

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**EFFECTO DEL CIPIONATO DE ESTRADIOL PREVIO A LA IATF SOBRE EL
DESARROLLO DEL FOLÍCULO OVULATORIO Y LA ACTIVIDAD LUTEAL
SUBSIGUIENTE EN VACAS DE CARNE EN ANESTRO**

Por

SECCO MARTÍNEZ Nicolás

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

MODALIDAD: Ensayo Experimental

MONTEVIDEO

URUGUAY

2017

1 PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de mesa:

Segundo miembro:

(tutor)

Alejo Menchaca

Tercer miembro:

Cuarto miembro:

(Co-tutor)

Diego Bosolasco

Fecha:

Autor:

.....

Nicolás Secco Martínez

2 AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, Dr. Alejo Menchaca por darme la oportunidad de trabajar en este experimento y por los conocimientos brindados.

A mi Co-tutor, Dr. Diego Bosolasco por el tiempo, dedicación y enseñanza tanto en la realización del ensayo experimental como en el trabajo escrito.

Al Dr. Richard Núñez por el apoyo en el trabajo experimental.

A todo el grupo del Instituto de Reproducción Animal del Uruguay.

A la Facultad de Veterinaria UdelaR.

A Francisca por su apoyo constante.

A mi familia y amigos por el estímulo y la compañía en este recorrido.

A Marcos, Antonio y Sandra, personal del establecimiento "San Sebastián".

A los propietarios del establecimiento San Sebastián Federico y Diego Rubio por permitirme realizar el experimento en sus instalaciones y brindarme la casa para alojarme.

Al personal de la Biblioteca de la Facultad de Veterinaria.

A la fundación IRAUy, por la financiación del proyecto.

Tabla de contenido

| | |
|---|----|
| 1 PÁGINA DE APROBACIÓN | 2 |
| 2 AGRADECIMIENTOS..... | 3 |
| 3 LISTA DE GRÁFICOS Y TABLAS..... | 5 |
| 4 RESUMEN..... | 6 |
| 5 SUMMARY | 7 |
| 6 INTRODUCCIÓN..... | 7 |
| 7 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... | 9 |
| 7.1 Ciclo estral en bovinos. | 9 |
| 7.2 Control farmacológico del ciclo estral. | 10 |
| 7.3 Inseminación artificial a tiempo fijo (IATF). | 11 |
| 7.4 Tasa ovulatoria y momento de la ovulación con distintos protocolos hormonales.. | 12 |
| 7.5 Efecto de la progesterona sobre el reconocimiento materno de la gestación. | 14 |
| 8 HIPÓTESIS | 17 |
| 9 OBJETIVOS | 17 |
| 9.1 Objetivos generales..... | 17 |
| 9.2 Objetivos específicos..... | 17 |
| 10 MATERIALES Y METODOS | 18 |
| 11 RESULTADOS | 21 |
| 12 DISCUSION | 23 |
| 13 CONCLUSIÓN..... | 24 |
| 14 BIBLIOGRAFÍA | 26 |

3 LISTA DE GRÁFICOS Y TABLAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Concentración sérica de Progesterona..... | 22 |
| Figura 2. Área del cuerpo Lúteo..... | 22 |
| Figura 3. Respuesta ovárica (Media \pm E.E.) en vacas con cría al pie sometidas al tratamiento Convencional, difiriendo la dosis del inductor de la ovulación (ECP) en 0,5mg; 1mg; y el grupo control sin ECP..... | 21 |

4 RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del cipionato de estradiol (ECP) sobre el folículo preovulatorio y posterior desarrollo luteal en vacas de cría en anestro posparto luego de un tratamiento de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF). Los animales fueron sincronizados con un protocolo basado en la colocación de un dispositivo intravaginal de progesterona por 7 días junto con la administración de benzoato de estradiol (EB) al colocar el dispositivo, utilizando ECP como inductor de la ovulación el día del retiro del dispositivo asociado a una dosis lueolítica de un análogo de Prostaglandina F2 α y 400 UI de gonadotrofina coriónica equina (eCG). Las vacas fueron asignadas aleatoriamente a los siguientes 3 grupos experimentales: tratadas con 0,5mg de ECP, 1mg de ECP y el grupo control que no recibió ECP el día del retiro del dispositivo. Desde el día del retiro la actividad ovárica fue monitoreada en todos los animales mediante ultrasonografía cada 12 horas hasta la ovulación y luego cada 24 horas durante los 14 días posteriores. Con el fin de medir las concentraciones séricas de progesterona se extrajo una muestra de sangre diariamente durante 14 días a partir de la ovulación. Los resultados mostraron la tasa ovulatoria, si bien no alcanzó diferencias significativas, hubo una tendencia a favor de los grupos que recibieron ECP vs el grupo control ($P < 0,1$). Se observó una diferencia significativa en el diámetro del folículo al momento de la ovulación, siendo de mayor tamaño en los animales que no recibieron ECP ($P < 0,05$). La ovulación ocurrió antes ($P < 0,05$) en los animales que recibieron 1mg de ECP en comparación con los otros dos grupos ($P < 0,05$). La concentración sérica de progesterona fue mayor en los grupos que recibieron ECP vs el grupo control, siendo esta diferencia significativa a los 13 y 14 días luego de la ovulación ($P < 0,05$). El desarrollo del cuerpo lúteo (CL) no presentó diferencias significativas entre los tres grupos. En conclusión, la utilización de ECP como inductor de la ovulación favorece la tasa ovulatoria e incrementa las concentraciones séricas de progesterona en la fase luteal siguiente. Con 1 mg ovulan folículos de menor tamaño. La diferencia en el momento de la ovulación entre los diferentes tratamientos podría tener implicancias en el momento de la IATF.

5 SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the effect of estradiol cypionate (ECP) on the preovulatory follicle and subsequent luteal development in postpartum anestrous breeding cows after a fixed-time artificial insemination (FTAI) treatment. The animals were synchronized with a protocol based on the placement of a progesterone-releasing intravaginal device for 7 days along with the administration of estradiol benzoate (EB) at the time of the insertion of device and using ECP as an ovulation inducer on the day of removal of the device associated with an luteolytic dose of Prostaglandin F₂ α analogue and 400 IU equine chorionic gonadotrophin (eCG). Cows were randomly assigned to the following 3 experimental groups: treated with 0.5mg of ECP, 1mg of ECP, and the control group that did not receive ECP on the day of device removal. From the day of the withdrawal the ovarian activity was monitored in all the animals by ultrasound examinations every 12 hours until ovulation and then every 24 hours during the following 14 days. In order to measure serum progesterone levels, a blood sample was taken daily from the day of withdrawal of the device until 14 days after ovulation. The results showed that although the difference in ovulatory rate was not significant, there was a trend in favor of the groups that received ECP vs the control group ($P < 0.1$). A significant difference was observed in the diameter of the ovulatory follicle, being larger in the animals that did not receive ECP ($P < 0.05$). Ovulation in animals receiving 1mg of ECP occurred significantly earlier compared to the other two groups ($P < 0.05$). The serum progesterone concentration was higher in the groups that received ECP vs the group that did not receive the inducer, this difference being significant at 13 and 14 days after ovulation ($P < 0.05$). The development of the corpus luteum (CL) did not present significant differences between the three groups. In conclusion, the use of ECP as an inducer of ovulation favors the ovulatory rate, and in spite of smaller follicles being ovulated, this increased the serum concentrations of progesterone in the following luteal phase. The difference in the time of ovulation between the different treatments could have implications at the time of the FTAI.

6 INTRODUCCIÓN

El desempeño reproductivo en los sistemas criadores de Uruguay se encuentra claramente limitado por la duración del anestro posparto (Quintans, 2000), siendo para varios autores el primer obstáculo si se quiere obtener una buena eficiencia reproductiva en un establecimiento ganadero (Montiel y Ahuja, 2005; Menchaca y col., 2013). El anestro es la ausencia de comportamiento estral que se da en un periodo de tiempo, y en una vaca con cría está determinado principalmente por dos factores: el amamantamiento y el estatus nutricional de la hembra. La duración del anestro posparto en condiciones pastoriles en promedio es superior a 60 días. Menchaca y col. (2005) en un análisis sobre 21.329 vacas en 11 predios ganaderos manejados en condiciones pastoriles típicas de Uruguay, tomando en cuenta la condición corporal y la actividad ovárica, encontraron que el 80% de las vacas que se encontraban entre 60 y 90 días posparto estaban en anestro al iniciar los servicios. Los autores encontraron que esto estaba asociado a la condición corporal y la situación era más crítica en vacas de segundo entore (revisado por Menchaca y col., 2013). El momento de concepción para las hembras que se encuentran en anestro se retrasa, y esto trae aparejado malos resultados en los indicadores reproductivos, como el aumento del intervalo entre partos, el cual refleja la producción de terneros por vaca por año. Por lo tanto, teniendo el país una baja tasa de procreo en el entorno del 65% (DIEA, MGAP 2014), sería de utilidad hacerles frente a estas problemáticas.

Una meta productiva en cualquier establecimiento criador es la de producir un ternero por vaca por año. Haciendo un sencillo cálculo, si a los 365 días del año se le restan los 280 días que dura aproximadamente la gestación quedarían 85 días para volver a preñar esos animales. Sabiendo que el anestro posparto es superior a 60 días y que solo un 20% de las vacas están ciclando entre los 60 y 90 días, las hembras prácticamente no tienen chances para volver a quedar preñadas en el momento adecuado para cumplir esa meta previamente mencionada (Baruselli, 2003). La aplicación de programas de (IATF) en explotaciones dedicadas a la cría son una alternativa viable para mejorar los indicadores productivos, así como también la rentabilidad económica de una empresa agropecuaria (Cutaia y col., 2003). Con la IATF, técnica ampliamente validada en el Uruguay por Menchaca y col (2013) entre otros, se logra obtener mayor cantidad de hembras preñadas en un menor periodo de tiempo, y mejores pesos al destete de los terneros (Bó 2012a).

7 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

7.1 Ciclo estral en bovinos.

La hembra bovina es de tipo poliéstrica anual (cicla todo el año), su ciclo tiene una duración de entre 17 y 23 días con un promedio de 21 días. La ovulación se produce entre 24 a 30 horas de comenzado el celo y este tiene una duración de 6 a 18 h (Bó, 2012a). Este patrón cíclico en las hembras se inicia en la pubertad y se prolonga durante toda la vida, la interrupción de los ciclos denominada anestro se puede dar por causas fisiológicas o patológicas (Ungerfeld, 2002).

-FASE FOLICULAR.

Esta fase comienza con la luteólisis el día 16 a 20 del ciclo cuando los niveles de progesterona caen de manera brusca. Cada pulso de LH incrementa la producción de estradiol por parte del folículo, y este estradiol en presencia de altas concentraciones de progesterona ejerce un efecto negativo en el hipotálamo sobre la secreción de gonadotrofinas (Bó, 2012a). Como en esta fase la progesterona se encuentra baja, ese efecto de retroalimentación negativa desaparece y se transforma en un *feedback* positivo entre el estradiol y la LH, por lo tanto, aumenta la frecuencia de los pulsos de esta hormona a través de un incremento de los pulsos de GnRH (Schams, 1987). Ese aumento de los pulsos de LH, que en esta fase son de uno por hora aproximadamente, va a estimular el desarrollo del folículo dominante, el que va a secretar cantidades crecientes de estradiol hasta que complete su crecimiento y sea capaz de producir niveles de estradiol suficientes para generar el pico de LH y por consiguiente la ovulación (Ireland y Roche, 1987).

-FASE PERIOVULATORIA.

En esta fase la hembra se muestra receptiva a la monta tanto de machos como de hembras, otros síntomas de celo que se pueden observar son inquietud, ansiedad, bramidos y disminución de su apetito. Presentan descarga de mucus con mínima viscosidad (filante), que contiene sustancias que atraen y excitan al toro debido a la presencia de feromonas (Bó, 2012a). El tiempo desde que se inicia la luteolisis hasta el inicio del celo es de 58-60 h, ese comportamiento característico de la hembra es provocado por las altas concentraciones de estradiol (Dieleman y col., 1986). Junto con el pico preovulatorio de LH se produce una liberación de FSH, lo que tiene gran importancia en el crecimiento de los folículos de la onda folicular que se comienza a desarrollar en ese momento (Bó, 2012a). El tamaño que es capaz de desarrollar el folículo ovulatorio tiene gran importancia en el éxito del ciclo, Sa filho y col. (2011) demostró la asociación positiva entre el tamaño del folículo y la tasa ovulatoria en vacas Nelore, aumentando la proporción de vacas que ovulaban cuando desarrollaban un folículo mayor a 11mm de diámetro.

-FASE LUTEAL.

Luego de la ovulación las células del folículo ovulatorio se diferencian en células luteales, las que van a formar el CL. Estas células se distinguen en dos tipos, células luteales pequeñas (derivadas de la teca) y células luteales grandes (derivadas de la granulosa). Las células pequeñas tienen la mayoría de los receptores para LH mientras que las células grandes tienen la mayoría de los receptores para FSH, PGE2 y PGF2 α (Braden y col., 1988). El principal producto de secreción del CL es la progesterona (P4), la que comienza a aumentar desde el día 3-4 del ciclo llegando a su máximo entre los días 8 a 12. Sin un reconocimiento materno de la preñez, después de 14 días bajo influencia de altos niveles de progesterona el endometrio secreta pulsos de PGF2 α , los que van a llegar al ovario a través de un mecanismo de contracorriente, desde la vena uterina hacia la arteria ovárica (Niswender y col., 1994). Según Wiltbank (1997) la diferencia entre un CL maduro (mayor de 6 días) de uno inmaduro (menor a 6 días) está en que el CL maduro tiene la capacidad para producir la PGF2 α que asegura la conclusión de la luteolisis. La PGF2 α secretada por el CL cumple diferentes funciones según en qué etapa se encuentre el propio CL, siendo luteotrópica en los CL jóvenes y luteolítica en CL ya envejecidos (Ohtani y col., 1998). Aún hay desacuerdos sobre el mecanismo de la regresión del CL, en la que actúan: PGF2 α sintetizada por el endometrio y por el CL, oxitocina producida por el CL y estradiol producto de los folículos (Britt y Howard 1989). La regresión del CL culmina alrededor del día 16-18 del ciclo y es ahí cuando los niveles de progesterona disminuyen y aumenta la frecuencia de los pulsos de LH estimulando el desarrollo del folículo dominante, tal como fue explicado previamente (Bó, 2012a).

7.2 Control farmacológico del ciclo estral.

Para que una vaca vuelva a concebir debe solucionar necesariamente dos inconvenientes: la restitución física del aparato reproductor y la recuperación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (H-H-O) (Ungerfeld, 2002). Los altos niveles de progesterona y estrógenos en la preñez producen cambios en las interrelaciones del eje para priorizar otras funciones, esto se refleja en un largo periodo de anestro que se prolonga luego del parto (Roche y Boland, 1991). Según Bó (2012a) la hembra ha superado la inhibición de la función de la hipófisis cuando logra liberar una cantidad máxima de LH frente a una dosis de GnRH. Por lo tanto, en condiciones naturales se afirma que una vaca finaliza su periodo de anestro con la primera ovulación posparto.

Uno de los principales recursos a tener en cuenta si se quiere obtener una mejoría en los índices reproductivos y a su vez incorporar genética de calidad en un rodeo, es la inseminación artificial (IA). Sin embargo, las limitantes de esta técnica, como las fallas en la detección de celo y el anestro posparto prolongado dificultan alcanzar los objetivos fijados en un establecimiento dedicado a la ganadería (Inforzatto y col., 2008). Con el conocimiento de las hormonas que participan en la fisiología

reproductiva y demostrado el control neuroendocrino del ciclo estral, surgió la posibilidad de utilizar esas hormonas normalmente producidas por la vaca, pero ahora como tratamiento para los animales en anestro.

Tratamientos hormonales que pueden controlar tanto la fase folicular como la fase luteal del ciclo estral han permitido sincronizar la ovulación de una manera eficiente. Además de eliminar el principal inconveniente en un sistema de IA como lo es la detección de celos, la aplicación de estas tecnologías permite inseminar un amplio número de animales al mismo tiempo (Oliveira y col., 2011). Esto ha influenciado en la notoria expansión del uso de la IA en ganado de carne, así también como la aplicación de nuevas biotecnologías como la IATF (Bó, 2012b).

7.3 Inseminación artificial a tiempo fijo (IATF).

Desde que Pursley y col. (1995) describieron en ganado lechero, y en ganado de carne, (Kastelic y col. 1990a; Ko y col.1991; Adams y col. 1992 y Bó y col. 1995) que era posible inducir el recambio folicular y la emergencia de una nueva onda para lograr la ovulación de una manera programada, la IATF ha sido una herramienta importante para el manejo reproductivo. Dentro de las biotecnologías reproductivas, la IATF es la que ha tenido un aumento más contundente en los países de la región, principalmente en Argentina, Brasil y Uruguay en los últimos 15 años (Menchaca y col., 2013, Baruselli y col., 2015 y Bó y col., 2015). Esto sin duda se explica por las ventajas que esta técnica trae consigo cuando es aplicada de manera correcta y acompañada con buenos planes de nutrición y sanidad (Bó, 2012b). El tratamiento del anestro posparto y el no tener que detectar celo fueron descritos anteriormente como virtudes de un programa de IATF, pero además de estas hay ventajas que se obtienen al aplicar IATF que creemos que merecen ser mencionadas. En primer lugar, la posibilidad de incluir a las vacas con cría dentro de un plan de IATF gracias a alternativas de manejo que no eran factibles hasta el año 2000 cuando la IATF estaba prácticamente reducida a vaquillonas (Bó y col., 2016). Otra, es que maximiza la incorporación de animales de alto valor genético produciendo un progreso genético más rápido y programado en comparación a una selección dirigida sin la aplicación de la técnica (Bó, 2012b). Y una ventaja con importancia económica es que produce un acortamiento de la temporada de servicios, dando como resultado un mayor número de terneros al destete promediando un mayor peso de los mismos. Por esos efectos se reflejan aumentos de productividad que oscilan entre un 10-40% (Quintans, 2000). Esto probablemente sea consecuencia de que en el primer día de servicio se tiene, en promedio, un 50% de las hembras preñadas (Bó, 2012b), lo cual es un buen resultado si se tiene en cuenta que esto se logra solo en un día y en hembras en anestro (Menchaca y col., 2013).

Como se mencionó en la introducción de este trabajo, Menchaca y col (2005) realizaron una evaluación de 11 predios ganaderos de Uruguay en un análisis retrospectivo de 21.329 vacas, encontrando que al iniciar la temporada de servicios

aproximadamente el 80% de las vacas con cría entre 60 a 90 días posparto se encontraban en anestro (entre un 20-40% estaban en anestro profundo) y con una condición corporal menor a 4,5 en la escala de 1 a 8. Con esta realidad los tratamientos sobre los que se ha trabajado son aquellos que permiten inducir la ovulación (Menchaca y col, 2013). Un aspecto importante en la aplicación del tratamiento es el conocimiento de la tasa ovulatoria, es decir, la cantidad de animales que ovulan del total de animales que fueron tratados (Bo, 2012b). Según Bó y col. (2016) existen dos tipos de protocolos de IATF que se utilizan comúnmente en rodeos de carne; protocolos en base a GnRH y en base a estrógenos y progesterona.

La elección de los distintos tratamientos a utilizar está influenciada por la disponibilidad de las hormonas en determinados países. Por ejemplo, los protocolos basados en estradiol son mayormente utilizados en Sudamérica y en Australia, mientras que los basados en GnRH son empleados en Norteamérica, Europa y Nueva Zelanda, donde el estradiol no está disponible (Bó y col., 2016). Desde el punto de vista biológico, el uso de estradiol y progesterona es más eficaz que la GnRH para sincronizar la emergencia de una onda folicular, y por lo tanto es el tratamiento más indicado para realizar una IATF (Bó 2012b).

7.4 Tasa ovulatoria y momento de la ovulación con distintos protocolos hormonales.

Como fue mencionado, diversas combinaciones hormonales son utilizadas en la actualidad para lograr la sincronización e inducción de la ovulación con el objetivo de realizar IATF.

-Tratamientos a base de estradiol.

La combinación de Estradiol y progestágenos ha sido utilizada ampliamente en tratamientos durante muchos años en sincronización de estros en ganado de carne (Shemesh y col. 1997). La administración de Benzoato de estradiol (EB) al momento de la inserción del dispositivo (día 0) produce la atresia del folículo dominante e induce la emergencia de una nueva onda folicular 4 días más tarde (Bó y col 1995), y esto evitaría que al día de la remoción del dispositivo (día 7 u 8) estén presentes folículos envejecidos. Esto permite que prácticamente todas las vacas alcancen el desarrollo folicular ovulatorio en un período muy similar (Bo y col 2002; Martínez y col., 2005). Estos tratamientos luego de sincronizar la emergencia de una nueva onda folicular requieren el uso de un inductor de la ovulación. En los primeros años para este fin se administraba una dosis de 1 mg de EB a las 24 horas del retiro del dispositivo, lo que permite sincronizar aún más el pico de LH y la ovulación, pero con la desventaja de tener que encerrar los animales una vez más. Con el fin de eliminar

ese encierro extra, una de las principales alternativas evaluadas en varios experimentos, fue adelantar la administración del EB al día del retiro, sin embargo, los resultados en las tasas de preñez no han sido convincentes, con resultados a favor y en contra (Cesaroni y col., 2000; Sorroarain y col., 2005 respectivamente). Una opción diferente es la aplicación de GnRH a las 48h luego del retiro, en la mañana del día de la inseminación, de esta manera el rodeo queda encerrado para recibir la IATF en la tarde del mismo día (Menchaca y col. 2013). De acuerdo con estos autores, esta alternativa fue utilizada durante varios años en Uruguay principalmente en vaquillonas. Una alternativa más atractiva y desarrollada más tarde, fue la utilización de otro éster de estradiol que difiere del EB por su vida media más prolongada, este es el cipionato de estradiol (ECP). Al tener una vida media más prolongada es posible administrarlo al día del retiro del dispositivo sin modificar el momento de la ovulación, simplificando el manejo del rodeo (Menchaca y col., 2013) y sin afectar los porcentajes de preñez (Colazo y col., 2003; Bó y col., 2013). Este tratamiento ha sido incorporado en los últimos tiempos a los programas de IATF en los países de la región (Menchaca et al., 2013).

Otro aspecto a tener en cuenta según el inductor que optemos por utilizar es el momento en que se induce la ovulación, ya que nos va a determinar el horario de inseminación. Uslenghi y col. (2013) observó que el 95%(19/21) de las vacas tratadas con EB a las 24 horas del retiro del dispositivo ovularon entre las 54 y 66 h, mientras que el 89%(17/19) de las tratadas con ECP al día del retiro ovularon entre las 42 y 78 h. Sin embargo, aún existe poca información vinculada a las características del folículo ovulatorio, momento de ovulación y características del CL generado con el uso de ECP.

-Tratamientos a base de GnRH.

La administración de GnRH al iniciar un tratamiento para IATF producirá la ovulación del folículo dominante, en el caso que haya uno presente, emergiendo una nueva onda folicular 1,5 a 2 días post ovulación (Bó 2012b). El tratamiento denominado Ovsynch consiste en la aplicación de una dosis de PGF2 α 7 días después de la primer GnRH, y una segunda dosis de GnRH 2 días después con la IATF 12-18 h más tarde (Pursley y Wiltbank, 1995), o como variante se administra la GnRH al momento de la IA (Geary y col., 2001). La emergencia de una nueva onda folicular al iniciar el tratamiento es causada solamente cuando se da la ovulación frente a la primer GnRH (Martínez y col., 1999), y la eficacia para esto es baja, ya que tanto en ganado lechero como en ganado de carne no se da en un alto porcentaje. Siendo en ganado de leche entre un 26 a un 56% (Martínez y col., 1999; Colazo y Ambrose, 2011) y en ganado de carne entorno al 60% (Small y col., 2009). La utilización de un dispositivo liberador de progesterona en un protocolo Co-synch de 7 días ha dado buenos resultados de preñez tanto en vaquillonas como en vacas de carne (Martínez y col., 1999b; Martínez y col., 2002). En general, la menor eficacia de la GnRH

comparada con la combinación de estradiol y progesterona en inducir el recambio folicular y sincronizar la emergencia de una nueva onda, hacen que los tratamientos con GnRH no sean los protocolos de elección cuando existe la posibilidad de usar otra alternativa.

7.5 Efecto de la progesterona sobre el reconocimiento materno de la gestación.

Uno de los registros importantes que se debe tener para manejar una buena eficiencia reproductiva es el porcentaje de pérdidas entre el servicio de las hembras y el diagnóstico de preñez. Según Bavera (2000) en ese intervalo es donde se encuentra el mayor número de pérdidas, tomando como un total desde que las vacas son servidas hasta el destete de los terneros. Las pérdidas de gestación pueden deberse a causas hormonales, nutricionales, enfermedades infecto-contagiosas, entre otras. Pero la causa más frecuente es por muerte embrionaria, la que se da comúnmente alrededor del día 16 de gestación, justo cuando ocurre el reconocimiento materno de la gestación (RMG) (Binelli y col., 2001). A pesar de que la mayoría de las pérdidas embrionarias se dan en las primeras semanas de gestación, como fue explicado previamente, la muerte embrionaria abarca todas aquellas pérdidas que ocurren entre la fertilización y la finalización de la fase de diferenciación cuando el embrión comienza a transformarse en feto aproximadamente en el día 42 de gestación (Bó, 2012a). El porcentaje de concepción en bovinos se encuentra generalmente entre 85-90% y las pérdidas embrionarias en vacas de carne son estimadas entre 29-39% (Roche y col., 1981; Dunne y col., 2000). Las pérdidas fetales por causas no infecciosas o nutricionales que ocurren posteriormente y se evidencian en un aborto, son de menor magnitud que las pérdidas embrionarias, aunque también afectan la eficiencia reproductiva. Con estos porcentajes de pérdidas de gestación en la etapa embrionaria, se justifica plenamente conocer en profundidad los mecanismos que actúan en el RMG con el fin de encontrar alternativas que ayuden a detectar sus fallas y posibles soluciones.

El RMG es un proceso fisiológico en el cual el embrión por medio de señales moleculares informa su presencia dentro del tracto reproductivo de la hembra (Spencer, 1998). En el cuarto día luego de la fecundación se produce la activación del genoma embrionario y el comienzo de la diferenciación celular en dos poblaciones. Las células que van a dar origen al embrión (embrioblasto) y las células encargadas del RMG y la placentación (trofoectodermo) (Gjorret y col., 2003). La progesterona es la hormona de la gestación por excelencia, y su principal fuente de producción en la vaca es el CL. En esta especie la gestación es dependiente del CL durante los 120 días luego de la fertilización. Luego del día 120 la progesterona secretada por la placenta es suficiente para mantener la gestación en ausencia de un CL (Bó, 2012a). En el día 5-6 postestro los niveles de progesterona son

aproximadamente de 5ng/ml, a partir de este momento se identifica un CL funcional y la producción de progesterona se mantiene en esos niveles si la madre logra reconocer el embrión, en su defecto, la producción de progesterona va a concluir por medio del mecanismo de luteolisis (Serrano, 1997). La progesterona producida en los primeros 10 días postestro posee la capacidad de inhibir la luteolisis de manera indirecta. Primero se adjudicó que esto se debe a que la unión de la progesterona con su receptor impide la unión del estrógeno con su receptor, lo que es necesario para el mecanismo de síntesis de PGF2 α , una de las principales hormonas que actúan en la luteolisis (Demmers y col., 2001). Posteriormente, Spencer y col. (2004) demostró que una exposición continua del endometrio a la progesterona tiene como resultado la saturación de sus receptores entre los días 11-12. Es en este momento que el estradiol producido por el folículo dominante puede interactuar con sus receptores e inducir la síntesis de receptores de oxitocina. Cuando la oxitocina circulante se une a sus receptores va a promover que el útero comience a secretar pulsos de PGF2 α (Bó, 2012a). La PGF2 α llega hasta el CL mediante un mecanismo de contracorriente entre la vena uterina y la arteria ovárica, estimulando la producción de oxitocina por el propio CL, lo que va a establecer un *feedback* positivo con el endometrio uterino que va a secretar aún más oxitocina (Ginther y col., 1996b; Bó, 2012a).

Durante los días 15 al 17 del ciclo estral es cuando se produce la luteolisis en el caso de que el embrión no sea reconocido. Por lo tanto, el propio embrión juega en ese momento un papel importante para garantizar los procesos luteoprotectores, mediante la modulación de la producción de PGF2 α y prostaglandina E2 (PGE2) en el endometrio. Esta última debe estar aumentada con respecto a los niveles de PGF2 α , favoreciendo los efectos luteoprotectores que posee (Tithof y col., 2007; Weems y col., 2006; Fortier y col., 1988). La acción antiluteolítica del embrión bovino se ejecuta por medio de una o varias proteínas que inhiben la secreción de PGF2 α por el útero, la más importante de ellas parece ser el interferón tau (INF-t) (Spencer, 2004). Este es producido en los ruminantes ungulados por las células trofoectodérmicas del embrión, se secreta en altas cantidades entre los días 13 al 17 permaneciendo los niveles altos hasta el día 27-28 de gestación (Arosh y col., 2004; Tithof y col., 2007 y Bo, 2012b). Una respuesta adecuada del endometrio ante el INF-t es disminuir la síntesis y secreción de los pulsos de PGF2 α y aumentar la secreción de PGE2. Una de las principales causas de muerte embrionaria es que esa respuesta ocurra de un modo inadecuado (Spencer y col., 2004; Roberts y col., 2008).

La cantidad de progesterona secretada por el CL en las primeras semanas de gestación es esencial en el proceso de adaptación del ambiente uterino para la nutrición del embrión. Y junto con el estradiol actúan como reguladores sistémicos, llevando a cabo algunos eventos necesarios en el oviducto y endometrio para la regresión del CL, en el caso que la comunicación entre el embrión y el útero no sea la adecuada (Robinson y col., 2001). Las causas de una baja sobrevivencia

embrionaria pueden ser muchas y variadas, pero la concentración de progesterona circulante en la fase luteal temprana y media va a ser un factor determinante en la retención de la preñez. Niveles de la hormona por debajo de los valores óptimos en esa etapa van a traer consigo baja fertilidad en rumiantes (Lonergan y Forde, 2015). Ha sido demostrado por varios autores que el aumento de la progesterona crea un ambiente uterino más beneficioso para el concepto, y esto se ve reflejado en un mayor desarrollo y elongación del mismo. Esto trae como consecuencia una mayor secreción de IFN-t que, como fue explicado previamente, participa de manera favorable en el reconocimiento materno de la preñez (Mann y Lamming, 2001; Santos y col, 2004; Stronge y col., 2005; McNeill y col., 2006; Ergene, 2012; Lonergan y col, 2015).

Geisert y col (1992) y Garret y col. (1988) demostraron, mediante la administración de progesterona exógena antes del día 6 de gestación en vacas lecheras, el aumento de la actividad biosintética del concepto al día 14. Mann y Lamming (1999) con un experimento similar informaron que las tasas de concepción eran mayores posiblemente debido a la propiedad de la progesterona de estimular la producción de varias proteínas endometriales y factores de crecimiento. Kerbler y col. (1997) observaron que aquellas vacas con mayores niveles de progesterona en la primera quincena luego de la inseminación, tuvieron blastocistos más desarrollados y que produjeron más IFN-t, y por lo tanto mayores posibilidades de establecer la preñez de manera exitosa. Esto fue ratificado por Mann y Lamming en el 2001. Estos datos indican que la disponibilidad de la progesterona en el diestro temprano aumenta las tasas de concepción y la supervivencia embrionaria (Santos y col, 2004).

Con esta vasta información es posible hipotetizar que la utilización de estradiol como inductor de la ovulación beneficiaría la tasa de ovulación en bovinos, sin afectar la función luteal siguiente. Lo que permitiría mayores tasas de concepción sin aumentar las pérdidas embrionarias en la gestación temprana.

Con esta amplia información acerca de la función de la progesterona sobre el RMG, aquel tratamiento que utilizemos como inductor de la ovulación en vacas en anestro, debe asegurar además concentraciones sistémicas de progesterona adecuadas luego de la ovulación para evitar pérdidas embrionarias en esta etapa.

8 HIPÓTESIS

La utilización de cipionato de estradiol (ECP) en tratamientos de IATF impacta favorablemente sobre la tasa ovulatoria y la sincronización de la ovulación, sin afectar el tamaño del folículo ovulatorio, el desarrollo del CL y las concentraciones séricas de progesterona.

9 OBJETIVOS

9.1 Objetivos generales

Evaluar el efecto del tratamiento con ECP en un protocolo de IATF sobre el folículo preovulatorio y el posterior desarrollo luteal en vacas de cría en anestro posparto.

9.2 Objetivos específicos

Establecer el efecto de diferentes dosis de ECP sobre:

- Diámetro folicular.
- Momento de la ovulación.
- Tasa ovulatoria.
- Desarrollo del cuerpo lúteo.
- Concentraciones de progesterona en sangre.

10 MATERIALES Y METODOS

Animales y manejo

El experimento fue llevado a cabo en el mes de enero del año 2015 en el establecimiento ganadero "San Sebastián" ubicado en el departamento de Florida-Uruguay (34° LS, Florida, Uruguay). La alimentación de los animales durante el experimento fue sobre pasturas de campo natural con agua *ad libitum*. Se seleccionaron 45 hembras multíparas cruce Angus por Hereford con una condición corporal (CC) promedio de 3,5. Para estimar la condición corporal se utilizó la escala de 1 a 8 propuesta por Vizcarra y col. (1986) en la cual 1 es un animal emaciado y 8 un animal obeso. Las vacas se encontraban con cría al pie y con un periodo posparto entre 60 y 90 días (Figura 1). El total de las hembras del experimento se encontraba en anestro, determinado mediante dos exámenes por ultrasonografía transrectal con 10 días de intervalo, descartando aquellos animales que tuvieran CL. Todas las técnicas y procedimientos (inyecciones, colocación de dispositivos intravaginales, extracción de muestras de sangre, ultrasonografía ovárica) llevados a cabo en el experimento fueron aprobados por el Comité de Ética en el Uso Animal (CEUA) de la Fundación IRAUy, certificado por la Comisión Nacional de Experimentación Animal del Uruguay (CNEA).

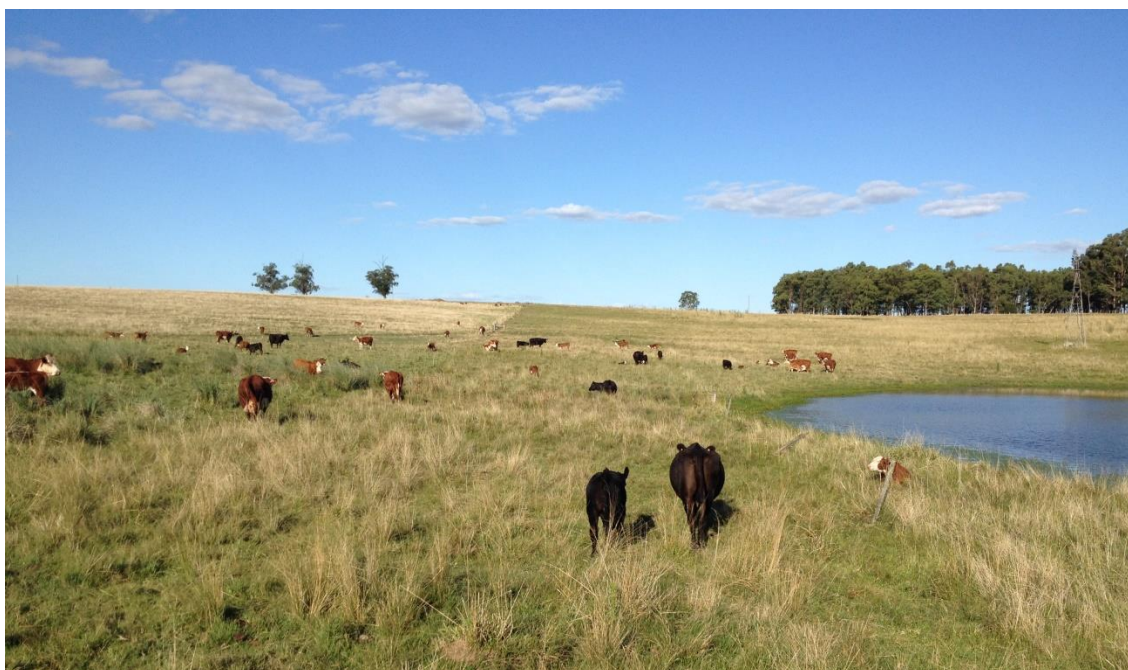


Figura 1. En esta imagen se pueden observar los animales con los que se trabajó, en el potrero que se encontraban.

Grupos experimentales.

El diseño experimental consistió en realizarles a los 45 animales previamente seleccionados, un tratamiento para IATF fundamentado por Menchaca y col (2013). El mismo consiste en la aplicación de un dispositivo con 0,5 g de progesterona (DIB® 0,5g, Syntex, Buenos Aires, Argentina) asociado con 2mg de BE por vía intramuscular (im) (Benzoato de Estradiol®, Syntex, Buenos Aires, Argentina). En este mismo día se les colocaron tablillas nasales a todas las crías de las hembras seleccionadas.

Siete días luego de haber colocado los dispositivos se procedió a su retiro conjuntamente con una aplicación de 400 UI de eCG (Novormon®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) y 500 µg de D (+) cloprostenol (Ciclase® DL, Syntex, Buenos Aires, Argentina). En este momento los animales fueron asignados a 3 grupos con 15 animales cada uno por bloques al azar considerando la CC.

- Grupo 1mg. Se les administró 1 mg de ECP (Cipiosyn®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) por vía IM al retirar el DIB.
- Grupo 0,5mg. Se les administró 0,5 mg de ECP por vía IM al retirar el DIB.
- Grupo control. A los animales de este grupo no se les administró ECP.

Ultrasonografía (US) de ovario.

Para la adaptación de los animales a los procedimientos y maniobras y el entrenamiento de los técnicos se realizaron ecografías diariamente por un periodo de 15 días previos al inicio del experimento.

Desde el día del retiro del DIB se llevó a cabo la visualización de las estructuras ováricas mediante un ecógrafo. El equipo fue un ecógrafo (WED-9618, Well.D, Shenzhen, China), provisto de un transductor lineal de 7,5 MHz. Con las vacas inmovilizadas en un cepo se procedió a hacer la ecografía transrectal registrando las estructuras ováricas presentes. Hasta el momento de la ovulación se realizó la ecografía cada 12 h, con un registro individual para cada animal mediante un mapeo con la ubicación relativa de las estructuras observadas en cada ovario. La ovulación fue definida como el momento que se dejó de observar el folículo de mayor diámetro, confirmándose con una nueva ecografía 12 h más tarde. Luego de la ovulación se procedió con el monitoreo de las estructuras una vez por día por los siguientes 14 días. Cada vez que se hizo la ecografía fue grabado un video para cada ovario con el fin de una mejor apreciación y posterior interpretación de las imágenes. El área del CL fue calculada con las medidas del diámetro mayor y menor de la estructura, tal como reportó Kastelic y col. (1990b).

Obtención de muestras sanguíneas y determinaciones hormonales

Desde el momento considerado como la ovulación los animales fueron sangrados 1 vez al día entre las 7 y las 9 am con el fin de determinar la concentración diaria de progesterona. Por los 14 días posteriores a la ovulación se procedió a obtener 10 ml de sangre de la vena yugular, luego centrifugadas a 3000 RPM por 20 minutos para extraer el suero. Las muestras de suero fueron congeladas a -20 °C para su posterior análisis. Las concentraciones séricas de progesterona se determinaron por duplicado (Meikle y col., 2001) mediante la técnica de radioinmunoanálisis (RIA) en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo-Uruguay, utilizando Kits comerciales DIAsource (DIAsource ImmunoAssays SA, Rue du Bosquet, 21348 Louvain-la-Neuve - Belgium). La concentración mínima detectable fue 0,30 ng/mL y el coeficiente de variación (CV) intraensayo para los controles bajo (0.4ng/ml) y alto (3.0 ng/ml) fue 12,4% y 9,0% respectivamente. El CV inter-ensayo fue 12,9% para el control bajo y 9,4% para el control alto.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante Modelos Lineales Generalizados Mixtos (MLGM), utilizando el software estadístico InfoStat (versión 2015). En el modelo se incluyó el patrón de crecimiento del folículo dominante y las concentraciones séricas de progesterona en el tiempo. Para el análisis del folículo dominante se tomó como co-variable la medida del folículo al momento del retiro del dispositivo considerándose como hora 0 el momento de la remoción del mismo, registrándose las mediciones realizadas hasta la ovulación. Para el análisis del volumen del cuerpo lúteo y concentración sérica de progesterona se consideró como Día 0 al día de la ovulación y se tomaron las mediciones realizadas hasta el Día 14. Fue definido el momento de la ovulación cuando se dejó de observar el folículo dominante. El modelo incluyó los factores tratamiento, día y su interacción. Se utilizó como variable aleatoria el número de identificación de cada animal. Cuando se detectaron efectos significativos de tratamiento o su interacción se utilizó la diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher (alfa=0,05) para comparar las medias entre los grupos para cada día por el test de LSD. Los resultados son presentados como media \pm SEM y las diferencias significativas cuando $P < 0,05$, y tendencia cuando $P < 0,1$.

11 RESULTADOS

Tabla 1. Respuesta ovárica (Media \pm E.E.) en vacas con cría al pie sometidas al tratamiento Convencional, difiriendo la dosis del inductor de la ovulación (ECP) en 0,5mg; 1mg; y el grupo control sin ECP.

| Variable | Tratamiento | | |
|--|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | CONTROL | 0,5 mg ECP | 1mg ECP |
| N.º de vacas | 15 | 15 | 15 |
| Tasa ovulatoria (%) | 73 ^a | 100 ^b | 86 ^b |
| N.º de ovulados/total | 11/15 | 15/15 | 13/15 |
| Diámetro del folículo ovulatorio(mm) | 15,24 \pm 0,26 ^b | 14,92 \pm 0,22 ^a | 13,98 \pm 0,24 ^{ab} |
| Intervalo retiro DIB a la ovulación (h) | 69,1 \pm 2,9 ^a | 67,7 \pm 2,5 ^a | 58,7 \pm 2,7 ^b |
| Crecimiento del folículo ovulatorio (mm/día) | 1,2 ^a | 1,1 ^a | 0,8 ^b |

La tasa ovulatoria no mostró diferencias significativas entre los grupos, sin embargo, hubo una tendencia ($P=0,06$) a favor de las vacas que recibieron ECP vs las que no recibieron (Tabla 1). En cuanto al diámetro del folículo en el momento de la ovulación se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, siendo mayor el diámetro del folículo ovulatorio del grupo no tratado y el que recibió 0,5 respecto de los animales tratados con 1 mg de ECP (Tabla 1). Por su parte el crecimiento del folículo ovulatorio fue menor en el grupo que recibió 1 mg de ECP. (1,2mm/día en el grupo control; 1,1 en el grupo 0,5 y 0,8 en el grupo de 1mg). El intervalo entre el retiro del dispositivo y la ovulación fue menor con 1mg de ECP que en el grupo de 0,5mg o en el que no recibió ECP. El 15% (2/13) de las vacas tratadas con 1mg ovularon a las 47h, mientras que en el grupo control no había ovulado ninguna vaca a esa hora y en el grupo de 0,5 un 7% (1/15). A las 72h el 100% (13/13) de los animales del grupo 1mg habían ovulado, sin embargo en el grupo 0,5 faltaban ovular un 13% (2/15) y en el grupo control un 9% (1/11).

El área del CL no mostró diferencias significativas a lo largo del experimento entre los tres grupos experimentales y los resultados se muestran en la Figura 2.

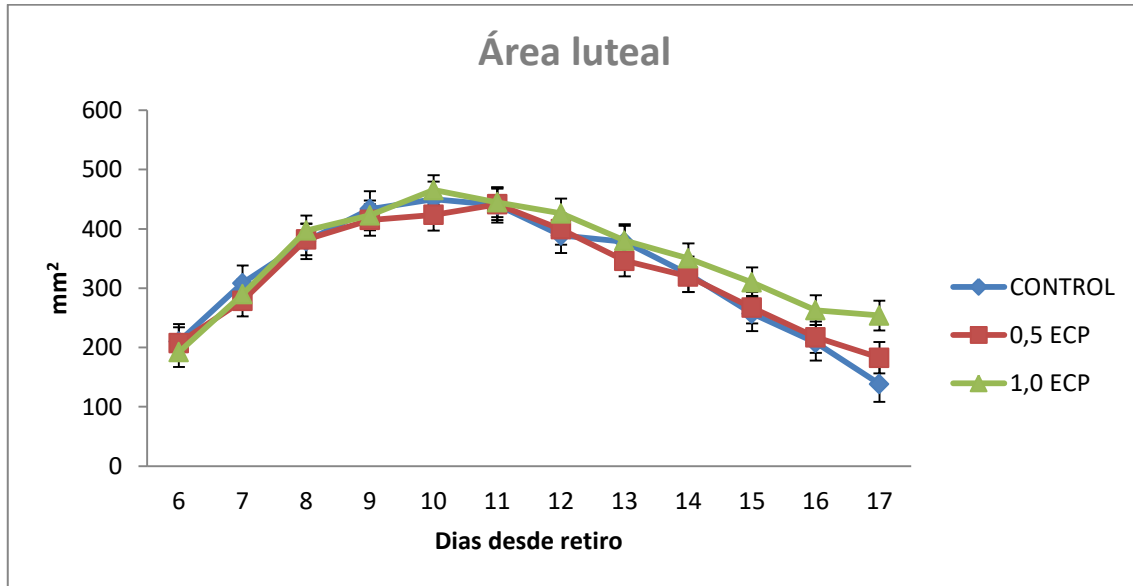
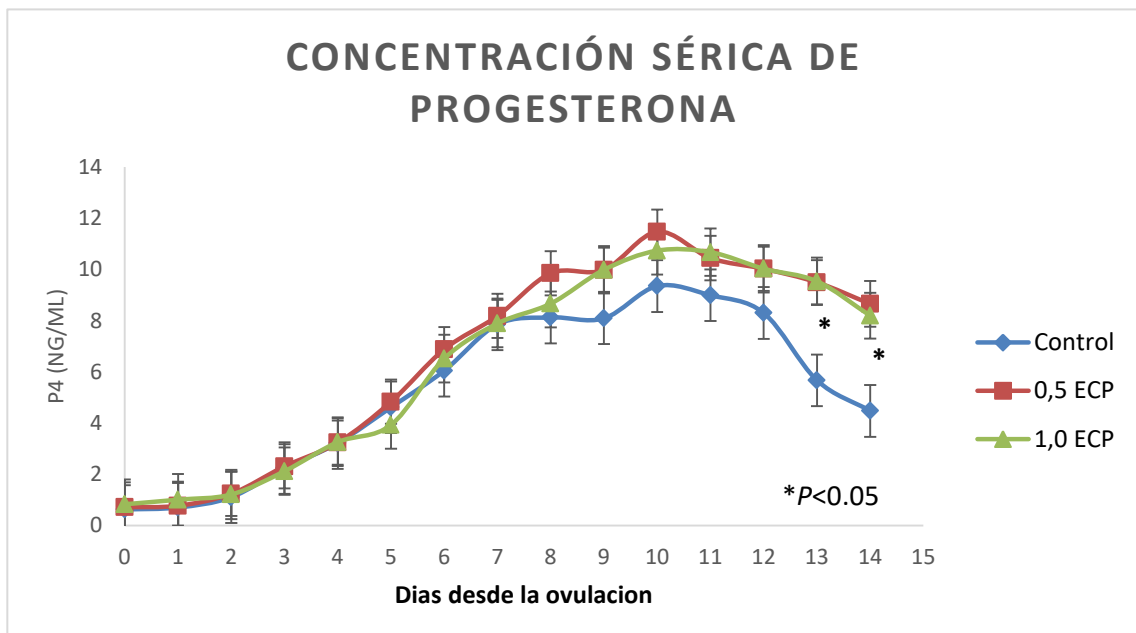


Figura 2. Volúmen luteal de los tres diferentes grupos en los días posteriores al retiro del DIB. Con un n de 11 animales en el grupo control, 15 en el de 0,5 ECP y 13 en el grupo de 1,0 ECP.



Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($P > 0,05$).

Figura 3. Concentraciones séricas de progesterona con un *n* de 11 animales en el grupo control, 15 en el de 0,5 ECP y 13 en el grupo de 1,0 ECP.

Las vacas que recibieron ECP tuvieron mayores concentraciones de progesterona durante los primeros 14 días luego de la ovulación (6.5 ± 0.2 y 6.3 ± 0.2 ng/ml vs. 5.3 ± 0.3 ng/ml con 0,5 y 1,0mg de ECP vs sin ECP, respectivamente; $P<0,05$), con un efecto significativo al día 13 y 14 después de la ovulación $P<0,05$.

12 DISCUSION

Los resultados confirmaron parcialmente la hipótesis, ya que se demostró que la utilización de ECP altera positivamente la tasa ovulatoria. Sin embargo la hipótesis acerca de que el ECP no afectaría la actividad luteal no fue confirmada debido a que las vacas tratadas con ECP mostraron mayores niveles de progesterona sérica. De igual manera no se pudo confirmar la hipótesis del tamaño del folículo ovulatorio, como muestran los resultados el diámetro del folículo ovulatorio del grupo que recibió 1 mg fue menor al de los otros 2 grupos. Con respecto al área del CL se pudo confirmar la hipótesis ya que el mismo no tuvo diferencias significativas en cuanto a su volumen.

La tasa ovulatoria no tuvo diferencias significativas entre los grupos, pero hubo una tendencia ($P=0,06$) a favor de los grupos que recibieron ECP como inductor de la ovulación (93,3%, 28/30), en comparación con el grupo que no lo recibió (73,3%, 11/15). Si bien no se encontraron trabajos diseñados para evaluar el uso de ECP como inductor de la ovulación en vacas en anestro posparto, resultados similares se obtuvieron con otros inductores y en otras categorías de hembras. Bo en 2012a en bovinos de leche obtuvo un 85% (17/20) utilizando EB como inductor y un 95% (19/20) con GnRH. En un experimento similar a este, Javier de la Mata (2016) en vaquillonas de carne tratadas con este mismo protocolo con ECP como inductor obtuvo un 100% (24/24) de animales que ovularon. La utilización de un inductor es fundamental en un protocolo de IATF para lograr una exitosa sincronización de la ovulación. El inductor debe sincronizar efectivamente el pico de LH necesario para una ovulación programada (Colazo y col., 1999). En suma, el resultado obtenido en esta tesis nos confirma la importancia de utilizar un inductor de la ovulación en los protocolos, en este caso ECP, principalmente cuando trabajamos con vacas en anestro.

Hubo diferencias significativas en el diámetro del folículo ovulatorio siendo menor en el grupo que se le administró la mayor dosis (1mg) de ECP que en los otros dos grupos. Esto coincide con los datos reportados por Colazo y col. (2003) en vaquillonas de carne utilizando el mismo protocolo que en este trabajo. El folículo dominante es capaz de ovular luego de adquirir receptores de LH, lo que ocurre en la etapa de selección, entorno al día 3 luego de la emergencia de la nueva onda folicular cuyo diámetro es de 8,5mm aproximadamente (Xu y col., 1995; Ginther y

col., 1996a). El hecho de administrar una dosis de ECP al retiro del dispositivo induce el pico del LH (Bó 2012b) y esto podría ser el motivo del adelanto en la ovulación, induciendo que el diámetro del folículo ovulatorio sea menor.

Con respecto al intervalo entre el retiro del dispositivo y el momento de la ovulación, se observó que fue significativamente más corto en los animales que recibieron 1mg de ECP vs los del grupo control y del grupo de 0,5mg. En este caso la ovulación se adelantó unas 10 h aproximadamente. Estos datos coinciden con los presentados por Uslenghi y col. (2013) con vacas secas. El 85% (17/19) de las vacas ovularon entre las 42 y 78 h. Este resultado estaría asociado a lo expuesto en el párrafo anterior, demostrando que la administración de ECP adelanta la ovulación y por lo tanto el folículo ovula con un menor diámetro. Estos datos nos indicarían que si se opta por utilizar 1mg de ECP quizás se debería adelantar la IATF aproximadamente unas 8 horas, de no hacerlo sería difícil preñar aquellos animales que ovulen primero. Normalmente el horario de IATF con estos protocolos es a las 48-54h y a la luz de estos resultados, cuando utilizamos 1 mg de ECP en ese momento ya habían ovulado el 15% de las vacas.

Las vacas que recibieron ECP tuvieron mayores concentraciones de progesterona durante los primeros 14 días luego de la ovulación, principalmente a los 13 y 14 días ($P<0,05$). Este hallazgo es difícil de explicar con la información disponible en este estudio. El volumen del CL desarrollado luego de la ovulación no mostró diferencias significativas entre los tres tratamientos. El hecho de que el tamaño del CL no sea diferente cuando sí se encontró diferencias en las concentraciones séricas de progesterona no es contradictorio ya que ambas variables indican cosas diferentes. No siempre las variables morfológicas están asociadas a la concentración de la hormona en sangre. Gutierrez y col. (1996) demostraron que la prevalencia en el tiempo de un CL estructural siempre es mayor a la prevalencia funcional del mismo. Además, cuando los niveles de progesterona en luteolisis ya han disminuido sustancialmente, la morfología del CL no alcanza a verse modificada cuando se evalúa por ultrasonografía (Kastelic y col., 1990c; Tom y col., 1998). En general, las determinaciones de progesterona por RIA son más sensibles que las medidas del CL por ecografía para determinar pequeñas diferencias en los últimos días de la fase luteal (Gutierrez y col.,1996). En suma, con estos resultados podemos asegurar que con el uso de ECP se logra un CL con un tamaño similar (y una actividad superior luego del día 13) que cuando no se utiliza ECP, hallazgo que también favorecería el uso de este inductor de la ovulación en vacas en anestro.

13 CONCLUSIÓN

La utilización de ECP como inductor de la ovulación favorece la tasa ovulatoria, promoviendo la ovulación de folículos de menor tamaño que cuando no se utilizó el inductor. A pesar de la disminución del folículo ovulatorio, la administración de ECP no tuvo efecto sobre el volumen del CL e incrementó las concentraciones séricas de

progesterona. Cuando la administración de ECP fue 1 mg, también se adelantó la ovulación de manera significativa, lo que nos indicaría que si optamos por esta dosis quizás se debería adelantar la IA para no inseminar animales en los que ya ocurrió la ovulación.

14 BIBLIOGRAFÍA

1. Adams GP; Matteri RL; Kastelic JP; Ko JCH; Ginther OJ. (1992). Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*. 94: 177-188.
2. Arosh JA.; Banu, SK.; Kimmins, S.; Chapdelaine, P.; Maclaren, LA.; Fortier, MA. (2004). Effect of interferon -Tau on prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling at the time of maternal recognition of pregnancy in cattle: evidence of polycrine actions of prostaglandin E2. *Endocrinology*. 145(11):528-533.
3. Baruselli PS., Marques MO., Reis EL., Bó GA. (2003). Tratamientos hormonales para mejorar la performance reproductiva de vacas de cría en anestro en condiciones tropicales. 5to Simposio Internacional de Reproducción Animal. Huerta Grande, Córdoba. Pag. 103-116.
4. Baruselli PS., Vieira LM., Sa Filho MF., Marques MO. (2015). Resynchronization programs in beef and dairy cattle. *Proceedings of the XI symposium on Animal Reproduction*. Institute of Animal Reproduction Córdoba. Córdoba, Argentina: p.235-256.
5. Bavera G. A. (2000). Producción, pérdidas o merma y porcentajes. Curso de Producción Bovina de Carne. Textos. Río Cuarto, UNRC. FAV. Disponible en <http://www.producción-animal.com.ar> Fecha de consulta: 13 setiembre 2016.
6. Binelli M., Thatcher W. W., Mattos R., Baruselli P. S. (2001). Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology*, 56;9: 1451-1463.
7. Bó G.A., Baruselli P.S., Mapletoft R.J. (2013). Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. *Animal Reproduction* 10: 137-142.
8. Bó G.A., Cutaia L., Tribulo R. (2002). Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos para carne: algunas experiencias realizadas en Argentina. *Segunda Parte. Taurus*; 15: 17-32.
9. Bó G.A.; Adams G.P.; Pierson R.A.; Mapletoft R.J. (1995). Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*; 43:31-40.
10. Bó GA. (2012a). Fisiología de la vaca. Córdoba, IRAC, 249p.
11. Bó GA. (2012b). Control farmacológico del Ciclo Estral y Sistemas de IATF en carne y leche. Córdoba, IRAC, 273p.
12. Bó GA., de la Mata JJ., Huguenine H., Menchaca A. (2015). Alterations to the conventional protocols for synchronization of ovulation in beef cattle. *Proceedings of the first Latin-American Society of Animal Reproduction*, Buenos Aires, Argentina: p.33-46.
13. Bó, G.; Huguenine, E.; Menchaca, A. (2016) .Control farmacológico del ciclo estral para IATF en vacas de cría: estado del arte. *Jornadas Taurus*. 7:76-94.
14. Braden, TD; Gamboni, F and Niswender, GD (1988). Effects of prostaglandin F-induced luteolysis on the populations of cells in the ovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*. 39:245-253.

15. Britt, JH; Howard HJ. (1989). Endocrinology and physiology of corpus luteum function in cattle. Embryo transfer workshop, University of Saskatchewan. Saskatchewan, Canadá p.30-39.
16. Cesaroni, G., Butler, H., Mc Dermott, E., Cano, A. (2000). Preñez de vaquillonas inseminadas a tiempo fijo después de un tratamiento con CIDR asociado con GnRH o con benzoato de estradiol aplicado 0 o 24 hs postratamiento. *Jornadas Taurus*; 6:20-25.
17. Colazo M. G.; Sefchek M., Illuminati, H., Meglia, G., Schmidt, E., Bó, G. A. (1999). Fixed-time artificial insemination in beef cattle using CIDR-B devices, progesterone and estradiol benzoate. *Theriogenology*, 51(1): 404.
18. Colazo M.G, Kastelic J.P., Mapletoft RJ (2003). Estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDRB-based, fixed-time AI programs in beef heifers. *Theriogenology* 60: 855–865.
19. Colazo MG., Ambrose DJ. (2011). Neither duration of progesterone insert nor initial GnRH treatment affected pregnancy per timed-insemination in dairy heifers subjected to a cosynch protocol. *Theriogenology*; 76:578-588.
20. Cutaia L., Veneranda G., Bó G. (2003). Análisis de costo beneficio: programas de inseminación artificial a tiempo fijo y servicio natural. Disponible en: https://www.abspecplan.com.br/upload/library/Analise_costo_beneficio_IATF_monta_natural.pdf . Fecha de consulta: 28 de enero del 2017.
21. de la Mata, J. J. (2016). Prolongación del proestro y reducción del período de inserción del dispositivo con progesterona en vaquillonas para carne inseminadas a tiempo fijo. Tesis Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba, 55p.
22. Demmers KJ, Derecka K, Flint A. (2001). Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction*; 121:41-49.
23. Dieleman SJ., Bevers MM., Van Tol H T M., Willemse A H. (1986). Peripheral plasma concentrations of oestradiol, progesterone, cortisol, LH and prolactin during the oestrous cycle in the cow, with emphasis on the peri-oestrous period. *Animal Reproduction Science*, 10(4): 275-292.
24. Diskin, M.G., Morris, D.G., (2008). Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*. 43 (Suppl 2): 260–267.
25. Ergene, O. (2012). Progesterone concentrations and pregnancy rates of repeat breeder cows following post insemination PRID and GnRH treatments. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Science*. 36: 283–288.
26. Fortier, MA. Guilbault, LA.; Grasso, F. (1988). Specific properties of epithelial and stromal cells from the endometrium of cows. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1:239-248.
27. Garrett, J.; Geisert, R.; Zavy, M.; Morgan, G. (1988) Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *Reproduction*. 84: 437–446.

28. Geary TW., Whittier JC., Hallford DM., MacNEIL MD. (2001). Calf removal improves conception rates to the ovsynch and Cosynch protocols. *Journal of Animal Science*; 79: 1-4.
29. Geisert, R.D., Morgan, G.L., Short, E.C., Zavy, M.T. (1992). Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. *Reproduction Fertility and Development*. 4, 301–305.
30. Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. (1996a) Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod*;55:1187–9
31. Ginther, OJ; Kot, K; Kulick, LJ; Martin S; Wiltbank, MC. (1996b). Relationship between FSH and ovarian follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*. 108: 271-279.
32. Gjørret JO, Knijn HM, Dieleman SJ, Avery B, Larsson LI., Maddox-Hyttel P. (2003). Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Biology of Reproduction*. 69:1193-11200.
33. Gutierrez A C., Zarco L., Galina C S., Rubio I., Basurto H. (1996). Predictive value of palpation per rectum for detection of the CL in Zebu cattle as evaluated by progesterone concentrations and ultrasonography. *Theriogenology*. 46:471-479.
34. Inforzatto G.R.; Santos W.R.M.; Climeni B.S.O.; Dellalibera F.L.; Filadelpho A.L. (2008). Emprego de IATF (Inseminação Artificial em Tempo Fixo) Como Alternativa na Reprodução da Pecuária de Corte. *Revista Científica de Medicina Veterinária* 6-11.
35. Ireland, JJ; Roche, JF. (1987). Hypotheses regarding development of dominant follicles during a bovine estrous cycle. p1-18.
36. Kastelic JP, Ko JCH., Ginther OJ (1990a). Suppression of dominant and subordinate ovarian follicles by a proteinaceous fraction of follicular fluid in heifers. *Theriogenology*; 34:499-509.
37. Kastelic JP, Pierson RA, Ginther OJ. (1990b) Ultrasonic morphology of corpora lutea and central luteal cavities during the estrous cycle and early pregnancy in heifers. *Theriogenology*;34:487–498.
38. Kastelic, J.P., Bergfelt, D.R., Ginther, O.J., (1990c). Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology*. 33 (6): 1269-1278.
39. Kerbler, T.L., Buhr, M.M., Jordan, L.T., Leslie, K.E. Walton, J.S. (1997). Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology* 47: 703-714.
40. Ko JCH, Kastelic JP, Del Campo MR., Ginther O.J. (1991). Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers.; *Journal of Reproduction and Fertility* 91:51 I-519.
41. Lonergan P, Forde N. (2015). The role of progesterone in maternal recognition of pregnancy in domestic ruminants. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*, 216: 87-104.

42. Mann, G.; Lamming, G. (2001) Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction*. 121: 175–180.
43. Mann, G.E., Lamming, G.E. (1999). The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*. 34, 269–274.
44. Martínez MF., Adams GP., Tatcher WW., Bergfelt D., Kastelic JP., Mapletoft RJ. (1999). Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in heifers. *Animal Reproduction Science* 57: 23-33.
45. Martínez MF., Kastelic JP., Adams GP., Cook RB., Olson WO., Mapletoft RJ. (2002) The use of progestins in regimens for fixed time artificial insemination in beef cattle. *Theriogenology*; 57:1049-1059.
46. Martínez MF., Kastelic JP., Bó G.A., Caccia M., Mapletoft RJ. (2005). Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. *Animal Reproduction Science* 86: 37-52.
47. Menchaca A., Núñez R., Wijma R., Pintos C. G., Fabini F., De Castro T. (2013). Cómo mejorar la fertilidad de los tratamientos de IATF en vacas Bos Taurus. *Simposio Internacional de Reproducción Animal. X. Córdoba, Argentina*. p. 103-134.
48. Menchaca A; Castro Teresa de; Alvarez M; Chifflet N.(2005). Uso combinado de IATF y destete precoz en vacas de cría en anestro posparto. XXXIII Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay, p 193-194.
49. MGAP-DIEA (2014) Anuario estadístico Agropecuario, Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-anuario-2014,O,es,0>. Fecha de consulta: miércoles 15 de junio del 2016.
50. Montiel, F., Ahuja, C. (2005). Body condition and suckling as factors influencing the duration of postpartum anestrus in cattle. *Animal Reproduction Science*, 85(1): 1-26.
51. Niswender G.D., Juengel J.L., McGuire W.J. (1994) the estrous cycle and early pregnancy *Biology of Reproduction*. 50: 239-245.
52. Ohtani M., Kobayashi S., Miyamoto A., Hayashi K., Fukui Y. (1998). Real-time relationships between intraluteal and plasma concentrations of endothelin, oxytocin, and progesterone during prostaglandin F₂α-induced luteolysis in the cow. *Biology of reproduction*, 58(1): 103-108.
53. Oliveira L. Z., Martins Hossepian de Lima V. F., Oliveira C. S., Alves B. G., Graff H. B., dos Santos R. M. (2011). Fertility rates following fixed-time artificial insemination in dairy heifers in a practical progesterone-based protocol. *Acta Scientiae Veterinariae*, 39(2): 1-6.
54. Pursley J. R., M. O. Mee, M. C. Wiltbank. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂α and GnRH. *Theriogenology*; 44: 915-923.
55. Quintans, G, (2000). Estrategia para acortar el anestro posparto en vacas de carne. INIA serie técnica número 108, 68 p. Disponible en:

www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/2461/1/14445110314103131.pdf.

Fecha de consulta: 29 de Enero del 2017.

56. Roberts, RM.; Yizhen, C.; Toshihiko, E.; Anyizhen, C.; Toshihiko, E.; Angela, MW. (2008). Interferons and the Maternal conceptus dialog in mammals. Review. *Seminars in Cell y Developmental Biology*. 19:170-177.
57. Robinson, RW. Mann, GE. Lamming, GE., Wathes, DC. (2001). Expression of oxytocin, estrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the estrus cycle and pregnancy in cows. *Reproduction* 122: 965–979.
58. Roche, JF. Boland, MP.; McGeady, TA.; (1981). Reproductive wastage following artificial insemination in cattle. *Veterinary Record*. 109: 95-97.
59. Roche, JF., Boland, MP. (1991). Turnover of dominant follicles in cattle of different reproductive states. *Theriogenology*. 35: 81-90.
60. Sá Filho MF, Santos JEP, Ferreira RM, Sales JNS, Baruselli PS. (2011). Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. *Theriogenology*; 76:455-463.
61. Santos JEP., Thatcher WW., Chebel RC., Cerri RLA., Galvao KN. (2004). The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Animal Reproduction Science*; 82-83: 513-535.
62. Sartori, R., Bastos, M.R., Wiltbank, M.C., (2010). Factors affecting fertilization and early embryo quality in single- and super ovulated dairy cattle. *Reproduction Fertility and Development*. 22: 151–158.
63. Schams, D. (1987). Luteal peptides and intercellular communication. *Journal of Reproduction and Fertility*; Suppl 34: 87-99.
64. Serrano Cesar OAM. (1997). Caracterización de la función luteal durante el primer ciclo posparto inducido por medio de un progestágeno en vacas cebú brahmán en amamantamiento. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*; 10:29-37.
65. Shemesh M., Dubrovski L., Gurevich M., Shore LS., Fuchs AR., Fields MJ. (1997). Regulation of bovine cervical secretion of prostaglandins and synthesis of cyclooxygenase by oxytocin. *Reproduction, Fertility and Development*, 9: 525-530.
66. Small JA., Colazo MG., Kastelic JP., Mapletoft RJ. (2009) Effect of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH bases time artificial insemination in cattle. *Theriogenology*; 71:698-706.
67. Sorroarain N., Vaca RJA., Fernández Francia MG., Lares SF., de La Sota RL., Baldo A. (2005). Eficiencia de la utilización de benzoato de estradiol a las 0 ó 24 horas del retirado el dispositivo intravaginal con progesterona para inducir la ovulación en vacas multíparas para carne. VI Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina, abstr.

68. Spencer, TE. Burghardt, RC.; Johnson, GA.; Bazer, FW. (2004). Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Animal Reproduction Science*. 82-83:537-550.
69. Stronge, A.; Sreenan, J.; Diskin, M.; Mee, J.; Kenny, D.; Morris, D. (2005) Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology*. 64: 1212–1224.
70. Tithof, PK.; Roberts, MP. Guan, W.; Elgayyar, M.; Godkin, JD.(2007). Distinct phospholipase A2 enzymes regulate prostaglandin E2 and F2 alfa production by bovine endometrial epithelial cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*. Apr 25:5-16.
71. Tom JW, Pierson RA, Adams GP. (1998) Quantitative echotexture analysis of bovine corpora lutea. *Theriogenology*;49: 1345–52.
72. Ungerfeld, R., (2002). Control endocrino del ciclo estral. En: Ungerfeld, R. *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo, Melibea, p. 39-53.
73. Uslenghi G, González Chaves S, Cabodevila J, Callejas S. (2013). Efecto del ciproionato de estradiol y de la cantidad de progesterona del dispositivo sobre la respuesta ovárica en vacas secas. Resúmenes X Simposio Internacional de Reproducción Animal. IRAC, Córdoba, Argentina, p. 327. Disponible en: <http://www.iracbiogen.com.ar/admin/biblioteca/documentos/horarios%20de%20IATF.pdf>. Fecha de consulta: 14 de diciembre de 2016.
74. Vizcarra, J.; Ibañez, W.; Oscasberro, R. (1986) Repetibilidad y reproductividad de dos escalas para estimar la condición corporal de vacas Hereford. *Investigaciones Agrónomicas*. 7: 45-47.
75. Weems, W.; Weems, YS. Randel, RD. (2006). Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *Veterinary Journal*. 171:206-228.
76. Wiltbank, MC. (1997). How information of hormonal regulation of the ovary has improved the understanding of timed breeding programs. *Proceeding of the society for Theriogenology*, p. 83-97.
77. Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS.(1995). Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biology of Reproduction*;53:951–957.