

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE SINCRONIZACIÓN DE CELOS CON
INSEMINACIÓN ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO EN VAQUILLONAS RAZA
HEREFORD POR LIMOUSIN**

Por

CABRERA SALVATIERRA Francisco
NADAL FIANDRA Juliana

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Estudio de caso

MONTEVIDEO
URUGUAY
2017

PÁGINA DE APROBACIÓN

TESIS DE GRADO APROBADA POR:

Presidente de mesa:

Dra. Daniela Crespi

Segundo Miembro (Tutor):

Dr. Daniel Elhordoy

Tercer Miembro:

Dr. Rafael Aragunde

Co-Tutor:

Dr. Ariel Ocariz

FECHA:

27 de marzo de 2017

AUTORES:

Francisco Manuel Cabrera Salvatierra

Juliana Nadal Fiandra

AGRADECIMIENTOS

- A nuestro tutor Dr. Daniel Elhordoy, por su dedicación, apoyo y ágil respuesta a nuestras consultas.
- A nuestro co-tutor Dr. Ariel Ocáriz por el tiempo dedicado para poder llevar a cabo la práctica de este trabajo.
- A el Sr. Godiño, por habernos recibido en su establecimiento “La Pelada” del departamento de Cerro Largo para poder realizar este trabajo haciendo uso de sus instalaciones, personal y animales.
- A Laboratorio Gensur por la donación del semen del toro raza Hereford
- A el laboratorio CODENOR por habernos donado las hormonas utilizadas para llevar a cabo los protocolos
- A nuestros padres y abuelos por darnos la oportunidad de estar acá y por su apoyo incondicional
- A nuestros hermanos y amigos que siempre estuvieron ahí cuando los necesitamos
- A todos los compañeros que conocimos y que formaron parte de los mejores recuerdos que nos llevamos
- A cada uno de los profesores que nos formaron en esta carrera

TABLA DE CONTENIDO

Página

PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	VI
RESUMEN	1
SUMMARY	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1.CICLO ESTRAL EN LA VACA	6
2.2. HORMONAS DE LA REPRODUCCIÓN.....	6
2.2.1. Hormonas Hipotalámicas.....	6
2.2.1.1.Oxitocina	6
2.2.1.2.Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH)	7
2.2.2. Hormonas Hipofisarias Gonadotróficas.....	7
2.2.2.1.Hormona folículo estimulante (FSH).....	7
2.2.2.2.Hormona luteinizante (LH).....	7
2.2.2.3.Prolactina	7
2.2.3. Hormonas gonadales	7
2.2.3.1.Relaxina	7
2.2.3.2.Inhibina	7
2.2.3.3.Hormonas esteroideas gonadales.....	8
2.2.4. Hormonas uterinas	8
2.2.4.1.Prostaglandinas	8
2.3. FASES DEL CICLO ESTRAL	9
2.3.1. Fase folicular o de regresión luteal.....	9
2.3.2. Fase periovulatoria	10
2.3.3. Fase luteal.....	10
2.3.3.1.Formación del Cuerpo Lúteo.....	10
2.3.3.2.Luteólisis.....	11
2.4. DINÁMICA FOLICULAR	12
2.5. COMPORTAMIENTO ESTRAL.....	13
2.5.1. Características del celo Bovino	13
2.5.1.1.Características de comportamiento primarias.....	14
2.5.1.2.Características de comportamiento secundarias.....	14
2.5.1.3.Signos físicos	15
2.5.2. Factores que afectan la expresión del celo	15
2.6. DETECCIÓN DE CELO.....	17
2.7. SCORE REPRODUCTIVO DE ANDERSEN.....	17
2.8. MANEJO FARMACOLÓGICO DEL CICLO ESTRAL BOVINO	18
2.8.1. Sincronización de celos con Prostaglandinas	19
2.8.1.1.Protocolo con dosis única de PGF2 α	19

2.8.1.2. Protocolo con doble dosis de PGF2 α	20
2.8.2. Sincronización de celos con GnRH	21
2.8.2.1. Combinación de GnRH y PGF2 α en protocolos utilizados en vacas ciclando	21
2.8.3. Sincronización de celos con Progesterona	22
2.8.3.1. Combinación de progesterona y PGF2 α	23
2.8.3.2. Combinación de progesterona y GnRH	23
2.8.4. Sincronización de celos con Estrógenos	23
2.8.4.1. Combinación de estrógenos con progesterona	24
2.8.4.2. Combinación de estrógenos, GnRH y PGF2 α	24
2.8.4.3. Combinación de GnRH, P4, PGF2 α y estrógenos	25
2.8.5. Protocolos que acortan el período de inserción del DIV y alargan el proestro	25
2.8.5.1. Protocolo Co-Synch de 5 días	25
2.8.5.2. Protocolo J-Synch	27
2.8.6. Hormonas utilizadas en el presente ensayo	27
2.9. EVALUACIÓN SEMINAL POST DESCONGELADO	28
2.9.1. Pruebas microscópicas	29
2.9.1.1. Motilidad espermática	29
2.9.1.2. Vigor	29
2.9.1.3. Acrosomía y Morfología	30
2.9.1.4. Concentración	30
2.9.1.5. Test de Termorresistencia	31
2.9.1.6. Estabilidad e Integridad de Membrana	31
2.9.1.7. Microbiología del semen	31
2.9.2. Parámetros de aceptabilidad	32
3. HIPÓTESIS	33
4. OBJETIVOS	33
4.1. OBJETIVO GENERAL	33
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS	34
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
6.1. PREÑEZ A LOS 45 DÍAS SEGÚN PROTOCOLO J-SYNCH	37
6.2. PREÑEZ A LOS 45 DÍAS SEGÚN PROTOCOLO 5-D CO-SYNCH + DIV	37
6.3. COSTOS POR VIENTRE INSEMINADO	38
6.4. ANÁLISIS ECONÓMICO	38
6.4.1. Presupuesto parcial de Protocolo J-SYNCH versus 5-d CO-SYNCH + DIV	39
7. CONCLUSIONES	40
8. BIBLIOGRAFÍA	41
9. ANEXO I	55

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro I. Descripción del Score Reproductivo de Andersen (Andersen y col., 1991)	18
Cuadro II. Escala basada en el porcentaje de células móviles (Dpto. Teriogenología, 2000)	29
Cuadro III. Escala del vigor del movimiento ondulado de los espermatozoides (Ax y col., 2000).....	30
Cuadro IV. Parámetros de aceptabilidad para evaluación de semen post descongelado (Derivaux, 1976; Morrow, 1986; Bonadonna, 1989; Barth y Oko, 1989; Ax y col., 2000; Elhordoy y Farías, 2003).....	32
Cuadro V. Descripción de hormonas y materiales utilizados para la IATF	35
Cuadro VI. Resultados del protocolo J-Synch (Grupo 1).....	37
Cuadro VII. Resultados del protocolo 5-d Co-synch + DIV (Grupo 2)	37
Cuadro VIII. Costos protocolo J-Synch.....	38
Cuadro IX. Costos protocolo 5-d Co-Synch + DIV.....	38
Cuadro X. Representación de presupuesto parcial de Protocolo J-SYNCH versus Protocolo 5-d CO-SYNCH + DIV (Alvarez y Falcao, 2009).	39
Cuadro XI. Presupuesto parcial de Protocolo J-SYNCH versus Protocolo 5-d CO-SYNCH + DIV	39
Figura 1. Esquema para explicar la sensibilidad del cuerpo lúteo (CL) a la administración de PGF _{2α} (Bó y Caccia, 2009).	9
Figura 2. Folículo maduro o de Graaf (Barrera y col., 2011)	11
Figura 3. Esquema de ciclo estral bovino (Perulactea, 2012).	11
Figura 4. Ondas foliculares del ciclo estral de tres ondas (Senger, 2003).....	12
Figura 5. Esquema de las variantes de protocolos basados en la utilización de GnRH-PGF _{2α} más populares en bovinos (De Jarnette, 2015).....	22
Figura 6. Esquema del protocolo J-SYNCH utilizado en el grupo 1	36
Figura 7. Esquema del protocolo 5-d CO-SYNCH + DIV utilizado en el grupo 2.....	36

RESUMEN

Los objetivos del presente trabajo fueron comparar la respuesta de dos protocolos de sincronización e inseminación artificial a tiempo fijo según porcentaje de preñez a los 45 días en vaquillonas cruce Hereford por Limousin y examinarlos desde el punto de vista económico con el fin de determinar cuál era la mejor alternativa a utilizar. Se utilizaron 12 vaquillonas de 2 años de edad, peso vivo aproximado 280 ± 20 Kg. a las cuales se les realizó en forma individual un examen ginecológico pre servicio por palpación rectal (Score Reproductivo de Andersen) para determinar presencia de cuerpo lúteo y / o folículos mayores a 10 mm, y descartar los animales preñados, no cíclicos o en anestro. Se dividieron en dos grupos al azar de 6 animales; grupo 1 protocolo J-SYNCH, grupo 2 protocolo 5-d CO-SYNCH + DIV. Se sincronizaron los celos para que coincidiera el momento de la inseminación en ambos protocolos. Fueron inseminadas con semen de un toro raza Hereford elegido por sus datos de EPD para facilidad de parto. El protocolo J-SYNCH se realizó de la siguiente manera: el Día 0 a las 7:00 horas se administró 2 mg de BE y se colocó el dispositivo intra vaginal (DIV) de progesterona; el Día 6 a las 7:00 horas se retiró el DIV y se administró 150 μ g (una dosis) de un análogo sintético de prostaglandina $F_{2\alpha}$ (D-cloprostenol), también se administró 1,7 ml de eCG debido a su condición corporal en; el Día 8 a las 17:00 horas luego de haber transcurrido 60 horas a partir del día 6, se administró 8 μ g de Acetato de buserelina (análogo sintético de GnRH) y se realizó la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF). El protocolo 5-d Co-Synch + DIV se realizó de la siguiente manera: el Día 0 a las 7:00 horas se administró 8 μ g de GnRH y se colocó el DIV de progesterona; el Día 5 a las 7:00 horas se retiró el DIV y se administró dos dosis simultáneas (150 μ g cada una) de prostaglandina, también se administró 1,7 ml de gonadotrofina coriónica equina; el Día 7 a las 17:00 horas luego de haber transcurrido 60 horas a partir del día 5, se administró 8 μ g de GnRH y se realizó la IATF. 45 días post inseminación se realizó el diagnóstico de gestación por palpación rectal, se constató que de las 12 vaquillonas inseminadas 4/6 de cada grupo estaban preñadas. Los protocolos se evaluaron según un análisis de presupuestación parcial (costo-beneficio) donde se pudo concluir que el protocolo más conveniente en este aspecto es el J-Synch en vez del 5-d Co-Synch + DIV. Este estudio de caso finaliza al Diagnóstico de Gestación, y al ser iguales sus Porcentajes de Preñez; el Producto Bruto (PB) de ambos protocolos es igual, por lo tanto se anulan. De esta manera, la diferencia entre los totales de ventajas y desventajas de la presupuestación parcial está dada por los costos de cada protocolo. Por otro lado, desde el punto de vista productivo, no podemos concluir que un protocolo sea mejor que el otro. Lo que si podemos decir es que el porcentaje de preñez en este caso fue de 66,6 % para ambos protocolos lo cual es un buen resultado.

SUMMARY

The objective of the present study was to compare the response of two protocols of synchronization and artificial insemination at fixed time according to pregnancy percentage after 45 days in Hereford for Limousin crossbreed heifers and to examine them from an economic point of view in order to determine the best alternative to use. Twelve 2-year old heifers with an approximately weight of 280 ± 20 kg. were used, a pre-service gynecological examination was carried out by rectal palpation (Andersen's Reproductive Score) to determine the presence of corpus luteum and / or follicles bigger than 10 mm, also for discarding pregnant, non-cyclic or anestrous animals. These were divided into two groups composed of 6 heifers each one; group 1 (6 heifers with J-SYNCH protocol), group 2 (6 heifers with 5-d protocol CO-SYNCH + DIV). All animals were synchronized so that the insemination moment of both protocols coincided. They were inseminated with Hereford bull semen chosen by birth facility from EPD data, due to their body size. The J-SYNCH protocol was performed as it follows: Day 0 at 7 a.m., 2 mg of BE were administered and an intra-vaginal device (IVD) of progesterone was placed; on Day 6 at 7 a.m. the IVD was withdrawn and 150 μ g (one dose) of synthetic prostaglandin F₂ α analogue (D-cloprostenol) were administered, also 1.7 ml of equine chorionic gonadotropin (eCG) because of its body condition; on Day 8 at 5 p.m. 60 hours after day 6, 8 μ g of Buserelin Acetate (synthetic analog of GnRH) were administered and artificial insemination at fixed time (AIFT) was performed. The 5-d Co-Synch + DIV protocol was performed as it follows: Day 0 at 7 a.m. 8 μ g of GnRH were given and the progesterone IVD was placed; Day 5 at 7 a.m. the IVD was withdrawn and two simultaneous doses (150 μ g each) of prostaglandin were administered, also 1.7 ml of eCG were administered; Day 7 at 5 p.m. 60 hours after day 5, 8 μ g of GnRH were administered and AIFT was performed. 45 days after insemination, gestation diagnosis was performed by rectal palpation where we found that 4/6 out of the 12 inseminated heifers were pregnant in each group. From an economic point of view, the alternatives were evaluated through a partial budgeting (cost-benefit) analysis where we concluded that the most convenient protocol was J-Synch instead of 5-d Co-Synch + DIV. This case study ends with the Gestation Diagnosis, and as its Pregnancy Percentages are equal; Gross Product (PB) of both protocols are equal, therefore they get nullified. That is why the difference between the total advantages and disadvantages of the partial budgeting is given by each protocol costs. On the other hand, from a productive point of view, we cannot conclude which protocol is better than the other one. What we can say is that in this case pregnancy percentage was 66.6% for both protocols which is not a bad result.

1. INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial en bovinos comenzó paulatinamente a estar disponible comercialmente en algunos países de avanzada desde la segunda mitad de la década del 1930. Desde entonces, su utilización en el mundo ha experimentado un crecimiento exponencial, al punto de ser considerada la biotecnología de reproducción asistida más importante en los países en desarrollo, permitiendo que un gran número de vientres sea servido con padres superiores a efectos de producir progenie con mayor valor económico (Rodríguez-Martínez, 2012).

En todo este tiempo, los programas de inseminación artificial han evolucionado acompañando los avances de los conocimientos referidos a la preservación del semen, de las evaluaciones genéticas de reproductores y del control del ciclo estral y de la ovulación de la hembra bovina. Particularmente el desarrollo de programas de sincronización de la ovulación ha permitido simplificar los trabajos en el campo porque su asociación a la inseminación sistemática de todos los vientres en un momento determinado posibilita prescindir, parcial o totalmente, de la demandante fase de detección de celos. Hasta el desarrollo de programas de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), el suceso de la inseminación dependía siempre de la identificación de hembras en celo. La detección correcta de celo es una actividad que demanda mucha labor y le agrega cierta complejidad a la tecnología, tornando su adopción más dificultosa (de Nava, 2013).

Además de la no detección de celo, uno de los factores que más interviene en los resultados de una IATF es el semen. El semen al ser congelado sufre una serie de procesos que alteran la calidad del semen original. Muchas veces semen de alta calidad al momento de la congelación ha resultado en semen de mediana y baja calidad al ser descongelado. De aquí surge la importancia de evaluar el semen luego de la congelación ya sea desde el punto de vista de la calidad seminal como de las enfermedades que el mismo puede transmitir ya sea virales o bacterianas. Esta evaluación debe hacerse siempre antes de iniciar un protocolo de sincronización (Jaime, 1992).

Con respecto al impacto productivo de la IATF en el ganado de carne, se puede observar que el potencial para el mejoramiento genético para el rodeo de cría nunca fue mayor al que se da en la actualidad. La mejora en los caracteres de importancia económica para la cría se puede lograr muy rápido y sencillamente mediante la selección de padres superiores y la introducción masiva de estos genes en la población a través de la IATF. Se dispone de evidencias publicadas internacionalmente respecto a que las vacas que paren temprano durante la parición destetan terneros más pesados, tienen más oportunidad de quedar preñadas en la siguiente estación reproductiva y de destetar más cantidad de terneros en su vida productiva. Por ello, uno de los objetivos del manejo reproductivo de los rodeos de cría es disponer de patrones de parición concentrados, lo que se logra acortando los entores y teniendo la mayor cantidad de vientres preñados en el menor tiempo posible (de Nava, 2013); debido a esto es que realizamos este trabajo, con el objetivo de hacer énfasis en las ventajas que existen al realizar una IATF ya que en muchas ocasiones productores que podrían beneficiarse con el uso de esta herramienta, no la utilizan debido al desconocimiento sobre la misma y sus beneficios; de esta manera nos planteamos realizar 2 protocolos de IATF y mostrar sus resultados productivos y el costo de los mismos.

El esquema de inseminación de vaquillonas de 24 meses ha sufrido modificaciones, donde en muchos rodeos esta categoría ha comenzado a tener servicios a los 16 a 18 meses por razones de mejoramiento productivo, adelantando así el primer parto. Esto significa que un porcentaje menor de estos animales aún no han alcanzado la pubertad y por lo tanto no estarán ciclando o estarán muy cerca de iniciar su actividad sexual. Por otro lado se encuentra la categoría de las vacas con cría, que se caracterizan por un anestro posparto y por lo tanto con ausencia de celos y ovulaciones. En ambos casos, la inducción a la ciclicidad, contribuye a reducir los periodos improductivos, consecuencia en el primer caso de animales jóvenes con bajo peso corporal y en el otro de procesos de reposo sexual mejorando la productividad general mediante la posibilidad del acortamiento significativo en los servicios, la optimización de los recursos económicos y además el incremento de la uniformidad del rodeo de terneros nacidos. Dados los antecedentes expresados, se pensaron alternativas que sincronizaran los celos u ovulaciones, e indujeran los ciclos estrales cuando la pubertad este por iniciarse o los anestros sean superficiales; además que sean fáciles de aplicar, económicos, que se puedan utilizar en periodos cortos de tiempo (Dahlen y col., 2002).

Se han logrado importantes avances en la efectividad de los tratamientos para la inducción de la ovulación y la ciclicidad, los que asociados a la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), permiten lograr muy buenas tasas de preñez a nivel de campo. Con esta tecnología se logra obtener más hembras preñadas en menos tiempo, mejorando el peso de los terneros al destete, a la vez que maximiza las ventajas de un eventual uso de genética superior (de Nava, 2008).

En los últimos años se ha avanzado en el desarrollo de tratamientos para IATF en rodeos bovinos, basados en la utilización de distintas sales de estradiol y progestágenos (Bó y col., 1995b; Bó y col., 1995c; Caccia y Bó, 1998; Moreno y col., 2001). Hace más de dos décadas que se comenzaron a utilizar agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), tanto para modificar la dinámica folicular como la función luteal (Thatcher y col., 1989). La introducción de protocolos Ovsynch en programas de IATF (Pursley y col., 1995; Twagiramungu y col., 1995) y sus modificaciones como el CO-synch (Geary y col., 1998), son una alternativa a los estrógenos y progestágenos en sincronizaciones de rodeos de leche y de carne.

Una reciente modificación en los tratamientos CO-synch, el CO-synch + dispositivo intravaginal (DIV) por 5 días con IATF a las 72 h, incremento las tasas de preñez 10,5 % cuando se los comparo con tratamientos de CO-synch + DIV por 7 días con IATF a las 60 h en vacas de carne (Bridges y col., 2008).

Bridges y col. (2009) reportaron que con protocolo CO-synch con DIV por 5 días en vacas de carne, era necesario administrar dos dosis de Prostaglandina (PGF) para producir luteólisis de cuerpos lúteos accesorios generados por la ovulación a la primera dosis de GnRH.

Dos inyecciones de PGF aumentan las necesidades de mano de obra y los costos farmacéuticos, pero parece ser beneficioso, ya que las tasas de preñez en IATF han incrementado desde 46 al 67% cuando se administró 1 inyección de PG (Peel y col., 2010; Wilson y col., 2010), en comparación con 50 a 80 % cuando se administraron 2 inyecciones de PGF (Bridges y col., 2008; Kasimanickam y col., 2009; Peel y col., 2010; Wilson y col., 2010).

Experimentos realizados en Brasil en los cuales se administró Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) al momento del retiro del DIV a vaquillonas con baja

condición corporal, han demostrado un aumento en la tasa de preñez en comparación con aquellas a las cuales no se les administro eCG (Souza y col., 2009).

Este tratamiento CO-synch + DIV 5 días, ha tenido como propósito modificar la duración del proestro que se define como el periodo comprendido entre la administración de la PGF hasta la aplicación de GnRH como inductor de la ovulación. Se ha demostrado que la prolongación del proestro, produce mejoramientos en la fertilidad. Los proestros largos (de 2 a 4 días) se relacionan con mejores tasas de concepción a la IATF, con mayores producciones de estradiol, provenientes del folículo dominante, y de progesterona luteal en el ciclo subsiguiente, en comparación con los proestros de corta duración (1 día) (Bridges y col., 2010).

Uno de los objetivos de este trabajo es comparar la efectividad del protocolo Co-Synch por 5 días con un protocolo alternativo, llamado J-Synch, utilizando Benzoato de Estradiol (BE) y un dispositivo con progesterona (P4) por 6 días sobre la tasa de preñez (de la Matta y Bó, 2012). El fundamento de este último protocolo se basa en que el largo del proestro afecta la habilidad del folículo en crecimiento para alcanzar la ovulación, por lo tanto el porcentaje de preñez podría ser mejorado si se alargara el proestro (Menchaca y col., 2015).

Con respecto al momento ideal para realizar la inseminación luego de retirado el DIV; Kasimanickam y col. (2012), realizaron un experimento que indica que la tasa de preñez en IATF realizada en vaquillonas, fue mayor cuando el intervalo entre el retiro del DIV y la inseminación artificial era reducido de 72 h (como en las vacas) a 56 h. Según estos mismos autores esto aún requiere investigaciones adicionales; en base a estos datos y la suma colectiva de los datos generados utilizando el protocolo de 5 días, el momento ideal para la IATF debería estar entre 56 y 66 h después del retiro del DIV (Callejas y Cabodevila, 2007; Dobbins y col., 2009).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. CICLO ESTRAL EN LA VACA

El ciclo estral se define como el período de tiempo que va desde el inicio del celo o estro hasta el inicio del siguiente (Bo y col., 1998). La vaca es un animal poliéstrico anual (cicla todo el año) y cada ciclo dura en promedio 21 días. El estro o celo se considera como el día 0, dura entre 6 y 18 horas y la ovulación tiene lugar 24 a 30 horas después de comenzado el celo. Después de la ovulación, el cuerpo lúteo (CL) se desarrolla y la concentración plasmática de progesterona aumenta entre el Día 4 y 12 del ciclo para permanecer constante hasta la luteólisis, que ocurre entre los días 16 a 20 (Callejas, 1996).

La fertilización del óvulo se da en la ampolla del oviducto. El blastocisto llega al útero alrededor del día 5. La gestación dura 279-290 días. El intervalo entre el parto y la primera ovulación varía enormemente dependiendo de la raza de la vaca, su nutrición, rendimiento lechero, estación y la presencia de un ternero mamando. La primera ovulación tras el parto no suele verse acompañada del comportamiento propio del estro, y es conocida con el nombre de “celo silencioso” (Ptaszynska, 2007).

2.2. HORMONAS DE LA REPRODUCCIÓN

Los cambios que se dan durante el ciclo estral bovino están regulados por una interacción entre las hormonas secretadas principalmente en el hipotálamo, la hipófisis, las gónadas (ovarios) y el útero; estos constituyen lo que se conoce comúnmente como eje hipotalámico-hipofisario-gonadal-uterino (Callejas, 1996).

2.2.1. Hormonas Hipotalámicas

El hipotálamo funciona como una interconexión entre el sistema nervioso y el endócrino y desempeña una función muy importante en la regulación hormonal de la reproducción (Reeves, 1989).

2.2.1.1. Oxitocina

La oxitocina es una hormona peptídica que se sintetiza en el hipotálamo y se almacena en la neurohipófisis (lóbulo posterior de la hipófisis). Una vez liberada a la circulación, la vida media de la oxitocina es muy corta (menos de 5 minutos) ya que es degradada rápidamente por las endopeptidasas del hígado y riñón (Hafez y col., 2000).

Las funciones fisiológicas de la oxitocina son: la contracción de la musculatura uterina y modificación de los umbrales de excitabilidad del miometrio en el útero. Durante el parto la oxitocina actúa en el proceso de expulsión del feto, la contracción de los vasos umbilicales y la contracción del útero después de concluido el parto para asegurar la hemostasia. También provoca un incremento en la frecuencia de contracciones del oviducto y, de esta manera, interviene en el transporte, tanto de los gametos femeninos como de los masculinos en el oviducto. Los estrógenos facilitan la capacidad de reacción de la musculatura lisa a la oxitocina mientras que la progesterona tiene el efecto inverso. Otra función de la oxitocina es la estimulación de las células mioepiteliales de los alvéolos mamarios, reflejo de expulsión de la leche o “bajada”. También se produce oxitocina en el CL e interviene activamente en el proceso de luteólisis (Hafez y col., 2000).

2.2.1.2. Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH)

La GnRH es un decapeptido que induce la liberación tanto de la hormona luteinizante (LH) como de la hormona folículo estimulante (FSH) a partir de la hipófisis. La función principal de la GnRH es inducir la síntesis y liberación de LH y FSH. Durante el ciclo estral la GnRH se secreta en pulsos (Hafez y col., 2000).

2.2.2. Hormonas Hipofisiarias Gonadotróficas

La adenohipófisis o hipófisis anterior secreta tres hormonas gonadotróficas: folículo estimulante, luteinizante y prolactina.

2.2.2.1. Hormona folículo estimulante (FSH)

La FSH es una hormona glicoproteica que tiene una vida media de 2 a 5 horas. En la hembra, estimula el crecimiento de los folículos en el ovario y participa, junto con la LH, estimulando la síntesis de estradiol en los folículos en desarrollo

2.2.2.2. Hormona luteinizante (LH)

La LH es una glicoproteína con una vida media de 30 minutos. Los niveles tónicos o basales de LH actúan con la FSH para inducir la secreción de estrógenos de los folículos ováricos. Las células de la teca interna contienen receptores de LH y mediante su estímulo producen andrógenos, estos luego pasan a través de la membrana basal a las células de la granulosa, donde mediante la acción de la FSH se induce la aromatización de estos andrógenos para transformarse en estrógenos que son liberados al antro folicular y de allí a la circulación general. Las células de la granulosa del folículo dominante también adquieren receptores de LH.

El pico preovulatorio de LH induce una cadena de reacciones enzimáticas que terminará con la ruptura de la pared folicular y la ovulación. Además, este pico preovulatorio inducirá la activación del ovocito para que continúe con la meiosis y estimulará la formación del CL. La LH es la principal sustancia luteotrófica en animales domésticos (Hafez y col., 2000).

2.2.2.3. Prolactina

La prolactina es una proteína que interviene en la lactancia y aparentemente actúa a nivel del sistema nervioso central e induce el comportamiento materno.

2.2.3. Hormonas gonadales

2.2.3.1. Relaxina

La relaxina es una hormona polipéptica que es secretada por el CL del ovario durante la preñez. La principal acción biológica de la relaxina es la dilatación del cérvix y la vagina antes del parto. También inhibe las contracciones uterinas y provoca un incremento en el crecimiento de la glándula mamaria si se le aplica junto con estradiol (Hafez y col., 2000).

2.2.3.2. Inhibina

Es una hormona proteica producida por las células de Sertoli en el macho y las células de la granulosa en la hembra. La inhibina está compuesta por dos cadenas, alfa y beta. A su vez la cadena beta tiene dos formas conocidas como beta-A y beta-B. Tanto la inhibina A como la inhibina B inhiben la secreción de FSH de la hipófisis, sin alterar la liberación de LH. Por el contrario, cuando se combinan dos cadenas beta la proteína resultante, llamada activina, estimula la secreción de FSH (Hafez y col., 2000).

2.2.3.3. Hormonas esteroideas gonadales

No solamente se secretan por el ovario y los testículos, sino también por la placenta y la corteza de las glándulas adrenales. Se puede predecir la actividad biológica de un esteroide a partir del número de carbonos presentes. Un esteroide de 18 carbonos tendrá actividad estrógena; uno de 19 carbonos, andrógena, y uno de 21 carbonos tendrá propiedades de progestágeno (Hafez y col., 2000).

a) Estrógenos: el principal estrógeno que se secreta en el ovario es el estradiol-17 β . La producción de estradiol por parte del folículo es un proceso en el que intervienen las células de la teca y de la granulosa con el aporte de la LH y FSH. Los estrógenos actúan en el sistema nervioso central para inducir el comportamiento de estro en la hembra. La expresión del celo en la vaca es un fenómeno en el que intervienen el incremento de los niveles circulantes de estradiol (producido por el folículo preovulatorio) como los niveles decrecientes de progesterona (debido a la luteólisis). Los estrógenos actúan también en el útero haciendo que aumente la masa del endometrio y del miometrio. Tal aumento se debe a una hiperplasia celular y a una hipertrofia. También hacen que aumente la actividad y frecuencia de las contracciones mediante la potencialización de los efectos de la oxitocina y de la prostaglandina F_{2 α} . Los estrógenos estimulan el desarrollo de las características sexuales de la hembra. Los estrógenos ejercen efectos de retroalimentación negativa y positiva en el control de la liberación de LH y FSH, a partir del eje hipotalámico-hipofisiario. El efecto de retroalimentación positiva y negativa está íntimamente correlacionado con los niveles de progesterona circulante. Durante la fase luteal, es decir, cuando tenemos un CL funcional y por lo tanto altos niveles de progesterona circulante, el efecto del estrógeno sobre las gonadotropinas es negativo. En cambio, en la fase folicular (luego de la luteólisis y cuando nos aproximamos al celo), al no haber concentraciones altas de progesterona en sangre, el estrógeno tiene efecto de retroalimentación positiva e induce la liberación de LH y FSH (pico preovulatorio) (Hafez y col., 2000).

b) Progestágenos: la progesterona es el progestágeno que se presenta en mayor cantidad en forma natural, y es secretada por las células del CL, la placenta y las glándulas adrenales. La regulación de la secreción de la progesterona en la vaca es estimulada principalmente por la LH. La función de la progesterona es preparar al útero para la implantación y el mantenimiento de la preñez mediante el aumento de las glándulas secretoras del endometrio y la inhibición de su motilidad. Actúa en forma sinérgica con los estrógenos para inducir el comportamiento del estro. Hace que se forme el tejido secretor (alvéolos) de la glándula mamaria. Concentraciones elevadas inhiben el estro y el pico ovulatorio de LH y afectan la frecuencia de los pulsos de LH, lo que hace evidente la importancia de esta hormona en la regulación del ciclo estral (Hafez y col., 2000).

2.2.4. Hormonas uterinas

2.2.4.1. Prostaglandinas

A diferencia de otras hormonas, las prostaglandinas no se localizan en ningún tejido en particular. La mayor parte de ellas actúan localmente en el sitio en donde son producidas, por medio de una acción parácrina aunque también se las puede transportar en la sangre, para actuar en un tejido blanco lejos del tejido de producción. En general, las concentraciones sanguíneas de prostaglandinas son bajas, pero se elevan en ciertas condiciones como en el caso del parto. Todas las prostaglandinas son ácidos grasos no saturados, de 20 carbonos, las más relacionadas con la reproducción son la F_{2 α} (PGF_{2 α}) y la E₂ (PGE₂) (Hafez y col., 2000).

2.3.2. Fase periovulatoria

Durante este período se producen importantes fenómenos: inicio del celo, onda preovulatoria de gonadotrofinas y ovulación. El intervalo entre el inicio de la luteólisis y el comienzo del celo es de 58-60 horas aproximadamente (Dieleman y col., 1986). Los niveles de estradiol aumentan desde la regresión luteal hasta alcanzar niveles máximos el día previo al inicio del celo. Dicha elevación del estradiol provoca el comportamiento propio del celo e induce la descarga preovulatoria de LH. Esta tiene una duración de 6 a 10 horas, se inicia junto con el celo y alcanza su valor máximo 4 a 5 horas más tarde. Durante el pico preovulatorio, la descarga de LH sigue un patrón pulsátil.

Las funciones principales de la LH son la estimulación de la maduración folicular final, la activación del ovocito para que continúe con la meiosis (se encuentra en profase I, ovocito I) y el mantenimiento del CL. La descarga preovulatoria de LH ocurre al comienzo del estro, concurrentemente con el pico de FSH. Se cree que este pico de LH causa la ovulación e inicia la luteinización de las células de la granulosa y de la teca. Generalmente la ovulación ocurre entre 24 y 30 horas después del comienzo de las descargas preovulatorias de LH y FSH. El pico preovulatorio de LH produce a nivel ovárico un aumento del riego sanguíneo, hay un aumento y cambio en la secreción de esteroides que se manifiesta por un aumento de la síntesis de progesterona. Se comienza a degradar el tejido conectivo que separa el folículo de la superficie ovárica y se inicia la formación del estigma (área extremadamente delgada del ápice folicular). Otro cambio que se produce es el aumento de los niveles de PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$, esto culmina con la formación del estigma. Posteriormente, las contracciones ováricas provocadas por la $PGF_{2\alpha}$ producen la rotura del folículo, el cual se contraerá por la misma $PGF_{2\alpha}$ y expulsará el ovocito (Walters y col., 1984).

2.3.3. Fase luteal

Después de la ovulación, las concentraciones de progesterona comienzan a elevarse en los días 3 o 4, alcanzan un pico entre los días 8 y 12 y luego disminuyen hasta concentraciones basales antes del próximo estro, como respuesta a la secreción uterina de $PGF_{2\alpha}$ y en ausencia de un embrión viable en el útero (Hansel y Convey, 1983).

2.3.3.1. Formación del Cuerpo Lúteo

Después de la ovulación, la cavidad del folículo ovulatorio es invadida por células que proliferan de la capa de la granulosa y de la teca. Los capilares y las membranas basales se ven alteradas en la ovulación, pueden causar una pequeña hemorragia, y permiten de esta manera que las células de los capilares y la teca penetren en la cavidad del folículo. Las células de la teca y de la granulosa se luteinizan en células luteales que forman el CL (Fitz y col., 1982). El CL es una glándula secretoria que produce principalmente progesterona y oxitocina. Las células de la teca se convierten en células de menor diámetro, conocidas como células luteales pequeñas y las de la granulosa en células luteales de mayor tamaño también llamadas células luteales grandes. Ambos tipos secretan progesterona, pero las células pequeñas parecen poseer casi todos los receptores de LH, las células grandes poseen casi todos los receptores para PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$ (Braden y col., 1988). Al comienzo de la preñez aproximadamente 20 días después de la concepción, las células grandes originales desaparecen y dejan lugar a las células luteales pequeñas, algunas de las cuales se expanden y se convierten en células luteales de mayor diámetro en el CL de la preñez (Schwall y col., 1986). El factor luteotrópico más importante en la vaca parece ser la LH. La progesterona es esencial para la ciclicidad normal de la vaca y después de la concepción es la principal hormona que

mantiene la gestación. Durante la fase luteal también se van a desarrollar ondas de desarrollo folicular (2 a 4 por ciclo) y cada onda folicular está precedida por un aumento de FSH, 1 o 2 días antes. La progesterona afecta negativamente los pulsos de liberación de GnRH y LH e impide que se produzca una nueva ovulación. Si el óvulo liberado por el folículo ovulatorio no es fertilizado, el animal no recibirá la “señal” de la preñez y alrededor del día 16 el endometrio del útero no gestante comienza a producir $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Thatcher y col., 1989).

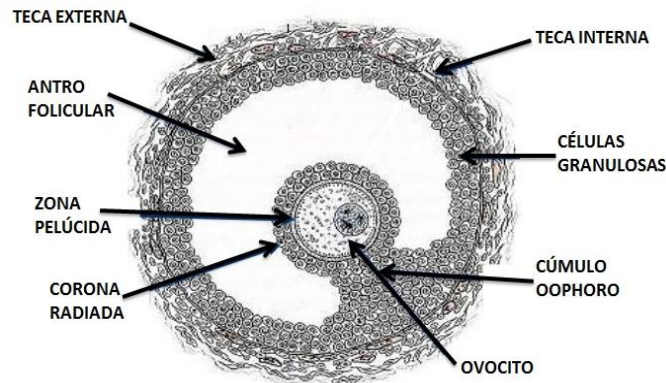


Figura 2. Folículo maduro o de Graaf (Barrera y col., 2011)

2.3.3.2. Luteólisis

La secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ por el útero causa la regresión del CL y consecuentemente finaliza la fase luteal. Después de aproximadamente 14 días bajo la influencia de la progesterona secretada por el CL, el endometrio secreta pulsos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ por un total de aproximadamente 36 horas. La luteólisis es un proceso complejo en el que intervienen el estradiol producido por el folículo dominante en crecimiento, que induce a su vez la síntesis de receptores de oxitocina. Al unirse la oxitocina con sus receptores la unión hormona-receptor desencadena el mecanismo enzimático que concluye con la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$. La $\text{PGF}_{2\alpha}$ es liberada a la circulación y a través de difusión pasa de la vena uterina a la arteria ovárica y llega al CL, donde inicia el mecanismo de luteólisis y a su vez estimula la liberación de más oxitocina por el CL, creando un sistema de feed-back positivo que culmina con la regresión del CL (Knickerbocker y col., 1988).

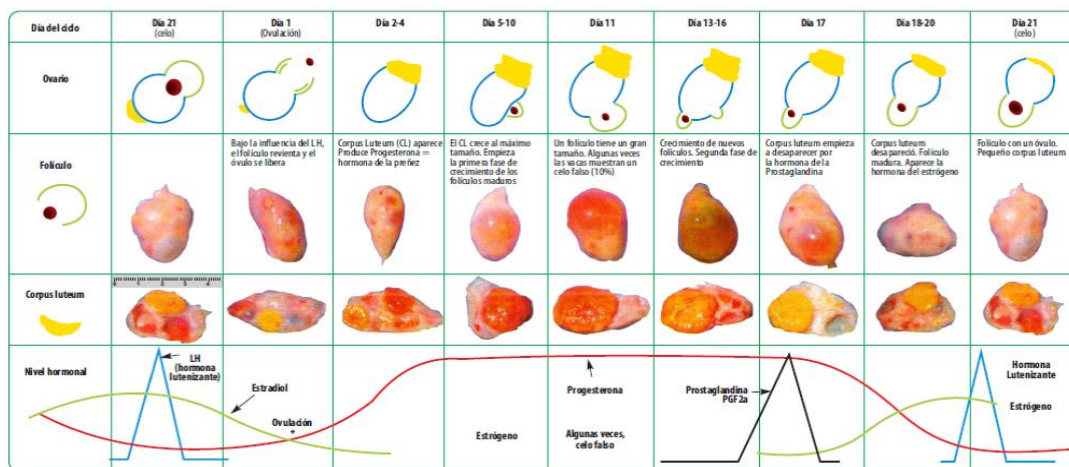


Figura 3. Esquema de ciclo estral bovino (Perulactea, 2012).

2.4. DINÁMICA FOLICULAR

La foliculogénesis es el proceso por el cual un rango de folículos, constante en la especie, y los ovocitos que estos contienen, maduran durante cada ciclo reproductivo. Frecuentemente, en cada ciclo estral de la vaca madura un solo folículo, no obstante pueden ocurrir ovulaciones dobles o múltiples de manera natural.

Una onda de crecimiento folicular involucra el desarrollo sincrónico de un grupo de folículos individualmente identificables a partir de un diámetro de 4 mm que ocurre al mismo tiempo en los dos ovarios. Durante aproximadamente 2 o 3 días todos los folículos crecen y uno de ellos es seleccionado, continúa creciendo y se convierte en folículo dominante, mientras el resto de los folículos, llamados subordinados, se vuelven atrésicos y regresan. El folículo dominante de la primera onda será anovulatorio, porque se desarrolla durante la fase luteal y tiene una fase de crecimiento (Días 0 a 6), una fase aparentemente estática (Días 6 a 12) y una fase de regresión (Día 12 en adelante). Los folículos subordinados en cada onda incrementan su tamaño, pudiendo el mayor de ellos alcanzar un diámetro de 8 mm tres días después de la emergencia de la onda, luego tienen una pequeña fase estática y regresan (Ginther y col., 1989a).

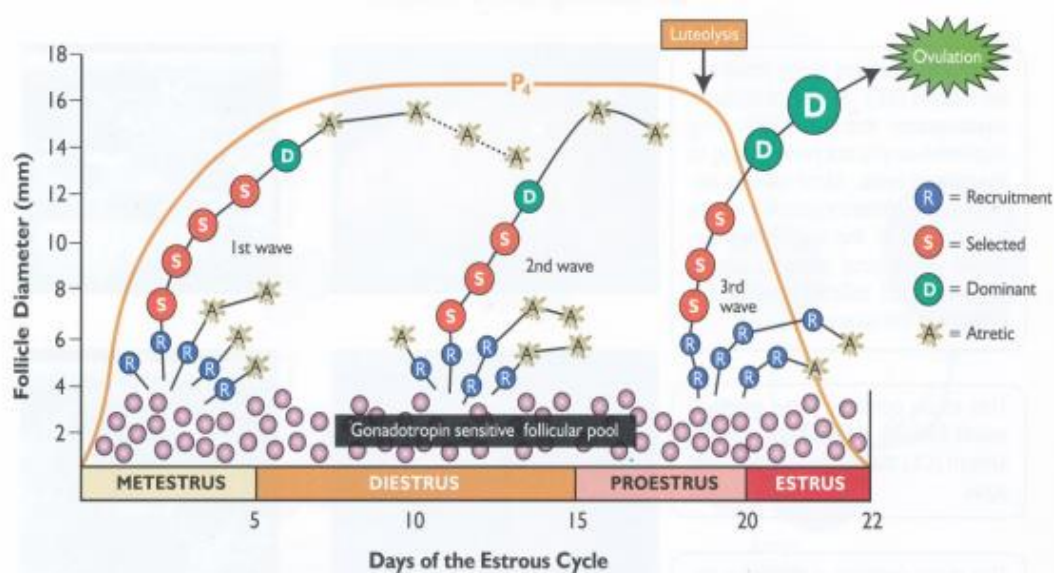


Figura 4. Ondas foliculares del ciclo estral de tres ondas (Senger, 2003)

Independientemente del patrón de desarrollo folicular del ciclo, la primera onda de desarrollo folicular se detecta el día de la ovulación (Día 0). La segunda onda comenzará el Día 9 o 10 para los ciclos de 2 ondas y el Día 8 o 9 en los ciclos de 3 ondas. En los ciclos de 3 ondas la tercera onda emerge en el Día 15 o 16 (Ginther y col., 1989b) las características del folículo dominante de la primera onda entre el patrón de 2 ondas y el patrón de 3 ondas son similares, pero la segunda onda emerge 1 a 2 días más temprano en los animales con 3 ondas que en los de 2 ondas. Además, existe una gran variabilidad en cuanto al día de emergencia de la segunda onda que puede comenzar entre los Días 6 a 12. El CL comienza su regresión más temprano en los ciclos de 2 ondas (Día 16) que en los de 3 ondas (Día 19), afectando el intervalo interovulatorio. La duración del ciclo estral de la vaca depende principalmente de su patrón de desarrollo folicular para ser de 18 a 20 días (2 ondas) o de 21 a 23 días (3 ondas). En ambos casos, el folículo dominante en el momento que ocurre la luteólisis se torna en folículo ovulatorio. Si bien se ha descrito que en el 95 % de los ciclos estrales hay 2 o 3 ondas de desarrollo

folicular, se ha encontrado que algunos animales *Bos Indicus* pueden tener ciclos con 4 ondas. En este caso la cuarta onda comienza el Día 20 o 21 y el ciclo estral dura 24 a 25 días (Bo y col., 1993).

Aparentemente no hay diferencias de fertilidad entre las vacas de dos ondas y de tres ondas. Sin embargo, factores como el nivel nutricional, stress calórico y estacionalidad pueden modificar el patrón de desarrollo folicular (Murphy y col., 1991).

El desarrollo folicular está controlado por la secreción de hormonas provenientes de la hipófisis, el CL y de los folículos. Se ha observado que cada onda folicular está siempre precedida por un pico de FSH. Se cree que este pico es fundamental para que los folículos antrales ingresen al pool de folículos grandes (≥ 4 mm) que observamos en la onda folicular. Luego del comienzo de la onda, el folículo dominante comienza a producir grandes cantidades de estradiol e inhibina que actuarán inhibiendo la liberación de FSH. Con poca FSH circulante los folículos subordinados comienzan a regresar. El folículo dominante puede seguir creciendo debido a la adquisición de receptores de LH en las células de la granulosa (además de los que se encuentran en la teca). Durante el diestro, los altos niveles de progesterona afectarán adversamente la frecuencia de los pulsos de LH e inducirán la regresión del folículo dominante. Con respecto a los productos foliculares, la investigación ha llevado a descubrir una extendida lista de factores reguladores intragonadales con importantes roles en el control autócrino, parácrino y/o endócrino de la función ovárica. Se piensa que estos factores intraováricos modulan el número y desarrollo de los folículos en crecimiento, primordialmente a través de la regulación de las gonadotrofinas o de la respuesta a las gonadotrofinas. Sin embargo, se sigue manteniendo que al menos en el bovino los efectos supresivos del folículo dominante sobre los subordinados se ejercen a través de canales sistémicos más que autócrinos o parácrinos (Ginther y col., 1996).

2.5. COMPORTAMIENTO ESTRAL

Las vacas pueden ser detectadas en celo debido a que durante este período muestran un comportamiento específico y signos físicos que pueden verse en el animal (Marcantonio, 1998; Van Eerdenburg, 2009). El perfil hormonal que puede llevar a la expresión del celo en la vaca es un alto nivel de estrógenos en sangre en presencia de un bajo nivel de progesterona. Esta situación hormonal normalmente existe cuando hay un folículo preovulatorio maduro secretando estrógenos en ausencia de un CL funcional. Otras condiciones que pueden llevar a la manifestación de celo incluyen la presencia de folículos quísticos y altos niveles de estrógenos con bajos niveles de progesterona en las vacas preñadas cerca del parto (Becaluba, 2006).

2.5.1. Características del celo Bovino

En una población de animales sexualmente activa con una distribución normal del ciclo estral, la frecuencia diaria de celos oscila entre un 3 y un 4 % diaria (Smalley, 1981). Los primeros datos sobre duración de celo mencionaban 17,8 horas en vacas y 15,3 en vaquillonas (Trimberger y Frincher, 1956). Un estudio realizado en Uruguay demostró en animales Holando que la duración del celo es de 10 horas en vacas y 13,5 en vaquillonas (Cavestany y col., 2007). Si bien hay evidencia que la mayor manifestación de celo se da durante las horas de la noche (Williamson y col., 1972; Esslemont y Bryant, 1976), estudios en nuestras condiciones han encontrado que la actividad de celo se presenta más uniformemente distribuida a lo largo del día (Arregui y col., 2008).

2.5.1.1. Características de comportamiento primarias

- Aceptación de la monta: generalmente se acepta que el criterio más seguro para saber si una vaca o vaquillona se encuentra en celo es que acepte ser montada por el toro u otra vaca (Foote, 1975; Peters y Ball, 1991; Becaluba, 2006; Marcantonio, 1998; Sepúlveda y Rodero, 2003; Van Eerdenburg, 2009). La receptividad de la monta consiste en la inmovilidad de la hembra durante 6 a 8 segundos al ser montada por el toro u otra compañera del grupo (Becaluba, 2006).

2.5.1.2. Características de comportamiento secundarias

Estas características llevan a que algunos animales del rodeo interactúen, conformando el denominado grupo sexualmente activo (Marcantonio, 1998).

- Actitud de monta: la característica secundaria de comportamiento más constante de celo es la actitud de montar. El 95 % de las hembras en celo montan a otras integrantes del grupo sexualmente activo, pero solamente el 30 a 40 % de las hembras que montan está en celo (Marcantonio, 1998; Van Eerdenburg, 2009). Según Van Eerdenburg (2009) una vaca puede ser considerada en celo cuando monta otra vaca dos veces en 24 horas y el comienzo del comportamiento de monta es el mejor predictor del momento de la ovulación (Roelofs y col., 2005; Van Eerdenburg, 2009). Las montas pueden ser craneales o “desorientadas”, cuando el animal activo monta a otra por la cabeza, (Marcantonio, 1998) siendo altamente discriminativo de que una vaca se encuentra en estro (Britt y col., 1986; Van Eerdenburg, 2009).

- Montada moviéndose: puede servir como indicación de proestro, dado que las vacas cercanas al estro son más atractivas para las vacas en celo, quienes intentaran montarlas (Van Eerdenburg, 2009).

- Incremento de la actividad: las vacas se encuentran inquietas, caminan con mayor frecuencia, interrumpen el pastoreo y se reduce el tiempo de rumia, pudiendo disminuir también la producción de leche (Foote, 1975; Arthur y col., 1991; Marcantonio, 1998; Sepúlveda y Rodero, 2003).

- Mugidos: el mugir de forma continua puede ser un síntoma de celo (Marcantonio, 1998; Van Eerdenburg, 2009), sin embargo en vacas de tambo solo algunos animales muestran este signo, por lo que el potencial selectivo para la vaca lechera es bajo (Van Eerdenburg, 2009).

- Flehmen: los animales pueden manifestar el reflejo de Flehmen o levantamiento del labio superior (Sepúlveda y Rodero, 2003). A pesar de que también es observado durante el diestro, tiene una alta frecuencia durante el estro (Van Eerdenburg, 2009).

- Olfateo de vulva: la vaca en celo suele olfatear y lamer los genitales de otras vacas, pero también es receptora de esta actividad por parte de las otras vacas del rebaño (Marcantonio, 1998; Sepúlveda y Rodero, 2003; Becaluba, 2006) y generalmente es seguido por el flehmen (Arthur y col., 1991; Van Eerdenburg, 2009).

- Encuentros cabeza-cabeza: presentan las clásicas “topadas”. El componente agresivo de comportamiento se explicaría por la conformación de un nuevo grupo dentro del rodeo, el grupo sexualmente activo, lo que llevaría a peleas por el establecimiento de un nuevo orden social (Marcantonio, 1998).

- Apoyo de mentón: lo más frecuente es que antes de intentar la monta la vaca en celo coloque la barbilla sobre la zona dorsal de una compañera con objeto de inspeccionar su posible receptividad a ser montada, signo que se considera como un buen indicador de celo (Arthur y col., 1991; Van Eerdenburg, 2009).

2.5.1.3. Signos físicos

Las hembras en celo presentan una serie de signos físicos que pueden ser evidenciados sin necesidad de que interactúen con el grupo sexualmente activo, los cuales complementan la sintomatología del celo pero no deben ser tomados como indicadores únicos (Marcantonio, 1998). Estos signos físicos auxiliares se manifiestan a medida que el animal se acerca al estro, se vuelven más frecuentes e intensos en él y declinan después del mismo (Mc Donald, 1991).

- Descarga vulvar mucosa: cuando un hilo largo de mucus (50 cm) claro y viscoso cuelga de la vagina, la vaca puede ser considerada en celo, pero no es confiable como indicador de celo ya que puede ser visto por varios días en ciertos animales (Arthur y col., 1991; Becaluba, 2006; Van Eerdenburg, 2009). Esta descarga se origina cervical es más evidente en vaquillonas que en vacas y se hace más notoria en el momento que la vaca monta a otra (Marcantonio, 1998).

- Edematización de vulva: producto de la acción de los estrógenos, que incrementan la irrigación del aparato genital, la vulva se encuentra ligeramente edematosa y congestionada (Foote, 1975; Arthur y col., 1991; Marcantonio, 1998).

- Pelos de la grupa: por las reiteradas montas podemos observar que los pelos de la región pélvica quedan revueltos, despeinados e incluso pueden verse peladuras con relación a las saliencias óseas, lo que nos indica que ese animal fue montado aún sin haber sido observado por el operador (Marcantonio, 1998; Van Eerdenburg, 2009).

- Aumento de la temperatura corporal: la hembra en celo aumenta su temperatura corporal en 0,3 a 1,1 °C. Este cambio es muy variable y de corta duración. El aumento también se ve reflejado en la temperatura de la leche (aumento de 0,2 a 0,4 °C) (Marcantonio, 1998).

2.5.2. Factores que afectan la expresión del celo

- El macho: el coito acorta la duración del periodo de celo y puede acelerar el momento de la ovulación (Mc Donald, 1991; Cavestany y Méndez, 1993).

- El clima: una temperatura ambiente elevada puede reducir no solamente la duración, sino también la intensidad del celo. Puede incluso aumentar la frecuencia de anestros o celos no detectados. Las lluvias intensas provocan una disminución de la actividad sexual (De Silva y col., 1981; White y col., 2002; Sanders, 2005; Ahmed, 2007; Youngquist y Threlfall, 2007; Van Eerdenburg, 2009). En climas templados o moderados la duración del estro puede ser de 20 a 30 % más duradero que en vacas de ambientes muy calurosos o fríos (Sepúlveda y Rodero, 2003).

- Momento del día: la mayoría de los autores apuntan a que el comienzo del celo se produce durante la noche o a primera hora de la mañana (Sepúlveda y Rodero, 2003). Cavestany (2005) describe que la ocurrencia de celos es mayor en horas de la noche, encontrando el 70 % entre las 18:00 y las 06:00 horas. Estudios realizados por De Silva y col., (1981), demuestran que los animales en celo, presentan mayor actividad estral durante la mañana que durante la tarde, lo que

concuenda con reportes de Foote (1975). Mientras que otros encontraron una mayor actividad de monta por la tarde (Gwazdauskas y col., 1983).

- Razas y líneas genéticas: está establecido que *Bos indicus* muestra una duración e intensidad del estro mucho más débil que *Bos Taurus*. En los derivados del *Bos Taurus* se han encontrado variaciones entre razas en la intensidad de celo, pero también entre individuos de diferente color de capa (Sepúlveda y Rodero, 2003).

- Población sexualmente activa: cuando el número de vacas en celo aumenta, el número de montas (actividad sexual) por período de celo aumenta (Cavestany y Méndez, 1993). Además se ha reportado que al introducir una vaca en celo a un grupo de animales, se estimula el comportamiento estral (aumentando las montas) (Van Eerdenburg, 2002).

- Celos postparto: a medida que aumentan los celos postparto la actividad de monta también aumenta (Cavestany y Méndez, 1993).

- Nutrición: la subnutrición lleva a una alta incidencia de inactividad ovárica, disminución de la expresión de celo y bajas tasas de ovulación (Ahmed, 2007). Así mismo el intervalo desde el parto a la ovulación está inversamente relacionado al promedio del balance energético durante los primeros 20 días de lactación (Sanders, 2005; Youngquist y Threlfall, 2007).

- Estrés: varios autores concuerdan en que un período de estrés para los animales resulta en una disminución de la liberación de GnRH y como consecuencia en los picos de LH, retrasando la ovulación y alterando los patrones normales de comportamiento estral (Stoebel y Mober, 1982; Nanda y col., 1990; Hilary y Smith, 2000).

- Producción de leche: aunque hay autores que sostienen que no existe una correlación negativa entre producción de leche y manifestación de celo (Britt y col., 1986), estudios más recientes han demostrado que altos niveles de producción de leche reducen la duración del estro así como su expresión. Los niveles de estrógenos en el estro y la duración e intensidad del mismo son afectados inversamente por la producción elevada de leche (Lopez y col., 2004; Glauber, 2007).

- Edad de la vaca: en vaquillonas la duración del celo es menor que en vacas adultas (Mc Donald, 1991). Por otro lado estudios demuestran que las vacas de más edad presentan mayor actividad de monta que las más jóvenes, (Gwazdauskas y col., 1983), pudiendo ser por una mayor dominancia y experiencia de las primeras sobre las segundas (De Silva y col., 1981).

- Superficie: la superficie donde montan las vacas influye en la duración del celo y en la actividad de monta y aceptación de ella. Superficies de cemento, mojadas y pisos de los corrales disminuyen la exteriorización del celo (Fernández y col., 2006; Ahmed, 2007). Son preferibles pisos de tierra o una cama de paja espesa (Van Eerdenburg, 2009). Esto concuerda con estudios realizados por Britt y col., (1986), quienes describieron que el factor que más afectaba la manifestación de celo era la superficie donde se observaba a los animales en celo.

- Sistemas de producción: cualquier sistema de alojamiento de los animales que no permita que éstos interactúen entre ellos a lo largo del día lleva a una menor manifestación de celo (Ahmed, 2007). Otros estudios reportan que los animales que

viven en confinamiento, al liberarlos para la detección de celos, demuestran un mayor número de montas por hora que aquellos que viven durante todo el año en la pastura (De Silva y col., 1981; Gwazdauskas y col., 1983). Esto podría sustentarse con lo sugerido por Britt y col., (1986) de que llevar los animales a un lugar distinto de su rutina diaria despertaría la actividad sexual.

2.6. DETECCIÓN DE CELO

La detección de celos es el mayor factor individual que limita la optimización de la eficiencia reproductiva en rodeos bovinos que utilizan inseminación artificial. En Uruguay, la eficiencia de la detección de celos se encuentra entre el 40 y 55 % (Cavestany y col., 2007). Con la utilización de análisis de progesterona en sangre o leche las investigaciones indican que entre el 5 y el 30 % de las inseminaciones artificiales se realizan en vacas que no están en estro (Nebel y col., 1987).

Lograr una performance reproductiva aceptable, requiere un primer servicio hecho a tiempo y una rápida identificación de las vacas que quedan vacías, así son servidas nuevamente. Los errores en la detección de celo constituyen un problema individual de cada rodeo y deben ser siempre considerados como causa de baja tasa de concepción. Debido a que además de las instalaciones y el buen manejo, el personal es el principal componente de la detección de celo, las pérdidas económicas ocasionadas por dicha tarea tienen dos orígenes:

- No observación de animales en celo. Este problema disminuye la eficiencia en la detección de celo.
- Error en la detección de los celos, es decir considerar en celo animales que no lo están; mayormente a consecuencia de conceptos equivocados sobre los signos de celo o bien por fallas en la identificación de los animales y/o registros.

Estos problemas disminuyen la exactitud en la detección de celo. Debido a que la efectividad en la detección de celos es muy variable y a la alta demanda laboral que insume el hacerlo visualmente, se estimuló la investigación y el desarrollo de formas de ayuda en la detección del celo y maneras de determinar el momento apropiado de inseminación, sin la necesidad de detectar las manifestaciones de comportamiento de celo (Ball y Cowpe, 1987).

2.7. SCORE REPRODUCTIVO DE ANDERSEN

El Score Reproductivo de Andersen (SRA) es un método que puede utilizarse para aumentar la eficacia reproductiva y aumentar positivamente el beneficio de las operaciones ganaderas de cría. El Sistema SRA estima la madurez sexual (pubertad) mediante la palpación rectal de los cuernos uterinos y de los ovarios como se describe en el Cuadro I:

Cuadro I. Descripción del Score Reproductivo de Andersen (Andersen y col., 1991)

SRA	CUERNOS UTERINOS	OVARIO			
		Largo (mm)	Alto (mm)	Ancho (mm)	Estructuras ováricas
1	Inmaduro <20 mm de diámetro. Sin tono	15	10	8	No hay estructuras palpables
2	20 a 25 mm de diámetro. Sin tono	18	12	10	Folículos de 8 mm
3	25 a 30 mm de diámetro. Poco tono	22	15	10	Folículos de 8-10 mm
4	30 mm de diámetro. Buen tono	30	16	12	Folículos de >10 mm. Posible cuerpo lúteo
5	>30 mm de diámetro. Buen tono	>32	20	15	Folículos de >10 mm. Cuerpo lúteo

Un SRA de valor 1 se asigna a las vaquillonas con sus zonas reproductivas infantiles, indicadas por los cuernos uterinos pequeños, sin tono y los ovarios pequeños con estructuras no significativas. Las vaquillonas con un "Score" = 1, son probablemente, las que estarán ciclando más adelante, al momento de la examinación. Las vaquillonas con SRA de 2, están más cercanas a ciclar que aquellas con grado 1, debido principalmente a la presencia de folículos pequeños (ampolla que contiene el huevo u ovum) y cuernos uterinos y ovarios levemente más grandes. Las vaquillonas con un SRA de 3 están al borde de estar ciclando, estimación basada en el tono uterino leve, además de la presencia de folículos. Las vaquillonas asignadas a un SRA de 4 están presumiblemente ciclando, como lo indica su buen tono y tamaño uterino, y el crecimiento folicular; sin embargo. Estas vaquillonas carecen de un Cuerpo Lúteo fácilmente distinguible (indicativo de haber completado un ciclo una vez), debido a la etapa de su ciclo estral. Las vaquillonas con los valores reproductivos de grado 5 son similares a las calificadas como 4, excepto por la presencia de un Cuerpo Lúteo palpable (demostrativo de que han ciclado recientemente) (Raggio, 2003).

2.8. MANEJO FARMACOLÓGICO DEL CICLO ESTRAL BOVINO

La regulación de la actividad ovárica se ha convertido en una herramienta muy útil y de creciente uso en la ganadería.

Los objetivos que se buscan alcanzar son:

- Programas de reproducción controlada (sincronización de celos)
- Regulación de ondas foliculares para mejorar la precisión de la sincronización de celos
- Reducción de la incidencia de los celos no detectados
- Mejorar la eficiencia de la inseminación artificial (Cavestany, 2002)

La mayoría de los sistemas de sincronización emplean un método para controlar el desarrollo de la onda folicular; prevenir la ovulación prematura en vacas cíclicas y promover la ovulación en vacas en anestro; provocar la regresión del CL y sincronizar el celo y la ovulación al final del tratamiento (Lucy, 2008). Para que se puedan aplicar no deben ser costosos y deben alcanzar una buena respuesta en términos de fertilidad (Cavestany, 2000). Un tratamiento de sincronización de celos adecuado, debe contemplar tanto la funcionalidad del CL como el desarrollo folicular, permitiendo así regular el momento de la ovulación de un folículo de buena calidad

(Viñoles y Cavestany, 2000). Esto facilita la implementación de la IA a celo visto y dependiendo de la combinación hormonal utilizada, se generan las condiciones para realizar una IATF, sin la necesidad de realizar detección de celos (Callejas, 2004). Las hormonas que se utilizan para controlar el ciclo estral son análogas (idénticas) a las hormonas reproductivas que se encuentran en la vaca (Lucy, 2008). Dentro de las principales hormonas utilizadas para manipular el ciclo encontramos: PGF2 α , GnRH, Estrógenos y Progesterona.

2.8.1. Sincronización de celos con Prostaglandinas

La utilización de PGF2 α para la sincronización de celos es una herramienta excelente. De hecho, la PGF2 α es la sustancia natural producida por el útero de la vaca para causar la regresión normal del CL. Por lo tanto, la inyección de PGF2 α es una manera de inducir selectivamente la regresión del CL de una manera similar al proceso normal (Cavestany, 2002). Esta hormona fue la base de los primeros métodos de sincronización de celos (Rowson y col., 1972).

Las prostaglandinas se encuentran en la mayoría de los tejidos (pulmón, timo, músculo esquelético, fluido menstrual, líquido amniótico, intestino, sangre, tejido graso, etc.). Actúan en, o muy cerca del lugar donde se producen y se destruyen rápidamente en circulación, pues de lo contrario, debido a su gran actividad biológica, inducirían efectos generalizados indeseables. Esto hizo que sea muy difícil aislar las prostaglandinas naturales en cantidades comerciables y que la mayor parte de las prostaglandinas que se utilizan a nivel comercial sean sintéticas (Baird, 1978).

Algunos de los análogos sintéticos que existen en el mercado son: Cloprostenol, Delprostenate, Alfaprostol, Etiproston, Fenprostaleno, etc. Como ha sido mencionado anteriormente, dependiendo del momento en que se administra la PG será la respuesta que se obtenga. Una de las desventajas de esta hormona es la variabilidad en la distribución de presentación de celo en un período hasta de 5 días, debida al estado folicular al momento del tratamiento (Huanca, 2001). El promedio más bajo del intervalo al estro en vacas cíclicas, se da cuando se inyecta PGF2 α de manera temprana (días 7 a 9), o de manera tardía (día 14 a 16) en el ciclo estral. Cuando se inyecta en los días 10 a 12 del ciclo se pueden observar 3 a 7 días de intervalo al estro, ya que el folículo dominante de la primera onda está sufriendo la atresia y el folículo dominante de la segunda onda es inmaduro aún (Lucy, 2008). La variación en el intervalo al estro luego de la inyección de PGF2 α puede verse disminuida si las inyecciones son administradas en series (intervalos de 11 a 14 días) o si la sincronización folicular se lleva a cabo 7 días antes de la inyección de PGF2 α (Lucy, 2008). En vacas en lactación los cambios metabólicos y hormonales alteran el desarrollo folicular del ovario, de modo que esta categoría de animales entra en celo más tarde que vaquillonas o vacas no lactando. Por lo tanto un intervalo de 11 días entre inyecciones resulta en una mayor proporción de vacas en etapas tempranas del ciclo al momento de la segunda inyección. Debido a esto, un intervalo de 14 días entre inyecciones en vacas en producción resulta en una mejor respuesta traducida en mayor porcentaje de preñez y disminución de días abiertos (Cavestany, 2002).

2.8.1.1. Protocolo con dosis única de PGF2 α

Este método es el más utilizado comercialmente y consiste en detectar celo e inseminar en forma convencional por 5 días. Al 5º día (Día 0 = día de comienzo de la inseminación) se inyecta con una dosis lúteo luteolítica de PGF2 α a los animales que no fueron inseminados hasta el momento y se continúa la inseminación hasta el día 11. La introducción de machos o hembras androgenizadas del día 11 al 19 es recomendable porque mejora los ciclos y su fertilidad. Éstos podrán tener un efecto

bioestimulador sobre vientres en anestro prepuberal superficial (Rodríguez Blanquet, 2002). A su vez, entre los días 11 y 19, sería conveniente introducir toros al rodeo para no perder ningún celo, ya que pueden aparecer hembras en celo luego de los 6 días (Bolaños y col., 1998). Los días 12 y 32 de mañana se inseminan los animales detectados en celo en los días 11 y 31 de tarde respectivamente. Con este método el trabajo de inseminación artificial es de 23 días con un período de servicio de 31,5 días para cubrir dos celos. Este método presenta la ventaja de dar una sola inyección solamente al 75 % del rodeo si éste está ciclando normalmente. A su vez con la detección de celos los 5 días previos a la única inyección, se podrá tener una idea aproximada de cómo está ciclando el rodeo. Si el rodeo está ciclando normalmente y el celo es correctamente detectado se debería detectar en celo en esos 5 días alrededor del 25 % de las hembras. Los inconvenientes que presenta este método son un mayor número de días de trabajo que otros métodos y que al tratamiento un 25 % de los animales se encuentran en el diestro temprano, con lo cual aproximadamente el 8,5% de las hembras no presentaran celos en los 6 días siguientes. Esto permite obtener un valor teórico de 88% de celos los 6 días siguientes a la aplicación de la dosis de PGF2 α (Rodríguez Blanquet y col., 1992).

Otro método de sincronización con dosis única de PGF2 α consiste en realizar previa palpación de un CL funcional y detección de celo 1 a 7 días post inyección; este método es recomendado para vacas en lactación (Blanc y col., 1994). Estos autores indican que la precisión de la detección de la presencia de un CL funcional, mediante palpación rectal ha oscilado entre 71 y 96 % y que la respuesta a la inyección única de PGF2 α de esas vacas fue de 64 a 72 % hasta los 8 días posteriores a ésta. La precisión de la palpación rectal para determinar funcionalidad ovárica está sujeta a errores debidos fundamentalmente a la presencia de CL no funcionales o a CL pequeños ubicados en el interior del ovario, los cuales no pueden detectarse fácilmente a la palpación (Cavestany 2000).

2.8.1.2. Protocolo con doble dosis de PGF2 α

a) Doble aplicación de PGF2 α en la totalidad de los animales

Utilización de dos dosis aplicadas con un intervalo de 11 a 14 días. Con la primera aplicación en rodeos cíclicos normalmente el efecto luteolítico se da aproximadamente en el 60% de las vacas. Con la segunda aplicación, se introduce en estro a la totalidad de los animales. A partir de las 48 horas de la segunda inyección se comienza a detectar celo e inseminar por 2 a 3 días (Becaluba, 2006).

b) Doble aplicación de prostaglandina con inseminación después de la primer y segunda dosis

Este método es una variante del procedimiento descrito anteriormente. Es utilizado para inseminar vacas que entran en celo después de la primera aplicación de PGF2 α . Se realiza detección de celo por 96 horas y se insemina. Los que no se detectaron en celo, reciben una segunda dosis de PGF2 α y son inseminados cuando demuestran el celo, que se da la mayoría de las veces entre las 48 y 96 horas. Tiene como desventaja en relación al método original la observación de un período más largo de celos (Becaluba 2006).

Todos los protocolos con prostaglandina como única hormona, son indicados solamente para animales cíclicos, resultando en completo fracaso cuando se aplican en animales con condiciones nutricionales deficitarias y con ausencia de un cuerpo lúteo maduro (Becaluba, 2006).

2.8.2. Sincronización de celos con GnRH

El avance en el conocimiento de la fisiología del ciclo estral ha permitido en los últimos años encarar la sincronización de celos trabajando no sólo sobre la funcionalidad del CL, sino también sobre la dinámica folicular. La utilización de un tratamiento con GnRH induce la ovulación de los folículos dominantes (de por lo menos 10 mm de diámetro) y el posterior desarrollo de una nueva onda folicular (Colazo y col., 2007). La GnRH sincroniza la emergencia de una nueva onda folicular solamente cuando es administrada en presencia de un folículo dominante funcional, mientras que si es administrada antes de la dominancia parecería no afectar el progreso subsecuente de la onda, presumiblemente por la falta de receptores de LH en las células de la granulosa de los folículos en crecimiento (Diskin y col., 2002).

2.8.2.1. Combinación de GnRH y PGF2 α en protocolos utilizados en vacas ciclando

- OVSYNCH

El folículo dominante en crecimiento puede ser ovulado de manera más precisa utilizando una segunda inyección de GnRH 1,5 a 2 días después de la PGF2 α . Esta información se utilizó para desarrollar programas de manejo reproductivo para vacas en lactancia y el protocolo para sincronizar la ovulación se hizo conocido como "OVSYNCH". Este protocolo como se muestra en la Figura 5, requiere de tres inyecciones. Después de la segunda inyección de GnRH, las vacas son servidas sin detectar celos (Geary y col., 2001).

La GnRH causa la luteinización u ovulación de los folículos grandes presentes en el ovario y el consiguiente inicio de una nueva onda de desarrollo folicular, en tanto la PGF2 α administrada 7 días más tarde provoca la regresión de las estructuras luteales formadas. Una segunda dosis de GnRH asegura la ovulación del folículo dominante de la siguiente onda. La inseminación a las 15-16 horas de la segunda dosis de GnRH permite la fecundación del ovocito liberado (Viñoles y Cavestany, 2000). La sincronía de la ovulación a la segunda GnRH y las tasas de preñez obtenidas a la IATF con este esquema son dependientes de que la primera inyección con GnRH induzca la ovulación del folículo dominante y consecuentemente sincronice el desarrollo folicular; por lo tanto se han llevado a cabo distintos procedimientos para mejorar el protocolo Ovsynch (Balla y col., 2006). Se ha demostrado recientemente que la fase del ciclo estral en el momento en el que se administra la GnRH afecta los resultados del programa Ovsynch. Si se administra GnRH durante la primera fase de crecimiento del folículo dominante, es posible que no se produzca la ovulación en respuesta a la liberación de LH, en cuyo caso, no se sincronizará la emergencia de la onda folicular. Los animales responderán de manera más consistente a los protocolos con GnRH si éstos se inician entre los días 5 y 12 del ciclo; esto se puede lograr con la pre sincronización antes de la primera inyección de GnRH (Bó y col., 2009). Este protocolo ha sido más eficaz en vacas lecheras en lactancia que en vaquillonas. La ovulación en respuesta a la primera aplicación de GnRH ocurrió en el 85 % de las vacas y en solo el 54 % de las vaquillonas (Huanca, 2001). Vacas en anestro no responden satisfactoriamente a protocolos de sincronización basados en combinaciones de GnRH y PGF2 α y sus porcentajes de preñez fueron menores que cuando se aplicó en vacas ciclando (Bicalho y col., 2007). Desde que el Ovsynch se introdujo en 1995, ha sido muy utilizado en la industria lechera. Se han introducido otros protocolos que utilizan GnRH como: Co-synch, Pre-synch, Heat-synch, Select-synch. El protocolo original de Ovsynch se ha ido modificando debido a la evolución de nuestros conocimientos y nuestra capacidad de controlar la reproducción en el

ganado bovino. Las modificaciones del protocolo Ovsynch se realizaron en base a información que sugiere que la sincronización de la ovulación (es decir, la ovulación dentro de las 48 horas posteriores a la segunda inyección de GnRH) depende del estadio del ciclo estral en que se administró la primera inyección de GnRH. (Vasconcelos y col., 1999). Recientemente los protocolos que combinan el Ovsynch con la inserción de un dispositivo con progesterona han mejorado las tasas de preñez en vacas que estaban en anestro al iniciar el tratamiento y mejoró la tasas de preñez en vaquillonas inseminadas a tiempo fijo (Bó, 2009).

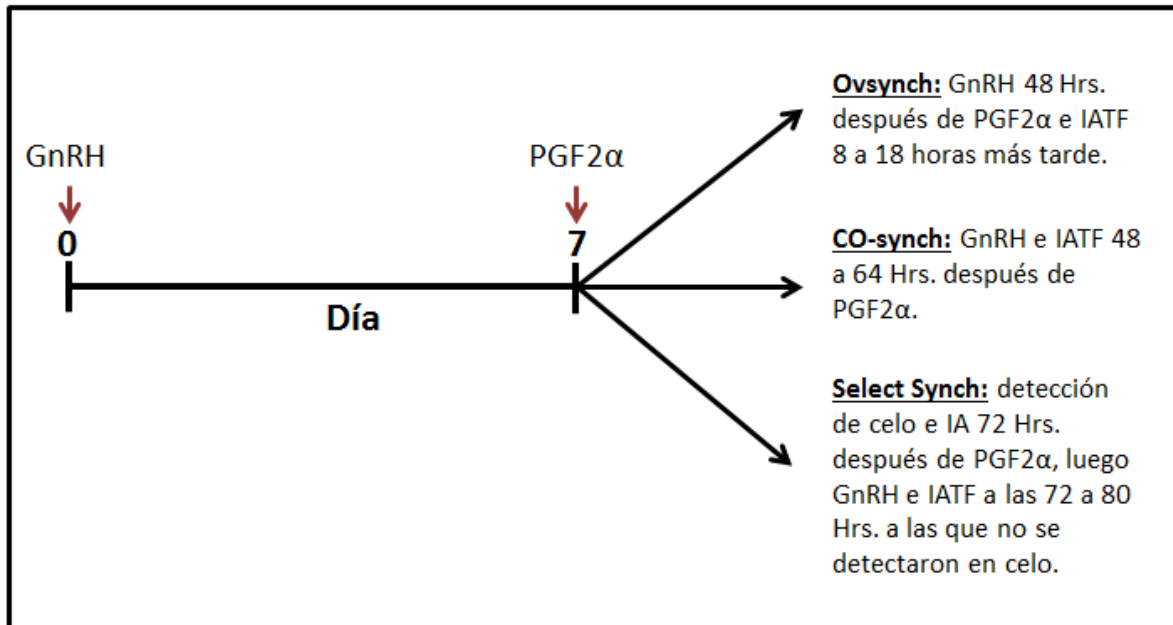


Figura 5. Esquema de las variantes de protocolos basados en la utilización de GnRH–PGF2α más populares en bovinos (De Jarnette, 2015).

Con respecto a su utilidad en ganado de carne, el sistema Co-synch es el que más se utiliza porque disminuye en día de tratamiento al asociar la segunda GnRH con la inseminación artificial. Este protocolo resultó en porcentajes de preñez aceptables en vacas con cría que están ciclando. Los resultados en vacas en anestro y vaquillonas son más bajos que los obtenidos en otros sistemas y nuevamente la adición de un DIV entre la primera GnRH y la PGF2α mejoró significativamente los resultados en vacas con cría al pie y vaquillonas (Geary y col., 2001).

2.8.3. Sincronización de celos con Progesterona

Intentos iniciales para regular el ciclo estral involucraron la administración exógena de progesterona (P4) o progestágenos sintéticos, para prolongar la fase luteal del ciclo estral o establecer una fase luteal artificial. Estas hormonas suprimen el estro y la ovulación a través de la inhibición de la liberación de la hormona LH y la maduración de los folículos de Graaf (Larson y Ball, 1992), mediante un feedback negativo sobre el hipotálamo suprimiendo la GnRH (Senger, 2003). El cese de la actividad de la fuente exógena de P4 permite el aumento de la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH y el crecimiento de un folículo dominante que ovulará entre 48 y 72 horas después (Senger, 2003). Los progestágenos además de mejorar la sincronización de celos también inducen estro y ovulación en un porcentaje aceptable de vacas en anestro (Lammoglia y col., 1998; Yániz y col., 2004; Lucy 2008). Son utilizados frecuentemente para inducir la ciclicidad ovárica en vaquillonas pre púberes y vacas en anestro postparto (Lammoglia y col., 1998). Ha sido demostrado que tratamientos prolongados con progestágenos por 14 o 21 días son efectivos para la sincronización de celos, sin embargo la fertilidad de estos celos es

reducida. La buena sincronización de celos se debe a que el patrón de onda folicular no es mantenido y los folículos grandes persisten seguidos de una luteólisis espontánea y la razón de la baja fertilidad se debe a la ovulación de ovocitos anormales y envejecidos (Larson y Ball, 1992). La duración de la exposición a los progestágenos y la fertilidad dependen del momento del ciclo estral en que es iniciado un tratamiento con P4. Si el tratamiento se realiza al inicio del ciclo estral la fertilidad es normal, mientras que se ve disminuida cuando el tratamiento es iniciado en etapas tardías del ciclo (alrededor del día 11). Estos autores han descrito que cuando los tratamientos comienzan al inicio del ciclo estral el CL existente podría sobrevivir al período de tratamiento con la P4 exógena llevando a una mala sincronización de los celos. Por ésta razón es necesaria la incorporación de un agente luteolítico cuando se aplica un tratamiento corto de P4 para obtener una buena eficiencia en la sincronización y una fertilidad normal (Larson y Ball, 1992). Dentro de esta clase de hormonas se encuentra la progesterona natural y los progestágenos sintéticos, dentro de estos últimos, los más difundidos son el Acetato de Melengestrol (MGA), Acetato de Fluorogestona (FGA), Acetato de Medroxiprogesterona (MAP) y Norgestomet (N).

Los métodos de administración de P4 incluyen: administración oral, inyectable, dispositivos intravaginales e implantes subcutáneos de liberación controlada (Larson y Ball, 1992).

2.8.3.1. Combinación de progesterona y PGF2 α

La combinación de un DIV con P4 y una PGF2 α mejora la sincronización de celo y la tasa de preñez en comparación con tratamientos con PGF2 α sola. La administración de P4 7 días antes de la PGF2 α asegura que el CL regrese en respuesta a la PGF2 α , ya que las vacas van a tener un CL de al menos 7 días (Fogwell y col., 1986; Lucy y col., 2001). De todas maneras no es eficaz cuando gran parte de los animales a tratar están en anestro o son pre púberes (Lucy y col., 2001).

2.8.3.2. Combinación de progesterona y GnRH

Debido a que el protocolo Ovsynch no tuvo éxito para sincronizar las vacas en anestro postparto; en los últimos años se ha combinado la utilización de un dispositivo de liberación de P4 con el protocolo Ovsynch en vacas de leche no cíclicas. En este protocolo, las vacas tienen el dispositivo de liberación de P4 colocado en la vagina en el momento en que se coloca la primera inyección de GnRH del protocolo Ovsynch y el dispositivo se retira durante el tratamiento con PGF2 α . Los resultados en las tasas de preñez de vacas con o sin dispositivos varían generalmente entre el 6 al 8 % (Bó y col., 2009). Una de las razones de ésta variación es que la falta de exposición a progesterona antes de la ovulación natural o inducida por la GnRH resulta en un mayor riesgo de encontrar fases luteales cortas, en donde la luteólisis ocurre alrededor del día 10 del ciclo estral, momento en el cual el embrión no llega a mandar la señal para bloquear la cascada luteolítica, resultando en un menor número de vacas preñadas (Chebel y col., 2010). Por otro lado estudios demuestran que la utilización de progestágenos en conjunto con GnRH y PGF2 α en protocolos de IATF reduce la incidencia de ovulaciones prematuras, es decir antes de la inyección de la PGF2 α y mejora la sincronización de celo (Chebel y col., 2010).

2.8.4. Sincronización de celos con Estrógenos

El tratamiento con estrógenos en presencia de una concentración luteal de progesterona reduce tanto la concentración de FSH como la frecuencia de los pulsos de LH, resultando en regresión folicular, seguido de una nueva onda de 3 a 5 días (Alnimer, 2005). Es por esta razón que varias veces se combina progesterona más estrógenos resultando en la supresión de las ondas presentes y la emergencia

sincrónica de una nueva onda folicular (Bó y col., 1995a; Burke y col., 2000). La administración de estrógenos un día después de la luteólisis produce el pico de LH y comportamiento de celo (Alnimer 2005). A través de la estimulación de la GnRH hipotalámica, la fuente estrogénica aplicada un día después de la prostaglandina, potencia la frecuencia en los pulsos de LH produciendo el pico y la ovulación. Por ello se puede sustituir la inyección de GnRH por estrógenos en los protocolos de sincronización teniendo como ventaja un menor costo y la inducción de las características normales del celo (Stevenson y col., 2004). Se detectan menos picos de LH al utilizar estrógenos porque la GnRH es el factor inmediato para la liberación de LH desde la hipófisis, no el estrógeno (Stevenson y col., 2004). Con el estrógeno se produce el pico de LH 30 horas luego de la inyección y se produce una ovulación más dispersa que con la GnRH (Cavestany y col., 2002).

Hay varios tipos de estrógenos que pueden ser utilizados, 17 β estradiol, Benzoato de estradiol, Valerato de estradiol y Cipionato de estradiol. Cada uno tiene una estructura química diferente que lo llevará a diferencias en cuanto a la absorción y metabolismo en el organismo, de ahí que la concentración de estradiol circulante luego de una sola dosis de estrógeno depende del tipo y la dosis de estrógeno que se va utilizar (Souza y col., 2005). Se ha observado que vacas tratadas con Benzoato de estradiol alcanzan la máxima concentración sanguínea más tarde que cuando se tratan con 17 β estradiol, pero más rápido que con el Cipionato de estradiol. Asimismo el 17 β estradiol resulta en un descenso más rápido a niveles basales luego de alcanzar el pico máximo que el Benzoato de estradiol (Souza y col., 2005). También es importante tener en cuenta la producción de leche de las vacas a tratar, ya que se estudió que en vacas de alta producción cuyo metabolismo es muy alto se produce una reducción en las concentraciones de estradiol circulantes, que varias veces termina con fallas en la fertilidad (Souza y col., 2005).

2.8.4.1. Combinación de estrógenos con progesterona

La combinación de estrógenos y progestágenos tiene un poder aditivo sobre la inhibición de la FSH y LH resultando en la supresión de las ondas presentes y la emergencia sincrónica de una nueva onda folicular de 3 a 5 días después (Bó y col., 2000). Además los estrógenos al tener la capacidad de producir atresia folicular disminuyen la infertilidad en protocolos basados en progesterona causada por el crecimiento y la ovulación de folículos viejos (Burke y col., 1999). La aplicación de estrógenos junto con la inserción de un dispositivo con P4 durante de 7 días, detienen el crecimiento del folículo dominante e inducen la emergencia de una nueva onda folicular en forma sincrónica (Balla y col., 2006). Si esto es seguido de una inyección de PGF2 α al ser retirado el dispositivo y una inyección de estradiol 24 a 30 horas después de retirado el dispositivo para inducir celo y ovulación se logra mejorar la sincronización en vacas ciclando y en anestro (Day y col., 2000; Lammoglia y col., 1998).

2.8.4.2. Combinación de estrógenos, GnRH y PGF2 α

- HeatSynch

Consiste de una inyección de GnRH seguida a los 7 días por una inyección de PGF2 α y una inyección de estradiol 24 horas después e inseminación 48 horas después. Es una variación del Ovsynch en donde la segunda inyección de GnRH es suplantada por estradiol (Kasimanickam y col., 2005). Como ventajas tenemos que este protocolo tiene un costo menor y más vacas manifiestan el celo que en el Ovsynch y si bien hay una mayor variabilidad en la respuesta, las tasas de gestación son comparables con las del protocolo Ovsynch (Stevenson y col., 2004; Kasimanickam y col., 2005). Para obtener el máximo beneficio con este protocolo se

recomienda inseminar las vacas que son observadas en celo antes del tiempo para la IATF e inseminar a tiempo fijo todas las vacas que no demostraron el celo (Kasimanickam y col., 2005).

2.8.4.3. Combinación de GnRH, P4, PGF2 α y estrógenos

Al utilizar la GnRH al inicio del tratamiento evitamos la presencia de folículos persistentes que pueden aparecer cuando el tratamiento con P4 comienza después del día 13 del ciclo estral (Schmitt y col., 1996). Esto también se puede lograr suplantando la GnRH por estrógenos (Day y col., 2000) obteniendo un protocolo más económico (Stevenson y col., 2004). Pero, según Ryan y col. (1995) la administración de GnRH es más efectiva que el estradiol cuando se da al inicio de un tratamiento con P4 (Ryan y col., 1995). La P4 previene las ovulaciones espontáneas que suelen ocurrir cuando el folículo no es lo suficientemente maduro para responder a la GnRH (Murugavel, 2003). Administrar un agente luteolítico como la PGF2 α el día que finaliza el tratamiento con la P4 permite obtener buenos resultados de sincronización y una buena fertilidad, ya que como se ha desarrollado anteriormente, cuando los tratamientos con P4 comienzan al inicio del ciclo estral el cuerpo lúteo existente podría sobrevivir a la hormona exógena provocando una mala sincronización de celos (Larson y Ball, 1992). La administración de estradiol 24-30 horas luego de finalizar el tratamiento con P4 sincroniza un pico de LH aproximadamente 16 a 18 horas después y la ovulación aproximadamente 24-32 horas después del pico de LH (Colazo y col., 2007). El estradiol debería ser aplicado a las 24 horas de haber retirado el dispositivo, una vez que la P4 haya desaparecido por completo y no a las 0 horas cuando podría haber P4 circulando, provocando una nueva sincronización de la onda folicular o forzando la ovulación de un folículo todavía “no maduro” (Cesaroni y col., 2007). Aplicando el estradiol a las 0 horas, habría una mayor dispersión en el momento de la ovulación que aplicándolo a las 24 horas (Cesaroni y col., 2007). Se ha descrito que esto no solo aumenta el número de animales en estro sino que además mejora la sincronización de celos (Murugavel, 2003). Xu y col. (2000) encontraron que se mejora la tasa de preñez al administrar GnRH e insertar un DIV con P4 el día 0, retirar el dispositivo e inyectar PGF2 α el día 7, y el día 9 una inyección de estrógenos, cuando se compara con un tratamiento con dispositivo y estrógenos solamente.

2.8.5. Protocolos que acortan el período de inserción del DIV y alargan el proestro

2.8.5.1. Protocolo Co-Synch de 5 días

En los últimos años se han realizado investigaciones tendientes a aumentar la tasa de preñez que se consigue realizando el protocolo más utilizado para vacas y vaquillonas en Estados Unidos (50 %), el mismo utiliza GnRH y un DIV con P4 por 7 días. Se ha analizado el efecto de diferentes factores que podrían afectar la fertilidad. Se ha propuesto que en vaquillonas el tamaño del folículo es determinante a la hora de inducir una ovulación (Perry y col., 2005). Sin embargo, se han reportado publicaciones recientes que sugieren que la fertilidad a los tratamientos de IATF que utilizan GnRH y progestágenos pueden mejorarse si se disminuye el período de crecimiento del folículo dominante ovulatorio y se prolonga la duración del proestro (Bridges y col., 2008; Rabaglino y col., 2010; Colazo y Ambrose, 2011; Lima y col., 2013). Bridges y col. (2008) compararon un protocolo Co-Synch de 7 días con un dispositivo de progesterona con IATF a las 60 horas y un protocolo Co-Synch de 5 días con IATF a las 72 horas en vacas de razas para carne. En ese estudio, las tasas de preñez fueron 11 % mayores con el protocolo de 5 días. Resultados más recientes reportados por Whittier y col. (2013) encontraron también una tasa de preñez significativamente mayor en las vacas tratadas con el Co-Synch de 5 días que en las tratadas con el protocolo Co-Synch de 7 días.

Las tasas de preñez más altas conseguidas con el protocolo Co-Synch de 5 días se relaciona con mayores concentraciones de estradiol en el periodo preovulatorio y mayores concentraciones de progesterona en la fase luteal subsiguiente, especialmente en aquellas vacas que no ovulan después de la primera GnRH (Bridges y col., 2014). Se encontró que las vacas tratadas con el Co-Synch de 7 días que no ovularon después de la primera GnRH tuvieron una reducción marginal en el diámetro del folículo dominante ovulatorio y una reducción substancial de las concentraciones de estradiol en el período preovulatorio y de progesterona en la fase luteal subsiguiente que las que habían ovulado después de la primera GnRH. Por el contrario, en las vacas tratadas con el Co-Synch de 5 días los parámetros endocrinos y las características foliculares fueron similares entre las vacas que ovularon o no a la primera GnRH (Bridges y col., 2014). Además del efecto sobre los folículos, se propone también que una mayor concentración de estradiol durante el periodo preovulatorio y de progesterona en la fase luteal, produce una mayor expresión de receptores de progesterona en el epitelio uterino, favoreciendo la función uterina durante el periodo pre-implantacional de la preñez (Bridges y col., 2012). Sin embargo, debido a un intervalo más corto entre la primera GnRH y la inducción de la luteólisis en el protocolo de 5 días, puede ser necesario administrar dos inyecciones de PGF2 α con 6 a 24 horas de intervalo, para inducir la regresión completa del CL inducido por la GnRH (Kasimanickam y col., 2009).

Cuando los protocolos se utilizan en vacas o vaquillonas de carne y leche, se sugieren algunas variaciones. Kasimanickam y col. (2012) informaron que las vaquillonas inseminadas a las 56 horas en un protocolo Co-Synch de 5 días, tenían en promedio una tasa de preñez a la IA 10,3 % más elevada que las vaquillonas inseminadas a las 72 horas. Por el contrario, Lima y col. (2011) observaron un aumento de la tasa de preñez en vaquillonas lecheras que recibieron la GnRH final al mismo tiempo que la IA, a las 72 horas después de la remoción del dispositivo con progesterona en comparación con la administración de GnRH a las 56 horas e IATF 16 horas después. Por lo tanto, se recomienda hacer la GnRH e IATF en vaquillonas de carne a las 56-60 horas y a las vaquillonas de leche a las 72 horas de la remoción del dispositivo con progesterona.

Últimamente, se han planteados dos preguntas a resolver, la primera sería la necesidad de utilizar GnRH en el momento de la inserción del dispositivo con P4 y la segunda la necesidad de utilizar una o dos dosis de PGF2 α en el momento de la remoción del dispositivo con progesterona. Lima y col. (2013) realizaron un experimento con vaquillonas de leche y encontraron las mejores tasas de preñez cuando se administró GnRH en el día de la inserción del dispositivo con progesterona y dos inyecciones de PGF2 α , con 24 horas de intervalo en el momento de la remoción del dispositivo con P4. Kasimanickam y col. (2014) realizaron un trabajo en el que utilizaron vaquillonas de carne y leche para determinar los efectos de la GnRH en el Día 0 y una o dos PGF2 α (con 6 horas de intervalo) en el Día 5. En este trabajo las vaquillonas Angus fueron inseminadas a las 56 horas y las Holando a las 72 horas de la remoción del DIV con P4. En las vaquillonas Angus las tasas de preñez fueron mayores cuando se utilizó GnRH en el Día 0, pero no hubo influencia del número de PGF2 α en las tasas de preñez. Sin embargo, en las Holando el uso de GnRH en el Día 0 o el uso de una o dos PGF2 α no influyo en las tasas de preñez. En este trabajo las tasas de preñez en las vaquillonas Holando fueron en general inferiores a las obtenidas con los Angus y sobre todo menores a las obtenidas por Lima y col. (2013). Por lo tanto, se podría interpretar que en vaquillonas de carne es necesario usar GnRH en el Día 0 pero no hace falta utilizar dos PGF2 α en el Día 5. En las de leche todavía hay controversia si es necesario utilizar GnRH en el Día 0 y una o dos PGF2 α en el Día 5. La mayoría de los

resultados obtenidos en vacas de carne indican la necesidad de utilizar dos dosis de PGF2 α , aunque en uno de los trabajos no se encontraron diferencias en vacas tratadas con dos dosis de PGF2 α con 8 horas de intervalo o una dosis doble de PGF2 α administrada en el mismo momento (Bridges y col., 2012).

2.8.5.2. Protocolo J-Synch

Se han reportado datos de un tratamiento realizado utilizando un protocolo basado en Benzoato de Estradiol y un dispositivo con P4 pero donde la remoción del dispositivo con P4 fue realizada 6 días después (en lugar de 7 u 8 días) y se prolongó el proestro administrando GnRH como inductor de la ovulación en el momento de la IATF que fue realizada 72 horas después de la remoción del dispositivo, en lugar de hacerlo a las 48 horas (de la Matta y Bó, 2012).

En este trabajo se comparó la eficiencia en la sincronización de celos y consecuente ovulación de dos tratamientos alternativos. Se utilizaron 28 vaquillonas para carne Bos Taurus, de entre 16 y 17 meses de edad, que fueron divididas al azar en 2 grupos. El grupo 1 recibió en el Día 0; 2 mg de Benzoato de Estradiol y un DIV con 0,6 g de P4. El grupo 2 recibió en el Día 1; 10,5 μ g de GnRH y un DIV con 0,6 g de P4. Los dispositivos fueron retirados en ambos grupos en el Día 6 y todas las vaquillonas recibieron 150 μ g de D-Cloprostenol (PGF2 α). La IATF se realizó a las 72 horas desde la PGF2 α (Día 9) y en el mismo momento se aplicó 10,5 μ g de GnRH en todos los animales. Durante el transcurso de estos tratamientos, todas las vaquillonas fueron examinadas mediante ultrasonografía transrectal para observar el desarrollo folicular y la ovulación. El día promedio de inicio de la nueva onda folicular ocurrió antes en las vaquillonas tratadas con GnRH que en las tratadas con Benzoato de Estradiol. Sin embargo, la tasa ovulatoria, el diámetro del folículo ovulatorio, el intervalo desde la PGF2 α hasta la ovulación y el porcentaje de concepción no difirieron significativamente entre los grupos. Esto fue repetido en ensayos de campo con un total de 854 vaquillonas inseminadas en rodeos comerciales con este tratamiento alternativo y el promedio de preñez fue del 53,7 % resultando en datos aceptables y alentadores.

2.8.6. Hormonas utilizadas en el presente ensayo

Benzoato de Estradiol: el uso de estradiol exógeno en el control del ciclo estral tiene como objetivo desencadenar la luteólisis, cuando es aplicado en la mitad del ciclo o impedir el crecimiento de un nuevo cuerpo lúteo cuando es aplicado luego de la ovulación. Así mismo el BE al ser inyectado en el momento de la aplicación del progestágeno, provoca la atresia de los folículos existentes, suprime la onda folicular presente e induce el desarrollo de una nueva onda folicular en promedio de 3 a 4 días (Bó, 2002; Caccia y col., 1996).

D-Cloprostenol (Análogo sintético de prostaglandina: la PGF causa una rápida regresión del cuerpo lúteo funcional con una rápida declinación en la producción de progesterona. La Luteólisis es comúnmente seguida por un desarrollo de folículos ováricos y celo con una ovulación normal. En bovinos, el celo ocurre a los 2-4 días después de la luteólisis. El cuerpo lúteo inmaduro es insensible a los efectos de la PGF, en bovinos este período refractario alcanza los primeros 4-5 días después de la ovulación (Bó y col., 1996).

Acetato de buserelina (análogo sintético de GnRH: las principales acciones de la GnRH son estimular, a nivel hipofisario, la síntesis y liberación de hormonas gonadotróficas: FSH y LH. La aplicación de GnRH y sus análogos se basa principalmente en su habilidad para estimular y producir picos de LH y FSH desde la hipófisis anterior. Este pico de LH inducido ha sido usado satisfactoriamente para

inducir ovulación en animales cuyas ondas preovulatorias de LH son muy cortas (Bó, 2002).

Gonadotropina Coriónica Equina: La eCG es una glicoproteína compleja, tiene la particularidad de provocar un efecto similar tanto al de FSH como al de LH. Las bases biológicas para esta doble actividad estarían dadas por la particularidad de los receptores de FSH en mamíferos, impartiendo la capacidad de responder a la LH equina como hormona. Un estudio reciente comparó la expresión génica y proteica de los receptores de prolactina (PRLR) en cuerpos lúteos de animales tratados con 400 UI de eCG al finalizar un tratamiento de sincronización de la ovulación, mostrando una participación de la eCG en la regulación de la expresión los PRLR que contribuyen al desarrollo del CL y al aumento de la síntesis de progesterona. Esto daría sustento a la hipótesis planteada en la que una dosis de eCG al finalizar un tratamiento con progesterona y estradiol podría favorecer el desarrollo luteal, la producción de progesterona y el mantenimiento de la gestación en vacas de cría. (Bó, 2002).

Progesterona: La P4 liberada del DIV Bovino es estructuralmente idéntica a la endógena y tiene un rol importante sobre la dinámica folicular ovárica. Los niveles supraluteales (>1 ng/ml) obtenidos a los pocos minutos de la introducción del dispositivos provocan la regresión del folículo dominante y aceleran el recambio de las ondas foliculares, este cese de la secreción de productos foliculares (estrógeno e inhibina) produce el aumento de FSH que va a ser la responsable del comienzo de la emergencia de la siguiente onda folicular. Por otro lado la extracción del dispositivo provoca la caída de P4 a niveles subluteales (< 1 ng/ml) que inducen el incremento de la frecuencia de los pulsos de LH, el crecimiento y la persistencia del folículo dominante con concentraciones muy altas de Estradiol que provocan por un lado el celo y a nivel endócrino inducen finalmente el pico de LH que es seguido por la ovulación (Bó, 2002).

2.9. EVALUACIÓN SEMINAL POST DESCONGELADO

En cualquier programa de IA ya sea convencional o IATF la calidad de la dosis seminal es un punto crítico que debe estar bajo control de fertilidad y sanitario, para evitar fracasos (Elhordoy y Farías, 2003).

Según González (2004), aproximadamente el 85 % de los espermatozoides bovinos presente en una muestra seminal sufre algún tipo de daño durante la congelación o en el procedimiento de descongelado.

Actualmente no existe ninguna normativa en la legislación en lo que respecta a valores de referencia y técnicas empleadas para el análisis de las muestras que son destinadas al comercio interno, a pesar de su importancia (Curbelo y Rodríguez, 2013). Quien regula los centros de toros registrados y habilitados para la congelación de semen destinada a la exportación es el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) a través de la Sección de Reproducción de la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) (Norma MERCOSUR de valores seminales).

Normalmente los laboratorios con el objetivo de estimar el potencial de fertilidad de una muestra de semen realizan determinadas pruebas:

- Motilidad espermática (%)
- Vigor (0-5)
- Acrosomía y Morfología (%)

- Concentración espermática (millones/ml)
- Prueba de termorresistencia (lenta o rápida)
- Estabilidad e integridad de Membrana

Lo que se busca es evaluar si el semen fue capaz de superar el proceso de congelación y de descongelación.

2.9.1. Pruebas microscópicas

2.9.1.1. Motilidad espermática

La estimación visual del porcentaje de espermatozoides móviles en una muestra de semen es el análisis más comúnmente hecho de rutina. Su importancia es debida al peso que tiene esta característica sobre la fertilidad (Graham y Mocé, 2005).

La motilidad es una manifestación de viabilidad espermática y de integridad celular. Un eyaculado con un porcentaje bajo de espermatozoides móviles (astenozoospermia), o ausencia de motilidad, debería ser automáticamente descartado para su conservación (Roberts, 1979; Den Daas, 1992; Holt y Van Look, 2004)

Para que un espermatozoide sea capaz de fecundar a un ovocito ha de reunir una serie de requisitos, entre ellos, tener motilidad progresiva. Dicho parámetro ha sido y sigue siendo el más utilizado para valorar la calidad de un eyaculado o de una dosis seminal.

Cuando se diluye el eyaculado o se descongelan dosis de semen congelado, se debe estimar el porcentaje de espermatozoides individuales que están en movimiento y el tipo de movimiento que realizan (progresivos o no progresivos)

La valoración visual de la motilidad espermática es el método más simple, rápido y barato. Sin embargo, es altamente subjetivo, puesto que los resultados obtenidos dependen en gran parte de la habilidad y experiencia del técnico que evalúa la muestra (Rodríguez- Martínez, 2000; Phillips y col., 2004a), y además, si se trabaja con muestras muy concentradas se tiende a sobrestimar el porcentaje de espermatozoides móviles. Por tanto, no es un método que, de forma fiable y repetible, permita predecir la capacidad fecundante de una muestra de semen (Saacke y White, 1972; Linford y col., 1976).

Cuadro II. Escala basada en el porcentaje de células móviles (Dpto. Teriogenología, 2000)

PORCENTAJE DE MOTILIDAD INDIVIDUAL	
5/5	80 y 100 % de spz con movimiento rectilíneo uniforme
4/5	60 y 80 % de spz con movimiento rectilíneo uniforme
3/5	40 y 60 % de spz con movimiento rectilíneo uniforme
2/5	20 y 40 % de spz con movimiento rectilíneo uniforme
1/5	20 % o menos de spz con movimiento rectilíneo uniforme

2.9.1.2. Vigor

La velocidad de movimiento de los espermatozoides, denominado vigor, es la velocidad con que éstos atraviesan el campo. Esta puede ser evaluada al mismo

tiempo que se hace la motilidad individual, y se clasifica bajo la siguiente escala (Cuadro III):

Cuadro III. Escala del vigor del movimiento ondulado de los espermatozoides (Ax y col., 2000)

GRADO	NIVEL DE MOVIMIENTO
5	Movimiento progresivo muy rápido, cel. difícil de seguir visualmente
4	Movimiento progresivo rápido
3	Movimiento progresivo continuo a velocidad lenta
2	Lento movimiento de cola con algo de movimiento progresivo
1	Leve movimiento de cola sin desplazamiento progresivo
0	Sin movimiento

Existen análisis por sistemas de computación que miden objetivamente % de motilidad progresiva, vigor, concentración espermática y el número de spz/mm³.

2.9.1.3. Acrosomía y Morfología

El estudio de la morfología espermática es muy importante a los fines de establecer porcentajes de espermatozoides normales y poder clasificar las anomalías.

El acrosoma es un lisosoma esencial para la función de la célula espermática, que cubre las dos terceras partes de la porción anterior de la cabeza espermática. Las enzimas contenidas en el acrosoma permiten que el espermatozoide capacitado penetre el óvulo. Por lo tanto un alto porcentaje de células que tienen acrosoma intacto y por ende ser capaces de realizar la reacción acrosómica, es considerado como una característica seminal importante (Sullivan, 1978; Den Daas, 1992; Ax y col., 2000).

Las técnicas utilizadas son de frotis secos o húmedos de un solo paso como la tinción con Rosa Bengala donde todos los espermatozoides se ven rosas sobre un fondo limpio, mientras que con Tinta China el fondo es oscuro y los espermatozoides permanecen sin teñirse y aparecen blancos (Dpto. de Teriogenología, 1998).

2.9.1.4. Concentración

La determinación exacta del número de espermatozoides y el volumen del eyaculado define el número de hembras que pueden ser inseminadas. La concentración del eyaculado es de 2×10^8 espermatozoides/ml en toros jóvenes, a $1,8 \times 10^9$ espermatozoides/ml en los maduros (Ax y col., 2000).

Las técnicas utilizadas para medir la concentración espermática son:

- Método de la Cámara Cuentaglobulos (espermaticómetro) (Elliot, 1978; Ax y col., 2000)
- Opacimetría (Turbimetría) (Arruda, 2000; Verstegen y col., 2002).
- Método de análisis de semen asistido con computadora (CASA) (Irvine, 1995; Krause, 1995; Mortimer, 2000; Verstegen y col., 2002).
- Coloración post vital (Januskauskas y Zilinskas, 2002).

2.9.1.5. Test de Termorresistencia

La prueba de termorresistencia (o incubación) es la más comúnmente utilizada para determinar la vitalidad del semen luego de descongelado (Curbelo y Rodríguez, 2013). Existe una prueba rápida y una lenta, la más utilizada hoy en día es la rápida celo (Dimitropoulos citado por Arruda y col., 1992).

La prueba rápida consiste en colocar la muestra a baño maría a 35 °C, durante media hora. Las pruebas de termorresistencia adquirieron gran aceptación ya que permiten mayor seguridad que las anteriormente utilizadas, una vez que el semen es sometido a condiciones semejantes a las que se expone en el tracto genital femenino de la hembra en celo (Dimitropoulos citado por Arruda y col., 1992).

2.9.1.6. Estabilidad e Integridad de Membrana

La membrana plasmática del espermatozoide es el principal sitio de lesión que ocurren durante la congelación y descongelación de semen (Hammerstedt y col., 1990; Krogenaes y col., 1994). La membrana intacta y un funcionamiento activo es esencial para que el espermatozoide pueda mantener el metabolismo, someterse a la capacitación y reacción acrosómica y además, para unir y penetrar en el ovocito a través de la zona pelúcida (Jeyendran y col., 1984; Burks y Sailing, 1992).

La integridad de membrana puede ser evaluada de las siguientes maneras:

- Test de resistencia osmótica (ORT) o el test de valoración de la funcionalidad acrosomal (Correa y Zavos, 1994; Gil y col., 2000; Pérez-Llano y col., 2001)
- Test de Endosmosis o también llamado HOST (Hypo Osmotic Swelling Test) (Vera, 2003; Rota y col., 2000)
- Estudio de la viabilidad espermática (Garner y col., 1997).

2.9.1.7. Microbiología del semen

La inseminación artificial es una técnica de mucho valor para prevenir enfermedades venéreas. Sin embargo, una gran cantidad de gérmenes patógenos se pueden transmitir por medio del semen. Hay algunas enfermedades propias del toro de las cuales debe ser libre para evitar transmisión y otras que surgen del proceso de congelación.

Los microorganismos patógenos específicos que el toro puede transmitir con el semen son los siguientes: Aftosa, Mycobacterium bovis, Mycobacterium paratuberculosis, Brucella abortus, Trichomonas fetus, Campylobacter fetus venereal, Leptospira sp.

Otros patógenos que son difíciles de controlar dado que se encuentran en la población de vacunos son: Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR), Diarrea Viral Bovina (BVD) Y Parainfluenza Bovina Tipo 3 (PI3).

Algunos gérmenes patógenos que pueden contaminar durante el proceso de congelación del semen son: Pseudomonas aeruginosa, Corynebacterium pyogenes, Estafilococos y Estreptococos, Escherichia coli, Hongos y Levaduras. Esto se puede evitar con higiene durante la colección y el procesado.

Si uno sospecha de las condiciones de higiene del laboratorio de donde proviene la muestra de semen, se puede proceder al aislamiento de bacterias y virus presentes en el semen. Es una tarea normalmente pasada por alto pero que no deja de ser de suma importancia.

La calidad bacteriológica del semen es testigo indirecto de la calidad higiénica del Centro de Inseminación Artificial y se mide en cantidades de unidades formadoras de colonias (UFC).

Un buen semen debería tener menos de 500 UFC por ml (Bó y col., 2007).

2.9.2. Parámetros de aceptabilidad

Para que una muestra post descongelado pueda ser considerada como de “Calidad Aceptable” y poder ser utilizado para IA, debería cumplir con los siguientes requisitos especificados en el Cuadro IV:

Cuadro IV. Parámetros de aceptabilidad para evaluación de semen post descongelado (Derivaux, 1976; Morrow, 1986; Bonadonna, 1989; Barth y Oko, 1989; Ax y col., 2000; Elhordoy y Farías, 2003)

PRUEBAS	VALORES DE REFERENCIA
Motilidad individual	<ul style="list-style-type: none"> • 0hs > 30% de spz móviles (Según ISO 9002 > o = 25%) • 2hs > 20% de spz móviles (Según ISO 9002 > o = 15%)
Vigor (0-5)	<ul style="list-style-type: none"> • 0hr > o = 3 • 2hs > o = 2
Acrosomía	<ul style="list-style-type: none"> • 0hr > 60% acrosomas intactos • 2hs > 40% acrosomas intactos
HOST	> 40% de spz reaccionantes
Morfología y acrosomía*	
Defectos cabeza	< 5-15%
Defectos acrosoma y cola	< 20%
Anormalidades totales	< 25%
Concentración (spz/pajuela)	> 10 millones (muy variable)
Termorresistencia (2hs)	> 50%

(*) El valor asignado para Malformaciones totales por la Facultad de Veterinaria de Uruguay basándose en la escuela sueca es de 20 % como máximo Aceptable (Elhordoy, D. Comunicación personal).

3. HIPÓTESIS

El protocolo J-Synch nos conviene porque es más económico y equipara resultados reproductivos con el protocolo 5-d Co-Synch + DIV.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar dos protocolos de sincronización e inseminación a tiempo fijo en vaquillonas.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar la respuesta de dos protocolos de sincronización e inseminación artificial a tiempo fijo según porcentaje de preñez a los 45 días en vaquillonas cruce Hereford por Limousin.
- Calificar la inseminación propiamente dicha de cada animal en una escala del 1 al 10 según el tiempo y alguna dificultad y determinar si existe alguna relación con el porcentaje de preñez.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un ensayo que consistió en comparar 2 protocolos de sincronización de celos con IATF (5-d CO-SYNCH + DIV y J-SYNCH). El trabajo se realizó en un establecimiento ubicado en la décima seccional policial del departamento de Cerro Largo, Uruguay.

El trabajo siguió un esquema que involucró los siguientes componentes:

a) **Predio:** se realizó en el establecimiento llamado “La Pelada”, propiedad de Sr. Godiño, el cual contaba con antecedentes de control de enfermedades reproductivas y con manejos sanitarios supervisados por profesionales veterinarios al momento de realizar los programas de inseminación artificial. El sistema pastoril del mismo se caracteriza por ser extensivo sobre campo natural, se realiza suplementación con sales orgánicas (Tortuga ®) a las vaquillonas previo al servicio.

b) **Vaquillonas:** se utilizaron 12 vaquillonas de 2 años a las cuales se les realizó en forma individual un examen ginecológico pre servicio por palpación rectal según el Score Reproductivo de Andersen (Andersen y col., 1991) para determinar presencia de cuerpo lúteo y / o folículos mayores a 10 mm, y descartar los animales preñados, no cíclicos o en anestro. Se utilizaron animales que estuvieran ciclando. Estas fueron divididas en dos grupos, ambos compuestos por 6 vaquillonas, inseminadas con semen de un toro raza Hereford.

c) **Raza y estado corporal:** todas las hembras sin excepción se clasificaron por peso (280,0 Kg \pm 20,0) y su condición corporal fue evaluada en una escala de 1 a 8 siendo aceptadas aquellas que tuvieran 3 o más de la escala corporal, siendo estas de la raza Hereford por Limousin.

d) **Semen:** se utilizó el mismo semen para los 2 grupos; de toro raza Hereford, con garantía sanitaria y de fertilidad brindado por el banco de semen habilitado oficialmente (Gensur).

e) **Hormonas:** las hormonas utilizadas fueron:

- Benzoato de estradiol, laboratorio CODENOR, 2 mg i/m (Benzoato de Estradiol ®)
- D-Cloprostenol, laboratorio CODENOR, 150 μ g i/m (Ciclar ®)
- Acetato de buserelina, laboratorio CODENOR, 8 μ g i/m (Progerelin ®)
- Gonadotrofina Coriónica Equina, laboratorio FATRO, 1,7 ml i/m (Dalmagon ®)
- Dispositivo intravaginal de Progesterona (4-pregnano-3.20-diona) 750 mg, laboratorio CODENOR (Pro-Ciclar P4 ®)

Cuadro V. Descripción de hormonas y materiales utilizados para la IATF

	LABORATORIO	PRECIO (U\$S)	PRECIO DOSIS*	PRESENTACIÓN
Benzoato de Estradiol	CODENOR	16	0,32	100 ml
Dispositivo IV	CODENOR	42	4,2	10 unid.
D-Cloprostenol	CODENOR	12	1,2	20 ml
Ecg	FATRO	32	2,17	25 ml
Acetato de buserelina	CODENOR	27	1,08	50 ml
Vainas		6	0,12	50 unid.
Guantes		16	0,16	100 unid.

*=Teniendo en cuenta la dosis utilizada en este trabajo.

f) Inseminación:

- El técnico inseminador fue la misma persona con el fin de llevar al mínimo el error experimental. Se realizaron dos grupos de animales, grupo 1 (6 vaquillonas con protocolo J-SYNCH), grupo 2 (6 vaquillonas con protocolo 5-d CO-SYNCH + DIV). Se sincronizaron el total de animales de manera de hacer coincidir el momento de la inseminación de ambos protocolos. El semen fue descongelado en agua a una temperatura entre 35 y 36 °C durante 40 segundos.

- La técnica aplicada en la inseminación se evaluó considerando los siguientes indicadores: tiempo de deposición y grado de dificultad. Se realizó una planilla (Cuadro VI) con el fin de calificar la inseminación propiamente dicha de cada animal en una escala del 1 al 10 según el tiempo y alguna dificultad (Ocáriz A, comunicación personal).

g) Descripción de protocolos

- Grupo 1: protocolo J-SYNCH (n=6) (según de la Matta y Bó, 2012)

El mismo se llevó a cabo de la siguiente manera (Figura 1):

Día 0: a las 7:00 horas administración de 2 mg de BE y colocación de DIV de P4.

Día 6: a las 7:00 horas retiro del DIV y administración de 150 µg (una dosis) de un análogo sintético de prostaglandina F_{2α} (D-cloprostenol). Administración de 340 UI de eCG debido a su condición corporal. Experimentos realizados en Brasil en los cuales se administró eCG al momento del retiro del DIV a vaquillonas con baja condición corporal, han demostrado un aumento en la tasa de preñez en comparación con aquellas a las cuales no se les administro eCG (Souza y col., 2009).

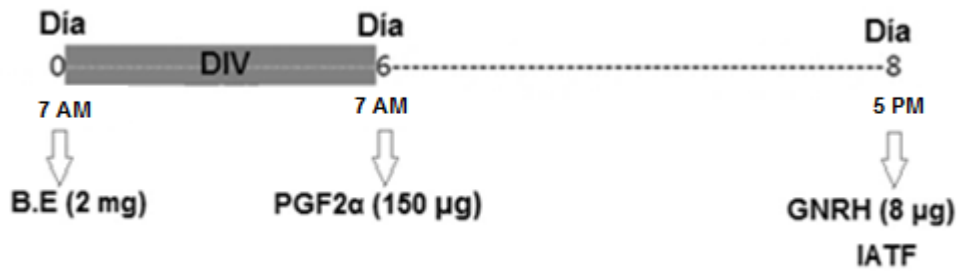


Figura 6. Esquema del protocolo J-SYNCH utilizado en el grupo 1

Día 8: a las 17:00 horas luego de haber transcurrido 60 horas a partir del día 6, se administraron 8 µg de Acetato de buserelina (análogo sintético de GnRH) y se realizó la inseminación artificial a tiempo fijo.

- Grupo 2: protocolo 5-d CO-SYNCH + DIV (n=6) (según Kasimanickam y col., 2012)

El mismo se llevó a cabo de la siguiente manera (Figura 2):

Día 0: a las 7:00 horas administración de 8 µg de GnRH y colocación de DIV de P4.

Día 5: a las 7:00 horas retiro del DIV y administración de dos dosis simultáneas (150 µg cada una) de PGF. Administración de 340 UI de eCG.

Día 7: a las 17:00 horas luego de haber transcurrido 60 horas a partir del día 5, se administraron 8 µg de GnRH y se realizó la IATF.

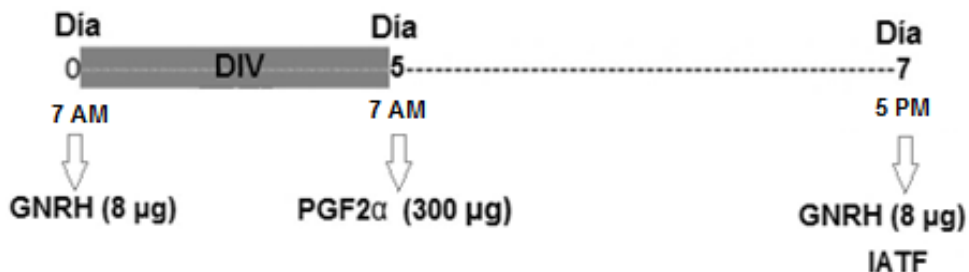


Figura 7. Esquema del protocolo 5-d CO-SYNCH + DIV utilizado en el grupo 2

- h) **Diagnóstico de gestación:** la técnica utilizada para el diagnóstico de gestación fue palpación rectal a los 45 días de realizada la IATF.
- i) **Análisis económico:** Las alternativas fueron evaluadas mediante un análisis de presupuestación parcial (costo-beneficio) (Alvarez y Falcao, 2009).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos en el ensayo.

6.1. PREÑEZ A LOS 45 DÍAS SEGÚN PROTOCOLO J-SYNCH

Se puede observar según el Cuadro VIII que de las 6 vaquillonas inseminadas del Grupo 1; al diagnóstico de gestación 2 estaban vacías y 4 preñadas.

Cuadro VI. Resultados del protocolo J-Synch (Grupo 1)

Nº	CATEGORÍA	SRA	SEMEN	RESULTADO
3634	Vaquillona 2 años	2	HEREFORD	FALLADA
1345	Vaquillona 2 años	2	HEREFORD	PREÑADA
3306	Vaquillona 2 años	2	HEREFORD	PREÑADA
3313	Vaquillona 2 años	3	HEREFORD	PREÑADA
9865	Vaquillona 2 años	3	HEREFORD	FALLADA
3629	Vaquillona 2 años	3	HEREFORD	PREÑADA

6.2. PREÑEZ A LOS 45 DÍAS SEGÚN PROTOCOLO 5-D CO-SYNCH + DIV

Se puede observar según el Cuadro IX que de las 6 vaquillonas inseminadas del Grupo 2; al diagnóstico de gestación, 2 estaban vacías y 4 preñadas.

Cuadro VII. Resultados del protocolo 5-d Co-synch + DIV (Grupo 2)

Nº	CATEGORÍA	SRA	SEMEN	RESULTADO
6741	Vaquillona 2 años	3	HEREFORD	PREÑADA
3309	Vaquillona 2 años	3	HEREFORD	PREÑADA
3310	Vaquillona 2 años	3	HEREFORD	PREÑADA
3308	Vaquillona 2 años	3	HEREFORD	FALLADA
4948	Vaquillona 2 años	3	HEREFORD	PREÑADA
4944	Vaquillona 2 años	3	HEREFORD	FALLADA

El porcentaje de preñez en este caso ($(vacaspreñadas)/(vacasentoradas) \times 100$), fue de 66,6 % para ambos protocolos; es igual a las tasas de preñez alcanzadas en programas de IATF en predios comerciales de Uruguay (de Nava, 2015) y a su vez en comparación con los resultados obtenidos por de la Matta y Bó (2012) cuando compararon estos mismos protocolos entre sí.

En referencia a los cuadros VI y VII, observamos que la técnica de IA y su escala no indican relación alguna entre la calificación del tiempo y la dificultad y el resultado de preñez obtenido.

6.3. COSTOS POR VIENTRE INSEMINADO

Cuadro VIII. Costos protocolo J-Synch

ITEM	PRECIO x DOSIS (USD)	CANTIDAD DOSIS
Benzoato de Estradiol	0,32	1
Dispositivo IV	4,2	1
D-Cloprostenol	1,2	1
Acetato de buserelina	1,08	1
eCG	2,17	1
Vainas	0,12	
Guantes	0,16	
Semen	6	
Honorarios	10	
COSTO / VIENTRE INSEMINADO	25,25	

Cuadro IX. Costos protocolo 5-d Co-Synch + DIV

ITEM	PRECIO x DOSIS (USD)	CANTIDAD DOSIS
Dispositivo IV	4,2	1
D-Cloprostenol	2,4	2
Acetato de buserelina	2,16	2
eCG	2,17	1
Vainas	0,12	
Guantes	0,16	
Semen	6	
Honorarios	10	
COSTO / VIENTRE INSEMINADO	27,21	

6.4. ANÁLISIS ECONÓMICO

Las alternativas fueron evaluadas mediante un análisis de presupuestación parcial (costo-beneficio), que significa buscar el retorno económico por la inversión ejecutada en esta tecnología. La justificación teórica para utilizar este método es que los cambios a evaluar no afectan la estructura global de la empresa. Justamente, el presupuesto parcial consiste en analizar solamente aquellos cambios de costos e ingresos que son afectados por la decisión a tomar. La aplicación más eficaz de esta

herramienta se da cuando las dos situaciones son muy similares, tanto en términos del uso de los recursos como en la interacción con respecto a los otros componentes del predio (Alvarez y Falcao, 2009).

6.4.1. Presupuesto parcial de Protocolo J-SYNCH versus 5-d CO-SYNCH + DIV

Para plantear este presupuesto parcial, se identificaron las ventajas y desventajas de la decisión, ambas se expresan en unidades monetarias y se suman para conocer el monto total. Luego se comparan las ventajas y desventajas expresadas por sus respectivos totales para analizar si conviene o no el cambio.

Si las ventajas son mayores nos conviene el Protocolo J-SYNCH, de lo contrario nos conviene el 5-d CO-SYNCH, si el resultado es 0 la decisión es neutra y se puede hacer tanto uno como el otro, tomando en cuenta otros factores quizás cualitativos o subjetivos para la decisión.

Cuadro X. Representación de presupuesto parcial de Protocolo J-SYNCH versus Protocolo 5-d CO-SYNCH + DIV (Alvarez y Falcao, 2009).

VENTAJAS J-SYNCH	DESVENTAJAS J-SYNCH
<ul style="list-style-type: none"> • AUMENTO DE INGRESOS: PRODUCTO BRUTO J-SYNCH • DISMINUCIÓN DE COSTOS: COSTOS 5-d CO-SYNCH + DIV 	<ul style="list-style-type: none"> • AUMENTO DE COSTOS: COSTOS J-SYNCH • DISMINUCIÓN DE INGRESOS: PRODUCTO BRUTO 5-d CO-SYNCH + DIV
TOTAL VENTAJAS	TOTAL DESVENTAJAS

En este caso, el Producto Bruto es la diferencia en el Porcentaje de Preñez y su posterior Porcentaje de Partición. Debido a que este estudio de caso finaliza al Diagnóstico de Gestación, y sus Porcentajes de Preñez fueron iguales; el Producto Bruto de ambos protocolos es igual, por lo tanto se anulan. De esta manera, la diferencia entre los totales de ventajas y desventajas está dada por los costos de cada protocolo.

Cuadro XI. Presupuesto parcial de Protocolo J-SYNCH versus Protocolo 5-d CO-SYNCH + DIV

VENTAJAS J-SYNCH		DESVENTAJAS J-SYNCH	
• COSTOS 5-d CO-SYNCH + DIV		• COSTOS J-SYNCH	
HORMONAS	10,93	HORMONAS	8,97
OTROS	0,28	OTROS	0,28
SEMEN	6	SEMEN	6
HONORARIOS	10	HONORARIOS	10
TOTAL VENTAJAS	27,21	TOTAL DESVENTAJAS	25,25
RESULTANTE= + 1,96 U\$S			

La resultante es positiva, por lo tanto conviene hacer el protocolo J-SYNCH en vez del 5-d CO-SYNCH.

7. CONCLUSIONES

1) De acuerdo al pequeño número de animales utilizados en este ensayo, los resultados de preñez no difieren de los obtenidos por otros investigadores para ambos protocolos; para poder afirmar esto con certeza se debería de repetir el trabajo con un número de animales mayor.

2) El análisis de costo beneficio indica que convendría hacer el protocolo J-Synch en vez del 5-d Co-Synch + DIV debido a que la resultante es positiva; teniendo en cuenta que estos pudieron ser comparados únicamente por sus costos debido a que sus Productos Brutos eran iguales.

3) La evaluación de la técnica de inseminación aplicada y su escala no indican relación alguna entre la calificación del tiempo y la dificultad con el resultado de preñez obtenido para este pequeño número de animales; tal vez esta misma escala utilizada en un número mayor de animales demuestre alguna relación.

- **RECOMENDACIONES:**

Los programas de IATF son una muy buena herramienta para realizar inseminación evitándonos la detección de celos. Si bien son protocolos simples deben realizarse con responsabilidad. No debemos descuidar ninguna etapa de la tecnología que estamos ejecutando, cualquier eslabón sin controlar nos lleva a malos resultados.

El contar con semen de reconocida calidad biológica y sanitaria y con el respaldo de un profesional; es elemental para evitar pérdidas económicas y productivas innecesarias.

“La inseminación artificial es una herramienta efectiva muy importante y muy útil, pero debemos tener bien en claro que por sí sola no funciona, debe estar acompañada del correcto manejo profesional, alimenticio y sanitario del rodeo.”

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmed W (2007). Overview on some factors negatively affecting ovarian activity in large farm animals. *Global Veterinaria*, 1:53-66.
2. Alnimer M (2005). Comparison of an oestrus synchronization protocol with oestradiol benzoate and PGF2alfa and insemination at detected oestrus to a timed insemination protocol (Ovsynch) on reproductive performance of lactating dairy cows. *Reproduction Nutrition Development*, 45:699-708.
3. Alvarez J, Falcao O (2009). Manual de gestión de empresas agropecuarias. Montevideo, Ed. Universidad de la República-Facultad de Agronomía, 180 p.
4. Anderson K, Le Fever D, Brinks J, Odde K (1991). The use of reproductive tract scoring in beef heifers. *Agri-Practice*, 12:19-26.
5. Arregui R, Haendel M, Lucchesini S (2008). Evaluación de diferentes protocolos de sincronización de celo en vaquillonas y vacas Holando en condiciones pastoriles. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria UDELAR, 44 p.
6. Arruda, R, Barnabe V, Alencar M, Barnabe R (1992). Avaliação de sêmen congelado de bovinos. Provas lenta e rápida de termoresistência: efeitos sobre a fertilidade. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 29(1):131- 137.
7. Arruda R (2000). Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotectores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescencia, citometria de fluxo, análises computarizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). (Livre docencia), Tese. Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia, Universidade de Sao Pablo, 121 p.
8. Arthur G, Noakes D, Pearson H (1991). Reproducción y Obstetricia en Veterinaria. 6ª ed. Interamericana McGraw-Hill. 702 p.
9. Ax R, Dally M, Didion B, Lenz R, Love C, Varner D, Hafez B, Bellin M (2000). Evaluación del semen. En: Hafez E, Hafez B. Reproducción e inseminación artificial en animales, 7ªed. Mexico, McGraw-Hill Interamericana, pp 375-386.
10. Baird D (1978). Local utero-ovarian relationships. En: Crighton D, Haynes N, Foxcroft G, Lamming G (Eds.) Control of ovulation. London. Butterworths, pp 217-233.
11. Ball P, Cowpe J (1987). Oestrus detection in dairy cattle. *In Practice*. 9:223.
12. Balla E, Filippi L, Maraña D, Peña D, Pincinato D, Peres L, Cutaia L, Veneranda G, Martínez M, Bó G (2006). Efecto de diferentes protocolos de sincronización de la ovulación con dispositivos intravaginales con progesterona sobre el desarrollo folicular y las tasas de preñez de vacas en lactancia. Jornadas de actualización en biotecnologías de la reproducción en bovinos. IRAC. Disponible en: www.geraembryo.com.br. Fecha de consulta: 1/03/17.

13. Barrera L, Hernández L, Yovany G (2011). Ensayo de Reproducción animal bovino. Disponible en: <http://www.monografias.com>. Fecha de consulta: 03/02/17
14. Becaluba F (2006). Métodos de sincronización de celos en Bovinos. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar. Fecha de consulta: 23/02/17.
15. Bicalho R, Cheong S, Warnick L, Guard C (2007). Evaluation of Progesterone Supplementation in a ProstaglandinF2alpha Based Presynchronisation Protocol Before Timed Insemination. *Journal of Dairy Science*, 90:1193-1200.
16. Bicudo S, Azevedo H, Maia S, Green R, Rodello L, Meira C (2007). Avanços na criopreservação do semen ovino visando sua aplicação em programas de inseminação artificial e em biotecnologias com embriões. *Acta Scientiae Veterinariae*, 35(3):787-798.
17. Blanc E, Moraes J, Ferraris A (1994). Respuesta a la sincronización de celos con un análogo sintético de la prostaglandina F2 alfa (Delprostenate) en vacas en ordeño. XXII Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay, c.c 2.1-c.c 2.5 .
18. Bó G, Martínez M, Nasser L, Caccia M, Tribulo H, Mapletoft R (1993) Follicular dynamics in *Bos-indicus* and *Bos-taurus* beef cattle under pasture conditions in Argentina. *Congresso Brasileiro de Reproducao Animal*, Belo Horizonte, Brasil, 2:221.
19. Bó G, Adams G, Pierson R, Mapletoft R (1995a). Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*, 43:31-40.
20. Bó G, Adams G, Caccia M, Martinez M, Pierson R, Mapletoft R (1995b). Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science*, 39(3):193-204.
21. Bó, G, Adams G, Pierson R, Tribulo H, Caccia M, Mapletoft R (1995c). Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology*, 41(8):1555-1569.
22. Bó G, Caccia M, Martínez M, Mapletoft R (1996). Follicle wave emergence after treatment with estradiol benzoate and CIDR-B vaginal devices in beef cattle. *Proceedings of the 13th Int. Animal Reproduction*, Sydney, Australia, pp 7-22.
23. Bo G, Adams G, Caccia M, Martinez M, Colazo M, Mapletoft R (1998). Actualización del control del ciclo estral bovino. *Jornadas CABIA. IV*, Buenos Aires, Argentina, pp 13-24.
24. Bó G, Bergfelt D, Brogliatti G, Pierson R, Dams G, Mapletoft R (2000). Local versus systemic effects of exogenous estradiol 17-beta on ovarian follicular dynamics in heifers with progesten implants. *Animal Reproduction Science*, 59:141-157.
25. Bó G (2002). Reporte Interno Syntex S.A. Facultad de Cs. Veterinarias, UNCPBA. Disponible en: <http://www.unicen.edu.ar/content/publicaciones-acad%C3%A9micas>. Fecha de consulta: 01/03/17

26. Bó G, Cutaia L, Moreno D, Tríbulo H (2007) Sincronización de Celos e Inseminación Artificial. Córdoba. IRAC, 185 p.
27. Bó G (2009). Tratamientos de sincronización de la ovulación utilizando GnRH o LH. En: Bó G, Tríbulo H, Tríbulo R, Barth A, Brogliatti G. Especialidad en Reproducción Bovina. Córdoba, IRAC, pp 69-107.
28. Bó G, Caccia C (2009). Principios fundamentales de endocrinología y mecanismos de acción de las hormonas. En: Bó G, Tríbulo H, Tríbulo R, Barth A, Brogliatti G. Especialidad en Reproducción Bovina. Córdoba, IRAC, pp 1-31.
29. Bó G, Cutaia L, Souza A, Baruselli E (2009). Actualización sobre protocolos de IATF en bovinos de leche utilizando dispositivos con progesterona. Disponible en: www.producción-animal.com.ar. Fecha de consulta: 1/03/17.
30. Bolaños J, Forsberg M, Kindahl H, Rodríguez Martínez H (1998). Biostimulatory effects of estrous cows and Bulls on resumption of ovarian activity in postpartum anestrous zebu (*Bos Indicus*) cows in the humid tropics. *Theriogenology*, 49:629-634.
31. Bonadonna T (1989). Reproducción animal e inseminación artificial. 2ª ed. Buenos Aires. Hemisferio Sur, 2v.
32. Braden T, Gamboni F, Niswender G (1988). Effects of prostaglandin F-induced luteólisis on the populations of cells in the ovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*, 39:245
33. Bridges G, Helser L, Grum D, Mussard M, Gasser C, Day M (2008). Decreasing the interval between GnRH and PGF2alfa from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology*, 69:843-851.
34. Bridges G, Mussard M, Hesler L, Day M (2009). Comparison of follicular dynamics and hormone concentrations between the 7 and 5 d CO-Synch + CIDR program in two-year-old beef cows. *Journal of Animal Science*, 87(E-Suppl.):464.
35. Bridges G, Mussard M, Burke C, Day M (2010). Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. *Animal Reproduction Science*, 117(3-4):208-215.
36. Bridges G, Ahola J, Brauner C, Cruppe L, Currin J, Day M, Gunn P, Jaeger J, Lake S, Lamb G, Marquezini G, Peel R, Radunz A, Stevenson J, Whittier W (2012). Determination of the appropriate delivery of prostaglandin F2alpha in the five-day Co-Synch + controlled intravaginal drug release protocol in suckled beef cows. *Journal of Animal Science*, 90:4814-4822.
37. Bridges G, Mussard M, Hesler L, Day M (2014). Comparison of follicular dynamics and hormone concentrations between the 7-day and 5-day CO-Synch + CIDR program in primiparous beef cows. *Theriogenology*, 81:632-638.
38. Britt J, Scott R, Armstrong J, Whitacre M (1986). Determinants of estrous behavior in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 69: 2195-2202.

39. Burke C, Boland M, McMillan K (1999). Ovarian responses to progesterone oestradiol benzoate administered intravaginally during diestrus in cattle. *Animal Reproduction Science*, 55:23-33.
40. Burke C, Day M, Bunt C, McMillan K (2000). Use of a small dose of estradiol benzoate during diestrus to synchronize development of the ovulatory follicle in cattle. *Journal of Animal Science*, 78:145-151.
41. Burks D, Sailing P (1992). Molecular mechanisms of fertilization and activation of development. *Animal Reproduction Science*, 28:79-86.
42. Caccia M, Bó G (1998). Follicle wave emergence following treatment of CIDR-B implanted beef cows with estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology*, 49(1): 341.
43. Callejas S (1996). Fisiología del ciclo estral bovino. *Revista Cabia*. (Buenos Aires), 29:10-24.
44. Callejas S (2004). Control farmacológico del ciclo estral bovino: bases fisiológicas, protocolos y resultados. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar. Fecha de consulta: 25/02/17.
45. Callejas S, Cabodevila J (2007). Diferentes horarios de IATF con la utilización de DIV 05 gramos en Vaquillonas Angus. VII Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina, 229 p.
46. Catena M, Cabodevila J (1999). Evaluación de semen bovino congelado. *Taurus*, 1(3):18-31.
47. Cavestany D, Méndez J (1993). El celo y su detección. *Manual de inseminación artificial en bovinos*. INIA, 39:27-37.
48. Cavestany D (1994). *Procesamiento y Congelación de Semen de Toro*. Montevideo. Santa Catalina, 23 p.
49. Cavestany D (2000). Sincronización de celos en vacas Holando en producción con una esponja intravaginal impregnada con acetato de medroxiprogesterona (MAP). INIA Serie Técnica N° 116, p. 53-54.
50. Cavestany D (2002). Sincronización y/o inducción de celos con o sin inseminación artificial a tiempo fijo en rodeos de Uruguay. XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay, pp 143-163.
51. Cavestany D, Meikle A, Hermann J, Forsberg M (2002). Substitution of GnRH by Estradiol Benzoate (EB) in an Estrus Synchronization Protocol in Dairy cows: Ovarian and Endocrine Response. Annual Meeting of the SFT and ACT. Colorado, USA. Disponible en: <http://www.worldcat.org/title/2002-annual-conference-sftact-proceedings-august-7-11-2002-coloradospringscolorado/oclc/51213225?ht=edition&referer=di>. Fecha de consulta: 25/02/17.
52. Cavestany D (2005). Manejo Reproductivo en vacas de leche. Producir o no producir. *Revista INIA*, 4:2-5.

53. Cavestany D, Blanc E, Ferraris A, Fernández M, Pérez M, Sánchez A (2007). Determinación de la duración, intensidad y conducta de celo en vacas en ordeño y vaquillonas Holando sincronizadas con prostaglandina F2alfa. XXXV Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay, pp 308-310.
54. Cesaroni G, Butler H, Durand M (2007). Evaluación del uso de dos ésteres de estradiol sobre la tasa de fertilidad a la IATF en vacas secas, tratadas con un dispositivo intravaginal con progesterona. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar. Fecha de consulta: 3/03/17.
55. Chaveiro A, Machado L, Frijters A, Engel B, Woelders H (2006). Improvement of parameters of freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. *Theriogenology*, 65:1875-1890.
56. Chebel R, Al-Hassan M, Fricke P, Santos E, Lima J, Martel C, Stevenson J, García R (2010). Supplementation of progesterone via controlled internal drug release inserts during ovulation synchronization protocols in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93:922-931.
57. Colazo M, Mapletoft R, Martínez M, Kastelic J (2007). El uso de tratamientos hormonales para sincronizar el celo y la ovulación en vaquillonas. Disponible en: www.bibliotecaunlpam.edu.ar. Fecha de consulta: 27/02/17.
58. Colazo M, Ambrose D (2011). Neither duration of progesterone insert nor initial GnRH treatment affected pregnancy per timed-insemination in dairy heifers subjected to a Co-synch protocol. *Theriogenology*, 76:578-588.
59. Correa J, Zavos P (1994). The hipoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*, 42:351-360.
60. Crespilho A, Papa F, Martins A, Dell'Aqua Junior J (2009). Evaluation of frozen bovine semen: how do semen collection and processing centers evaluate the quality of commercialized samples? *Veterinária e Zootecnia*, 16(2):335-342.
61. Dahlen C, Lamb G, Zehnder C, Miller L, DiConstanzo A (2002). Fixed-time insemination in prepuberal, lightweight replacement beef heifers after estrus synchronization with PGF2 alpha and GnRH. *Theriogenology*, 59:1827-1837.
62. Day M, Burke C, Taufa V, Day A, McMillan K (2000). The strategic use of oestradiol to enhance fertility and submission rates of progestin-based estrus synchronization programs in lactating dairy herds. *Journal of Animal Science*, 78:523-529.
63. De la Matta J, Bó G (2012). Sincronización de celos y ovulación utilizando protocolos con benzoato de estradiol y GnRH en períodos reducidos de inserción de un dispositivo con progesterona en vaquillonas para carne. *Taurus*, 55:17-23.
64. De Leeuw A, Den Daas J, Woelders H (1991). The fix vital stain methods. *Journal of Andrology*, 12:112-118.

65. De Nava G (2008). Un tratamiento para la inducción de la ovulación en vacas con cría al pie asociado a inseminación artificial a tiempo fijo. Seminario de actualización técnica: Cría Vacuna. INIA, 174:182-188.
66. De Nava G (2013). Reproducción bovina aplicada: desarrollo y validación de programas de inseminación artificial a tiempo fijo en Uruguay. Montevideo. Agropecuaria Hemisferio Sur, 136 p.
67. De Nava G (2015). La IATF como tecnología reproductiva para la cría. Disponible en: <http://www.inia.uy>. Fecha de consulta: 12/03/17.
68. De Silva A, Anderson G, Gwazdauskas F, McGilliard M, Lineweaver J (1981). Interrelationships with estrous behavior and conception in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 64:2409-2418.
69. De Jarnette M (2015). Ovsynch, Co-synch, Presynch and Kitchensynch: how did breeding cows get so complicated? *Select Sires*. Disponible en: <http://www.selectsires.com>. Fecha de consulta: 21/02/17.
70. Den Daas J (1992). Laboratory assessment of semen characteristics. *Animal Reproduction Science* 28:87-94.
71. Derivaux J (1976). Reproducción de los animales domésticos. 2º ed. Zaragoza, Acribia, 486 p.
72. Dieleman S, Bevers M, Van Tol H, Willemse A (1986). Peripheral plasma concentrations of oestradiol, progesterone, cortisol, LH and prolactin during the oestrus cycle in the cow, with emphasis on the peri-oestrus period. *Animal Reproduction Science*, 10:275-292.
73. Diskin M, Austin E, Roche J (2002). Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, 23:211-228.
74. Dobbins C, Eborn D, Tenhouse D, Breiner R, Johnson S, Marston T (2009). Insemination timing affects pregnancy rates in beef cows treated with CO-synch protocol including an intravaginal progesterone insert. *Theriogenology*, 72: 1009 –16.
75. Elliott F (1978). Significance of semen quality. En: Salisbury W, VanDemark N, Lodge J. *Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle*. San Francisco, Freeman, p 428-441.
76. Esslemont R, Bryant M (1976). Oestrus behavior in a herd of dairy cows. *Veterinary Record*, 99:472-475.
77. Fernández M, Pérez M, Sánchez A (2006). Determinación de la duración, intensidad y conducta de celo en vacas en ordeño y vaquillonas Holando. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria UDELAR, Montevideo, 48 p.
78. Fitz T, Mayan M, Sawyer H, Niswender G (1982). Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*, 27:703

79. Fogwell R, Kanyima B, Villa-Godoy A, Enright W, Ireland J (1986). Enhanced Precision of Estrus and Luteinizing Hormone After Progesterone and Prostaglandine in Heifers. *Journal of Dairy Science*, 69:2171-2185.
80. Foote R (1975). Estrus detection and estrus detection aids. *Journal of Dairy Science*, 58:248-252.
81. Garner D, Thomas C, Allen C, Senger P, Sasser R (1997). Effect of cryopreservation on bovine sperm as determined by dual DNA staining. *Reproduction in Domestic Animals*, 32:279-283.
82. Geary T, Whittier J (1998). Effects of timed insemination following synchronization of ovulation using the Ovsynch or CO-Synch protocol in beef cows. *The Professional Animal Scientist*, 14:217-220.
83. Geary T, Whittier J, Hallford D, MacNeil M (2001). Calf removal improves conception rates to the Ovsynch and Co-synch protocols. *Journal of Animal Science*, 79:1-4.
84. Gil J (1999). Evaluation of post-thaw sperm quality in the bull and ram with special emphasis on semen processing (Licenciate thesis). Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 29 p.
85. Gil J, Januskaukas A, Haard M, Johannisson A, Söderquist L, Rodriguez-Martinez H (2000). Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-plus ® and Triladyl ®. *Reproduction in Domestic Animals*, 35:69-77.
86. Ginther O, Kastelic J, Knopf L (1989a). Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Animal Reproduction Science*, 20:187-200.
87. Ginther O, Knopf L, Kastelic J (1989b). Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycle with two and three follicular waves. *Journal of Reproduction and Fertility*, 87:223-230.
88. Ginther O, Wiltbank M, Fricke P, Gibbons J, Kot K (1996). Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, 55:1187-1194.
89. Glauber C (2007). Manejo reproductivo en el rodeo bovino lechero: propuestas y reflexiones. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar. Fecha de consulta: 28/02/17.
90. Gonzales R (2004). Effect of cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotectants on sperm parameters and membranes integrity of bovine spermatozoa. Tese. Universidade Sao Paulo. 94p. Disponible en: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-19102004-101719/pt-br.php> Fecha de consulta: 04/03/2017.
91. Graham J, Mocé E (2005). Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, 64:927-504.
92. Gwazdauskas F, Lineweaver J, McGilliard M (1983). Environmental and management factors affecting estrous activity in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 66:1510-1514.

93. Hafez E (2000). Preservación y criopreservación de gametos y embriones. En: Hafez B, Hafez E, Reproducción e inseminación artificial en animales, 7ª ed. Mexico. McGraw-Hill Interamericana, pp 441-452.
94. Hafez E, Jainudeen M, Rosnina Y (2000). Hormonas, factores de crecimiento y reproducción. En: Hafez B, Hafez E (Eds.) Reproducción e inseminación artificial en animales. 9 Ed. México, McGraw-Hill Interamericana, pp 33-55.
95. Hammerstedt R, Graham J, Nolan J (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, 11:73- 88.
96. Hansel W, Convey E (1983). Physiology of the estrous cycle. *Journal of Animal Science*, 57(2): 404-424.
97. Hilary D, Smith R (2000). What is stress, and how does it affect reproduction? *Animal Reproduction Science*, 60:743-752.
98. Holt W, Van Look J (2004). Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory test of semen quality. *Reproduction*, 127:527-535.
99. Huanca W (2001). Inseminación Artificial a Tiempo Fijo en Vacas Lecheras. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 12:161-163.
100. Ireland J, Roche J (1987). Hypotheses regarding development of dominant follicles during a bovine estrous cycle. En: Roche JF, O'Callaghan D (Eds.) *Follicular Growth and Ovulation Rate in Farm Animals*. Boston. Dordrecht Martinus Nijhoff, pp 1-18.
101. Irvine D (1995). Computer assisted semen analysis system: sperm motility assessment. *Human Reproduction*, 10:53-59.
102. Jaime R (1992). *Manual Práctico de Inseminación Artificial en Bovinos*, ITCA. Gráfica Latina, Montevideo, 13 p.
103. Januskauskas A, Zilinskas H (2002). Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bulls fertility. *Veterinarija ir Zootechnika*, 39:1-8.
104. Jeyendran R, Van der Ven H, Perez-Pelaez M, Crabo B, Zanevald L (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70:219-228.
105. Kasimanickam R, Cornwell J, Nebel R (2005). Fertility following fixed time AI or insemination at observed estrus in Ovsynch and Heatsynch programs in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 63:2550-2559.
106. Kasimanickam R, Day M, Rudolph J, Hall J, Whittier W (2009). Two doses of prostaglandin improve pregnancy rates to timed-AI in a 5-day progesterone based synchronization protocol in beef cows. *Theriogenology*, 71:762-767.
107. Kasimanickam R, Asay M, Firth P (2012). Artificial insemination at 56 h after intravaginal progesterone device removal improved AI pregnancy rate in beef

- heifers synchronized with five-day CO-Synch + controlled internal drug release (CIDR) protocol. *Theriogenology*, 77:1624-1631.
108. Kasimanickam R, Firth P, Schuenemann G, Whitlock B, Gay J, Moore D, Hall J, Whittier W (2014). Effect of the first GnRH and two doses of PGF2alpha in a 5-day progesterone-based CO-Synch protocol in heifer pregnancy. *Theriogenology*, 81:797-804.
 109. Knickerbocker J, Wiltbank M, Niswender G (1988). Mechanism of luteolysis in domestic livestock. *Domestic Animal Endocrinology*, 5(2): 91-107.
 110. Krause W (1995). The significance of Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) for diagnosis in andrology and fertility prognosis. *Human Reproduction*, 10:60-66.
 111. Krogenaes A, Andersen-Berg K, Hafne A.L, Engeland E (1994) Membrane alteration in bull spermatozoa after freezing and thawing and after in vitro fertilization. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 35:17-26.
 112. Lammoglia M, Short R, Bellows S, Bellows R, McNeil M, Hafs H (1998). Induced and Synchronized Estrus in Cattle: Dose Titration of Estradiol Benzoate in Peripubertal Heifers and Postpartum Cows After Treatment with an Intravaginal Progesterone-Releasing Insert and Prostaglandin F2alpha. *Journal of Animal Science*, 76:1662-1670.
 113. Larson L, Ball P (1992). Regulation of estrous cycles in dairy cattle: a review. *Theriogenology*, 38: 255-267.
 114. Lima F, Ayres H, Favoreto M, Bisinotto R, Greco L, Ribeiro E, Baruselli P, Risco C, Thatcher W, Santos J (2011). Effects of gonadotropin releasing hormone at initiation of the 5-day timed artificial insemination (AI) program and timing of induction of ovulation relative to AI on ovarian dynamics and fertility of dairy heifers. *Journal of Animal Science*, 94:4997-5004.
 115. Lima F, Ayres H, Favoreto M, Bisinotto R, Greco L, Ribeiro E, Baruselli P, Risco C, Thatcher W, Santos J (2013). Hormonal manipulations in the 5.day timed artificial insemination protocol to optimize estrous cycle synchrony and fertility in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, 96:7054-7065.
 116. Linford E, Glover F, Bishop C, Stewart D (1976). The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *Journal of Reproduction and Fertility*, 47(2):283-291.
 117. Lopez H, Satter L, Wiltbank C (2004). Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 81:209-223.
 118. Lucy M, Billings M, Butler W, Ehnis L, Fields M, Kesler D, Kinder J, Mattos R, Short R, Thatcher W, Wettemann R, Yelich J, Hafs H (2001). Efficacy of an intravaginal progesterone insert and an injection of PGF2 alfa for synchronization estrus and shortening the interval to pregnancy in postpartum beef cows, peripubertal beef heifers, and dairy heifers. *Journal of Animal Science*, 72:982-995.

119. Lucy M (2008). Fuentes de infertilidad y soluciones para corregir la infertilidad en las vacas de tambo al postparto. XXXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay, pp 70-74.
120. Marcantonio S (1998). Cómo y porque una vaca entra en celo. Disponible en: www.producciónbovina.com. Fecha de consulta: 23/02/17.
121. Mc Donald L (1991). Endocrinología Veterinaria y Reproducción. 4ª ed. México. Interamericana, 551 p.
122. Menchaca A, Dutra S, Carrau J, Sapriza F, Salazari J, de la Matta J, Bó G (2015). Improvement of pregnancy rate by using the 6-days J-synch protocol in recipient cows transferred with in vitro produced embryos. *Animal Reproduction Science*, 12 (3): 651.
123. Moreno D, Cutaia L, Villata L, Ortisi F, Bo G (2001). Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol and progesterone. *Theriogenology*, 55(1):408(abstract).
124. Mortimer S (2000). CASA: practical aspects. *Journal of Andrology*, 21:515-524.
125. Murphy M, Enright W, Crowe M, McConnell K, Boland M, Roche J (1991). Effect of dietary intake of pattern of growth of dominant follicles during the estrous cycle in beef heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, 92:333-338.
126. Murugavel K (2003). Reproductive performance of dairy cows following different estrous synchronization protocols. Disponible en: www.tesisenxarxa.net. Fecha de consulta 3/03/17.
127. Nanda A, Dobson H, Ward W (1990). Relationship between an increase in plasma cortisol during transport-induced stress and failure of oestradiol to induce a luteinizing hormone surge in dairy cows. *Research in Veterinary Science*, 49:25-28.
128. Nebel R, Whittier W, Cassell B, Britt J (1987). Comparison of on-farm and laboratory milk progesterone assays for identifying error in detection of estrus and diagnosis of pregnancy. *Journal of Dairy Science*, pp 70:1471.
129. Peel R, Whittier J, Enns R, Grove A, Seidel G (2010). Effect of 6- versus 12-hour interval between two prostaglandin F_{2α} injections administered with 5-day CO-Synch + controlled internal drug-release protocol on pregnancy in beef cows. *The Professional Animal Scientist*, 26:307–312.
130. Pérez-Llano B, Sanchez-Sanchez R, Yenes P, García-Casado P (2001). Estudio de la evolución de poblaciones de espermatozoides de verraco según su respuesta al HOST corto y el estado del acrosoma durante la conservación a 15°C. 6th International Conference on Pig Reproduction. Missouri, p 50.
131. Perry G, Smith M, Lucy M, Green J, Parks T, McNeil M, Roberts A, Geary T (2005). Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 102:5268-73.

132. Perulactea (2012) El celo de la Vaca Lechera: Todo está en las Hormonas. Disponible en: <http://www.perulactea.com>. Fecha de consulta: 02/02/17.
133. Peters R, Ball P (1991). Reproducción del ganado vacuno. Zaragoza. Acribia, 222 p.
134. Phillips N, Evans G, McGowan M (2004a). Measures used to assess frozen-thawed semen in Australian livestock semen processing centers. Australian Veterinary Journal, 82:309-310.
135. Ptaszynska M (2007). Compendium de reproducción animal, 9a. ed. Asunción, Ed. Intervet Internacional, pp 422.
136. Pursley J, Mee M, Wiltbank M (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. Theriogenology, 44(7): 915-923.
137. Rabaglino M, Risco C, Thatcher M, Kim I, Santos J, Thatcher W (2010). Application of one injection of prostaglandin F2 α in the five-day Co-Synch+CIDR protocol for estrous synchronization and resynchronization of dairy heifers. Journal of Dairy Science, 93:1050-1058.
138. Raggio R (2003). Método de Evaluación del Tracto Reproductivo, Disponible en: <http://www.produccion-animal.com.ar>. Fecha de consulta: 01/03/17.
139. Reeves J (1989). Endocrinología de la Reproducción, En: Hafez E, Hafez B. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Ciudad de México, Mc Graw-Hill Interamericana, México, p 91.
140. Roberts S (1979). Obstetricia veterinaria y patología de la reproducción. Buenos Aires, Hemisferio Sur, 1079 p.
141. Rodríguez Blanquet J, Fornio O, Parietti C, Revello T, Salvarrey L (1992). Sincronización de celos en vaquillonas Hereford con dosis reducidas de prostaglandina F2 α . Disponible en: www.produccionanimal.com. Fecha de consulta: 27/02/17.
142. Rodríguez Blanquet J (2002). Bioestimulación: una alternativa para incrementar la productividad del rodeo de cría. INIA, 288:81-97.
143. Rodríguez-Martínez H (2000). Evaluation of frozen semen: traditional and new approaches. En: Topics in bull fertility. Disponible en: http://www.ivis.org/advances/Repro_Chenoweth/Rodriguez_Martinez/chapter_a_sp?LA=1 Fecha de consulta: 05/03/2017.
144. Rodríguez-Martínez H (2006). Can we increase the estimative value of semen assessment? Reproduction in Domestic Animals, 41(52):2-10.
145. Rodríguez-Martínez H (2012). Assisted reproductive techniques for cattle breeding in developing countries: A critical appraisal of their values and limitations. Reproduction in Domestic Animals, 47(1):21-26.
146. Roelofs J, Van Eerdenburg F, Soede N, Kemp B (2005). Various behavioral signs of estrous and their relationship with time of ovulation in dairy cattle. Theriogenology, 63:1366-1377.

147. Rota A, Penzo N, Vicenti L, Mantovani R (2000). Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 53:1415-1420.
148. Rowson L, Tervit R, Brand A (1972). The use of PG for synchronization of oestrous in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility (Abst.)*, 29:145.
149. Ryan D, Snijders S, Yaakub H, O'Farrel K (1995). An evaluation of estrus synchronization programs in reproductive management of dairy herds. *Journal of Animal Science*, 73:1904-1910.
150. Saacke R, White J (1972). Semen quality tests and their relationship to fertility. *Proceeding. 4to Technical Conference National Association Animal Breeders (NAAB). Columbia*, pp 22-27.
151. Sanders D (2005). Troubleshooting Poor Reproductive Performance in Large Herds. *Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice*, 21:289-304.
152. Schams D (1987). Luteal peptides and intercellular communication. *Journal of Reproduction and Fertility*, 34:87-99.
153. Schmitt E, Drost M, Díaz T, Roomes T, Thatcher W (1996). Effect of gonadotropin-releasing hormone agonist on follicle recruitment and pregnancy rate in cattle. *Journal of Animal Science*, 74:154-161.
154. Schwall R, Gamboni M, Mayan M, Niswender G (1986). Changes in the distribution sizes of ovine luteal cells during the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, 34:911-918.
155. Senger P (2003). *Pathways to Pregnancy and Parturition*. 2^a ed. Washington. Current Conceptions, 373 p.
156. Sepúlveda N, Rodero E (2003). Comportamiento sexual durante el estro en vacas lecheras. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar. Fecha de consulta: 24/02/17.
157. Smalley S (1981). Management problems of large dairies. *Veterinary Clinics of North America: Large Animal Practice*, 3:289-305.
158. Souza A, Viechnieski S, Lima F, Silva F, Araújo R, Bó G, Wiltbank M, Baruselli P (2009). Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology*, 72:10-21.
159. Souza H, Cunha A, Caraviello D, Wiltbank M (2005). Profiles of circulating estradiol-17B after different estrogen treatments in lactating dairy cows. *Animal Reproduction*, 2:224-232.
160. Stevenson J, Tiffany S, Lucy M (2004). Use of Estradiol Cypionate as a Substitute for GnRH in protocols for Synchronization Ovulation in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 87:3298-3305.
161. Stoebel D, Mober G (1982). Repeated Acute Stress During the Follicular Phase and Luteinizing Hormone Surge of Dairy Heifers. *Journal of Dairy Science*, 65:92-96.

162. Sullivan J (1978). Morfología y motilidad de los espermatozoides. En Salisbury G, Van Demark N, Lodge J. Fisiología de la reproducción e inseminación artificial en bóvidos, 2^oed. Zaragoza, Acribia, 831 p.
163. Thatcher W, Macmillan K, Hansen P, Drost M (1989). Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology*, 31:149-160.
164. Trimberger G, Frincher M (1956). Regularity of estrus, ovarian function and conception rates in dairy cattle. Cornell University. Agricultural Experiment Station Bulletin, 911:1-6.
165. Twagiramungu H, Guilbault L, Dufour J (1995). Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: a review. *Journal of Animal Science*, 73(10):3141-51.
166. Van Eenderburg F, Karthaus D, Taverne M, Merics I, Szenci O (2002). The relationship between Estrous Behavioral Score and Time of Ovulation in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 85:1150-1156.
167. Van Eerdenburg F (2009). Detección de celo en vacas lecheras: como vencer al toro. XXXVII Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay, pp 44-54.
168. Vasconcelos J, Silcox R, Rosa G, Pursley J, Wiltbank M (1999). Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 52:1067-1078.
169. Vera O (2003). Evaluación seminal comparativa pre y post congelación en machos bovinos. En: González-Stagnaro, C. Reproducción Bovina. Maracaibo. Fundación Giraz, pp 251-262.
170. Verstegen J, Iguer-Ouada M, Oclin K (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57:149- 179.
171. Viñoles C, Cavestany D (2000). Sincronización de celos e inseminación a tiempo fijo en vaquillonas Holando. *INIA*, 116:49-51.
172. Walters D, Schams D, Schallenberger E (1984). Pulsatile secretion of gonadotropins, ovarian steroids and oxytocin during the luteal phase of the oestrus cycle in the cow. *Journal of Reproduction and Fertility*, 71:479-491.
173. White F, Wettermann R, Looper M, Prado T, Morgan G (2002). Seasonal effects on estrous behavior and time of ovulation in nonlactating beef cows. *Journal of Animal Science*, 80:3053-3059.
174. Whittier W, Currin J, Schramm H, Holland S, Kasimanickam R (2013). Fertility in Angus cross beef cows following 5-day Co-Synch + CIDR or 7-day CO-Synch + CIDR estrus synchronization and timed artificial insemination. *Theriogenology*, 80:963-969.

175. Williamson N, Morris R, Blood D, Cannon C (1972). A study of oestrous behavior and oestrous detection methods in a large commercial dairy herd. The relative efficiency of methods of oestrous detection. *Veterinary Record*, 91:50-58.
176. Wilson D, Mallory D, Busch D, Leitman N, Haden J, Schafer D, Eilersieck M, Smith M, Patterson D (2010). Comparison of short-term progestin-based protocols to synchronize estrus and ovulation in postpartum beef cows. *Journal of Animal Science*, 88:2045–2054.
177. Xu Z, Burton L, McDougall S, Jolly P (2006). Treatment of Noncyclic Lactating Dairy Cows with Progesterone and Estradiol or with Progesterone, GnRH, Prostaglandin F2alpha and Estradiol. *Journal of Dairy Science*, 83:464-470.
178. Yániz J, Murugavel K, López-Gatius F (2004). Recent developments in Oestrous Synchronization of Postpartum Dairy Cows with and without Ovarian Disorders. *Reproduction in Domestic Animals*, 39:86-93.
179. Youngquist R, Threlfall W (2007). *Current Therapy of Large Animal Theriogenology*. 2^a ed. St. Louis Mo. Saunders, 1061 p.

9. ANEXO I

Marco legal

Si bien a nivel nacional no existe reglamentación, en la región la comercialización de semen se basa en las resoluciones del Mercosur. Para comercializar dentro de éste, hay que estar registrado y habilitado, como Centros de colecta y procesamiento de semen de toros, por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) a través de la Sección Reproducción de la Dirección de Laboratorios Veterinarios DILAVE "Miguel C. Rubino"

A continuación se amplía la reglamentación:

A) Marco regulatorio para el tratamiento de la genética animal de bovinos, caprinos, ovinos, équidos y porcinos en el MERCOSUR

Estándares biotecnológicos mínimos para la comercialización de material seminal en el ámbito del Mercosur:

- Volumen de la dosis: 0,25 ml
- Porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales con movimiento progresivo al descongelado mayor al 30%.
- Vigor mayor a 3
- Número de espermatozoides morfológicamente normales con movimiento progresivo al descongelado mayor a 6 millones, sugiriéndose un mínimo de 10 millones. Para las dosis con 6 a 10 millones de espermatozoides, el número total de anomalías espermáticas no será superior al 20% y los defectos mayores, no mayor al 10%. Para dosis superiores a 10 millones de espermatozoides normales con motilidad progresiva, el número total de espermatozoides anormales no será mayor al 30%, defectos mayores y menores del 20%.

B) Requisitos zoonosanitarios para el intercambio entre los estados partes de semen bovino y bubalino

SOBRE EL ESTADO PARTE DE ORIGEN:

Artículo 21.- El Estado Parte exportador deberá estar libre de Peste Bovina, Pleuroneumonía Contagiosa Bovina, Dermatitis Nodular Contagiosa y Fiebre del Valle del Rift, de acuerdo con lo establecido en el Código Sanitario de los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

Artículo 22.- El Estado Parte libre de Fiebre Aftosa con o sin vacunación, en todo su territorio o en una región del mismo, reconocido por la OIE o por el Estado Parte importador, certificará esta condición.

El Estado Parte exportador, que no sea libre de Fiebre Aftosa, en todo su territorio o en una región del mismo, podrá acordar con el Estado Parte importador garantías adicionales compatibles con las recomendaciones del Código Sanitario de los Animales Terrestres de la OIE.

LOS ANIMALES

Artículo 23.- Sólo podrán ingresar al CCPS animales nacidos y criados ininterrumpidamente en el Estado Parte exportador, o animales que hayan ingresado al Estado Parte exportador cumpliendo lo establecido en las normas del

MERCOSUR relativas a los requisitos zoosanitarios para el intercambio de bovinos y bubalinos. En este caso, deberán haber permanecido en el Estado Parte exportador como mínimo 60 (sesenta) días antes de la fecha de la primera colecta.

Los animales importados desde terceros Estados deberán haber permanecido en el Estado Parte exportador como mínimo 60 (sesenta) días antes de la fecha de la primera colecta.

Artículo 24.- El CCPS deberá comunicar inmediatamente al Servicio Veterinario Oficial del respectivo Estado Parte las bajas de todo animal, informando el motivo de la baja, el número de registro del animal, el número de dosis de semen en existencia y la fecha de colecta.

Todo animal bajo sospecha de enfermedad infecciosa transmisible por el semen deberá ser aislado. El hecho deberá ser comunicado inmediatamente al Servicio Veterinario Oficial. Las dosis de semen del referido animal, no podrán ser comercializadas hasta la confirmación de su diagnóstico por un Laboratorio Oficial. El destino del semen almacenado será determinado por el Servicio Veterinario Oficial.

Artículo 25.- Los animales residentes, que por cualquier motivo salieran del CCPS, deberán cumplir con la cuarentena de ingreso para reingresar al mismo.

PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO

Artículo 26.- Además de las pruebas mencionadas en la presente Resolución, podrán ser acordados, entre el Estado Parte importador y el Estado Parte exportador, otros procedimientos y pruebas de diagnóstico que presenten garantías equivalentes para el intercambio de semen bovino y bubalino.

PROCEDIMIENTOS ZOOSANITARIOS PREVIOS AL INGRESO A LA CUARENTENA

Artículo 27.- Para ingresar al CCPS los animales deberán estar acompañados de un certificado zoosanitario, expedido por el Veterinario Oficial o responsable del CCPS, donde conste que en el establecimiento de origen no hubo ocurrencia de enfermedades transmisibles por el semen que afecten a la especie en los últimos 90 (noventa) días y que las pruebas de diagnóstico realizadas a los animales obtuvieran resultados negativos para las siguientes enfermedades:

a. TUBERCULOSIS - Prueba intradérmica simple con PPD bovina o comparada con PPD bovina y aviar.

b. BRUCELOSIS – Antígeno Acidificado Tamponado (BBAT/BPA) / Rosa de Bengala. Los animales positivos serán sometidos a Fijación de Complemento (FC) o 2-mercaptoetanol o Test de ELISA.

PROCEDIMIENTOS ZOOSANITARIOS EN LA CUARENTENA

Artículo 28.- Con respecto a la Estomatitis Vesicular los animales que ingresen al centro deberán cumplir con lo establecido en los capítulos correspondientes del Código Sanitario de los Animales Terrestres de la OIE.

Artículo 29.- Los animales deberán ser mantenidos en cuarentena durante un período mínimo de treinta (30) días, pudiendo ingresar al rebaño residente después de haber obtenido resultado negativo a las siguientes pruebas:

1. BRUCELOSIS – Antígeno Acidificado Tamponado (BBAT/BPA) / Rosa de Bengala. Los animales positivos serán sometidos a Fijación de Complemento (FC) o 2-mercaptoetanol o Test de ELISA.
2. TUBERCULOSIS: prueba intradérmica simple con PPD bovina o comparada con PPD bovina y aviar. Esta prueba solamente podrá ser realizada después de los 60 (sesenta) días de la última prueba realizada.
3. CAMPILOBACTERIOSIS GENITAL BOVINA: 4 (cuatro) pruebas negativas de cultivo de material prepucial, realizadas a intervalos de 7 (siete) días, o una prueba de inmunofluorescencia.
4. TRICHOMONIASIS: 4 (cuatro) pruebas negativas de cultivo de material prepucial, realizadas a intervalos de 7 (siete) días.
5. DIARREA VIRAL BOVINA (BVD): prueba de aislamiento e identificación por técnica de inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa en muestras de sangre total. Se realizarán 2 (dos) pruebas. Si la primera arroja resultado positivo se repetirá la prueba con un intervalo mínimo de 14 (catorce) días. Si el resultado de la segunda prueba fuera negativo dicho animal será autorizado para ingresar al CCPS.

PROCEDIMIENTOS ZOOSANITARIOS PARA EL RODEO RESIDENTE

Artículo 30.- Los animales residentes serán sometidos a pruebas de diagnóstico cada 180 (ciento ochenta) días, que deberán presentar resultado negativo, a las siguientes enfermedades:

1. BRUCELOSIS – Antígeno Acidificado Tamponado (BBAT/BPA) / Rosa de Bengala. Los animales positivos serán sometidos a Fijación de Complemento (FC) o 2-mercaptoetanol o Test de ELISA.
2. TUBERCULOSIS: prueba intradérmica simple con PPD bovina o comparada con PPD bovina y aviar.
3. CAMPILOBACTERIOSIS GENITAL BOVINA: un cultivo de material prepucial o una prueba de inmunofluorescencia (IF).
4. TRICOMONIASIS: un cultivo de material prepucial.

Artículo 31.- Los animales residentes, cuyo semen va a ser destinado a exportación, serán sometidos además a pruebas de diagnóstico que deberán presentar resultado negativo a las siguientes enfermedades:

- a. RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA (IBR): prueba de seroneutralización o Test de ELISA realizada como mínimo 21 (veintiún) días después de la colecta; o someter una muestra de 0,5 ml de semen procesado de cada partida a una prueba de aislamiento viral o prueba de PCR.
- b. LENGUA AZUL (LA): una prueba de inmunodifusión en gel de agar o Test de ELISA, realizada 40 (cuarenta) días después de la última colecta; o muestras de sangre total del animal dador colectadas cada 14 (catorce) días sometidas al test de

aislamiento viral en huevos embrionados o a la prueba de PCR de semen, o someter una muestra de 0,5 ml de semen procesado de cada partida a una prueba de PCR.

c. LEUCOSIS BOVINA ENZOOTICA (LBE): prueba de inmunodifusión en gel de agar o Test de ELISA en una muestra de suero obtenida como mínimo 30 (treinta) días después de la última colecta de semen; o someter una muestra de 0,5 ml de semen procesado de cada partida a una prueba de PCR.

d. DIARREA VIRAL BOVINA (DVB): se exige prueba de ELISA captura de antígenos.

Artículo 32.- Los animales residentes que obtuvieran resultados positivos para las enfermedades mencionadas en este capítulo, deberán ser aislados y reevaluados por el Servicio Veterinario Oficial del respectivo Estado Parte, que determinará el destino de los animales.

Artículo 33.- No será necesaria la realización de las pruebas de diagnóstico correspondiente a las enfermedades mencionadas en el artículo 31, cuando el Estado Parte exportador se encuentre libre de alguna de ellas, en todo su territorio o en una región del mismo, en virtud de un reconocimiento de la OIE o del Estado Parte importador.

En este caso, el Estado Parte exportador deberá certificar dicha condición y además que el CCPS cuenta con certificación oficial de establecimiento libre, emitido por el Servicio Veterinario Oficial del Estado Parte respectivo, en el marco de un programa nacional de erradicación.

SEMEN

Artículo 34.- El semen deberá ser colectado y procesado de acuerdo a lo establecido en el Código Sanitario de los Animales Terrestres de la OIE.

Artículo 35.- El semen será almacenado por un período de 45 (cuarenta y cinco) días a partir de la colecta en las instalaciones del CCPS.

Artículo 36.- Para el intercambio entre los Estados Partes, el semen bovino y bubalino deberá estar acompañado del "Certificado Zoosanitario para el intercambio entre los Estados Partes de semen bovino y bubalino", conforme al modelo que consta como anexo II de la presente Resolución.

Dicho certificado deberá estar firmado por el Veterinario responsable del CCPS y refrendado por el Veterinario del Servicio Oficial del Estado Parte exportador.

Todas las hojas del certificado deberán estar numeradas secuencialmente, sellada y rubricadas por el Veterinario del Servicio Oficial del Estado Parte exportador.