

## Follicular and luteal morphometry, progesterone concentration and early gestation in Holstein cows (*Bos Taurus*) at high altitude in the tropics (Colombia)

### Morfometría folicular y luteal, concentración de progesterona y éxito de la gestación en vacas Holstein (*Bos Taurus*) en el trópico alto (Colombia)

Marbel Monroy G<sup>1\*</sup> M.Sc, Claudia Jiménez E<sup>1</sup> DVSc, Aureliano Hernández V<sup>1</sup> Ph.D.

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, departamento de Ciencias de Salud Animal. Edificio 561B, Carrera 30 No. 45-03 Bogotá, Colombia. \*Correspondence: [mymonroyg@unal.edu.co](mailto:mymonroyg@unal.edu.co)

Received: November 2017; Accepted: April 2018.

#### ABSTRACT

**Objectives.** The aim of this study is to evaluate the relationship among ovulatory follicle (OF) size, corpus luteum (CL) volume, and progesterone (P4) serum levels with pregnancy success. **Materials and methods.** Nineteen Holstein cows located in Bogotá, Colombia with a history of 2 to 6 previous calving were used in the study. Following 40 day postpartum, two consecutive phases were evaluated as follows: 1) estrous cycle; 2) early pregnancy or return to estrus after Artificial Insemination (AI). Ultrasound exam was performed twice daily after first sign of estrus to evaluate OF diameter and CL volume, and serum P4 levels were evaluated on days 6, 9, 12 and 15 after ovulation. Cows were inseminated 12 hours post estrus signs and pregnancy was diagnosed 30 days post AI. **Results.** 47.36% of the cows were diagnosed as pregnant after AI. Pregnant cows had smaller OF diameters ( $17.85 \pm 2.39$  mm) than non-pregnant females ( $21.10 \pm 2.86$  mm) ( $p < 0.05$ ). Cows with smaller OF were more likely to become pregnant (OR=0.624, IC=95% (0.4-0.9) ( $p < 0.05$ ). There were non significant differences in the CL volume ( $p = 0.10$ ) and P4 serum values ( $p = 0.39$ ) between pregnant and no pregnant cows on days 6, 9, 12 and 15 post ovulation. Serum P4 levels were not correlated to CL size and reproductive status. **Conclusions.** This study shows that there was not significant difference in serum P4 levels and the CL volume when comparing pregnant with non-pregnant cows. A relationship was found between the OF diameter and the CL volume. Small OF diameter was a factor associated with early pregnancy.

**Keywords:** Estrous cycle, follicular dynamics, ovary, postpartum, pregnancy, reproduction (*Source: CAB*).

#### RESUMEN

**Objetivo.** Evaluar la relación entre el diámetro del folículo ovulatorio (FO), el volumen del cuerpo lúteo (CL), los niveles séricos de progesterona (P4) con el éxito de la gestación. **Materiales y métodos.** En 19 vacas Holstein que habían tenido 2 a 6 partos ubicadas en Bogotá, se evaluaron dos fases consecutivas a partir del día 40 postparto, la primera correspondió al ciclo estral y la segunda correspondió a la gestación temprana o repetición de celo. En cada fase se detectó el celo, se realizó ultrasonografía para evaluar el diámetro del FO, confirmar ovulación, y el volumen del CL los días 6, 9, 12 y 15; en estos días también se evaluó los niveles séricos de P4. En la segunda fase se realizó

inseminación artificial (IA) y se diagnosticó la gestación 30 días post-IA. **Resultados.** El 47.36% de las vacas se diagnosticaron como gestantes y el 52.63% como no gestantes. Las gestantes presentaron diámetros de FO menores  $17.85 \pm 2.39$  mm al de las no gestantes ( $21.10 \pm 2.86$  mm;  $p < 0.05$ ). Las vacas que presentaron diámetros de FO más pequeños tuvieron mayor posibilidad de quedar gestantes (OR=0.624, IC=95% (0.4-0.9) ( $p < 0.05$ ). Los animales gestantes y no gestantes presentaron similares volúmenes de CL ( $p=0.10$ ) y niveles séricos de P4 ( $p=0.39$ ) los días 6, 9, 12 y 15. **Conclusiones.** No hubo diferencias en los niveles séricos de p4 y el volumen del CL. Vacas con FO de menor diámetro tuvieron mayor probabilidad de gestación. Otras variables como CL y niveles de P4 no fueron predictivos del éxito de la gestación.

**Palabras clave:** Ciclo estral, dinámica folicular, ovario, postparto, preñez, reproducción (Fuente: CAB).

## INTRODUCTION

In ruminants, a successful pregnancy depends on complex interactions between the mother and the conceptus in the genital tract of the female (1). During maternal pregnancy recognition, the viable embryo must be able to interrupt the luteolysis with the production of Bovine trophoblastic interferon, and promoting the action of a functional CL that synthesizes adequate levels of P4 (2), a hormone that plays a vital role in early gestation, since it stimulates and maintains the functions necessary for the growth of the conceptus, implantation and placentation (3,4).

An OF with appropriate size can become, after ovulation, a functional CL that will secrete P4 with a positive effect on the establishment of pregnancy (5,6). Although the results from different studies have been variable and contradictory (7-10). Other studies suggest that there is no association of the diameter of the ovulatory follicle, size of the CL, serum levels of P4 with pregnancy rates (11,12).

Given the wide variation in the abovementioned results, it was considered worth to evaluate OF diameter, CL volume, serum progesterone levels and their possible relationship with the estrous cycle and success of pregnancy, under the specific environmental conditions in the Sabana of Bogotá (Colombia), at an altitude of 2565 meters above sea level, average temperature of 13°C and relative humidity of 80-85%.

## MATERIALS AND METHODS

**Location and animals.** The study was conducted at the Marengo Agricultural Center of the Universidad Nacional de Colombia, located Bogotá-Mosquera, with an altitude of 2565 meters above sea level. Average annual temperature of 13°C, with fluctuations between 4°C and 20°C, a relative humidity of 80% to 85% (13).

## INTRODUCCIÓN

En rumiantes, el éxito de la gestación depende de complejas interacciones entre la madre y el conceptus en el tracto genital de la hembra (1). Durante el reconocimiento materno de la preñez el embrión viable en el útero debe ser capaz de interrumpir la luteolisis mediante la secreción del interferón trofoblástico bovino, inhibiendo la síntesis de prostaglandina y promoviendo la acción de un cuerpo lúteo (CL) funcional que sintetice niveles adecuados de progesterona (P4) (2), la P4 juega un papel vital en la gestación temprana, al estimular y mantener las funciones necesarias para el crecimiento del embrión, implantación y placentación (3,4).

Un FO de un adecuado tamaño puede generar un CL funcional que va a secretar más P4 por lo tanto tiene un efecto positivo en el establecimiento de la gestación (5,6); aunque los resultados han sido variados y contradictorios, algunos autores indican que existe un rango óptimo de tamaño folicular en el que se puede llegar a altas tasas de gestación (7-10). Otros estudios sugieren que no existe asociación entre el diámetro del FO, tamaño del CL, niveles séricos de P4 y porcentajes de preñez (11,12).

Dada la amplia variación de los resultados anteriores, se consideró necesario evaluar el diámetro del FO, volumen del CL, niveles séricos de P4 y establecer su relación en el ciclo estral y la gestación temprana bajo las condiciones medioambientales de la Sabana de Bogotá (trópico alto Colombiano), altitud (2650 msnm), temperatura (13°C) y humedad (80-85%).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Sitio de estudio y animales.** El trabajo experimental se realizó en el Centro Agropecuario Marengo de la Universidad Nacional de Colombia, ubicado en Mosquera (Cundinamarca, Colombia), con una altitud de 2565 msnm y temperatura promedio de 13°C, (rango 4-20°C), humedad relativa 80 a 85% (13).

Nineteen Holstein cows with a history of 2 to 6 previous calving and a body condition >2.5 (1=thin, 5=obese), were used in the study, under a rotational grazing system. The cows are maintained under appropriate welfare conditions as a part of a herd health program.

Cows were found with good sanitary conditions, with the current vaccination plan (Brucellosis and foot-and-mouth disease). At the beginning of the experiment, only the females that did not present clinical reproductive pathologies such as metritis, endometritis, follicular or luteal cysts among others, were selected; which was determined through visual inspection of the external reproductive organs, rectal palpation, ultrasonography and vaginoscopy.

Cows enrolled in the study were evaluated starting 10 days postpartum. Rectal palpations and trans-rectal ultrasound were performed in order to determine return to cyclicity, absence of reproductive pathologies and the occurrence of one regular estrus cycle. From 40 days post-partum on, only cows which completed the abovementioned conditions were selected (14), they were enrolled in the study. Heat detection, rectal palpations, ultrasound, and blood sampling, to evaluate serum levels of P4, were performed as explained below.

**Estrus Detection.** The detection of estrus was achieved by visual observation performed four times a day by the same persona throughout the experiment. The observation periods were as follow, from 6:00 to 7:00 am, 12:00(noon) to 1:00 pm, 5:30 to 6:30 pm and from 9:00 to 10:00 pm. The beginning of estrus was determined when a cow showed restlessness, attempt to mount other females or permit them to do so, licking and sniffing of external genitals, or the presence of vulvar mucus; estrus was determined when a cow repeatedly allowed to be mounted by other females (15).

**Rectal Palpation and Trans Rectal Ultrasound examination.** Ultrasound was performed by an expert professional throughout the experiment with a Pie-medical Aquila Pro Vet ultrasound scanner, equipped with a 7.5 MHz linear trans rectal transducer.

From the 40<sup>th</sup> postpartum day on, two consecutive phases were evaluated, the first phase corresponded to the first estrous cycle and was defined as the lapse between the presentation of the first and second estrus (Day 0), following the latter all the cows enrolled were inseminated. The second phase corresponded to early gestation or return to estrus starting on Day 0. Pregnancy diagnosis was performed on day 30 (Figure 1).

Se seleccionaron animales que parieran entre agosto de 2013 y junio de 2014. La muestra consistió de 19 vacas Holstein entre 2 a 6 partos, con condición corporal > 2.5 (1=delgada, 5=obesa) y permanecieron bajo un sistema de pastoreo rotacional, con condiciones de salud y bienestar adecuadas.

Las vacas fueron encontradas con buenas condiciones sanitarias, y con el plan vacunal vigente (Brucelosis y Fiebre aftosa). Al iniciar el experimento solamente se seleccionaron las hembras que no presentaron patologías clínicas reproductivas como metritis, endometritis, quistes foliculares o luteales entre otros; el estatus de salud de los animales se determinó por medio de un examen clínico general, la inspección visual de los órganos reproductivos externos, palpación rectal, ultrasonografía y vaginoscopia.

Desde el día 10 posparto se realizó palpación rectal y ultrasonografía a todas las hembras para determinar el restablecimiento de los ciclos ováricos (presencia de un CL en los ovarios), y ausencia de patologías uterinas postparto. Solo se seleccionaron las vacas que al día 40 postparto cumplieran con los anteriores criterios de inclusión. El experimento inició a partir del día 40 postparto (14) y se realizó mediante identificación de celos, palpaciones rectales, ecografías, y toma de muestras sanguíneas para evaluar niveles séricos de P4.

**Detección del estro.** La detección del estro se realizó por el método de observación visual y por el mismo operario durante todo el experimento, cuatro veces al día, de 6 a 7 am, 12 a 1 pm, 5:30 a 6:30 pm y de 9 a 10 pm; se consideró como inicio de celo cuando una vaca presentó signos como inquietud, intento de monta a otras hembras, lamido y olfateo de los genitales externos, o presencia de moco vaginal; el inicio del celo fue definido como la permanencia de un animal para ser montado por otro u otros animales durante algunos segundos y en varias ocasiones, conducta denominada monta estática (15).

**Palpación rectal y ultrasonografía.** La ultrasonografía fue realizada por un profesional experto durante todo el experimento, se usó un ecógrafo marca Pie-medical Aquila Pro Vet, con transductor rectal lineal de 7.5 MHz.

Los animales seleccionados fueron seguidos hasta que se detectara el primer celo después de los 40 días postparto. Este celo se consideró el día cero para el inicio del estudio y la información se normalizó a partir de este estro. Se analizaron dos fases consecutivas, la primera fase correspondió al ciclo estral y fue definida como el lapso que

Ultrasound examination was performed at the first signs of estrus and subsequently repeated every 12 hours until ovulation was confirmed defined as the OF disappearance and the subsequent appearance of a CL. The largest diameter of the OF was recorded for analysis (Figure 1).

Additionally, ultrasound was performed on days 6, 9, 12 and 15 of each phase in order to evaluate the diameter of the CL in mm. CL Volume was calculated with a formula previously reported (11) as follows,  $\frac{4}{3} \times \pi \times r^3$ , in which the value of  $\pi$  (3.1416) is a constant and  $r$  corresponds to the radius (diameter divided by 2) of the size of the CL. For CL with a cavity, the volume was calculated with the same formula and the volume of the cavity was subtracted from volume of the luteal tissue. A functional CL was considered as such when serum levels of P4 on day 6 after estrus were greater than 1 ng/ml (11).

Pregnancy diagnosis was performed on day 30 post AI. A cow was considered pregnant when there was presence of amniotic fluid and an embryo with a heartbeat (11).

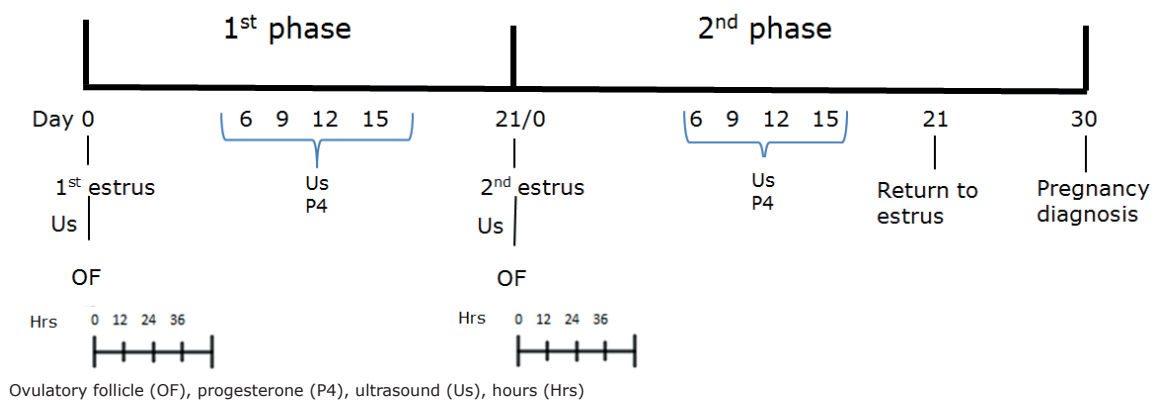
#### Blood samples and hormonal analysis.

The serum P4 levels of days 6, 9, 12 and 15 of the two consecutive phases were analyzed. Subsequently, ELISA technique with a "DS-EIA-Steroid-progesterone" kit, RH-351, (Italy) was used for the quantification of serum P4 levels. The serum levels of P4 were adapted to the test by standardizing the curve, taking into account what was reported by the literature in bovines (14). The test had a lower sensitivity limit of 0.1 ng/ml and an inter-assay and intra-assay variation coefficient of 4.2% and 3.6% respectively.

transcurrió entre la presentación del primer (día 0 del ciclo) y segundo celo (IA); la segunda fase inició con el segundo celo en el cual se realizó inseminación artificial (IA) a todas las vacas. Esta fase incluyó vacas que se diagnosticaron gestantes 30 días después del servicio o aquellas que repitieron celo regular o irregularmente (Figura 1). La IA se realizó 12 horas después de detectado el celo con semen congelado de casa comercial (ABS) y asignado a cada vaca de acuerdo a su evaluación lineal (Figura 1).

Tanto en el primer como en el segundo celo (en el cual se realizó IA) se realizó examen ecográfico con el fin de determinar el diámetro máximo en mm del FO (folículo observado a la ultrasonografía desde la manifestación de celo hasta la ovulación) y posteriormente se repitió cada 12 horas hasta confirmar la ovulación, definida como la desaparición del FO y la subsiguiente aparición de un CL; el mayor diámetro del FO observado fue el que se tuvo en cuenta para realizar el respectivo análisis (Figura 1).

Adicionalmente se realizaron mediciones ultrasonográficas los días 6, 9, 12 y 15, después de cada celo, con el fin de evaluar el diámetro del CL en mm y de acuerdo con esta medida se calculó su volumen (11). Para ello, se empleó la fórmula  $\frac{4}{3} \times \pi \times r^3$ , en la que el valor de  $\pi$  (3.1416) es una constante y  $r$  correspondió al radio (diámetro dividido en 2) del tamaño del CL. En los CL con cavidad, el volumen de ella se calculó con la misma fórmula; del volumen del tejido luteal se restó el de la cavidad y de esta forma se obtuvo el volumen del CL. Se consideró CL funcional cuando los niveles séricos de P4 en el día 6 posterior al celo fueron mayores a 1 ng/ml (11).



**Figure 1:** Methodology used in the two phases

**Statistical analysis.** For the statistical analyzes of the two consecutive phases, data was normalized to the estrus manifestation day (day 0), and for days 6, 9, 12 and 15 of each phase. The information obtained from each of the variables was initially analyzed using descriptive statistics with mean values and standard deviation (SD). Animals with 2 and 3 follicular growth waves were compared using the Student's t test (16).

Subsequently, a general linear model of repeated measures was used, in which the repeated measurements were on days 6, 9, 12 and 15, and the variables were: serum levels of P4 and CL volume. The presence of significant differences among the levels were analyzed with the orthogonal polynomial test and normality was evaluated according to Scheffe' test (16).

The relationship among independent continuous variables: volume of CL, OF diameter, interval from the beginning of estrus to ovulation, interval from the beginning of estrus to AI, P4 serum levels in relation to independent variable reproductive status (pregnant, non-pregnant on day 30 after the AI), was determined by binary logistic regression. The strength of the association was estimated through the odds ratio (OR) calculation. To determine the relation between OF diameter, luteal volume and serum levels of P4 in each cycle, linear regression analysis was used. All  $p < 0.05$  were considered significant. The statistical software used was SAS 9.3 program (SAS 2002 Institute, Cary, NC, USA) and SPSS® version 22.

## RESULTS

### Follow-up of the first phase: estrous cycle.

On average, first heat was observed on day  $61.36 \pm 26.7$  postpartum and the duration of the correspondent cycle was  $22.94 \pm 1.8$  days (mean  $\pm$  SD) with a range between 21 to 26 days. 47.36% (9/19) of the animals presented 2 waves of follicular growth, of which 66.6% (6/9) had an estrous cycle duration of 21 days and 33.3% (3/9) of 22 days. Cows with 3 follicular waves (52.63% (10/19)) had estrous cycle duration of 23 days (30% (3/10)), 24 days (20% (2/10)), 25 days (30% (3/10)) of and 26 days (20% (2/10)) (Figure 2).

There were no significant differences in the OF diameter among animals that presented 2 follicular waves and those of 3 follicular waves ( $p > 0.05$ , Table 1). The time elapsed between the beginning of estrus and ovulation was on average of  $27.66 \pm 6.32$  h. for cows with 2 follicular waves and of  $28 \pm 6$  h. for cows with 3 waves ( $p > 0.05$ ), with a range between 21 at 36 h.

La gestación se diagnosticó como positiva el día 30 post IA, por la detección de líquido amniótico y el latido cardiaco embrionario (11).

### Muestras de sangre y análisis hormonal.

Los niveles séricos de P4 se midieron en los días 6, 9, 12 y 15 de cada fase, por la técnica de ELISA con un kit "DS-EIA-Steroid-progesterone", RH-351, Italia. Los niveles fueron adaptados al ensayo mediante la estandarización de la curva, teniendo en cuenta lo reportado por la literatura para bovinos (14). El límite inferior de sensibilidad fue de 0.1 ng/ml y el coeficiente de variación inter-ensayo e intraensayo de 4.2% y 3.6% respectivamente.

### Análisis estadístico.

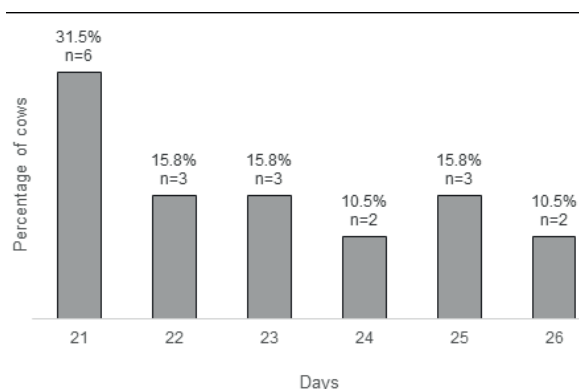
Para los análisis estadísticos, se normalizaron los datos a partir de la manifestación de celo en las vacas (día 0), posteriormente se tuvo en cuenta los días: 6, 9, 12 y 15 de cada fase. La información obtenida de cada una de las variables inicialmente se analizó utilizando estadística descriptiva. Se compararon los resultados de los animales de 2 y 3 ondas de crecimiento folicular mediante la prueba t de Student (16).

Posteriormente se utilizó el modelo general lineal de medidas repetidas, en donde aquellas fueron los días 6, 9, 12 y 15 y las variables respuestas fueron: niveles séricos de P4 y volumen del CL. La presencia de diferencias significativas entre los niveles se analizó con la prueba de polinomios ortogonales y se evaluó normalidad de acuerdo con la prueba de Scheffe (16).

La relación de las variables continuas independientes, volumen del CL, diámetro del FO, intervalo del inicio del celo a la ovulación, intervalo del inicio del celo a la IA, niveles séricos de P4, con la variable dependiente, el estado reproductivo (gestante, no gestante) al día 30 después de la IA, se determinó mediante regresión logística binaria. La fortaleza de la asociación entre las variables se estimó a través del cálculo de "odds ratio" (OR). Para determinar la relación del diámetro del FO, volumen luteal y niveles séricos de P4 en cada ciclo, se utilizó análisis de regresión lineal. Todo valor  $p < 0.05$  fue considerado significativo. Todos los procedimientos fueron realizados con el programa SAS 9.3 (SAS 2002 Institute, Cary, NC, USA) y SPSS® versión 22.

## RESULTADOS

Seguimiento de la primera fase: ciclo estral. Una vez se identificó el celo a cada una de las vacas, se inició el seguimiento del primer ciclo estral en promedio en el día  $61.36 \pm 26.7$  posparto y la duración de este ciclo fue de  $22.94 \pm 1.8$  días



**Figure 2.** Distribution of estrous cycle duration in postpartum Holstein cows.

After ovulation, ultrasound evaluation of luteal growth was performed. Days 12 and 15 had the largest size of CL during the study period. CL on Day 12 had an average volume of  $13800 \pm 2788.72 \text{ mm}^3$  in cows with 2 follicular waves and of  $16343.88 \pm 3579.05 \text{ mm}^3$  on cows with 3 waves. Similarly, on day 15, an average luteal volume of  $13814.98 \pm 2655.17 \text{ mm}^3$  was observed in cows of 2 waves and of  $16342.83 \pm 3542.1 \text{ mm}^3$  in those with 3 waves. There were no significant differences.

Serum levels of P4 for all the cows on day 6 of the estrous cycle were  $>3 \text{ ng/ml}$  ( $4 \pm 0.9 \text{ ng/ml}$ ). On day 12 the highest levels were found; cows with 2 follicular waves had  $6.43 \pm 0.46 \text{ ng/ml}$  of P4 and cows with 3 follicular waves had  $6.52 \pm 0.32 \text{ ng/ml}$  (Table 1, Figure 3).

**Follow-up of the second phase: Pregnant and non-pregnant cows.** The second cycle began when the second heat was detected at which point, all the cows in the study were inseminated  $12.8 \pm 1.8 \text{ h}$  after the estrus signs were first seen. On average, cows were AI at  $89.4 \pm 34.7$  days postpartum; with an average milk production of  $24.4 \pm 4.9 \text{ Lts/day}$  (range of 16.4 to 32.7 Lts). After ovulation, ultrasound evaluation of luteal growth was performed on days 6, 9, 12 and 15. Thirty days post-AI, 47.36% of the cows were diagnosed as pregnant (9/19), and 52.63% (10/19) as non-pregnant by trans-rectal ultrasound examination.

The OF from pregnant cows had significantly ( $p < 0.05$ ) smaller diameter ( $17.85 \pm 2.39 \text{ mm}$ ) when compared with non-pregnant cows ( $21.10 \pm 2.86 \text{ mm}$ ) as seen in Table 2.

No significant differences were found in P4 levels in pregnant and non-pregnant cows during the studied days. On day 6 of the cycle P4 levels were on average  $4.08 \pm 1.1 \text{ ng/ml}$  for the group

(promedio  $\pm$  DE) con un rango entre 21 a 26 días. El 47.36% (9/19) de los animales presentaron 2 ondas de crecimiento folicular, de los cuales el 66.6% (6/9) tuvo una duración del ciclo estral de 21 días y el 33.3% (3/9) de 22 días. El 52.63% (10/19) de las vacas presentaron 3 ondas de crecimiento folicular de las cuales el 30% (3/10) evidenciaron duración del ciclo estral de 23 días, el 20% (2/10) de 24 días, el 30% (3/10) de 25 días y el 20% (2/10) de 26 días (Figura 2).

No hubo diferencias significativas en el diámetro del FO, cuando se compararon los animales que presentaron 2 ondas de crecimiento folicular, con aquellos de 3 ondas ( $p > 0.05$ ; Tabla 1). El tiempo transcurrido entre el inicio del celo y la ovulación fue en promedio de  $27.66 \pm 6.32 \text{ h}$  para las vacas de 2 ondas foliculares y similarmente de  $28 \pm 6 \text{ h}$  para las vacas de 3 ondas ( $p > 0.05$ ).

Luego de la ovulación se continuó con la evaluación del crecimiento luteal. En los días 12 y 15 se observó el mayor tamaño del CL, para el día 12 se observó un volumen promedio de  $13800 \pm 2788.72 \text{ mm}^3$  para las vacas de 2 ondas de crecimiento folicular y de  $16343.88 \pm 3579.05 \text{ mm}^3$  para las de 3 ondas, similarmente el día 15 se observó un volumen luteal en promedio de  $13814.98 \pm 2655.17 \text{ mm}^3$  para las vacas de 2

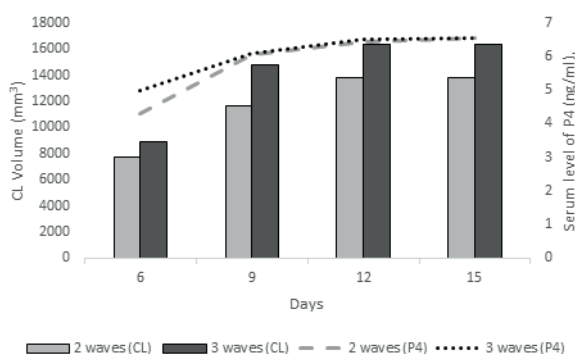
**Table 1.** Comparison between animals with 2 and 3 follicular waves in the first cycle for values (average  $\pm$  SD) for OF diameter (mm), CL volume ( $\text{mm}^3$ ), serum P4 concentration (ng / ml) and time elapsed from the beginning of estrus to ovulation.

Variable	2 Waves	3 Waves	P-value
OF (mm)	19.87 $\pm$ 2.8	19.83 $\pm$ 2.8	0.97
Time elapsed from the beginning of estrus to ovulation (h)	27.66 $\pm$ 6.3	28.00 $\pm$ 6.0	0.91
P4 (ng/ml) day 6	4.30 $\pm$ 0.9	4.97 $\pm$ 0.8	0.13
day 9	6.07 $\pm$ 0.5	6.08 $\pm$ 0.6	0.96
day 12	6.43 $\pm$ 0.4	6.52 $\pm$ 0.3	0.65
day 15	6.53 $\pm$ 0.3	6.54 $\pm$ 0.3	0.92
CL Volume ( $\text{mm}^3$ ) day 6	7766.89 $\pm$ 1985.4	8902.86 $\pm$ 2863.5	0.34
day 9	11629.68 $\pm$ 2527.6	14736.05 $\pm$ 4225.1	0.07
day 12	13800.08 $\pm$ 2788.7	16343.88 $\pm$ 3579.1	0.11
day 15	13814.98 $\pm$ 2655.2	16342.83 $\pm$ 3542.1	0.10

Ovulatory Follicle (OF), Corpus Luteum (CL), progesterone (P4)

\*Values  $p < 0.05$  were considered as statistically significant.

\*\* The reported values correspond to the average  $\pm$  ED



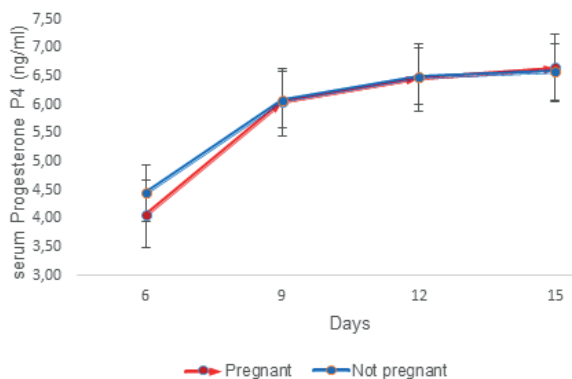
Corpus Luteum (CL), progesterone (P4) n=19

**Figure 3.** Progesterone serum concentrations and corpus luteum volume on days 6, 9, 12 and 15 of the 1<sup>st</sup> estrous cycle in Holstein cows with 2 and 3 follicular growth waves.

of pregnant cows, and  $4.51 \pm 0.6$  ng / ml for non-pregnant. The highest serum levels of P4 were found on the day 12;  $6.48 \pm 0.3$  ng/ml for pregnant cows, and  $6.58 \pm 0.4$  ng/ml for non-pregnant animals. Similarly, on day 15, P4 mean levels found in pregnant animals were  $6.65 \pm 0.3$  ng/ml and  $6.67 \pm 0.4$  ng/ml in non-pregnant animals (Table 2, Figure 4).

Similarly, there were no significant differences in luteal volume in pregnant and non-pregnant cows ( $p=0.10$ ), (Table 2, Figure 5); Regardless of size and reproductive status, CL produced similar serum levels of P4.

However, when evaluating non-pregnant cows (10/19), females with normal return to estrus (5/10) and others with late return (5/10) were found. The females to normal return to estrus were those that had a cycle length in the second phase ( $22.6 \pm 1.5$  days) similar to the first phase ( $23 \pm 1.4$  days). Cows considered with a delayed



**Figure 4.** Serum levels of Progesterone (P4) (ng/ml) in pregnant and non-pregnant cows

ondas y de  $16342.83 \pm 3542.1$  mm<sup>3</sup> para las de 3 ondas, y no hubo diferencias significativas. Los niveles séricos de P4 a partir del día 6 del ciclo estral fueron  $>3$  ng/ml ( $4 \pm 0.9$  ng/ml) y en el día 12 se encontraron mayores concentraciones, para las vacas de 2 ondas foliculares  $6.43 \pm 0.46$  ng/ml y similarmente para las de 3 ondas  $6.52 \pm 0.32$  ng/ml (Tabla 1; Figura 3).

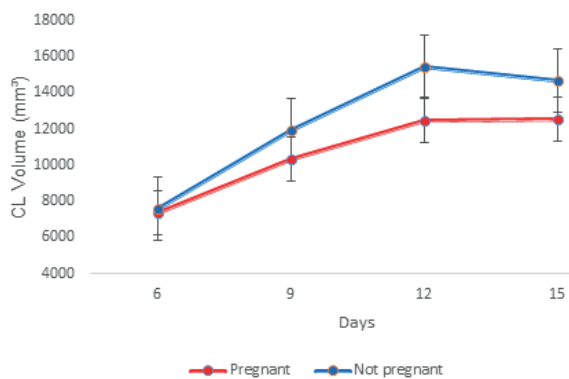
**Seguimiento de la segunda fase: Vacas gestantes y no gestantes.**

La segunda fase del seguimiento comenzó cuando se detectó el segundo celo. Las vacas fueron inseminadas  $12.8 \pm 1.8$  h después de iniciado el celo, en promedio a los  $89.4 \pm 34.7$  días postparto; con una producción promedio de  $24.4 \pm 4.9$  Lts (rango de 16.4 a 32.7 Lts). El día 30 post-IA se evaluó el estado reproductivo y se diagnosticaron el 47.36% como hembras gestantes (9/19), y el 52.63% (10/19) como no gestantes. Los resultados de las mediciones de las vacas gestantes y no gestantes se muestran en la Tabla 2, las vacas gestantes presentaron diámetros de FO ( $17.85 \pm 2.39$  mm) significativamente menores ( $p < 0.05$ ) comparados con las no gestantes ( $21.10 \pm 2.86$  mm); no hubo diferencias significativas en las otras variables evaluadas ( $p > 0.05$ ).

**Table 2.** Comparison of the values (average  $\pm$  standard deviation) of OF diameter (mm), CL volume (mm<sup>3</sup>), serum P4 concentration (ng / ml), time elapsed from the beginning of estrus to ovulation in pregnant and non-pregnant cows.

Variable	Pregnant Average $\pm$ DE	Not pregnant Average $\pm$ DE	P-value
OF (mm)	17.85 $\pm$ 2.3	21.10 $\pm$ 2.8	0.01*
Time elapsed from the beginning of estrus to ovulation (h)	30.00 $\pm$ 7.3	28.00 $\pm$ 6.0	0.53
Time from AI to ovulation (h)	17.33 $\pm$ 6.3	16.00 $\pm$ 6.0	0.65
P4 (ng/ml) day 6	4.08 $\pm$ 1.1	4.51 $\pm$ 0.6	0.35
day 9	6.05 $\pm$ 0.4	6.21 $\pm$ 0.4	0.47
day 12	6.48 $\pm$ 0.3	6.58 $\pm$ 0.4	0.62
day 15	6.65 $\pm$ 0.3	6.67 $\pm$ 0.4	0.93
CL Volume (mm <sup>3</sup> ) day 6	7325.57 $\pm$ 1891.6	7207.45 $\pm$ 1978.7	0.89
day 9	10353.88 $\pm$ 2688.7	11926.27 $\pm$ 2200.1	0.19
day 12	12487.43 $\pm$ 2988.2	15518.63 $\pm$ 3656.0	0.07
day 15	12524.88 $\pm$ 2959.5	14935.41 $\pm$ 3599.4	0.14

Ovulatory Follicle (OF), Corpus Luteum (CL), progesterone (P4)  
 \*Values  $p < 0.05$  were considered as statistically significant.  
 \*\* The reported values correspond to the average  $\pm$  DE



**Figure 5.** Volume of Corpus luteum (CL) (mm<sup>3</sup>) in pregnant and non-pregnant cows.

return to estrus where those that had a greater cycle length ( $33.4 \pm 7.7$  days) compared with their first phase ( $23.6 \pm 2.7$ ) (Table 3).

**Table 3.** Comparison between OF diameter and duration of the first and second phase in cows of normal and late return to heat.

Reproductive status	Variable	First phase	Second phase	P-value
Normal return to estrus	Duration (days)	$23 \pm 1.4$	$22.6 \pm 1.5$	0.47
	OF (mm)	$21.38 \pm 2.6$	$19.72 \pm 2.7$	0.08
Delay return to estrus	Duration (days)	$23.6 \pm 2.7$	$33.4 \pm 7.7$	0.04
	OF (mm)	$19.74 \pm 2$	$22.46 \pm 2.02$	0.02

In addition, females with normal return to estrus had smaller OF diameters in the second phase (phase in which AI was performed) ( $19.72 \pm 2.76$ mm) compared to the first phase ( $21.38 \pm 2.6$ mm). In contrast to these results, the cows with late return to estrus had higher OF diameters in the second phase ( $22.46 \pm 2.02$ mm) compared with the first ( $19.74 \pm 2$ mm) (Table 3). Association between serum levels of P4, CL volume, and the diameter of the OF

After comparing pregnant and non-pregnant animals regarding the OF diameter, volume of CL and serum levels of P4, the relationship between these variables was evaluated. A linear relationship was found between the OF diameter and the CL volume ( $p < 0.05$ ). Additionally, in the first phase there was a linear relationship between CL volume and serum P4 levels ( $p < 0.05$ ), however in the second phase this relationship was not found ( $p > 0.05$ ).

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de P4 en vacas gestantes y no gestantes. En el día 6 del ciclo se observaron niveles de P4 en promedio de  $4.08 \pm 1.1$  ng/ml para el grupo de gestantes, y de  $4.51 \pm 0.6$  ng/ml para las no gestantes y los mayores niveles séricos de P4 se encontraron en el día 12 con niveles de  $6.48 \pm 0.3$  ng/ml para gestantes, y de  $6.58 \pm 0.4$  ng/ml para las no gestantes; similarmente en el día 15 se encontraron niveles en promedio de  $6.65 \pm 0.3$  ng/ml para gestantes y de  $6.67 \pm 0.4$  ng/ml para las no gestantes (Tabla 2; Figura 4).

Igualmente no hubo diferencias significativas en relación con los valores del volumen luteal entre vacas gestantes y no gestantes ( $p = 0.10$ ), (Tabla 2; Figura 5); independientemente del tamaño y del estado reproductivo, los CL de estos animales produjeron similares niveles séricos de P4.

Al evaluar las vacas no gestantes (10/19) se encontraron hembras con retorno normal al estro (5/10) y otras con retorno tardío (5/10). Las hembras con retorno normal al celo fueron aquellas que la duración en días de la segunda fase ( $22.6 \pm 1.5$  días) fue similar a la primera ( $23 \pm 1.4$  días); por el contrario, las vacas con retorno tardío la duración en días de la segunda fase ( $33.4 \pm 7.7$  días) fue mayor a la primera fase ( $23.6 \pm 2.7$ ) (Tabla 3).

Además las hembras con retorno normal al estro presentaron diámetros menores de FO en la segunda fase (fase en la cual se realizó IA) ( $19.72 \pm 2.76$ mm) comparado con la primera ( $21.38 \pm 2.6$ mm). En contraste con estos resultados las vacas de retorno tardío presentaron diámetros de FO mayores en el segunda fase ( $22.46 \pm 2.02$ mm) comparado con la primera ( $19.74 \pm 2$ mm) (Tabla 3).

Luego de comparar los animales gestantes y no gestantes en cuanto al diámetro del FO, volumen del CL y niveles séricos de P4, se evaluó la relación entre estas variables. Se encontró relación lineal entre el diámetro del FO y el volumen del CL ( $p < 0.05$ ). Adicionalmente en la primera fase hubo relación lineal entre el volumen del CL y los niveles séricos de P4 ( $p < 0.05$ ), sin embargo en la segunda fase no se encontró esta relación ( $p > 0.05$ ).

Por otro lado, de acuerdo con los resultados del modelo de medidas repetidas, se determinó que los promedios de los volúmenes del CL y los niveles séricos de P4 fueron significativamente diferentes ( $p < 0.001$ ) a través del tiempo (días 6, 9, 12 y 15) y esta relación fue lineal ( $p < 0.001$ ) y cuadrática ( $p < 0.001$ ).



On the other hand, the repeated measures model showed that the mean values of the CL volumes and the serum levels of P4 were significantly different ( $p < 0.001$ ) along the time period studied (days 6, 9, 12 and 15) and this relationship was linear ( $p < 0.001$ ) and quadratic ( $p < 0.001$ ).

**Association between OF diameter, CL volume, serum P4 levels, and early pregnancy.** When evaluating the association between OF diameter, CL volume, P4 and pregnancy, only small OF diameter (18.1 mm) was a factor associated with early pregnancy (OR=1.65, 95% CI (1.039-2.619) ( $p < 0.05$ ) (Table 4). That is to say that the smaller diameter of the OF, the greater the probability of gestation.

**Table 4.** Association between the OF diameter, Corpus Luteum (CL) volume and serum levels of progesterone (P4) during the second phase and gestation at day 30 post-AI.

Variable	OR	95% CI	P-value
OF	1.65	1.039-2.619	0.034
CL day 6	1.0	1.000-1.001	0.769
CL day 9	0.5	0.23-13.801	0.72
CL day 12	5.8	0.25-13.678	0.52
CL day 15	0.06	0.23-10.862	0.30
P4 day 6	1.62	0.543-4.822	0.38
P4 day 9	1.0	1.000-1.001	0.19
P4 day 12	0.99	0.997-1.001	0.33
P4 day 15	1.0	0.99-1.004	0.20

## DISCUSSION

In the present study, we found cows with 2 and 3 follicular growth waves during an estrous cycle as reported in studies conducted in other countries (17-19).

When comparing animals with 2 and 3 follicular waves; there were no significant differences in OF diameter, with both groups of animals having an average diameter of 19.8 mm. It is possibly that no significant differences were found because they presented similar growth rates and duration of the ovulatory wave. These results differ from those of other authors (20), who reported differences in the diameter of the OF between cows with 2 and 3 follicular waves. Cows with 2 follicular waves and those with 3 follicular waves had an average diameter of 15.03 mm and 14.68 mm respectively. Our results may be an incidental finding and require further investigations to determine if there are

**Asociación del diámetro del FO, volumen del CL, niveles séricos de P4, con la gestación temprana.** Posteriormente al evaluar cuáles de las anteriores variables (diámetro del FO, volumen CL, P4, de la segunda fase) fueron asociadas a la gestación, se encontró que solamente el menor diámetro del FO (18.1 mm) fue un factor asociado a la gestación temprana (OR=1.65, IC 95% (1.039-2.619) ( $p < 0.05$ ), (Tabla 4); es decir que entre menor diámetro tenga el FO hay mayor probabilidad de gestación.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio en la primera fase se presentaron ciclos estrales de 2 y 3 ondas de crecimiento folicular, resultados que coinciden con los reportes de otros países (17-19).

Al comparar los animales de 2 y 3 ondas de crecimiento folicular; se encontró que no hubo diferencias en el diámetro del FO, ya que estos grupos de animales presentaron diámetros promedio de 19.8 mm, posiblemente no se encontraron diferencias porque presentaron similares tasas de crecimiento y de duración de la onda ovulatoria. Estos resultados difieren con los de otros autores (20), que reportan diferencias en el diámetro del FO, donde las vacas de 2 ondas presentaron un diámetro promedio de 15.03 mm y las de 3 ondas de 14.68 mm; nuestros resultados pueden ser un hallazgo incidental y se necesitan más investigaciones para determinar si hay diferencias en el diámetro del FO y de la misma manera determinar los diferentes factores que pueden influir en la presentación de un determinado patrón de ondas de crecimiento folicular en una hembra.

En este grupo de animales también se observó que no hubo diferencias significativas en el tiempo transcurrido desde el inicio del celo hasta la ovulación, las hembras de 2 ondas presentaron un promedio de duración de 27 horas y las de 3 ondas un promedio de duración de 28 horas, lo cual significa que ovularon durante el tiempo esperado normalmente, entre 25 y 36 horas después de iniciado el estro (11).

De otra parte el volumen del CL y los niveles séricos de P4 los días 6,9,12 y 15 fueron similares en los animales de 2 y 3 ondas de crecimiento folicular, probablemente no debería existir diferencias en estos días que se realizó la comparación, ya que a partir del día 6 hay un CL funcional produciendo niveles séricos de P4 mayores a 1 ng/ml independientemente del número de ondas; las diferencias probablemente se observarían cuando comienza la regresión

differences in the diameter of the OF between cows with 2 waves and those with 3 waves and if there are different factors that can influence the presentation of a certain pattern of follicular growth in females.

In this group of animals, it was also observed that there were no significant differences in the average time elapsed from the beginning of estrus to ovulation between cows with 2 follicular waves (of 27 hours) and those with 3 waves (28 hours), in agreement with reports indicating that physiologically, ovulation occurs between 25 and 36 hours after the end of estrus (11).

On the other hand, the volume of the CL and the serum levels of P4 on days 6, 9, 12 and 15 were similar in the animals with 2 and 3 waves of follicular growth. This is probably given to the fact that around day 6 post ovulation there is a functional CL producing serum levels of P4 greater than 1 ng/ml regardless of the number of waves.

Most likely, significant differences would be seen when comparing the beginning of luteal regression and the decline in the serum levels of P4 as cows with 2 waves initiate this process before cows with 3 waves. Furthermore, several authors have found no significant differences in the maximum diameter of CL and the highest serum levels of P4 between 2 and 3 waves cows (20-24).

In the second phase of the present study, there were no significant differences ( $p > 0.05$ ) in the interval from beginning of estrus to ovulation between those cows that became pregnant (30 hrs.) and those that returned to estrus (28 hrs.). This indicates that this interval is not a factor that can be associated with gestation in this group of animals (11).

Pregnant cows had significantly smaller OF diameters than non-pregnant cows; It was found that the small OF diameter was a factor associated with diagnosis of early gestation. It is possible that the duration of the ovulatory wave was longer in non-pregnant animals and that it took longer time to decrease the serum levels of P4, leading to an increase in the size of the dominant follicle due to a longer time of follicular development. Possibly, these large follicles took longer to reach the estrogen levels needed to trigger the estrus behavior and thus there was an anticipated stimulus in the secretion of LH that could cause early maturation or resumption of the meiosis of the oocyte before the ovulatory pick of LH. This could explain that at the time of ovulation, the fertilization ability of the ovum

luteal, y las vacas de 2 ondas inician primero la regresión del CL y disminución de los niveles de P4 comparado con las de 3 ondas. En otra investigación (23) no hubo diferencias en el diámetro máximo del CL ( $p=0.30$ ) y en los mayores niveles séricos de P4 ( $p=0.4$ ). Datos similares a los reportados por varios autores (20-24).

En la segunda fase del presente estudio, tanto las vacas gestantes como las no gestantes ovularon dentro del rango esperado, lo que indica que la ovulación tardía o la ausencia de ésta, no fueron factores que influyeron en la no gestación de este grupo de animales (11).

Las vacas gestantes presentaron diámetros de FO significativamente más pequeños que las no gestantes; además se encontró que el menor diámetro del FO fue un factor asociado a la gestación temprana. Las diferentes causas por las cuales se presentó esta diferencia son inciertas; posiblemente el tiempo de duración de la onda ovulatoria fue mayor en animales no gestantes y tardaron más tiempo en disminuir los niveles séricos de P4 lo cual conlleva a un aumento del tamaño del foliculo dominante por un mayor tiempo de desarrollo folicular. Posiblemente estos folículos al ser de mayor diámetro tardaron más tiempo en alcanzar los niveles de estrógenos necesarios para desencadenar la conducta de celo y de esta manera hubo un estímulo anticipado en la secreción de LH con lo que ocurriría maduración temprana o reanudación de la meiosis del oocito antes de la onda ovulatoria de LH y en el momento de la ovulación pudo afectar la fertilización o resultar en mortalidad embrionaria. De acuerdo con Mimh et al (25) cuando el periodo de dominancia tuvo una duración entre 1 y 4 días se encontró una alta tasa de preñez, mientras que la dominancia mayor a 10 días fue asociada con la ausencia de preñez. Probablemente se debe a que el incremento en la producción de estradiol por un periodo largo de dominancia, afecta el tiempo normal de maduración del oocito (26) y afecta el éxito de la fertilización o pueden presentarse alteraciones en el desarrollo embrionario temprano (27). Otra investigación indica que al extender la duración de dominancia folicular mediante el uso de un dispositivo de P4 dio lugar a un mayor tamaño del FO (11 vs 16 mm) y menor tasa de concepción (65 vs 37%) (28). En un estudio (29), encontraron en vacas Holstein que los FO  $> 20$  mm se relacionaron como predictores de pérdida de la gestación. Sin embargo, aunque hay varias investigaciones (9-11, 29) que concluyen que hay una relación entre el diámetro del FO y la gestación temprana, no está totalmente dilucidado y tampoco existe una

has been affected decreasing fertilization rate or resulting in an early embryonic death before maternal recognition.

According to Mimh and colleagues (25), when the dominance period lasted between 1 and 4 days, a high pregnancy rate was found, while dominance greater than 10 days was associated with a decrease in pregnancy. This is probably due to the fact that the increase in the production of estradiol over a long period of dominance affects the normal oocyte maturation (26) affecting fertilization or causing alterations in early embryonic development (27).

Extending the duration of follicular dominance by using a P4 device resulted in a larger OF size (11 vs 16 mm) and lower conception rate (65 vs 37%) (28). In another study (29), researchers found that OF > 20 mm in Holstein cows was a predictor of gestation loss. However, although there are several studies that conclude that there is a relationship between the OF diameter and early gestation, it is not fully understood and there is not a clear physiological explanation. Additional studies are needed to determine the type of association of follicular diameter with gestation and why larger follicles are associated with a lower pregnancy rate.

When analysing non-pregnant cows, we found animals with normal and late return to estrus. Those with normal return to estrus, in the two phases evaluated, had the same number of follicular waves, similar length of cycles and similar average OF diameters during the 2 cycles evaluated. Fertilization may have failed or conceptus could died before pregnancy recognition.

In the case of the cows that did not conceive and also had a late return to estrus, we observed an increase in the number of follicular waves, some took up to 43 days to return to estrus and in the ultrasound 30 days post AI some of them had persistent CL and/or anechoic fluid in the uterine horns in the absence of a fetus. The presence of fluid possibly indicates early embryonic death and reabsorption taking place after maternal recognition which may have prolong the half-life of CL, maintaining the production of P4 and causing late return to heat.

On the other hand, we found that pregnant and non-pregnant cows presented similar serum levels of P4 in the first days of the cycle (days 6, 9, 12 and 15) and that these values were not significantly different ( $p > 0.05$ ). This could indicate that the serum levels of P4 in the mentioned days, did not have an influence in the success of gestation.

explicación fisiológica al respecto; es necesario realizar más estudios con el fin de determinar el tipo de asociación del diámetro folicular con la gestación y por qué los folículos más grandes están relacionados con una menor probabilidad de preñez.

Al evaluar las vacas no gestantes, se encontraron animales con retorno normal y tardío al celo; los primeros, en las dos fases evaluadas, tuvieron el mismo número de ondas de crecimiento folicular, similares días de duración de los dos ciclos y de promedios de diámetros de FO. Es probable que en las vacas no gestantes encontradas en el presente estudio no hubo fertilización y retornaron normalmente al siguiente celo, o que hubo mortalidad embrionaria antes del reconocimiento materno de la gestación y por lo tanto retornaron nuevamente al celo, con similar duración a la anterior fase y con el mismo número de ondas de crecimiento folicular. También se encontraron vacas con retorno tardío al celo, este grupo de hembras se caracterizó porque en la segunda fase (fase en la cual se realizó IA) presentaron un mayor número de ondas de crecimiento folicular y la duración de esta fase fue mayor que la primera; la segunda fase se prolongó hasta 43 días; probablemente en estos animales pudo ocurrir mortalidad embrionaria después del reconocimiento materno, prolongando la vida media del CL, producción de P4 y el retorno al celo. También es importante mencionar que en estas vacas se realizó ultrasonografía al día 30 post-IA y en algunas se observó CL persistente, y contenido o líquido anecogénico en los cuernos uterinos que posiblemente indica el resultado de la presencia previa de un embrión.

Por otro lado, en esta investigación se encontró que las vacas gestantes y no gestantes presentaron similares niveles de P4 en los primeros días del ciclo (días 6, 9, 12 y 15) y no fueron diferentes significativamente ( $p > 0.05$ ), lo cual podría indicar que los niveles de P4 en los días mencionados, no influyeron en el éxito de la gestación.

Estos resultados coinciden con lo encontrado en la literatura (30), quienes concluyeron que no hubo diferencias detectables en la expresión de genes en el endometrio de novillas gestantes y cíclicas en los días 5, 7 y 13 post-estro; resultados que indican que para los primeros días del ciclo los cambios que ocurren en el transcriptoma del endometrio son independientes de la presencia de un conceptus hasta cuando ocurre el reconocimiento de la preñez; estos autores indican que solo en el reconocimiento materno de la preñez (a partir del día 16) se observan las diferencias entre novillas cíclicas

These results are in agreement with previous studies (30), that found no detectable differences in the expression of genes in the endometrium of pregnant and cyclic heifers on days 5, 7 and 13 post-estrus; results that indicate that for the first days of the cycle the changes that occur in the transcriptome of the endometrium are independent of the presence of a conceptus until there is pregnancy recognition. Only after the maternal recognition of pregnancy (around day 16) there are observed differences in the endometrial transcriptome between cyclic and pregnant heifers (30). In addition, there were no differences in the luteal phase of gestating and cyclic heifers and their levels of P4. Differences between these two groups were observed after maternal recognition of pregnancy when interferon tau secreted by the trophoblast prevents luteolysis triggering changes in the endocrine system that regulates endometrial gene expression.

In the present study, a linear relationship was found in the first and second phases between the OF diameter and the CL volume ( $p=0.01$ ); perhaps, the ability of the CL to produce P4 depends on the number granulosa cells in the OF, which may be directly related to its diameter.

The larger the OF, the greater the number of granulosa cells and, consequently, the better steroidogenic potential CL (1,7,9). However, the aforementioned size depends not only on the number of granulosa cells, but also on the number of internal theca cells, the volume of the follicular antrum, the number of receptors for LH in both cell types and the blood levels of this hormone. In a previous work (31), it was found that the volume of the CL on day 7 or 14 was significantly correlated with follicular size; and the ovulation of small follicles led to the formation of small CLs. In sheep, it was demonstrated that the premature induction of ovulation with GnRH subsequently reduces the luteal size and the number of luteal cells, related to a reduction in the number of granulosa and thecal cells in the OF that was induced to ovulate prematurely (32).

Moreover, in the first phase of the present study, a linear relationship was observed between CL volume and serum P4 levels ( $p=0.01$ ) but in the second phase this association was not found. It is possible, then, that the aforementioned relationship does not occur regularly in all animals, which would explain the contradictory findings reported in different studies (7-10). Therefore, a CL of greater volume not necessarily produces more P4. After ovulation, the number of thecal and granulosa cells producing P4, is a function of their respective number of receptors.

y gestantes (30). Además que durante toda la fase luteal del ciclo estral de novillas gestantes y cíclicas presentaron los mismos niveles de P4; solamente las diferencias se observaron durante el reconocimiento materno de la gestación cuando el interferón tau proveniente del trofoblasto impide la luteolisis y por lo tanto el sistema endocrino que regula la expresión génica endometrial difiere entre novillas cíclicas y gestantes.

En la presente investigación se encontró en la primera y segunda fase una relación lineal entre el diámetro del FO y el volumen del CL ( $p=0.01$ ); tal vez, la habilidad del CL para producir P4 depende del mayor número de las células luteales grandes que provienen de las células de la granulosa del FO, el cual puede estar directamente relacionado con su diámetro. Cuanto más grande sea un FO, mayor podría ser el número de células de la granulosa y en consecuencia mejor potencial esteroidogénico del futuro CL (1,7,9). Sin embargo, el tamaño mencionado depende no solamente del número de estas células, sino también del correspondiente a las células luteales pequeñas que provienen de las células de la teca. Así mismo, del número de receptores para la LH en los dos tipos de células y de los niveles sanguíneos de esta hormona. En un trabajo anterior (31), se halló que el volumen del CL en el día 7 o 14 estuvo correlacionado significativamente con el tamaño folicular; y la ovulación de pequeños folículos conllevó a la formación de CL pequeños. En ovejas se demostró que la inducción prematura de la ovulación con GnRH reduce subsecuentemente el tamaño luteal y el número de células luteales, relacionada con una reducción del número de células de la granulosa y tecales en el FO que fue inducido a ovular prematuramente (32).

Por otra parte, en la primera fase del presente estudio, se observó una relación lineal entre el volumen del CL y los niveles séricos de P4, pero en la segunda fase no se encontró esta asociación. Es posible entonces, que la relación mencionada no se presenta de manera regular en todos los animales, o probablemente la hay en otros días diferentes a los evaluados, lo que coincidiría con los hallazgos contradictorios reportados en otros estudios (7-10). Además, que no necesariamente un CL de mayor volumen produce más P4, lo cual depende, después de la ovulación, del número de células luteales activas en cuanto a producción de P4, en función de los receptores para la hormona luteinizante.

En resumen, los resultados obtenidos mostraron que en los animales gestantes se encontraron valores de los diámetros de FO menores que

In summary, we found that the OF from pregnant cows had significantly smaller diameter when compared with non-pregnant cows. No significant differences were found in luteal volume and P4 levels in pregnant and non-pregnant cows during the studied days. A relationship was found between the OF diameter and the CL volume. Small OF diameter was a factor associated with early pregnancy. That is to say that the smaller diameter of the OF, the greater the probability of gestation.

### Acknowledgements

The authors will like to thank the National University of Colombia for the partial funding of this research, Dr. Zambrano for his collaboration in the development of this research, Marengo agricultural center for the loan of their animals for this study, Dr. Grajales for allowing us to use the Ovines and Hormones Laboratory of the Universidad Nacional de Colombia for the processing of hormonal samples.

en los no gestantes. No hubo diferencias en los niveles de P4 y volumen del CL al comparar los valores hallados en vacas gestantes con los de las no gestantes. Hubo asociación del tamaño del FO con el volumen del CL. Se encontró una asociación entre el menor diámetro del FO y el éxito de la gestación, estos resultados indicarían que existe un rango óptimo del tamaño del FO con el que se puede lograr mayor porcentaje de preñez.

### Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia por la financiación parcial de esta investigación. Al Dr. Zambrano por sus aportes y colaboración en el desarrollo de esta investigación. Al centro agropecuario Marengo por el préstamo de sus animales para este estudio. Al Dr. Grajales por permitir el procesamiento y lectura de las muestras en el Laboratorio de Ovinos y de Hormonas de la Universidad Nacional de Colombia.

## REFERENCES

1. López-Gatius F, Garbayo JM, Santolaria P, Yániz J, Ayad A, Sousa NM, Beckers JF. Milk production correlates negatively with plasma levels of pregnancy-associated glycoprotein (PAG) during the early fetal period in high producing dairy cows with live fetuses. *Domest Anim Endocrinol.* 2007; 32(1):29-42.
2. Roberts RM, Ealy AD, Alexenko AP, Han CS, Ezashi T. Trophoblast interferons. *Placenta.* 1999; 20(4):259-264.
3. Goff AK. Embryonic Signals and Survival. *Reprod Domest Anim.* 2002; 37(3):133-139.
4. Spencer T, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim Reprod Sci.* 2004; 82-83:537-50.
5. Binelli M, Machado R, Bergamaschi MACM, Bertan CM. Manipulation of ovarian and uterine function to increase conception rates in cattle. *Anim Reprod.* 2009; 6(1):125-134.
6. Busch DC, Atkins JA, Bader JF, Schafer DJ, Patterson DJ, Geary TW, Smith MF. Effect of ovulatory follicle size and expression of estrus on progesterone secretion in beef cows. *J Anim Sci.* 2008; 86(3):553-563.
7. Filho MF, Crespilho AM, Santos JEP, Perry GA, Baruselli PS. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Anim Reprod Sci.* 2010; 120(1-4):23-30.
8. Lopes AS, Butler ST, Gilbert RO, Butler WR. Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 2007; 99(1-2):34-43.
9. Machado LF, Bonilla SC, Schneider A, Schmitt E, Nunes M. Effect of the ovulatory follicle diameter and progesterone concentration on the pregnancy rate of fixed-time inseminated lactating beef cows. *R Bras Zootec.* 2012; 41(4):1004-1008.

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.
11. Lynch CO, Kenny DA, Childs S, Diskin MG. The relationship between periovulatory endocrine and follicular activity on corpus luteum size, function, and subsequent embryo survival. *Theriogenology.* 2010; 73(2):190–198.
12. Pfeifer LFM, Mapletoft RJ, Kastelic JP, Small J, Adams GP, Dionello NJ, Singh J. Effects of low versus physiologic plasma progesterone concentrations on ovarian follicular development and fertility in beef cattle. *Theriogenology.* 2009; 72(9):1237–1250.
13. González J, Jiménez C, Méndez J, Ortiz L, Ruiz A, Vargas A. Levantamiento edafológico del centro Agropecuario Marengo. Bogotá: Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia; 1997.
14. Guáqueta, H., Zambrano, J., & Jiménez, C. Factores que afectan la reactivación ovárica postparto en vacas Holstein, en el trópico alto. *Rev MVZ Córdoba,* 2014; 19(1):3970–3983.
15. Palmer MA, Olmos G, Boyle L, Mee JF. A comparison of the estrous behavior of Holstein-Friesian cows when cubicle-housed and at pasture. *Theriogenology.* 2012; 77(2):382–388.
16. Martínez BR, Martínez MN, Martínez MMD. Diseño de experimentos en ciencias agropecuarias y biológicas con SAS, SPSS, R Y STATISTIX. Fondo Nacional Universitario: Bogotá, Colombia; 2011.
17. Martinez MF, Sanderson N, Quirke LD, Lawrence SB, Juengel JL. Theriogenology Association between antral follicle count and reproductive measures in New Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system. *Theriogenology.* 2016; 85(3):466–475.
18. Wolfenson D, Inbar G, Roth Z, Kaim M, Bloch A, Braw-Tal R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology.* 2004; 62(6):1042–1055.
19. Sakaguchi M, Sasamoto Y, Suzuki T, Takahashi Y, Yamada Y. Postpartum ovarian follicular dynamics and estrous activity in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 2004; 87(7):2114–2121.
20. Jaiswal RS, Singh J, Marshall L, Adams GP. Repeatability of 2-wave and 3-wave patterns of ovarian follicular development during the bovine estrous cycle. *Theriogenology.* 2009; 72(1):81–90.
21. Carriquiry M, Dahlen CR, Weber WJ, Lamb GC, Crooker BA. Postpartum ovarian activity in multiparous Holstein cows treated with bovine somatotropin and fed n-3 fatty acids in early lactation 1. *J Dairy Sci.* 2009; 92(10):4876–4888.
22. Kornmatitsuk S, Kornmatitsuk B. Characteristics of oestrous cycles in Holstein cross-bred dairy heifers: An evidence of delayed post-ovulatory progesterone rise. *Trop Anim Health Prod.* 2009; 41(3):337–344.
23. Noseir WMB. Ovarian follicular activity and hormonal profile during estrous cycle in cows: the development of 2 versus 3 waves. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003; 1:50. DOI: <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-50>
24. Quezada-casasola A, Avendaño-reyes L, Correa-calderón A. Estrus behavior, ovarian dynamics, and progesterone secretion in Criollo cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. *Trop Anim Health Prod.* 2014; 46:675–684.
25. Mihm M, Baguisi A, Boland MP, Roche JF. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. *J Reprod Fertil.* 1994; 102(1):123–130.
26. Hafez E, Sugie T, Gordon I. Superovulation and related phenomena in the beef cow and hcg injections. *J Reprod Fertil.* 1963; 5:359–379.
27. Mattheij JAM, Swarts JJM, Hurks HMH, Mulder, K. Advancement of Meiotic Resumption in Graafian-Follicles By Lh in Relation To Preovulatory Aging of Rat Oocytes. *J Reprod Fertil.* 1994; 100(1):65–70.

28. Savio JD, Boland MP, Roche JF. Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in post-partum dairy cows. *J Reprod Fertil.* 1990; 88(2):581–591.
29. Colazo MG, Behrouzi A, Ambrose DJ, Mapletoft RJ. Diameter of the ovulatory follicle at timed artificial insemination as a predictor of pregnancy status in lactating dairy cows subjected to GnRH-based protocols. *Theriogenology.* 2015; 84(3):377–83.
30. Forde N, Beltman ME, Lonergan P, Diskin M, Roche JF, Crowe M. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim Reprod Sci.* 2011; 124(3-4):163–169.
31. Vasconcelos JLM, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank MC. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology.* 2001; 56(2):307–314.
32. Murdoch WJ, Van Kirk E. Luteal dysfunction in ewes induced to ovulate early in the follicular phase. *Endocrinology.* 1998; 139(8):3480–3484.