y diestro temprano respectivamente como estrategia para disminuir la luteolisis precoz. Experimentos en los cuales se desarrolló la pasantía; con el acompañamiento de actividades a campo y rutina de laboratorio.

5. ACTIVIDADES DESARROLLADAS

5.1. Rutina del Laboratorio de Biología Molecular:

- ✓ Extracción de proteínas:
- ✓ Cuantificación de abundancia de proteínas: Western.Blot
- ✓ Extracción de ácidos nucleicos.
RNA por protocolos:
Trizol® modificado
Columna-Kit: pureLink® RNA-Ambion (protocolo realizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante).
- ✓ Síntesis de cDNA-RT. Transcripción reversa realizado con el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied BioSystems).
- ✓ Cuantificación de transcritos mediante qPCR: Termociclador (Step One PlusT® Figura 8 y SYBR® Green PCR Master Mix-applied biosystems
- ✓ Técnicas de histoquímica e Inmuno-histoquímica.

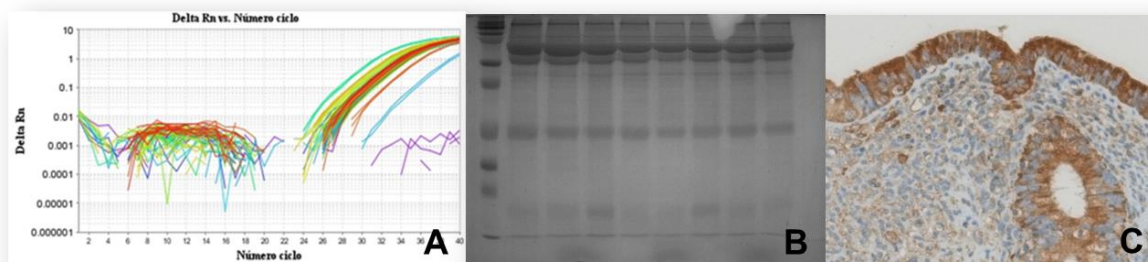


Figura 4. Técnicas acompañadas en rutina de laboratorio: **A.** Curva de amplificación da PCR en tiempo real; **B.** Western Blotting; **C.** Corte histológico- Inmuno-histoquímica de tejido endometrial marcando receptor de progesterona.

5.2. Actividades en campo.

Acompañamiento en actividades experimentales.

- ✓ Ultrasonografía en escala de grises.
- ✓ Ultrasonografía Doppler.
- ✓ Toma de muestras para dosajes hormonales: colectas pareadas de sangre y extracción de plasma sanguíneo.
- ✓ Toma de muestras endometriales: Citologías y Biopsias uterinas.
- ✓ Aspiración folicular guiada por ultrasonido.



Figura 5. Actividades desarrolladas y acompañadas a Campo. **A.** Ecografía Color-Doppler, Vascularización (Flujo) de CL día 9, Ecógrafo Mindray M5; **B.** Toma de muestra-Biopsia Endometrial con Pinza; **C.** Toma de muestra-Citología Endometrial con escoba citológica.

5.3. Jornal Club semanal

Discusión crítica de artículos científicos “Discusión y delineamientos experimentales de los ensayos desarrollados en el Laboratorio.

5.4. Congresos y Simposios

- ✓ XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu-Paraná. Agosto 25-27 de 2016.
- ✓ VI Simpósio de Pesquisa e Pós Graduação do Programa de Pós Graduação em Reprodução Animal da FMVZ/USP - Pirassununga SP. Septiembre 7-9 de 2016.



Figura 6. Equipo de trabajo LFEM **A.** Workshop “Proseando com o embrião in vivo: os idiomas tubárico e uterino” (IV Workshop do Projeto Temático Assinaturas da

Receptividade) **B. PremiacionXXX** Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu, 2016.

5.5. Conversatorios, Seminarios y Aulas con invitados internacionales.

- ✓ **Disciplina de posgrado - Endocrinología Molecular de los Procesos Reproductivos a cargo del profesor Mario Binelli (3-8 de octubre/2016)**
- ✓ **Niamh Forde** (Univ. Leeds, Inglaterra): Emerging areas of research in uterine biology including Extracellular vesicles. Octubre 7 de 2016.
- ✓ **Niamh Forde**(Univ. Leeds, Inglaterra):: Using omics to understand the effect of lactation on dairy cow fertility. Octubre 6 de 2016.
- ✓ **Juliano da Silveira** (FZEA-USP): O papel das vesículas extracelulares no desenvolvimento folicular e embrionário em equinos e bovinos. Octubre 5 de 2016.
- ✓ **Bruce Murphy** (University of Montreal) The LHR gene regulates the ovary. Septiembre 14 de 2016.
- ✓ **Bruce Murphy** (University of Montreal) How to write a scientific paper from an author and editor's views, Septiembre 14 de 2016.
- ✓ **Guilherme Pugliesi** (Universidade Federal de Minas Gerais) Detección y favorecimiento de la gestación en bovinos en el inicio del desarrollo embrionario, Julio 1 de 2016.

5.6. Capacitaciones y cursos.

- ✓ Capacitación en el uso de Bases de Datos Scopus, Science Direct, Compendex y Mendeley de ELSEVIER Mayo 4 de 2016 - Anfiteatro FZEA/USP-Pirassununga.
- ✓ Capacitación en Técnicas de Pipetaje. Seminario Pipetas Gilson: como aumentar la vida útil y obtener mejores resultados. Mayo 31 de 2016. USP-Campus Pirassununga.

5.7. Proyecto de asistencia tecnica veterinaria al productor de leche de la region de Pirassununga. Ciclo de Seminarios teorico practicos-Hospital Veterinario ZMV-USP.

- ✓ Ed Hoffmann Madureira. FMVZ-USP. Desafios en la fertilidad de Vacas lecheras de alta producción, Septiembre 13 de 2016.
- ✓ Eduardo Harry Birgel Júnior FZEA-USP. Principales afecciones pódalas de vacas de alta producción, Agosto 23 de 2016.
- ✓ Melina Yasuoka. FZEA-USP. Evaluación de la conducta neonatal, Junio 7 de 2016

- ✓ Cristian Martins, FMVZ-USP. Importancia de la mastitis en la calidad de la leche, Mayo 10 de 2016
- ✓ Agustin Silva, FMVZ-USP. Cual es la importancia y como evaluar el escore de condición corporal en vacas lecheras, Abril 26 de 2016

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Adquisición y aprendizaje de técnicas laborales como:

- ✓ Western Blotting
- ✓ qPCR-RT
- ✓ Inmuno-histoquímica.

Acompañamiento, experiencia y trabajo en campo con:

- ✓ Aplicación hormonal para el control de la ovulación en hembras bovinas.
- ✓ Colecta de muestras biológicas sangre-endometrio (Biopsia y citología).
- ✓ Evaluación del tracto reproductivo mediante ultrasonografía transrectal (Escala de grises-Color doppler).
- ✓ Técnica de aspiración folicular (OPU).

Siendo un gran resultado, este proceso formativo en la cual se ha participado en procesos investigativos desde sus bases con delineamientos experimentales hasta el acompañamiento en el procesamiento y análisis de la información, redacción y discusión de resultados. Dejando además algunas citaciones como coautor de algunas publicaciones científicas (resúmenes de congresos y artículos científicos en proceso de redacción).

7. CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

En la actualidad, las técnicas y biotecnologías disponibles para la producción animal y en nuestro caso investigación para el esclarecimiento de procesos fisiológicos básicos son altamente diversificadas y conocidas. Tener dominio de estas es un gran resultado y una gran experiencia; pero la conclusión puntual de esta práctica es la adquisición de un criterio científico, compartiendo y hablando en un lenguaje científico.

Se da como recomendación la continuación de este tipo de opción de Grado, practica importante para la adquisición de conocimiento y experiencia en conjunto con la iniciación en académicas y científicas que son de gran importancia en un proceso formativo. Además de aumentar el acompañamiento y el orden para la aprobación y desarrollo de esta por parte del Comité de Programa.

8. APRECIACIÓN PERSONAL

Fue una de las experiencias más gratificantes que se ha desarrollado en este proyecto personal de formación académica. Altamente formativa en la cual se compartió en academia e investigación. Un proceso de educación en una escuela de Veterinaria de tradición, un departamento de trabajo altamente diversificado y un grupo de trabajo muy eficiente, con calidad y alta publicación intelectual.

Proceso formativo con grandes orientadores y acompañada de experiencia y publicaciones que han mejorado mi hoja de vida; más importante aún han enriquecido y mudado la forma de ver la investigación, aumentando la curiosidad y el cariño por esta rama de la profesión.

9. PUBLICACIONES Y CITACIONES:

Resúmenes en: Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu, 2016.
Workshop “Proseando com o embrião in vivo: os idiomas tubárico e uterino”
(IV Workshop do Projeto Temático Assinaturas da Receptividade)

Molecular control of early luteolysis in Nelore (*Bos indicus*) cows supplemented with injectable long-acting progesterone during the early luteal phase

Emiliana Oliveira Santana Batista¹; Beatriz Cardoso¹; Milena Lopes Oliveira¹; Fabian David Cuellar Cuadros¹; Lorena G. Zapata²; Maressa Izabel Santos da Silva²; Barbara Piffero Mello²; Mariana Sponchiado¹; Diego Kenji Codá Miyai²; Guilherme Pugliesi¹; Mario Binelli¹

1. FMVZ-USP; 2. FZEA-USP.

Keywords: cattle; corpus luteum; cytobrush

Long-acting injectable (i) progesterone (P4) supplementation at the onset of diestrus increases conception rate in beef cattle. However, earlier onset of functional and structural regression of the corpus luteum (CL) has been observed, resulting in pregnancy loss in 30 to 50% of animals subjected to this treatment. Therefore, we tested the hypothesis that iP4 -induced premature luteolysis is associated with earlier decrease in the abundance of endometrial P4 receptor (PGR) and an earlier rise in the abundance of oxytocin receptors (OXTR). Cycling, multiparous, non-lactating Nelore cows (n=24) were selected after detection a CL in at least one of two consecutive exams, conducted 12 days apart. Cows received a P4 -releasing device (Sincrogest®, OuroFino Saude Animal), 2 mg of estradiol benzoate i.m. (Sincrodiol®, Ouro Fino Saude Animal) and PGF₂α treatment (500 µg sodium cloprostenol; Sincrocio®, Ouro Fino Saude Animal). After 8 days an additional PGF₂α treatment was performed. The day of ovulation was defined as Day 0. According to pre-ovulatory follicle size, cows that ovulated were assigned to receive no treatment (Control group; n=12) or 300 mg of iP4 on Day 3 post-ovulation (Sincrogest®, Ouro Fino Saude Animal, Brazil; iP4 group; n=12). Endometrial tissue was collected transcervically from every cow using a cytological brush on days 3, 5, 7, 9, 11, 13 and 16, immediately submerged in 1 mL Trizol reagent and stored at -80°C. Color Doppler ovarian ultrasonography was conducted every 12 h from device removal to verify ovulation and daily from Day 3 to 25 for evaluation of development and regression of the CL. The day of structural luteolysis was defined as the day when CL area (cm²) decreased by 25% of the average CL area measured on Days 7 and 8. Data were examined for normality using Shapiro-Wilk test. Data that were not normally distributed were transformed to natural logarithms, square or ranks. The

SAS PROC MIXED procedure (version 9.2; SAS Institute, Cary, NC, USA) was used for analysis. Fisher's exact test distribution was used for comparisons of frequency data. Data are presented as the mean $\pm$ SEM, unless otherwise indicated. Structural luteolysis occurred earlier ($P=0.03$) in the iP4 group (16.4 ± 0.9 d) compared to the control group (18.8 ± 0.7 d). The frequency of cows that began functional luteolysis before Day 17 was greater ($P=0.03$) in the iP4 group (50.0%) than in the control group (8.3%). There was a group by time interaction ($P<0.05$) for abundance of the OXTR gene. Cows in the iP4 group that presented earlier onset of luteolysis had a greater abundance of OXTR on Day 16 than the previous days while cows of P4 group that did not have early luteolysis showed similar abundance of OXTR across the experiment. Abundance of PGR was similar between groups across time. In conclusion, iP4-induced early luteolysis is associated with an early rise in the abundance of endometrial OXTR. We speculate that this molecular event is associated with earlier release of endometrial PGF₂ α pulses, involved in CL regression.

Acknowledgements: FAPESP, CNPq, CAPES

Spatio-specific functional transcriptomic signature of bovine endometrium 7 days after insemination

Mariana Sponchiado¹; Nathália Souza Gomes¹; Guilherme Pugliesi¹; Thiago Martins¹; Maite del Collado²; Roney dos Santos Ramos³; Moana Rodrigues França¹; Milena Lopes Oliveira¹; Angela María Gonella-Díaz¹; Kaue Ribeiro¹; Fabian David Cuellar Cuadros¹; Mario Binelli¹

1. FMVZ-USP; 2. FZEA-USP; 3. Ourofino Saúde Animal.

Keywords: gene expression; uterus; embryo development

Establishment of pregnancy depends on a well-balanced interplay between sex-steroid profiles, the maternal reproductive tract and the developing conceptus. The bovine endometrium is a dynamic tissue that undergoes spatio-temporal functional changes directed by the ovarian hormones, estradiol (E2) and progesterone (P4). Due to local vascular arrangements, sex steroid input to the uterus varies both along its wide and the broad axis. A long standing unresolved question is how early can the embryo signal to the reproductive tract and change its function. The present study tested two hypotheses simultaneously: (1) there is a spatio-specific transcriptomic signature in the endometrium and, (2) presence of an embryo influences such signature 7 days after AI (D7). It was expected that abundance of sex-steroid-responsive, receptivity related genes would decrease from anterior to posterior thirds of the uterine horn and from mesometrial to antimesometrial side. Moreover, due to its limited number of cells, presence of a D7 embryo would not affect endometrial gene expression. Estrous cycles of multiparous, non-lactating Nelore cows were synchronized and animals were allocated to one of two experimental groups at estrus (D0): Control (Con; n=8), cows were sham-inseminated and received semen diluent; or Pregnant (Preg; n=16), cows were

inseminated with semen from the same batch of a commercial bull, 12h post estrus. Size of the pre-ovulatory follicle, subsequent CL area and plasmatic P4 concentrations on D7 were similar between groups ($p>0.1$). Cows were slaughtered on D7 and the uterine horn ipsilateral to the CL was isolated and divided in anterior, middle and posterior thirds, starting from the uterotubaric junction. Each uterine third was washed individually with DMPBS and presence of an embryo in the flushing was confirmed in the Preg group. All embryos found ($n=10$) were in the anterior third flushings. Subsequently, intercaruncular endometrial samples were collected from each uterine third in the mesometrial and antimesometrial region. Relative abundance of transcripts for 89 key genes was measured by PCR using Fluidigm platform (Biomark HD). Data were analyzed by split-split-plot ANOVA and included the effects of group (Con vs. Preg.), third (anterior, middle and posterior) and region (mesometrial and antimesometrial) and interactions. Spatial regulation of gene expression across the uterine horn was verified with upregulation for expression of genes associated to secretory activity, transporters, prostaglandin cascade and redox environment pathways on the anterior and decreasing to the posterior third. In contrast, for transcripts associated with extracellular matrix remodeling and growth factors, there was an upregulation of transcript abundance from the anterior towards the posterior third. In conclusion, the expression pattern of specific genes varied among regions of the female reproductive tract.

Acknowledgements: FAPESP, CNPq, CAPES.

Effect of AI on the incidence of short luteal lifespan in cows supplemented with P4 at early diestrus

Thiago Martins¹; Guilherme Pugliesi¹; Mariana Sponchiado¹; Beatriz Cardoso¹; Kauê Ribeiro da Silva¹; Nathália Souza Gomes¹; Fabian D. Cuellar Cuadros¹; Maressa Izabel S. da Silva²; Barbara Piffero Mello²; Diego Kenji C. Miyai²; Mario Binelli¹

1. FMVZ-USP; 2. FZEA-USP.

Keywords: embryo; luteolysis; bovine

In cattle, progesterone supplementation (P4 -suppl) during early diestrus stimulates conceptus growth and the proportion of pregnant cows (P/AI). Despite such beneficial effects, a proportion (~40%) of non-inseminated and P4 -suppl animals undergo reduction on luteal lifespan (early luteolysis) (Reprod.Dom.Anim.49,85-91,2014) which may reduces the potential of further improvements of this strategy in inseminated cows. Accordingly, the presence of an embryo or conceptus between days 13 and 16 of diestrus alters gene expression in the endometrium (Biolreprod. 85,144-156, 2011). We hypothesized that presence of the conceptus in P4 -suppl cows reduces the incidence of early luteolysis. Non-lactating multiparous cows ($n=94$) were synchronized using an estradiol/P4 -based protocol followed by estrus detection twice a day for 4 days. Cows detected in estrus ($n= 66$), were split to

receive 12h after estrus an AI with semen from a single high fertility bull (n=23; AI subgroup) or semen extender only (n=43; non-AI subgroup). At AI, the pre-ovulatory follicle diameter was measured and ovulation (d0) was monitored every 12h by transrectal ultrasonography. On d3, an IM injection with 150 mg of long acting P4 (Sincrogest; Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, SP) was given to non-inseminated (P4 -suppl group; n= 21) and inseminated cows (AI+P4 -suppl group; n= 23). Non-inseminated and non-treated cows (Control; n= 22) received at the same moment (d3) a sham injection (NaCL 0.9%). From d3 to d23 CL development and function was evaluated by B-mode and Color Doppler ultrasonography. Criteria for classifying cows that underwent luteolysis was CL area <2.0 cm² and colored blood flow signals that covered ≤ 25% of total CL area. Additionally, blood samples were collected every 48 h from d9 to d21 for measurement of P4 concentrations by RIA. On d30, pregnancy was checked by ultrasonography. Data were analysed with SAS v.9.3. Frequency of luteolysis was analyzed using Chi-square test and continuous variables using Kruskal-Wallis test. Treatment with P4 (p=0.03) reduced luteal lifespan (Control: 17.6^a ± 0.37; P4 -suppl: 16.4^b ± 0.37 and AI+P4 -suppl non-pregnant cows: 15.9^b ± 0.71 days). The proportion of cows in luteolysis on d15 was not affected by AI (Control: 4.5%^b [1/22]; P4 -suppl: 33.3%^a [7/21] and AI+P4 -suppl: 26.1%^a [6/23]; p≤0.05) but on d16, the proportion was similar between AI+P4 -suppl and the control group and tended to differ between AI+P4 -suppl and the P4 -suppl (Control: 31.8%^b [7/22]; P4 -suppl: 61.9%^{a,X} [13/21] and AI+P4 -suppl: 34.8%^{a,b,Y} [8/23]; ^{a,b}p=0.05; ^{X,Y}p=0.07). On d30 the P/AI was 30.4% (7/23). Removing the D30 confirmed pregnant cows, the proportion of D30 non-pregnant cows that showed luteolysis until d16 was 50.0% (8/16). In conclusion, AI affected incidence of short luteal lifespan, but this effect is limited by the conceptus developmental stage. Acknowledgements: FAPESP, CNPq, CAPES.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Binelli M, Scolari SC, Pugliesi G, et al. The transcriptome signature of the receptive bovine uterus determined at early gestation. *PLoS One*. 2015;10(4):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0122874.
2. Berg DK, van Leeuwen J, Beaumont S, Berg M, Pfeffer PL. Embryo loss in cattle between Days 7 and 16 of pregnancy. *Theriogenology*. 2010;73(2):250-260. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.09.005.
3. Daniel Givens M, Marley MSD. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology*. 2008;70(3):270-285. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.04.018.
4. Pugliesi G, Santos FB, Lopes E, Nogueira É, Maio JRG, Binelli M. Improved fertility in suckled beef cows ovulating large follicles or supplemented with long-acting progesterone after timed-AI. *Theriogenology*. 2016;85(7):1239-1248. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.12.006.
5. Kaloglu C, Onarlioglu B. Extracellular matrix remodelling in rat endometrium during early pregnancy: The role of fibronectin and laminin. *Tissue Cell*. 2010;42(5):301-306. doi:10.1016/j.tice.2010.07.004.
6. Van Hoeck V, Scolari SC, Pugliesi G, et al. Gene expression profiling by high throughput sequencing to determine signatures for the bovine receptive uterus at early gestation. *Genomics Data*. 2015;5:94-96. doi:10.1016/j.gdata.2015.05.030.
7. Dadarwal D, Mapletoft RJ, Adams GP, Pfeifer LFM, Creelman C, Singh J. Effect of progesterone concentration and duration of proestrus on fertility in beef cattle after fixed-time artificial insemination. *Theriogenology*. 2013;79(5):859-866. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.01.003.
8. Peres RFG, Júnior IC, Filho OGS, Nogueira GP, Vasconcelos JLM. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. *Theriogenology*. 2009;72(5):681-689. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.04.026.
9. Bridges GA, Mussard ML, Burke CR, Day ML. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. *Anim Reprod Sci*. 2010;117(3-4):208-215. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.05.002.
10. Perry GA, Smith MF, Roberts AJ, MacNeil MD, Geary TW. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J Anim Sci*. 2007;85(3):684-689. doi:10.2527/jas.2006-519.
11. McNeill RE, Diskin MG, Sreenan JM, Morris DG. Associations between milk

- progesterone concentration on different days and with embryo survival during the early luteal phase in dairy cows. *Theriogenology*. 2006;65(7):1435-1441. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.08.015.
12. Ramos RS, Oliveira ML, Izaguirry AP, et al. The periovulatory endocrine milieu affects the uterine redox environment in beef cows. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015;13(1):39. doi:10.1186/s12958-015-0036-x.
 13. Sontag ED. Molecular Systems Biology and Control. *Eur J Control*. 2005;11(4-5):396-435. doi:10.3166/ejc.11.396-435.
 14. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell* 6e. Vol 6.; 2014. doi:10.1002/1521-3773(20010316)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C.
 15. Ramalho, M. A. P.; Santos, J. B.; Pinto CABP. *Genética Na Agropecuária*. 5th ed. Lavras-Minas Gerais: UFLA; 2012.
http://www.funep.org.br/visualizar_livro.php?idlivro=2580.
 16. Wrenzycki C. Expresión gènica calidad de los embriones. In: *Biotechnología de La Reproducción*. Mar de la Plata; 2008:381-396.
 17. Gabriel J. Emprego das técnicas de biologia molecular nos estudos de expressão gènica. In: *Biologia Molecular Aplicada a Produção Animal*. 1rt ed. Brasília: Embrapa Informações tecnológicas,; 2001:123-134.
 18. Griffiths A. J. F.; Wessler S. R.; Lewontin R.C. *Genetica*. 9th ed. Medellin (Colombia): McGraw-Hill; 2008.
http://odin.ces.edu.co/Contenidos_Web/41025104.pdf.
 19. Rodriguez-Martinez MA, Francisco G, Sanches-Cabral L, Garcia-Ruiz IR, Festa-Neto C. Molecular genetics of non-melanoma skin cancer. *An Bras Dermatol*. 2006;81(5):405-419.
 20. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech*. 2004;15(3):155-166. doi:15/3/155 [pii].
 21. Forde N, Mehta JP, McGettigan PA, et al. Alterations in expression of endometrial genes coding for proteins secreted into the uterine lumen during conceptus elongation in cattle. *BMC Genomics*. 2013;14:321. doi:10.1186/1471-2164-14-321.
 22. Forde N, Mehta JP, McGettigan PA, et al. Alterations in expression of endometrial genes coding for proteins secreted into the uterine lumen during conceptus elongation in cattle. *BMC Genomics*. 2013;14(1):321. doi:10.1186/1471-2164-14-321.
 23. Leutenegger CM, Alluwaimi AM, Smith WL, Perani L, Cullor JS. Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time

- TaqMan?? polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol*. 2000;77(3-4):275-287. doi:10.1016/S0165-2427(00)00243-9.
24. Diskin MG, Morris DG. Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants Fertilization Rate in Cattle Fertilization Rates in Small Ruminants Extent and Timing of Early Embryo Loss in. 2008;43:260-267. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01171.x.
 25. Souza AH, Narciso CD, Batista EOS, Carvalho PD, Wiltbank MC. Effect of uterine environment on embryo production and fertility in cows. *Anim Reprod*. 2014;11:159-167.
 26. Stronge AJH, Sreenan JM, Diskin MG, Mee JF, Kenny DA, Morris DG. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology*. 2005;64(5):1212-1224. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.02.007.
 27. Mann GE, Fray MD, Lamming GE. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-?? production in the cow. *Vet J*. 2006;171(3):500-503. doi:10.1016/j.tvjl.2004.12.005.
 28. Forde N, Carter F, Fair T, et al. Progesterone-Regulated Changes in Endometrial Gene Expression Contribute to Advanced Conceptus Development in Cattle. *Biol Reprod*. 2009;81(4):784-794. doi:10.1095/biolreprod.108.074336.
 29. Carter F., Forde N., Duffy P., Wade M., Fair T., Crowe M. A., Evans A. C. O., Kenny D. A., Roche J. F. LP. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reprod Fertil Dev*. 2008;20:368-375. <http://dx.doi.org/10.1071/RD07204>.
 30. O'Hara L, Forde N, Carter F, et al. Paradoxical effect of supplementary progesterone between day 3 and day 7 on corpus luteum function and conceptus development in cattle. *Reprod Fertil Dev*. 2014;26(2):328-336. doi:10.1071/RD12370.
 31. Ginther OJ. Effect of progesterone on length of estrous cycle in cattle. *Am J Vet Res*. 1970;31:493-496.
 32. Beltman ME, Roche JF, Lonergan P, Forde N, Crowe MA. Evaluation of models to induce low progesterone during the early luteal phase in cattle. *Theriogenology*. 2009;72(7):986-992. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.06.018.
 33. Friedman E, Roth Z, Voet H, Lavon Y, Wolfenson D. Progesterone supplementation postinsemination improves fertility of cooled dairy cows during the summer. *J Dairy Sci*. 2012;95(6):3092-3099. doi:<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-5017>.

34. Pugliesi G, Oliveria ML, Scolari SC, et al. Corpus luteum development and function after supplementation of long-acting progesterone during the early luteal phase in beef cattle. *Reprod Domest Anim*. 2014;49(1):85-91. doi:10.1111/rda.12231.
35. Parr MH, Crowe MA, Lonergan P, Evans ACO, Rizos D, Diskin MG. Effect of exogenous progesterone supplementation in the early luteal phase post-insemination on pregnancy per artificial insemination in Holstein-Friesian cows. *Anim Reprod Sci*. 2014;150(1-2):7-14. doi:10.1016/j.anireprosci.2014.08.008.
36. Monteiro Jr. PLJ, Ribeiro ES, Maciel RP, et al. Effects of supplemental progesterone after artificial insemination on expression of interferon-stimulated genes and fertility in dairy cows. *J Dairy Sci*. 2014;97(8):4907-4921. doi:http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7802.
37. Gonella-Díaz AM, da Silva Andrade SC, Sponchiado M, et al. Size of the Ovulatory Follicle Dictates Spatial Differences in the Oviductal Transcriptome in Cattle. *PLoS One*. 2015;10(12):e0145321. doi:10.1371/journal.pone.0145321.
38. Mesquita FS, Pugliesi G, Scolari SC, et al. Manipulation of the periovulatory sex steroidal milieu affects endometrial but not luteal gene expression in early diestrus Nelore cows. *Theriogenology*. 2014;81(6):861-869. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.12.022.
39. Sá Filho MF, Santos JEP, Ferreira RM, Sales JNS, Baruselli PS. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. *Theriogenology*. 2011;76(3):455-463. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.02.022.
40. Pohler KG, Geary TW, Atkins JA, Perry GA, Jinks EM, Smith MF. Follicular determinants of pregnancy establishment and maintenance. 2012:649-664. doi:10.1007/s00441-012-1386-8.
41. Madsen CA, Perry GA, Mogck CL, Daly RF, Macneil MD, Geary TW. Effects of preovulatory estradiol on embryo survival and pregnancy establishment in beef cows &. *Anim Reprod Sci*. 2015;158:96-103. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.05.006.

11. ANEXOS

Se presentan como Anexos:

- ✓ Carta calificación del Orientador Mario Binelli.
- ✓ Certificado de conclusión de pasantía