

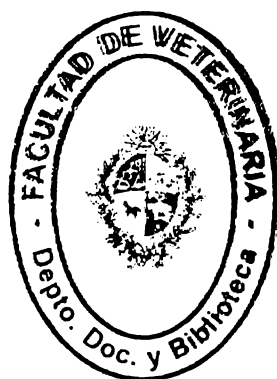


UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

**NIVELES DE PROGESTERONA EN SANGRE Y DINÁMICA FOLICULAR EN
VACAS HOLANDO TRATADAS CON DOS DOSIS DE PROGESTERONA
PARENTERAL Y CIDR, EN FASE FOLICULAR O LUTEAL**

Por

Andrés ALONZO
Rodney LÓPEZ
Antonella PILÓN



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

MODALIDAD: Experimento
Experimental

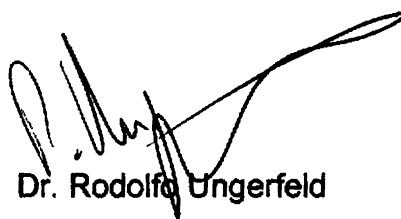


MONTEVIDEO
URUGUAY
2011

PÁGINA DE APROBACIÓN

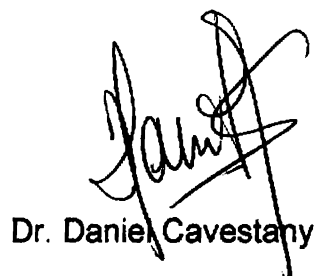
TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de Mesa:



Dr. Rodolfo Ungerfeld

Segundo Miembro (Tutor):



Dr. Daniel Cavestany

Tercer Miembro:



Dr. Danilo Fila

Fecha:

14 de julio de 2011

Autores:

Andrés Alonzo

Rodney López

Antonella Pílon

29034

FACULTAD DE VETERINARIA

Aprobado con 9 (nueve) ~~6~~

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Daniel Cavestany, por su tutoría, apoyo y dedicación.
- Al personal de Biblioteca, Hemeroteca y Referencia de la Facultad de Veterinaria, por su ayuda, disposición, y proporción del material bibliográfico.
- A Belky Mesones de la Biblioteca del INIA Treinta y Tres, por proporcionarnos material necesario al cual no teníamos acceso.
- Al personal de INIA La Estanzuela, especialmente a Estéban López, por su compañía y ayuda durante el experimento experimental.
- A nuestros familiares, por su apoyo incondicional y por su confianza durante toda nuestra carrera.
- A nuestros amigos y compañeros, por ayudarnos y acompañarnos en estos años de estudio.

ÍNDICE

	Página
TABLA DE CONTENIDO	
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	VI
RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
CICLO ESTRAL	5
Regulación neuro-endócrina del ciclo estral	5
<i>Hipotálamo</i>	5
<i>Hipófisis</i>	5
<i>Gónadas</i>	6
Hormonas que regulan el ciclo estral	6
<i>Hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH)</i>	6
<i>Hormona folículo estimulante (FSH)</i>	6
<i>Hormona luteinizante (LH)</i>	6
<i>Estrógenos (E2)</i>	7
<i>Progesterona (P4)</i>	7
<i>Inhibina</i>	8
<i>Relaxina</i>	8
<i>Prostaglandina</i>	8
Dinámica folicular	9
<i>Ondas foliculares</i>	9
<i>Regulación hormonal de la dinámica folicular</i>	10
SINCRONIZACIÓN DE CELOS	13
Hormonas utilizadas para la sincronización de celos	13
<i>Prostaglandina</i>	13
<i>Progesterona</i>	13
<i>Hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH)</i>	14
<i>Estrógenos (E2)</i>	15

Protocolos de sincronización	1
<i>Protocolos con prostaglandinas</i>	1
<i>Ovsynch</i>	1
<i>Ovsynch + P4</i>	1
CAUSAS DE BAJA FERTILIDAD EN GANADO LECHERO	1
Factores que afectan la fertilidad en el período posparto	1
<i>Pérdida de condición corporal y balance energético negativo</i>	1
<i>Desordenes metabólicos</i>	2
<i>Patologías uterinas, salud de la ubre y cojeras</i>	2
<i>Reinicio de la ciclicidad</i>	2
Factores que afectan la fertilidad en la temporada reproductiva	2
<i>Comportamiento estral</i>	2
<i>Falla en la fertilización</i>	2
<i>Mortalidad embrionaria</i>	2
HIPÓTESIS	2
OBJETIVOS	2
MATERIALES Y METODOS	2
EXPERIMENTO 1	2
EXPERIMENTO 2	2
ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS DOS EXPERIMENTO	2
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	2
RESULTADOS	3
EXPERIMENTO 1	3
Concentración de P4 en sangre	3
Dinámica folicular	3
EXPERIMENTO 2	3
Concentración de P4 en sangre	3
Dinámica folicular	3
TASA DE CRECIMIENTO Y EVOLUCIÓN FOLICULAR	3
DISCUSIÓN	3
CONCLUSIONES	4
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Descripción	Página
CUADRO I. Esquema de sangrados durante el experimento, detallando el día y las horas en que se realizó la extracción	26
CUADRO II. Tasa de crecimiento folicular para los cuatro tratamientos, calculada entre los días 1 y 9 del experimento	35
CUADRO III. Evolución folicular, expresada en proporción de animales sobre el total de cada grupo	35
Figura 1. Representación esquemática de la dinámica folicular en bovinos, en un ciclo de 3 ondas foliculares	10
Figura 2. Modelo del perfil hormonal propuesto para explicar la dinámica folicular en ondas durante intervalos ovulatorios de 2 ondas y 3 ondas	12
Figura 3. Esquema del protocolo Ovsynch	17
Figura 4. Protocolo Ovsynch modificado con P4	18
Figura 5. Tratamientos realizados a los grupos en anestro	26
Figura 6. Tratamientos realizados a los grupos de vacas repetidoras	28
Figura 7. Evolución de los niveles de progesterona en sangre (ng/mL), para los grupos de animales en anestro	31
Figura 8. Dinámica folicular observada en los grupos del experimento 1	32
Figura 9. Evolución de los niveles de progesterona en sangre (ng/ml), para los grupos de vacas repetidoras	33
Figura 10. Dinámica folicular observada en los grupos del experimento 2	34



RESUMEN

El presente trabajo consistió en evaluar diferentes dosis de progesterona (P4) y vías de administración en un protocolo de sincronización de la ovulación a tiempo fijo (Ovsynch + P4). Para el mismo se utilizaron 22 vacas Holando con mas de 200 días abiertos y mas de tres servicios previos, las que fueron presincronizadas con dos dosis de prostaglandina F2 α (PG) 26 y 12 días previos al comienzo del experimento para que el mismo coincida aproximadamente con el décimo día del ciclo estral.

Se realizaron dos experimentos, el primero formado por dos grupos de 4 y 3 vacas en anestro, las que fueron tratadas con 200 mg de MAD I/M y CIDR de 1,3g respectivamente. El experimento 2 fue realizado con dos grupos de vacas ciclando de 7 y 8 animales tratadas con 200 mg y 400 mg de MAD I/M respectivamente.

En el experimento 1 los animales tratados con 200 mg de MAD presentaron un perfil irregular de P4 plasmática, ya que se generó un pico muy pronunciado dentro de las primeras 24 h y luego cayó a niveles basales (<1ng/mL) hasta el fin del experimento, mientras que el CIDR mantuvo la concentración plasmática constante hasta su extracción. Por otro lado, en la dinámica folicular no se observaron diferencias significativas, si una tendencia en el grupo 1 de que los folículos regresaran luego del día 7, mientras que los del grupo 2 mantuvieron su crecimiento hasta el día 9, ésto se ve reflejado en la mejor tasa ovulatoria y de crecimiento en el grupo 2.

En el experimento 2 los perfiles plasmáticos de P4 de ambos grupos fueron similares, observándose diferencia solamente entre las 4 y 12 h ($P < 0,05$) de iniciado. En ambos grupos se observó un marcado pico dentro de las primeras 24 h, que luego desciende manteniendo niveles luteales de P4 (>1ng/mL) hasta el final del experimento. Con respecto a la dinámica folicular, en este experimento tampoco hubieron diferencias significativas en el diámetro de los folículos, mientras que si se observó una tendencia de que los folículos del grupo 4 fueron levemente más chicos y tuvieron una menor tasa ovulatoria y de crecimiento que los del grupo 3.

SUMMARY

In the present work, different doses of progesterone (P4) and routes of administration were evaluated in an ovulation synchronization protocol (Ovsynch + P4). For this 22 Holstein cows with more than 200 days open and more than three previous services were used; cows were presynchronized with two doses of prostaglandin F2 α 26 and 12 days previous in the beginning of the trials, so that at the beginning of them they were at the tenth day of the estrous cycle. Two trials were conducted, first formed by 2 groups of 4 and 3 cows in anestrus, that were treated with 200 mg of MAD-4 IM and a CIDR with 1.3 g of P4 respectively. Trial 2 was formed by two groups of cycling cows of 7 and 8 animals treated with 200 mg and 400 mg of MAD-4 IM respectively. In trial 1 the animals treated with 200 mg of MAD-4 presented an irregular profile of P4, since a high peak was detected within the first 24 (P<0.05) and soon falls to basal levels (<1ng/mL) until the end of the trial, whereas the CIDR maintains a constant plasmatic concentration until their extraction. In follicular dynamics, significant differences were not observed, only a tendency in group 1 to regress after day 7, whereas group 2 maintains its growth until day 9; this is reflected in the better ovulatory rate and follicular growth in this last group. In trial 2 plasmatic profiles of P4 of both groups were similar, existing a difference only between 4 and 12 h (P<0.05) of the beginning of the trial. In both groups a marked peak within the first 24 h is observed, a difference in luteal concentrations (>1ng/mL) that was maintained during the rest of the trial. With respect to follicular dynamics, in this trial there were no significant differences in the diameter, whereas a tendency is observed as the follicles of group 4 are slightly smaller, have a smaller ovulatory rate and of growth that those of the group 3.

INTRODUCCIÓN

Uno de los factores limitantes en el éxito de un programa de Inseminación Artificial (IA) es la presencia de vacas problema o repetidoras. Esto puede ser debido a varios factores, como son la falla en la expresión de celos, la ovulación de ovocitos de baja calidad, la formación de un cuerpo lúteo (CL) con deficiente producción de progesterona (P4), la presencia de un ambiente inadecuado para la implantación del embrión y la producción de un embrión de mala calidad (Walsh y col., 2011). Por lo tanto un tratamiento de sincronización de celos adecuado debe contemplar tanto la funcionalidad del CL como el adecuado desarrollo folicular, permitiendo así regular el momento de la ovulación de un folículo de buena calidad (Thatcher y col., 1989). Hace unos años se comenzaron a desarrollar esquemas de sincronización combinando GnRH y Prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PG) (Wolfenson y col., 1994). La GnRH causa la luteinización, ovulación o regresión de los folículos de más de 10 mm presentes en el ovario y el consiguiente inicio de una nueva onda de desarrollo folicular, en tanto la PG administrada 7 días más tarde provoca la regresión de las estructuras luteales formadas o provenientes de un ciclo anterior (Thatcher y col., 1995) y una segunda dosis de GnRH asegura la ovulación del folículo dominante de la reciente onda. La inseminación a las 15 horas de la segunda dosis de GnRH (IATF) permite la fecundación del ovocito liberado, eliminando la necesidad de detectar celos. Sin embargo, la etapa del ciclo estral al momento del tratamiento afecta tanto la sincronía del mismo como la fertilidad consecuente (Moreira y col., 2000), ya que si el tratamiento se inicia en una etapa inadecuada puede llevar a la ovulación de folículos pequeños que derivan en menores tasas de concepción (Lamb y col., 2001), y reduce las concentraciones plasmáticas de P4 luego de la ovulación, llevando a mayores pérdidas embrionarias (Perry y col., 2005). La adición de una fuente de P4 al protocolo puede mejorar la sincronía y disminuir la incidencia de vacas repetidoras, dado que niveles altos de esta hormona previenen la ovulación prematura (Sakase y col., 2007), asegurando la ovulación en el momento adecuado de un ovocito de buena calidad que producirá un embrión capaz de secretar niveles suficientes de interferón tau, y por otra parte la formación de un CL de buen tamaño que producirá buenas cantidades de P4 logrando un adecuado ambiente uterino para la gestación. Por otro lado, muchos estudios

indican que la suplementación de P4 puede inducir la ciclicidad en vacas en anestro (Smith y col., 1987, Twagiramungu y col., 1995, Lucy y col., 2001). En el presente trabajo evaluamos el funcionamiento de un protocolo Ovsynch modificado con progesterona, tanto en vacas repetidoras como en vacas en anestro.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Ciclo estral:

El ciclo estral en la vaca es un conjunto de eventos que se repiten sucesivamente en el animal no preñado luego de la pubertad, y tienen una duración de 21 días, siendo un animal poliéstrico anual o no estacional (Ungerfeld, 2002c).

El mismo puede dividirse en dos fases: la fase luteal, con predominio de progesterona, que comienza el día 2-3 del ciclo (día 0: celo) y se extiende hasta alrededor del día 13; y la fase folicular, de predominancia estrogénica, que comprende los días 13 al día 2, desde la luteólisis hasta la ovulación (Ungerfeld, 2002c).

A su vez estas fases pueden subdividirse en proestro (desde la luteólisis hasta el inicio del celo), estro (fase de receptividad sexual), metaestro (desde el final del celo hasta la formación del CL), y diestro (presencia de CL activo) (Ungerfeld, 2002c).

Regulación neuro-endocrina del ciclo estral

El ciclo estral es regulado por mecanismos endocrinos y neuroendocrinos, es decir, por hormonas hipotalámicas, gonadotrofinas y esteroides secretados por los ovarios, lo que se denomina eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (Hafez y Hafez, 2002).

Hipotálamo

En el hipotálamo se produce la Hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), la cual proporciona un enlace humoral entre los sistemas neural y endocrino. En respuesta a las señales neurales se liberan pulsos de GnRH hacia el sistema portal hipofisario, para la liberación de LH y FSH de la hipófisis anterior o adenohipófisis (Hafez y Hafez, 2002).

Hipófisis

La hipófisis es la principal glándula endocrina de los organismos. Tiene dos grandes regiones: el lóbulo anterior (adenohipófisis) y el posterior (neurohipófisis).

En la adenohipófisis se produce la síntesis y secreción de las gonadotrofinas (la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH)) y la prolactina. En la neurohipófisis se almacena y libera otra hormona: la oxitocina, producida por neuronas cuyo cuerpo se localiza en el hipotálamo (Ungerfeld, 2002a).

Gónadas

Las gónadas desempeñan una doble función: la producción de células germinales (gametogénesis) y la secreción de hormonas gonadales. Mientras que las células de la teca interna del folículo de Graaf son la fuente primaria de estrógenos, después de la rotura del folículo (ovulación) dichas células, junto con las células de la granulosa, son reemplazadas por el cuerpo lúteo que secreta progesterona (Hafez y Hafez, 2002).

Hormonas que regulan el ciclo estral

Hormona liberadora de Gonadotrofinas

Esta hormona desempeña un papel clave en el desarrollo y el mantenimiento de la reproducción, siendo su función más conocida el control de la secreción de LH y FSH hipofisarias (Somoza, 2002).

Hormona Folículo Estimulante

A esta hormona se la puede considerar como la iniciadora de la actividad ovárica, ya que provoca directamente el crecimiento de los folículos ováricos (Peters y Ball, 1991). La FSH promueve el reclutamiento de folículos antrales y estimula el crecimiento y la maduración de los mismos. Se demostró que hay incrementos en la concentración de FSH antes de la emergencia de cada onda, de manera que se observan dos picos de FSH en los ciclos de dos ondas (Adams y col., 1992).

Hormona Luteinizante

La función de la LH es fundamentalmente estimular la maduración y ovulación del folículo antral, y en forma secundaria, estimular la formación y el mantenimiento del cuerpo lúteo, siendo la principal hormona luteotrófica. La concentración plasmática de esta hormona es generalmente baja, presentando un pico que

coincide con el estro. Este pico preovulatorio es el responsable de la ovulación y del inicio de la luteinización de las células de la granulosa y de la teca del folículo (Peters y Ball, 1991). La LH actúa conjuntamente con la FSH para inducir la producción de estrógenos por parte del folículo dominante (Hafez y Hafez, 2002).

Estrógenos

Son sintetizados en los folículos antrales. Las células tecales de los folículos en crecimiento sintetizan básicamente andrógenos y algo de estrógenos. La mayoría de los andrógenos sintetizados en la célula tecal son convertidos a estrógenos por las células de la granulosa, lo que es regulado fundamentalmente por la FSH. En el folículo preovulatorio las células de la granulosa adquieren receptores para la LH, y durante el pico preovulatorio de LH la granulosa es convertida en células sintetizadoras de progesterona (Ungerfeld, 2002b).

Los estrógenos cumplen variadas funciones: inducen el comportamiento estral, aumentan la amplitud y frecuencia de contracciones uterinas potenciando los efectos de la oxitocina y de la PG, desarrollan los caracteres sexuales secundarios femeninos, estimulan el crecimiento de los conductos y el desarrollo de la glándula mamaria y ejercen control de retroalimentación en la liberación de LH y FSH a través del hipotálamo (Hafez y Hafez, 2002).

Progesterona

También denominada hormona de la preñez, es secretada por el CL en el animal cíclico y por el CL y la placenta en el animal preñado (Ungerfeld, 2002b).

La progesterona realiza las siguientes funciones: prepara el endometrio para la implantación y el mantenimiento de la preñez, aumentando la actividad de las glándulas secretorias e inhibiendo la motilidad del miometrio, actúa sinérgicamente con los estrógenos para inducir el comportamiento estral, desarrolla el tejido secretor de la glándula mamaria y, en altas concentraciones, inhibe el estro y el pico de LH (Hafez y Hafez, 2002).

Inhibina

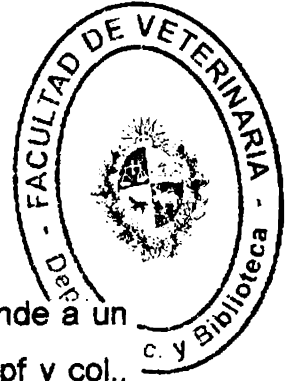
Esta hormona es sintetizada principalmente por la granulosa de los folículos en crecimiento. Actúa regulando la secreción de la FSH, ya que provoca un feedback negativo sobre la síntesis y liberación de la misma (Ungerfeld, 2002b). Las inhibinas actúan como señales químicas a la hipófisis respecto al número de folículos que crecen en el ovario, reduciendo la secreción de FSH a un nivel tal que mantiene el número de ovulaciones. Al inhibir la liberación de FSH sin alterar la liberación de LH, las inhibinas pueden ser en parte las responsables de la liberación diferencial de LH y FSH desde la hipófisis (Hafez y Hafez, 2002).

Relaxina

Esta es una hormona sintetizada por el CL de la preñez. Su principal función es la dilatación del cuello uterino y la vagina antes del parto. También inhibe las contracciones uterinas y causa mayor crecimiento de la glándula mamaria (Hafez y Hafez, 2002). Además esta hormona cumple un rol en la disrupción del tejido conectivo de la pared del folículo, lo que facilita su ruptura (ovulación) (Ungerfeld, 2002b).

Prostaglandina

Casi todos los tejidos corporales la secretan. Son ácidos grasos derivados del ácido araquidónico. Las más estrechamente relacionadas con la reproducción son la PGF₂α y la PE₂, secretadas por el útero. La PGF₂α es el agente luteolítico natural que finaliza la fase lútea del ciclo estral y permite el inicio de un nuevo ciclo en ausencia de fertilización (Hafez y Hafez, 2002). Otras funciones de la PGF₂α son la luteólisis en el momento del parto, y la contractilidad miometrial que inicia la salida del feto (Ungerfeld, 2002b).



Dinámica folicular

Ondas foliculares

Se sabe que el crecimiento folicular durante el ciclo estral bovino responde a un patrón de crecimiento en ondas foliculares (Sirois y Fortune, 1988; Knopf y col., 1988), existiendo ciclos con dos ondas y otros con tres ondas, los que presentan una distribución similar (Adams y Pierson, 1995).

La primera onda de crecimiento folicular se detecta el día de la ovulación (día 0), mientras que la segunda onda comienza el día 9 o 10 para los ciclos de dos ondas y el día 8 o 9 en los ciclos de tres ondas, en los cuales la tercera onda emerge el día 15 o 16 (De Rensis y Peters, 1999; Mapletoft y col., 2002). Asimismo, el CL comienza su regresión más temprano en los ciclos de dos ondas (día 16) que en los de tres ondas (día 19) (Ginther y col., 1989). La duración del ciclo será entonces de un promedio de 21 y 23 días en los de dos y tres ondas respectivamente (Pierson y Ginther, 1987; Sirois y Fortune, 1988). En ambos casos, el folículo dominante (FD) en el momento que ocurre la luteólisis será el folículo destinado a ovular (Bo y Caccia, 2002).

Cada onda de crecimiento folicular involucra el desarrollo sincrónico de un grupo de folículos que ocurre al mismo tiempo en los dos ovarios (Ginther y col., 1989). Durante 2 o 3 días todos los folículos de este grupo crecen, hasta que uno de ellos es seleccionado para continuar creciendo y convertirse en el FD, mientras que el resto de los folículos, llamados subordinados, se vuelven atrésicos y regresan (Bo y Caccia, 2002).

El FD de la primera onda es anovulatorio porque se desarrolla durante la fase luteal. Por lo tanto, este folículo tendrá una fase de crecimiento (días 0 a 6), una fase estática (días 6 a 12) y una fase de regresión (día 12 en adelante) (Ginther y col., 1989).

Por otra parte, los folículos subordinados también incrementan su tamaño, pudiendo alcanzar el mayor de ellos un diámetro de 8 mm a los 3 días de la emergencia de la onda, pero luego tienen una pequeña fase estática y terminan regresando (Bo y Caccia, 2002) (Figura 1).

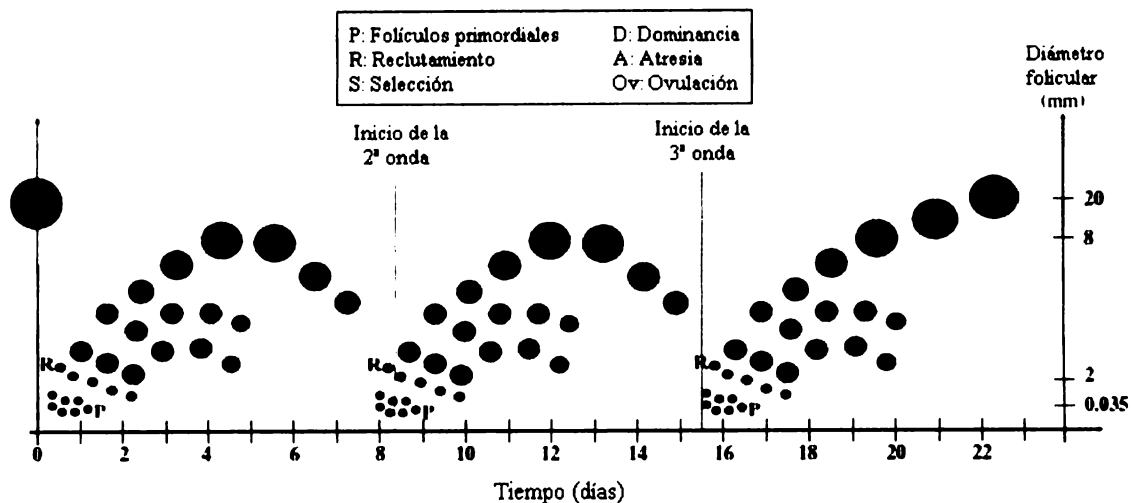


Figura 1. Representación esquemática de la dinámica folicular en bovinos en un ciclo de tres ondas foliculares (Modificado de Aerts y Bols, 2010).

Regulación hormonal de la dinámica folicular

El mecanismo que regula la dinámica folicular está basado en respuestas diferenciales de los folículos a la FSH y la LH (Ginther y col., 1996).

Se demostró que existen incrementos en la concentración de FSH antes de la emergencia de cada onda (Adams y col., 1992b). Esta descarga de FSH es aparentemente la responsable del reclutamiento de los folículos de una onda folicular, y comienza dos días antes de la emergencia de una onda, para llegar al pico máximo un día antes o el día del comienzo de la onda (Adams y col., 1992b). Por lo tanto, se observan dos picos de FSH en los ciclos de dos ondas y tres picos en los ciclos de tres ondas.

Luego de la emergencia de cada onda, los niveles de FSH comienzan a decrecer, observándose los niveles más bajos al momento de la desviación (día 2 de la onda) (Adams y Pierson, 1995), cuando el FD alcanzó alrededor de 8,5 mm y el subordinado alrededor de 7,2 mm (Ginther y col., 1996, 1997). En este momento los niveles de FSH se encuentran por debajo de los niveles necesarios para el desarrollo de los folículos subordinados los cuales se atresian, mientras que el dominante adquiere la habilidad de seguir creciendo con niveles bajos de FSH (Ginther, 2000).

La caída de la FSH se debe a que los folículos en crecimiento producen hormonas como el estradiol-17 β y la inhibina que actúan suprimiendo los niveles circulantes de esta hormona (Findlay y col., 1992). La inhibina es aparentemente secretada por todos los folículos en desarrollo, mientras que el estradiol es producido principalmente por el FD (Kulick y col., 1999).

La razón por la cual el FD puede crecer con niveles bajos de FSH, mientras que los subordinados se atresian puede estar relacionada con la síntesis de receptores para la LH en las células de la granulosa del primero (Ginther y col., 1996). Todos los folículos poseen receptores de LH en las células de la teca y de FSH en las de la granulosa (Ireland, 1987) pero sólo el dominante adquiere receptores de LH en las células de la granulosa. Los receptores de LH aumentan abruptamente a partir del día 4 de la onda, cuando el FD tiene más de 8 mm de diámetro (Xu y col., 1995). Por esta razón se dice que éste es FSH-independiente, pero LH-dependiente (Ginther y col., 2001).

Por otra parte, los niveles de progesterona pueden explicar el fenómeno de regresión del FD de las ondas anovulatorias y el comienzo de la próxima onda folicular ("recambio folicular"). Se sabe que la administración de niveles altos de progesterona altera el desarrollo del FD (Adams y col., 1992a). Estos niveles altos de progesterona no suprimen la liberación de FSH (Adams y col., 1992a) pero si afectan adversamente la frecuencia de pulsos de LH (Stock y Fortune, 1993). Por lo tanto, al aumentar los niveles de progesterona debido al crecimiento del CL durante la fase luteal, se altera la secreción pulsátil de LH y causa que el FD detenga sus funciones metabólicas y comience a regresar (Aerts y Bols, 2010).

Al regresar este folículo, cesa la secreción de estradiol e inhibina, lo que tiene como consecuencia el aumento de las concentraciones de FSH que va a reclutar los folículos de la siguiente onda folicular (Bo y Caccia, 2002).

Por el contrario, la disminución de los niveles de progesterona al ocurrir la luteólisis hacia el final del ciclo permite el incremento de la frecuencia de los pulsos de LH, lo que estimula un mayor crecimiento del FD y un aumento de las concentraciones de estradiol que induce los signos de celo, el pico de LH y la ovulación (Mihm y Austin, 2002).

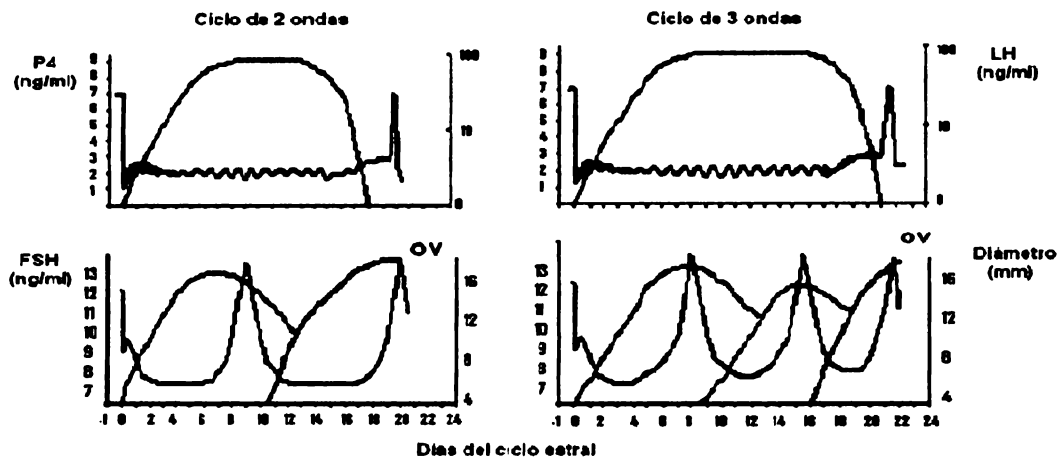


Figura 2. Modelo propuesto para explicar la dinámica folicular en ondas durante intervalos ovulatorios de 2 ondas (izq.) y de 3 ondas (der.); OV=ovulación. Arriba, concentraciones plasmáticas de progesterona (ng/mL) y pulsos de LH; abajo, desarrollo de los folículos y su relación con las concentraciones plasmáticas de FSH (Modificado de Adams y Pierson, 1995).

Sincronización de celos

Hormonas utilizadas para la sincronización de celos

Prostaglandina

La PG es el agente luteolítico natural que finaliza la fase lútea del ciclo estral (Hafez y Hafez, 2002). Esta capacidad para inducir la luteólisis ha sido aprovechada para manipular el ciclo estral (Hafez y Hafez, 2002).

La administración de PG o alguno de sus análogos, durante la fase lútea del ciclo conduce a la luteólisis prematura y, consecuentemente, a la caída de la concentración de progesterona. A esto le sigue una elevación de la secreción de gonadotrofinas y estradiol, lo que culmina con el crecimiento final del folículo, el pico de LH y la ovulación (Peters y Ball, 1991).

Dado que la PG causa la regresión del CL, ésta solo es efectiva en animales ciclando y en el período en que el CL se encuentra activo (día 6 al 16 del ciclo estral). La PG no es efectiva para la inducción de la luteólisis hasta unos 5 o 6 días después del celo y si el tratamiento se administra cuando el ciclo estral está avanzado (día 16 en adelante), puede que la luteólisis ya haya comenzado por la acción de la PG endógena (Seguin, 1987).

Por otra parte, el momento de la ovulación en los ciclos tratados con PG presenta grandes variaciones (Pursley y col, 1997). Cuando se induce la luteólisis con PG, el comienzo del estro se distribuye en un período de 6 días (Seguin, 1987). Esta variación se debe a que este tratamiento no sincroniza el crecimiento folicular ni el pico preovulatorio de LH, sino que sólo regula la duración de la vida del CL (de la Sota y col., 2003).

Progesterona

La progesterona es la hormona secretada por el CL durante el diestro que actúa inhibiendo la secreción de LH en la hipófisis. Si se administra un progestágeno por un período relativamente largo (14 a 21 días), de forma que el CL tenga su regresión natural durante ese tiempo, el progestágeno exógeno continuará ejerciendo retroalimentación negativa en la secreción de LH después de la

regresión del CL. Cuando se suspende el progestágeno se observa crecimiento folicular, estro y ovulación a los 2 a 8 días (Hafez y Hafez, 2002).

Es importante destacar que la progesterona no suprime la secreción de FSH, por lo tanto, las ondas foliculares siguen emergiendo en presencia de esta hormona.

Un problema que surge en este tipo de tratamientos es la disminución en la fertilidad del celo siguiente (Larson y Ball, 1992; Odde, 1990). Esto se debería a que los dispositivos de P4 solos no llegarían a reemplazar los niveles luteales de P4 producidos por el CL, por lo tanto, la secreción pulsátil de LH se encontraría aumentada y el FD seguiría creciendo, transformándose en un FD persistente, el cual al ovular presentaría un ovocito envejecido con bajas probabilidades de ser fertilizado (Sánchez y col., 1995; Mihm y col., 1994).

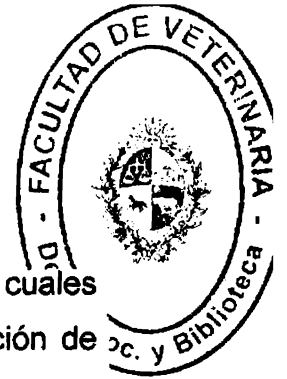
Hormona liberadora de Gonadotrofinas

La GnRH es la hormona sintetizada en el hipotálamo que induce la liberación de LH y FSH en la hipófisis (de la Sota y col., 2003). Por lo tanto, administrando GnRH exógena se podría controlar el desarrollo folicular.

En bovinos con un folículo dominante en crecimiento (al menos de 10 mm de diámetro), el tratamiento con GnRH induce la ovulación de dicho folículo, con la emergencia de una nueva onda aproximadamente 2 días después del tratamiento (Thatcher y col., 1993; Pursley y col., 1995).

Se ha demostrado que el tratamiento con GnRH provoca la ovulación del folículo dominante sólo en el 56% de las vaquillonas, y por lo tanto, no induce de manera uniforme la emergencia de una nueva onda folicular (Martinez y col., 1999).

La efectividad de la GnRH para provocar la ovulación depende del tamaño que presenta el folículo en el momento de la administración de la hormona, lo que depende fundamentalmente de la etapa del ciclo estral. Algunos autores han mencionado que cuando la GnRH se administra entre los días 1 a 4 o 13 a 17 del ciclo estral no es efectiva para provocar la ovulación (Thatcher y col., 2000), mientras que cuando se administra entre los días 5 a 12 del ciclo los resultados serían mejores (Vasconcelos y col., 1999).



Estrógenos

Los estrógenos son las hormonas sintetizadas en los folículos ováricos, las cuales ejercen feedback a nivel hipotalámico e hipofisario, controlando la liberación de gonadotrofinas (LH y FSH). Un alto nivel de estrógenos inhibe la secreción de FSH provocando la atresia de los folículos pequeños, pero estimula la secreción de LH promoviendo el crecimiento del FD y llevándolo a la ovulación. La caída de los estrógenos luego de la misma, estimula la FSH iniciando la emergencia de una nueva onda.

Por lo antedicho, la administración de estradiol al inicio de una onda folicular suprime el desarrollo del folículo antral, debido a la supresión de la FSH (Bo y col., 1994); pero una vez que el estradiol es metabolizado, se da un pico de FSH en la circulación que lleva a la emergencia de una nueva onda folicular. La nueva onda emerge entre 3 y 5 días luego de la administración del estrógeno, sin importar la etapa del ciclo estral al momento del tratamiento (Bo y col., 1995).

Por otro lado, al administrar el estradiol se estimula un pico de LH (16-18 h posteriores al tratamiento) el cual, en caso de existir un folículo preovulatorio, desencadena la ovulación del mismo (24-32 h luego del pico de LH) (Martínez y col., 1999, 2005).

Protocolos de sincronización

Como hemos descripto, cada una de las hormonas tiene una determinada función que podría utilizarse con el fin de inducir o sincronizar las ovulaciones en un rodeo. Sin embargo, utilizadas individualmente ninguna de ellas es capaz de asegurar la ovulación en un momento determinado y menos aún, de concentrar adecuadamente las ovulaciones.

Por este motivo es que se han desarrollado diversos protocolos que utilizan repetidas dosis de la misma hormona o combinan las diferentes hormonas, con el fin de conseguir una máxima concentración de los celos, e incluso de poder realizar la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) sin necesidad de detectar celos.

Protocolos con Prostaglandina

- *Única dosis de prostaglandina, después de un período de detección de celos (DC):* se trata de la DC por un período de 5 días y la inseminación artificial (IA) de las detectadas, administrando en el día 6 una dosis de PG a las que no mostraron celo, para realizar DC e IA por 5 días más. Con este protocolo nos aseguramos que al día de la administración todos los animales se encontrarán en diestro.
- *Dos dosis de prostaglandina, separadas 11-14 días, con DC e IA luego de cada una:* este método permite inseminar los animales que se encontraban en diestro al momento de la primera dosis, dando una segunda oportunidad a los animales que no mostraron celo por no tener CL activo en ese momento. Con este protocolo obtenemos dos períodos de concentración de celos, luego de cada una de las prostaglandinas.
- *Dos dosis de prostaglandina, separadas 11-14 días, con DC e IA luego de la segunda dosis:* con éste método logramos que en el momento de la segunda dosis todos los animales se encuentren en diestro, por lo cual todos serán susceptibles a la segunda PG, apareciendo el celo entre los 3 y 5 días (Seguin, 1987). Con este método se consigue sincronizar los animales, llevándolos a todos a la misma etapa del ciclo estral.

Ovsynch

El Ovsynch es un método de sincronización de ovulaciones desarrollado con el fin de realizar la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) sin necesidad de detección de celos.

El mismo consta de una primera dosis de GnRH, seguida de una inyección de PG siete días más tarde, y una segunda dosis de GnRH a los dos días, terminando con la IATF 16 a 20 horas luego de la segunda GnRH (Pursley y col., 1995).

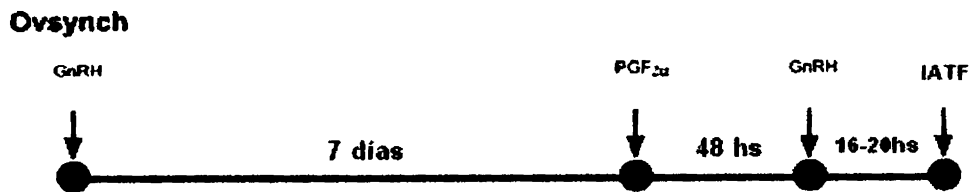


Figura 3. Esquema del protocolo Ovsynch

La primera inyección de GnRH induce la liberación de LH y FSH, las cuales producen la ovulación del FD e inician una nueva onda de crecimiento folicular, respectivamente. La PG, administrada siete días más tarde, produce la regresión del CL formado ante la primer GnRH. La segunda aplicación de GnRH, 48 horas después de la PG, causará la ovulación del FD de la onda iniciada con la primer GnRH, aproximadamente en 30 horas. La IATF se realiza de 16 a 20 horas luego de la segunda GnRH, o sea, 10 a 14 horas antes de la ovulación (Giraldo, 2008).

Un inconveniente que surge con el uso de este protocolo, es la ovulación prematura cuando el Ovsynch se inicia pocos días antes de la regresión del CL. Si el protocolo se inicia en los días 14 o 15 del ciclo, en ese momento no existe un folículo sensible a la GnRH y no se dará la ovulación, por lo tanto, el folículo continuará creciendo y ovulará cuando se de la regresión natural del CL (antes de la inyección de PG).

Ovsynch + P4

Este protocolo combina al Ovsynch con la utilización de una fuente de progesterona. Para esto, la P4 (inyectable, CIDR, etc.) es administrada en el mismo momento en que se da la primera inyección de GnRH y en caso de tratarse de una fuente extraíble, ésta se retira el día que se administra la PG (Bo y col., 2009). En caso de usarse P4 inyectable, ésta se metabolizaría en el correr de los 7 días.

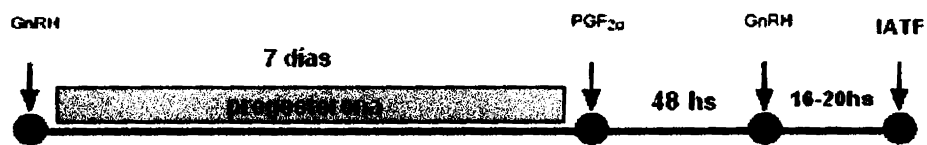


Figura 4. Protocolo Ovsynch modificado con progesterona

Este protocolo se basa en que el tratamiento con progesterona puede impedir la maduración folicular prematura, observada en vacas tratadas con el protocolo Ovsynch. Esto es logrado por el mantenimiento de altas concentraciones de P4 en la sangre (que no permite la ovulación), hasta que se da la PG (Sakase y col., 2005).

Causas de baja fertilidad en el ganado lechero

La fertilidad en las vacas lecheras se ha reducido en las últimas cinco décadas, mientras que la producción de leche por vaca ha aumentado. Muchas hipótesis se han propuesto para explicar esto, incluyendo la genética, fisiología, nutrición y manejo.

En la presente revisión destacamos los puntos que se deben tener en cuenta para mejorar el problema de la baja fertilidad:

En primer lugar se debe minimizar el balance de energía negativa y resolver cualquier tipo de infección uterina posparto. En segundo lugar se debe realizar la correcta detección de celo seguida de la inseminación con un semen de alta calidad. En tercer lugar lograr la ovulación y la fertilización de un ovocito de alta calidad. En cuarto lugar, debe existir una adecuada secreción de progesterona a principios de la formación del CL. En quinto lugar, el endometrio debe producir un ambiente adecuado y estimular el desarrollo del embrión. En sexto lugar, debe producirse un embrión productor de cantidades adecuadas de interferón tau, que altera la secreción de PG uterina y mejora las señales de reconocimiento materno de la gestación (Walsh y col., 2011).

Factores que afectan la fertilidad en el período posparto

Pérdida de condición corporal y Balance energético negativo

Luego del parto las vacas de alta producción aumentan sustancialmente sus requerimientos de energía para acompañar el pico de producción de leche que se da entre 4 y 8 semanas después del parto. Estos requerimientos no pueden ser totalmente satisfechos por el consumo de alimento (debido a las limitaciones en la ingesta y el apetito), por lo que son compensados por la movilización de las reservas corporales que llevan al animal a un balance energético negativo (BEN) (Grummer, 2007). Este BEN trae como consecuencia un aumento del riesgo de enfermedades metabólicas en el primer mes de lactancia, inmunosupresión y la reducción en la fertilidad posterior (Roche y col., 2009). Las vacas con baja condición corporal al parto, o que sufren en el posparto un exceso de pérdida de condición corporal (CC), tienen menos probabilidades de ovular, menor tasa de

detección de celos, baja tasa de concepción al primer servicio, mayor probabilidad de pérdida de la preñez y mayor intervalo parto concepción (Roche y col., 2009).

El estrés por calor puede agravar los efectos del BEN, al reducir aún más el apetito y aumentar la pérdida de CC (Shehab-El-Din y col., 2010).

Por otra parte, el alto consumo de materia seca aumenta el metabolismo y la tasa de clearance de las hormonas esteroideas, lo que puede dar lugar a períodos de subestros y disminución de la detección de celos (Walsh y col., 2011).

Desordenes metabólicos

Debido al BEN, las vacas corren el riesgo de desarrollar trastornos metabólicos, tales como hipocalcemia clínica, hipomagnesemia y cetosis, los cuales pueden exacerbar aún más el grado de inmunodepresión en la lactancia temprana (Mulligan y Doherty, 2008). Las vacas que sufren alteraciones metabólicas en el período periparto tienen mayor incidencia de mastitis, cojera y endometritis (Roche, 2006) lo cual contribuye a la reducción de la eficiencia reproductiva.

Debido al BEN las concentraciones de insulina permanecen bajas impidiendo el aumento de los receptores de la hormona del crecimiento en el hígado, lo que disminuye la secreción de IGF-1 (Lucy, 2008). Esto tiene un impacto negativo en la reproducción, ya que la insulina y el IGF-1 actúan sinérgicamente con las gonadotropinas en las células del ovario y su déficit altera el desarrollo folicular e impide la ovulación del FD (Beam y Butler, 1999) retrasando el reinicio de la ciclicidad.

Patologías uterinas, salud de la ubre y cojeras

Se sabe que los animales que sufren endometritis en el período posparto presentan mayor cantidad de días abiertos y menor porcentaje de preñez a los 150 días de lactancia que los que no sufren esta patología puerperal (Fourichon y col., 2000). Incluso en las vacas que son tratadas con éxito para la endometritis clínica la tasa de concepción disminuye en un 20% en comparación con animales no afectados y un 3% de los animales permanecen estériles (Sheldon y col., 2009a). Por otra parte, las vacas con endometritis tienen más probabilidad de tener una fase luteal prolongada, ya que las células epiteliales endometriales

responden a la infección uterina con una alteración de la secreción de PG (de acción luteolítica) a una acción luteotrófica por la prostaglandina E2 (Peter y col., 2009; Sheldon y col., 2009b).

Las vacas con mastitis clínica en los primeros 28 días posparto, demoraron más en reiniciar la ciclicidad (Huszenicza y col., 2005) y requieren más servicios por concepción en comparación con las sanas, presentando además más cantidad de días vacías (Ahmadzadeh y col., 2009). Por otra parte, las vacas que sufren un caso de mastitis clínica entre la IA y los 50 días de gestación tienen más probabilidades de sufrir la pérdida de embriones en comparación con las vacas que no presentan mastitis (Chebel y col., 2004; Santos y col., 2004).

Por su parte, la cojera se asocia con el aumento del número de servicios por concepción, y por lo tanto con menores tasas de concepción al primer servicio (Hernández y col., 2001; Meléndez y col., 2003.).

Reinicio de la ciclicidad

Un posparto "normal" se define como aquel que ha concluido con la involución uterina, continuando con un desarrollo folicular que produce una ovulación de un FD saludable en el posparto temprano y continúa con ciclos estrales regulares de aproximadamente 21 días, junto con las concentraciones homeostáticas de insulina, IGF-I y glucosa (Roche, 2006).

Han sido identificados numerosos factores que atrasan el reinicio de la ciclicidad. Por ejemplo, las vacas primíparas demoran más días a la primera ovulación que las vacas multíparas (Tanaka y col., 2008), lo que se debe a que las primeras tienen demandas energéticas para el crecimiento además de las de lactación y mantenimiento (Lucy, 2001). Otros factores ya mencionados que demoran la reanudación de la ciclicidad incluyen los trastornos periparto, la estación reproductiva, el manejo, las mastitis, las cojeras y las severas pérdidas de CC (Crowe, 2008; Garnsworthy y col., 2008).

Factores que afectan la fertilidad en la temporada reproductiva

Comportamiento estral

El porcentaje de animales que demuestran el celo siendo montados ha disminuido del 80% al 50% en los últimos tiempos, mientras que el tiempo de detección de celos se ha reducido (Dobson y col., 2008). Estos dos factores dificultan la inseminación en el momento correcto.

Los factores que influyen en una pobre expresión del estro se clasifican en factores inherentes al animal y en factores ambientales. Entre los factores del animal se incluyen los estros silenciosos o anovulatorios, la paridad, la producción de la leche y la salud; y en los factores del medio ambiente están la nutrición, el alojamiento, la temporada y el número de animales en celo al mismo tiempo (Roelofs y col., 2010).

Las vacas lecheras de alta producción tienen períodos de estros más reducidos que las de baja producción, lo que puede explicarse en parte, por el mayor metabolismo de las primeras, que aumenta la tasa de depuración del estradiol en el hígado (Sangsrivong y col., 2002).

Por otra parte las vacas primíparas muestran una mayor duración del celo que las vacas múltiparas (Nebel y col., 1997), lo que también se explica por la mayor concentración de estradiol en las vaquillonas (Sartori y col., 2004; Wolfenson y col., 2004). Además, las vacas múltiparas se encuentran bajo BEN, el que se ha vinculado con la disminución de la secreción de LH y con bajas concentraciones de IGF-I (Diskin y col., 2003). Como ya se mencionó, tanto la LH como la IGF-I actúan de forma sinérgica para promover el desarrollo folicular (Lucy, 2000), por lo que su déficit deriva en una expresión mas pobre del estro.

Los factores de estrés tales como la cojera y mastitis reducen la secreción de GnRH y por lo tanto la frecuencia de pulsos de LH, lo que lleva a una menor producción de estradiol por el FD y menor manifestación de celo (Dobson y col., 2007).

Las vacas libres en pastoreo presentan menor intensidad pero mayor duración del comportamiento estral que las que están en confinamiento (Walsh y col., 2011).

El estrés calórico en los animales lleva a un aumento en la incidencia de anestro y ovulaciones silentes (De Rensis y Scaramuzzi, 2003).

Falla en la fertilización

La fertilización puede verse afectada por diversos factores que pueden disminuir la calidad del ovocito. El estrés por calor entre 20 y 50 días antes de la IA se ha asociado con una reducción en la calidad de los ovocitos y del embrión a principios del desarrollo (Roth y col., 2001). Los trastornos posparto como el BEN, infecciones uterinas, secreción anormal de gonadotrofinas, etc. pueden también comprometer la calidad del ovocito.

Otros factores pueden llevar a la reducción de la fertilización, como ser, la calidad del semen (Saacke y col., 2000) o la eficiencia del inseminador (Lof y col., 2007).

Mortalidad embrionaria

La mortalidad embrionaria es una de las principales causas de fracaso reproductivo. La misma se puede clasificar en muy temprana (mortalidad entre los días 0 y 7), temprana (entre los días 7 y 24), y tardía (a partir de 24 días y hasta los 45 días), y después de los 45 días se considera mortalidad fetal. La mayor mortalidad embrionaria se produce dentro de las tres primeras semanas de gestación (Humblot, 2001; Inskeep y Dailey, 2005; Diskin y Morris, 2008).

Las causas de la mortalidad embrionaria muy temprana son la mala calidad de los ovocitos o un ambiente uterino inadecuado. Los animales que presentan un aumento más temprano de las concentraciones de progesterona, entre los días 4 y 7 después de la inseminación, tienen mayor probabilidad de mantener la gestación que los animales con un aumento más lento (Diskin y Morris, 2008). Esto es atribuido a que, mayores concentraciones de progesterona, promueven un mejor ambiente uterino para el desarrollo del embrión.

Además de las causas mencionadas, en el período entre los 7 y 24 días de gestación, es importante la secreción de interferón tau por parte del embrión, el cual inhibe la secreción de PG por el endometrio y permite el reconocimiento materno-fetal (Spencer y col., 2008).

HIPÓTESIS

1. La administración de progesterona parenteral en un vehículo oleoso que permite su liberación lenta mantiene niveles sanguíneos luteales de P4 por 7 días, tanto en vacas ciclando como en anestro.
2. Los niveles de P4 plasmática alcanzados con la progesterona parenteral en los animales en anestro son similares a los provocados con la colocación de un CIDR con 1,3 g de P4.
3. La etapa fisiológica en que se encuentra el animal al inicio del tratamiento (ciclando o anestro) afecta tanto los niveles de progesterona plasmática como la dinámica folicular.

OBJETIVOS

1. Evaluar la duración y magnitud de los niveles plasmáticos de P4 luego de la administración parenteral de 200 y 400 mg de P4 en vacas ciclando, y de la administración de 200 mg de P4 y la inserción de un CIDR en vacas en anestro.
2. Comparar la dinámica folicular en dos grupos de vacas en anestro, sincronizadas con una combinación de GnRH, PG y GnRH (Ovsynch), modificado con 200 mg de P4 o con un CIDR con 1,3 g de P4; y por otra parte, en dos grupos de vacas repetidoras, sincronizadas con un Ovsynch modificado con 200 o con 400 mg de P4.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo fue realizado en el tambo experimental de INIA "La Estanzuela", Colonia, Uruguay, entre el 4 y el 15 de enero de 2010.

El trabajo comenzó con la presincronización de 46 vacas con dos dosis de PG. La primera dosis fue administrada 26 días previos al inicio de los experimentos y la segunda dosis se aplicó 14 días después, o sea, 12 días previos al inicio de los experimentos.

El día -1 se clasificaron los animales, en base a la presencia o ausencia de CL y a la existencia o no de celo luego de la presincronización. De las 46 vacas iniciales se seleccionaron 22 para ser utilizadas en los experimentos, ya que el resto no cumplía con las condiciones necesarias para los mismos. Las seleccionadas fueron 7 vacas en anestro y 15 vacas cíclicas repetidoras (con más de 3 servicios sin concepción), con las que realizamos el experimento 1 y 2 respectivamente.

Experimento 1

Para este experimento se utilizaron 7 vacas en anestro, raza Holando, de $466,1 \pm 19,6$ kg de peso vivo, $2,4 \pm 0,1$ de CC, $203,3 \pm 21,7$ días posparto, de $2,1 \pm 0,6$ lactancias y $14,5 \pm 1,0$ litros de leche diarios.

Estos animales se subdividieron en dos grupos: el Grupo 1, de 4 animales y el Grupo 2, de 3 animales.

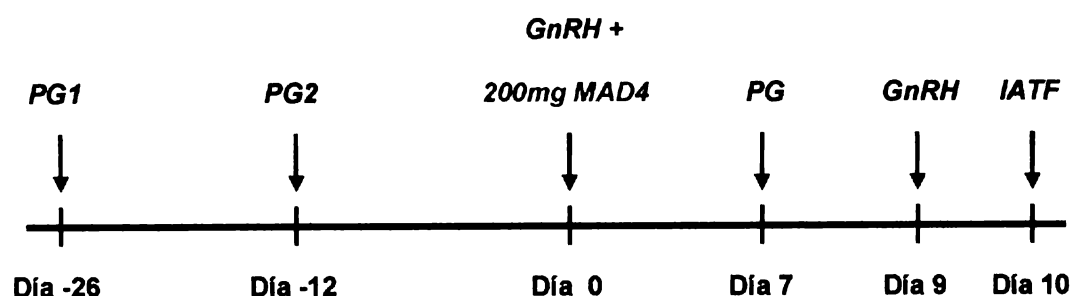
El día 0, los dos grupos recibieron una dosis I/M de 8 μ g de un análogo sintético de la GnRH (GnRH, Acetato de Buserelina, Laboratorio Río de Janeiro, Santa Fe, Argentina); y a cada grupo se le realizó el tratamiento correspondiente:

- Al grupo 1, se le administró 200 mg de progesterona I/M, en base oleosa (MAD4, Laboratorio Río de Janeiro).
- Al grupo 2, se les colocó un dispositivo intravaginal de liberación controlada (CIDR, Universal Lab, Montevideo), con 1,3 gramos de progesterona.

El día 7 del experimento, a los dos grupos se les administró 500 µg I/M de un análogo sintético de la PG (Prostaglandina, Cloprostenol, Laboratorio Río de Janeiro, Santa Fe, Argentina) y se extrajo el CIDR a los animales del grupo 2.

El día 9, se administró una segunda dosis de 8 µg de GnRH, I/M.

Grupo 1:



Grupo 2:

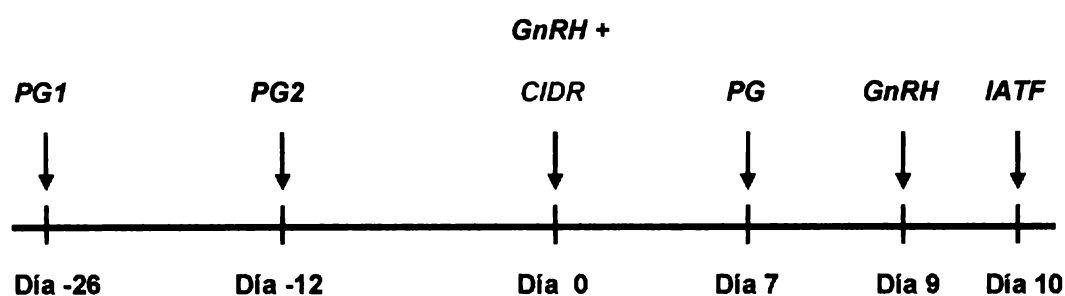


Figura 5. Tratamientos realizados a los grupos de vacas en anestro.

Los sangrados se realizaron con la siguiente frecuencia: una muestra 24 horas antes del tratamiento, para la determinación de niveles basales de P4, otra al momento de los tratamientos (día 0 del protocolo), luego a las 4, 8 y 12 horas del mismo; los dos días siguientes se realizaron dos sangrados diarios, y los seis días restantes un sangrado diario (Cuadro I).

Cuadro I. Esquema de sangrados realizados durante el experimento, detallando el día y las horas en que se realizó la extracción.

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Día	-1	0	0	0	0	1	1	2	2	3	4	5	6	7	8
Hora	-24	0	4	8	12	24	36	48	60	72	96	120	144	168	192

Las muestras de sangre se obtuvieron en tubos al vacío, heparinizados, mediante punción yugular. Luego fueron centrifugadas dentro de los 30 minutos de obtenidas, a 3000 RPM, durante 15 minutos. El plasma fue obtenido con pipetas Pasteur y congelado en tubos Ependorf. La determinación de progesterona plasmática fue realizada por radioinmunoanálisis (RIA) con un Kit comercial (Coat-a-Count, DPC, USA), por la Dra. Ana Meikle, en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria. Los coeficientes de variación intra e inter experimento fueron del 6% y 11% y la sensibilidad del experimento de 0,1 nmol l⁻¹.

Los días -1, 1, 7 y 9 del protocolo se realizó ultrasonografía ovárica, con el objetivo de evaluar la dinámica folicular y luteal y de determinar la ovulación. Se utilizó un ecógrafo Aloka 500 (Aloka CO. Ltd., Tokio, Japón) con un transductor lineal, de modo B, de tiempo real, con una frecuencia de 7,5 MHz.

Para determinar la ovulación se tomaron en cuenta las dos últimas ecografías, considerando que ovuló aquella vaca que tuvo un crecimiento constante del folículo hasta la ecografía del día 9 y siendo éste de tamaño preovulatorio (>10 mm) para inducir la ovulación con la administración de la segunda GnRH. Se clasificó como vaca que ovuló prematuramente aquella que presentó al día 7 folículos preovulatorios y al día 9 folículos menores a 5 mm. También se determinó la regresión folicular, tomando en cuenta la presencia de un folículo preovulatorio el día 7 y al día 9 folículos de entre 5 y 10 mm.

Para determinar la tasa de crecimiento folicular se tomaron en cuenta los diámetros foliculares medidos en las ultrasonografías de los días 1 y 9, y la misma se calculó como: $\text{Diámetro Final} - \text{Diámetro Inicial} / \text{N}^{\circ} \text{ de días}$.

Experimento 2

Para el mismo utilizamos 15 animales, raza Holando, de $525,1 \pm 18,3$ kg de peso, $2,9 \pm 0,1$ de CC, $230,3 \pm 15,1$ días posparto, de $2,3 \pm 0,4$ lactancias y $14,2 \pm 0,6$ litros de leche diarios.

Estos animales se encontraban ciclando, ya que habían mostrado dos celos anteriores, y que presentaron CL a la ultrasonografía. Sin embargo, en nuestro

trabajo los consideramos "vacas problema", ya que se encontraban vacías luego de haber recibido más de tres servicios.

Los animales se subdividieron en dos grupos: Grupo 3 y 4, de 7 y 8 animales respectivamente. Las hormonas y dosis utilizadas fueron iguales al experimento 1.

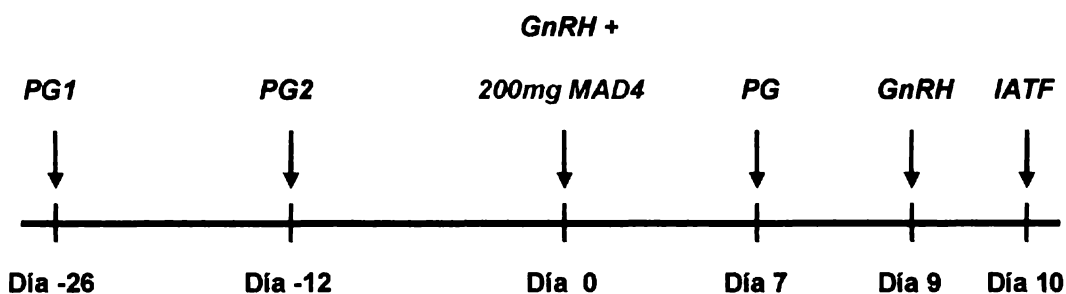
El día 0, los dos grupos recibieron una dosis I/M de 8 µg de un análogo sintético de la GnRH, y a cada grupo se le realizó el tratamiento correspondiente:

- Al grupo 3, se le administraron 200 mg de MAD4
- Al grupo 4, se le administraron 400 mg de MAD4

El día 7 del experimento, a los dos grupos se les administró 500 µg I/M de un análogo sintético de la PG.

El día 9, se administró una segunda dosis de 8 µg de GnRH, I/M.

Grupo 3:



Grupo 4:

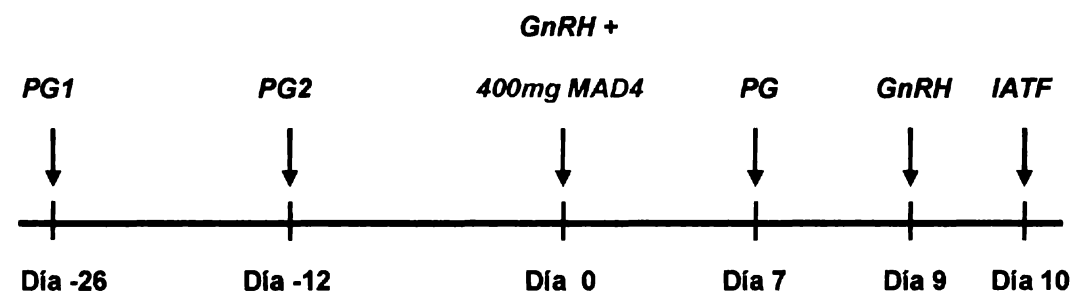


Figura 6. Tratamientos realizados a los grupos de vacas repetidoras.

Los sangrados y las ecografías, así como la tasa de crecimiento folicular y la evolución folicular se realizaron con la misma frecuencia y metodología que para el experimento 1.

Análisis comparativo de los dos experimentos:

Con el objetivo de evaluar la misma dosis I/M de 200 mg en diferente estado fisiológico (anestro o ciclando) se compararon los grupos 1 y 3 de los experimento 1 y 2, respectivamente, analizando tanto los niveles plasmáticos de progesterona alcanzados, como la dinámica folicular.

Análisis estadístico

Para el análisis de variables continuas con varias mediciones en el experimento (niveles de progesterona y diámetro folicular) se utilizó un modelo mixto (PROC MIXED, SAS). El modelo incluyó como efecto aleatorio a la vaca. La estructura de covarianza utilizada fue AR (1) (Littell y col., 1998) y las medidas repetidas se realizaron sobre cada vaca.

RESULTADOS

Experimento 1

Concentraciones de progesterona en sangre

Todos los animales en anestro presentaron en la muestra previa al tratamiento concentraciones de P4 muy por debajo de 1 ng/mL. En la muestra tomada al inicio de los tratamientos, aún no se apreciaron cambios en dichas concentraciones. En la tercera muestra, tomada 4 horas luego del tratamiento, se observó un pico máximo en los animales del grupo 1; en cambio en el grupo 2, si bien existió un aumento apreciable, éste no fue tan marcado. En la siguiente muestra, a las 8 horas, pudimos observar que las concentraciones se mantuvieron similares a las anteriores, para ambos grupos, siendo en ésta el pico máximo para el grupo 2. A las 12 horas, comenzaron a declinar los valores en ambos grupos, aun así mantuvieron niveles por encima de 1 ng/mL. En la siguiente muestra, a las 24 horas, los niveles del grupo 1 descendieron encontrándose ya concentraciones inferiores a 1 ng/mL que se mantuvieron hasta el final del experimento, a excepción de la muestra tomada a las 72 horas en la cual se observó un pequeño pico que llegó a 1,1 ng/mL. En la misma muestra, para los animales del grupo 2, si bien los niveles comenzaron a descender, se mostraron siempre por encima de 1 ng/mL, manteniéndose en las siguientes muestras de manera bastante uniforme, observándose al igual que el grupo anterior un leve pico a las 72 horas. En la última muestra, a las 192 horas, las concentraciones para el grupo 2 descendieron por debajo de 1 ng/mL. Las diferencias entre los dos tratamientos sólo fueron significativas a la hora 4 y 8 del experimento ($P < 0,05$). Los resultados descriptos pueden apreciarse en la siguiente figura (figura 7).

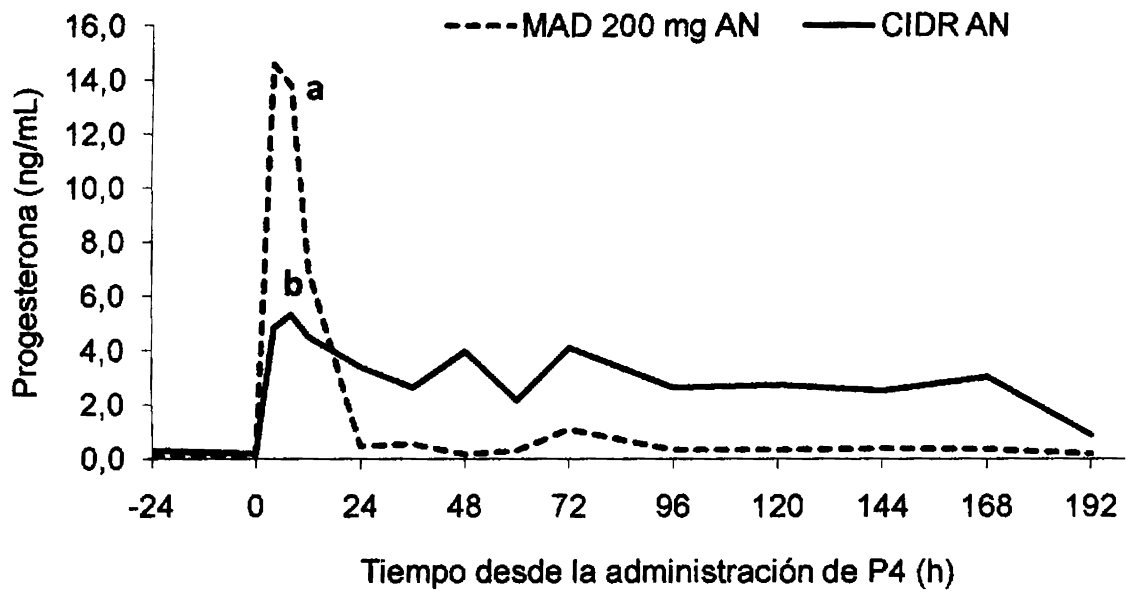


Figura 7. Evolución de los niveles de progesterona en sangre (ng/mL), para los grupos de animales en anestro. Se incluyen todas las muestras tomadas durante el experimento, siendo a la hora 0 el inicio del protocolo. Las diferencias significativas entre tratamientos se observan a la hora 4 y 8 del experimento (a,b: $P < 0,05$).

Dinámica folicular

Al día -1 ambos grupos presentaron folículos de pequeño tamaño, los cuales el día 1 alcanzaron diámetros de folículo preovulatorio (> 10 mm). El día 7 el grupo 1 presentó un pequeño crecimiento alcanzado su diámetro máximo, mientras que para el grupo 2 el crecimiento fue mayor. El día 9, los folículos del grupo 1 presentaron un diámetro menor que el día 7, en tanto que los del grupo 2 continuaron creciendo, alcanzando su diámetro máximo.

Si bien en la figura 8 se ve una tendencia del grupo 1 a regresar luego del día 7, mientras el grupo 2 mantuvo su crecimiento, esto no es significativo, ya que estadísticamente solo existen diferencias entre el día -1 y 1 del experimento ($P < 0,05$). De la misma forma, no existieron diferencias significativas entre los tratamientos, en ningún día del experimento ($P > 0,05$).

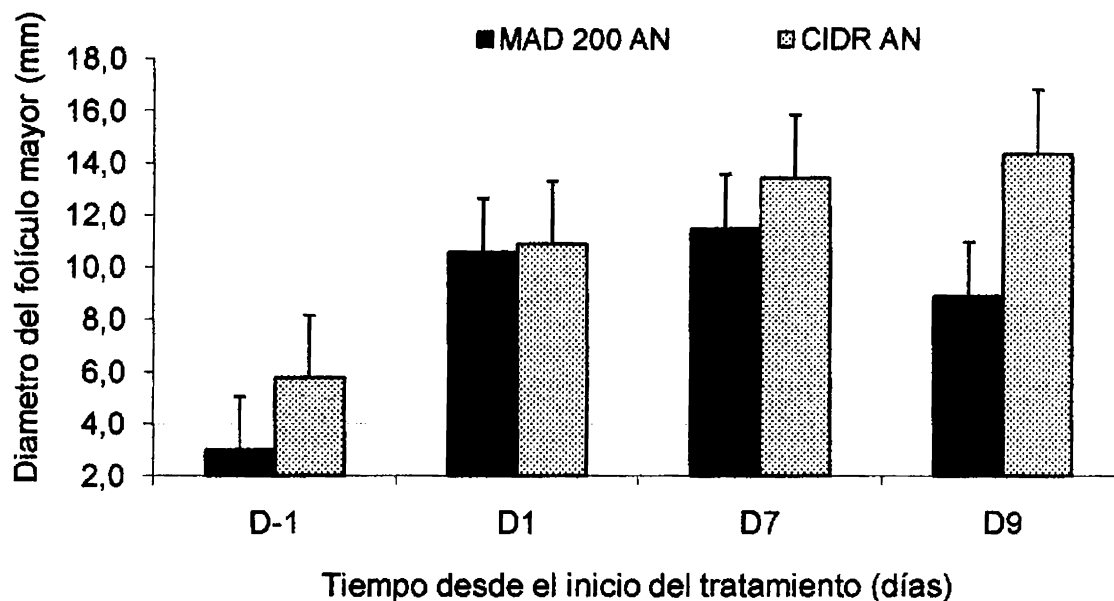


Figura 8. Dinámica folicular observada en los grupos del experimento 1. Diámetro máximo de los folículos observados en cada ecografía (realizadas un día antes del inicio del protocolo y los días 1, 7 y 9 luego del tratamiento).

Experimento 2

Concentraciones de progesterona en sangre

Todos los animales ciclando (repetidoras), a diferencia de los que se encontraban en anestro, presentaron en la muestra 1 y 2 niveles de P4 en sangre por encima de 1 ng/mL. A las 4 horas del tratamiento, se observó para los dos grupos un importante aumento de la concentración, alcanzando los animales del grupo 3 el pico máximo, mientras que el mayor pico para el grupo 4 se observó en la siguiente muestra, a las 8 h. A partir de este momento los valores se mantuvieron relativamente constantes, viéndose un aumento a partir de la muestra 10, para luego descender en las últimas dos muestras, hasta llegar a los valores mínimos apenas por encima de 1 ng/mL en ambos grupos. Las diferencias significativas entre ambos tratamientos se observaron a la hora 4, 8 y 12 del experimento. ($P < 0,05$). En la siguiente figura se reflejan estos resultados (Figura 9).

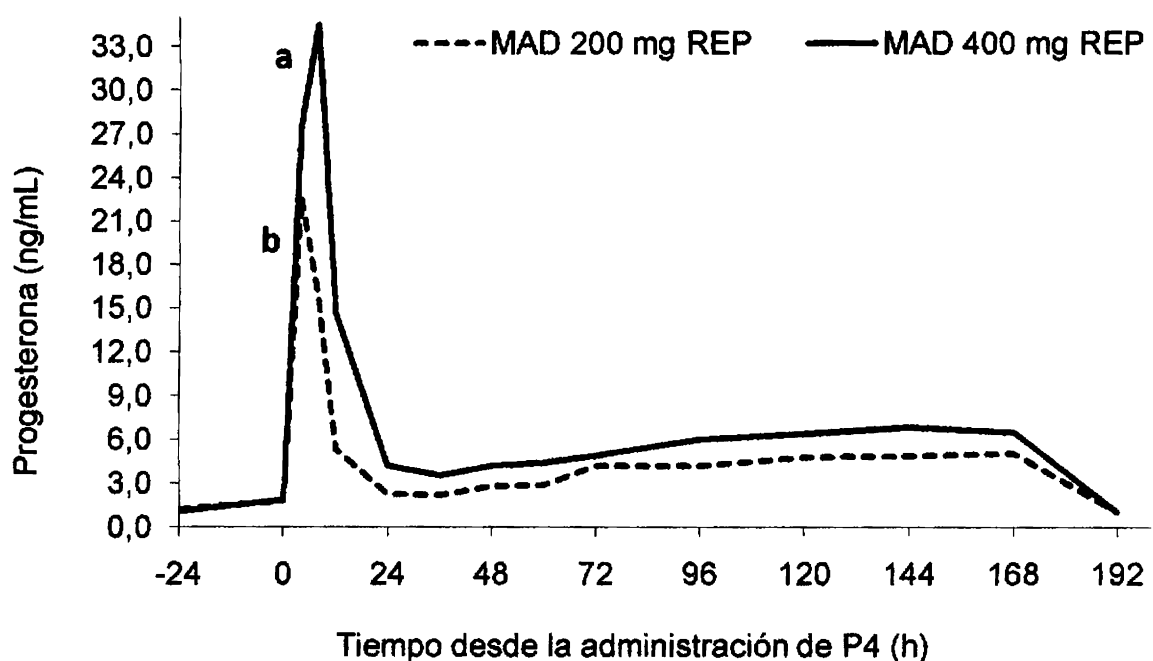


Figura 9. Evolución de los niveles de progesterona en sangre (ng/ml), para los grupos de vacas repetidoras. Se incluyen todas las muestras tomadas durante el experimento, siendo a la hora 0 el inicio del protocolo (a,b: $P < 0,05$).

Dinámica folicular

El día -1 ambos grupos presentaron folículos de bajo diámetro, los cuales al día 1 mostraron un pequeño crecimiento. El día 7 los folículos de ambos grupos continuaron creciendo y alcanzaron su diámetro máximo, presentando el grupo 3 folículos de mayor tamaño que el grupo 4. En el día 9 el grupo 3 mantuvo su diámetro, mientras que el grupo 4 presentó folículos de menor tamaño. En la figura 10 se muestran estos resultados.

Las diferencias aparentes entre los dos tratamientos no fueron significativas ($P > 0,05$). Si existieron diferencias entre días, viéndose éstas entre el día -1 y 1 y entre el día 1 y 7 ($P < 0,05$).

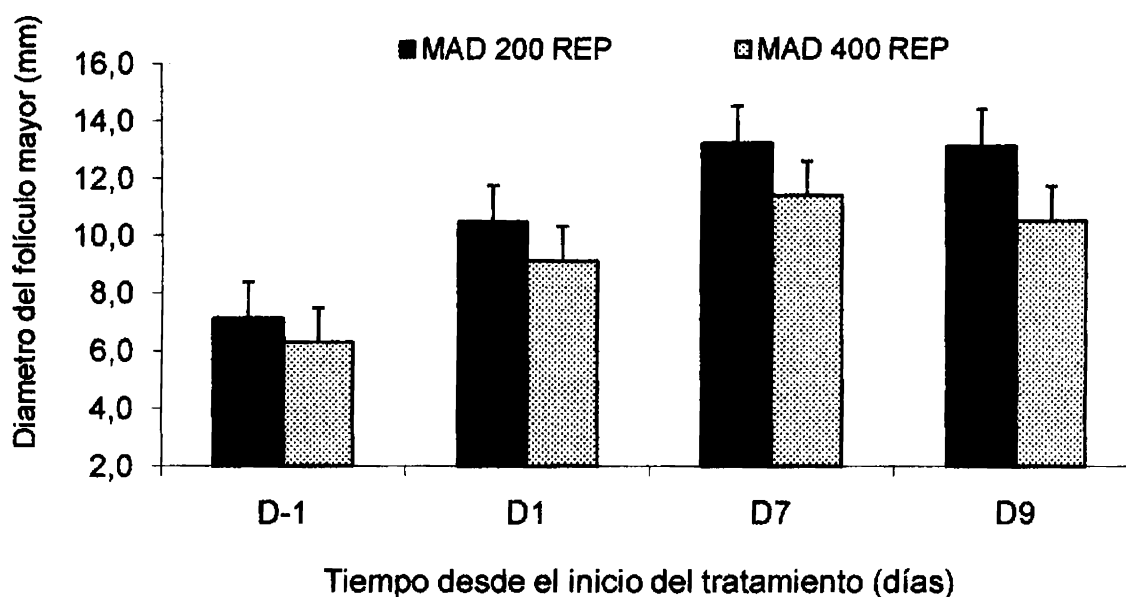


Figura 10. Dinámica folicular observada en los grupos del experimento 2. Se muestran los folículos observados en cada ecografía (realizadas un día antes del inicio del protocolo y los días 1, 7 y 9 luego del tratamiento).



Tasa de crecimiento y evolución folicular

Cuadro II. Tasa de crecimiento folicular para los cuatro tratamientos, calculada entre los días 1 y 9 del experimento. $T = (\text{Diámetro final} - \text{Diámetro inicial}) / \text{N}^{\circ}$ días.

	TRATAMIENTO			
	1	2	3	4
TASA DE CRECIMIENTO	-0,21	0,43	0,33	0,18

Cuadro III. Evolución folicular, expresada en proporción de animales sobre el total de cada grupo.

	TRATAMIENTO	OVULÓ	OVULO PREM.	REGRESÓ
EXPERIMENTO 1	1	1/4	1/4	2/4
	2	2/3	0/3	1/3
EXPERIMENTO 2	3	5/7	1/7	1/7
	4	4/8	1/8	3/8

DISCUSIÓN

Para que la vía parenteral de administración de progesterona (P4) pueda sustituir la aplicación local (CIDR), ésta debe asegurar niveles luteales en sangre durante por lo menos 7 días, los cuales son capaces de crear ambientes altos en P4, que son necesarios en programas iniciados al comienzo o al final del ciclo estral, tanto en vacas en anestro como en vaquillonas (Stevenson y col., 1999; Rivera y col., 2005).

En el presente experimento obtuvimos concentraciones aceptables durante 7 días en el grupo de animales en anestro tratados con CIDR y en los grupos de vacas ciclando tratados con 200 y 400 mg de MAD. En el único grupo que los niveles no se mantuvieron durante los 7 días fue en los animales en anestro tratados con 200 mg de MAD, similar a lo observado en el trabajo de Cavestany y col. en 2007 utilizando vacas ovariectomizadas tratadas con 400 mg de MAD por vía subcutánea, en el cual la P4 cayó por debajo de 1 ng/mL antes de las 60 horas post tratamiento.

Como era esperable los animales en anestro, antes de comenzar el tratamiento presentaron valores de P4 en plasma por debajo de los niveles luteales (1ng/mL), al igual que lo observado por McDougall y col. en 2004. Luego de realizados los tratamientos, los dos grupos (CIDR y MAD) presentaron concentraciones de P4 por encima de 1ng/mL, existiendo diferencias significativas ente ambos, a favor del MAD, a la hora 4 y 8 post tratamiento ($p < 0,05$). Desde la hora 24, y hasta el final del experimento, los perfiles de P4 para el grupo CIDR se mantuvieron por encima del nivel luteal cayendo por debajo de 1 ng/mL recién en el día 8, es decir, luego de la extracción del dispositivo. Por el contrario, en el trabajo de McDougall, utilizando un CIDR con 1,56 g de P4 la misma desciende de 1 ng/mL ya en el día 6. El pico máximo de P4 plasmática se observó en el presente estudio al tercer día de la inserción, siendo éste de 4,1 ng/mL. Valores similares se observaron en el trabajo realizado por Nation y col. en el 2000 en el cual el mayor pico fue de 4 ng/mL, pero observándose éste a las 24 horas de la colocación del CIDR. El grupo MAD por su parte presentó niveles subluteales de P4 ya a la hora 24 del experimento y hasta el final del mismo, similar a lo observado en el trabajo de Cavestany y col. en el que la P4 cayó por debajo de 1 ng/mL a las 48 horas de la

administración. La diferencia en la duración de la P4 en sangre, observada entre los grupos 1 y 2 del presente experimento la atribuimos a la vía de administración. El CIDR produce una liberación constante y uniforme durante todos los días que está colocado, alcanzando niveles plasmáticos igualmente uniformes (Sorensen, 1982). En cambio la administración I/M, a pesar de ser en base oleosa, alcanza rápidamente concentraciones plasmáticas muy altas que luego declinan bruscamente.

Todas las vacas repetidoras tuvieron antes del tratamiento niveles de P4 por encima de 1 ng/mL, ya que se encontraban en el día 10 del ciclo, presentando un CL funcional. Si bien los valores estuvieron por encima de los niveles basales, estos fueron <2 ng/mL mientras que otros trabajos observaron en vacas ciclando en el décimo día del ciclo estral valores cercanos a 5 ng/mL (Wolfenson y col., 2004). A lo anterior podemos atribuir el hecho de que las vacas de nuestro experimento presentaban baja aptitud reproductiva. Luego de los tratamientos con 200 y 400 mg de MAD, la concentración de P4 se elevó muy por encima de los niveles basales luteales, llegando a valores superiores a 11 y a 19 ng/mL para la dosis de 200 y 400 mg, respectivamente. Esto difiere de lo reportado en trabajos realizados con CIDRs en animales ciclando, en los cuales se observaron niveles máximos de alrededor de 2,5 (Sakase y col., 2005) y 4 ng/mL (Kawate y col., 2004). La mayor concentración de P4 alcanzada para el grupo 4 respecto al grupo 3 en el presente estudio la atribuimos a la dosis de P4 exógena administrada. Macmillan y col. en 1991, en un trabajo similar realizado con CIDRs múltiples demostraron que la concentración plasmática de progesterona es dosis dependiente, aumentando los niveles sanguíneos de P4, al aumentarse la dosis administrada. Similares resultados obtuvieron McDougall y col. en 2004, utilizando CIDRs con diferentes dosis de P4. Luego de la hora 12 post tratamiento, y hasta el final del experimento, los niveles de P4 disminuyeron considerablemente, pero manteniéndose por encima de 1 ng/mL, no existiendo diferencias entre tratamientos. Lo que se destaca del perfil plasmático de P4 logrado con la administración parenteral es el gran pico inicial alcanzado que luego declina bruscamente. Esto difiere de los trabajos realizados con CIDRs, en los cuales se observó un perfil en meseta durante los días que estuvo colocado el dispositivo

(Kawate y col., 2004), o incluso se vio una curva de crecimiento de la P4 plasmática en esos días (Sakase y col., 2005).

Al comparar el mismo tratamiento (200 mg de MAD) en vacas en anestro y vacas ciclando, existieron diferencias en la concentración de P4 plasmática alcanzada a la hora 4 y 8 post tratamiento a favor de los animales cíclicos, lo que fue debido a la presencia de P4 endógena en estos últimos. En el resto del experimento, si bien la diferencia no fue significativa, la tendencia se mantuvo.

Los folículos observados en los animales en anestro tratados con CIDR presentaron una tendencia a ser levemente mayores que los del grupo MAD, durante todo el experimento, aunque estas diferencias no fueron significativas. Esto lo atribuimos a los mayores niveles de progesterona plasmática alcanzados en el grupo MAD, que produjo una menor tasa de crecimiento del folículo dominante y un menor tamaño del mismo. Por lo tanto se puede inferir que las diferencias observadas entre ambos grupos se deberían a los efectos de la concentración de P4 generada durante el tratamiento (Callejas y col., 2002; Vasconcelos y col., 1999). En ambos tratamientos se vieron al día 9, folículos de bajo tamaño (<14,5 mm), que posiblemente deriven en una menor fertilidad. Este menor tamaño puede también deberse a que las vacas no hubieran ovulado luego de la primer dosis de GnRH, lo que disminuiría el tamaño del FD al momento de aplicar la segunda dosis de GnRH (Atkins y col., 2010). Según informaron Vasconcelos y col. en 2001 folículos pequeños (de 11,5mm) resultarán, luego de la ovulación, en CL de menor tamaño que producirán menores concentraciones de P4, llevando a la reducción de la fertilidad. Pérez Marín y col. reportaron en 2003 que el diámetro medio de los folículos preovulatorios es de $17,8 \pm 3,6$ mm, lo que difiere de nuestros resultados.

Los grupos de vacas repetidoras presentaron también folículos preovulatorios de pequeño tamaño (<13,5 mm), siendo menores aún los del grupo MAD400 que los del MAD200. Como pudimos observar en este experimento, si bien no hubieron diferencias entre ambos grupos ($p > 0,05$), existió una tendencia de que, en el experimento en el cual se administró mayor dosis de P4, se observaron folículos de menor tamaño. Como se mencionó anteriormente esto puede ser debido a la

inhibición que provoca la alta concentración de P4 sobre el crecimiento folicular (Callejas y col., 2002; Vasconcelos y col., 1999).

Si comparamos el mismo tratamiento (200mg de MAD) en vacas en anestro y en vacas ciclando, observando las figuras 8 y 10 podemos decir que en el grupo de vacas en anestro se observó una regresión de los folículos, mientras que en la vacas ciclando los mismos crecieron de manera continua hasta la segunda GnRH. Estadísticamente estos resultados no presentan diferencia.

Como observamos en el cuadro II, la tasa de crecimiento folicular en ambos experimentos fue muy baja en comparación con lo reportado por otros autores, de 1 a 2 mm/día por (Fortune y otros, 1988; Murphy y col., 1990) y de 0,89 mm/día (Atkins y col., 2010). Esta baja tasa puede ser debida a que los animales de nuestro experimento fueron animales de baja aptitud reproductiva, "repetidoras", con un prolongado período de días abiertos y baja condición corporal. Una de las posibles causas es un BEN, el que se ha vinculado con la disminución de la secreción de LH y con bajas concentraciones de IGF-I (Diskin y col., 2003), las cuales actúan de forma sinérgica para promover el desarrollo folicular (Lucy, 2000). Se observó una correlación positiva significativa entre el tamaño del diámetro folicular y los niveles de IGF-I $r = 0.55$, $p < 0.001$, $n = 44$ (Albanell y Silva 2006). Otra posible causa puede estar relacionada a lo planteado por Atkins y col., 2010, dependiendo de la ovulación o no en respuesta a la primera administración de GnRH.

En el cuadro III se puede ver que en el experimento 1 el grupo CIDR se comportó de mejor forma que el grupo MAD 200, esta diferencia se ve reflejada en la figura 8 en la cual se puede observar que en el tratamiento 1 la onda folicular al momento de la segunda GnRH se encontraba ya en regresión y con un diámetro promedio del FD menor a 10 mm, en tanto que en el tratamiento 2 la situación fue inversa. Este comportamiento es atribuido a que, si bien en el grupo 1 existió un pico inicial de P4, luego de las 24 hs ésta cayó por debajo de 1 ng/mL, y teniendo en cuenta que las vacas vienen de un anestro no teniendo el "priming" de P4 necesario para un desarrollo folicular adecuado, esto se traduce en un deficiente crecimiento y maduración del FD (Roche y col.; 1992). En cambio en el grupo CIDR las concentraciones alcanzadas fueron constantes (> 1 ng/mL) cumpliendo

con este requisito. Al igual que en el experimento anterior, en el experimento 2 el grupo que mejor se comportó fue el MAD 200, presentando una onda folicular en crecimiento y un FD de mayor tamaño al momento de la administración de la segunda GnRH. Por otra parte, el grupo MAD 400 mostró una regresión de los folículos y un FD de menor tamaño. Esto se observa en la Figura 10 y se explica teniendo en cuenta que la administración de niveles altos de P4 altera el desarrollo del FD (Adams y col., 1992a). Esto altera la secreción pulsátil de LH y causa que el FD detenga sus funciones metabólicas y comience a regresar (Aerts y Bols, 2010).

La dosis de 200 mg de MAD en el segundo experimento obtuvo mejores resultados que la misma dosis en el experimento 1, esto es debido a que, en el experimento 2 los niveles de P4 se mantuvieron siempre por encima de 1 ng/mL ya que existió también P4 endógena porque los animales se encontraban ciclando.

CONCLUSIONES

Los animales ciclando lograron mantener niveles plasmáticos luteales durante los 7 días luego de la administración de P4 parenteral, pero cuando se utilizó esta vía en animales en anestro, los niveles luteales se mantuvieron sólo por 24 horas, por lo que suponemos que gran parte de la P4 observada en los animales ciclando puede deberse a la presencia de P4 endógena, de origen luteal.

La misma dosis (200 mg) usada en distinta etapa fisiológica del animal generó respuestas diferentes en los niveles plasmáticos de P4, según fue administrada en animales ciclando o en anestro, no observándose diferencias significativas en lo referente a la dinámica folicular.

Si bien la dosis de 400 mg, al igual que la de 200 mg, cumplió con los niveles plasmáticos necesarios para el protocolo, los folículos obtenidos con esta dosis presentaron una tendencia a ser de menor tamaño y se observó una peor evolución folicular, representando además un costo mayor innecesario.

El perfil plasmático de P4 logrado por la administración parenteral no se comportó como los perfiles logrados con un CIDR, ya que la vía I/M generó un gran pico en las primeras horas que luego cayó bruscamente, mientras que el CIDR mantuvo niveles uniformes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams, GP, Matteri, RL, Ginther, OJ. (1992a) The effect of progesterone on growth of ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating FSH in heifers. *J. Reprod. Fert.*; 95:627-640.
2. Adams, GP, Matteri, RL, Kastelic, JP, Ko, JC, Ginther, OJ. (1992b) Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fert.*; 94:177-188.
3. Adams, GP, Pierson, RA. (1995) Bovine model for study of ovarian follicular dynamics in humans. *Theriogenology*; 43:113-120.
4. Aerts, JMJ, Bols, PEJ. (2010) Ovarian follicular dynamics: A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. *Reprod. Dom. Anim.*; 45: 180-187.
5. Ahmadzadeh, A, Frago, F, Shafii, B, Dalton, JC, Price, WJ, McGuire, MA. (2009) Effect of clinical mastitis and other diseases on reproductive performance of Holstein cows. *Anim. Reprod. Sci.*; 112:273-282.
6. Albanell, F, Silva, AL. (2006) Efecto de la suplementación energética sobre la reproducción y producción en vacas holando en pastoreo. Tesis de grado, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo, Uruguay, 63 p.
7. Atkins, JA, Smith, MF, Wells, KJ, Geary, TW. (2010) Factors affecting preovulatory follicle diameter and ovulation rate following gonadotropin-releasing hormone in postpartum beef cows. Part II: anestrous cows. *J. Anim. Sci.*; 88:2311–2320.
8. Beam, SW, Butler, WR. (1999) Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *J. Reprod. Fert.*; 54:411-424.
9. Bo, GA, Adams, GP, Pierson, RA, Caccia, M, Tribulo, H, Mapletof, RJ. (1994) Follicular wave dynamics alter estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestagen implant. *Theriogenology*; 41:1555-1569.
10. Bo, GA, Adams, GP, Pierson, RA, Mapletof, RJ. (1995) Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*; 43:31-40.
11. Bó, GA, Caccia, M (2002) Dinámica folicular ovárica en el ganado bovino. En: Ungerfeld, R. Reproducción en los animales domésticos, Tomo I, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay, Melibea, 55-68.

12. Bó, GA, Cutaia, LE, Souza, AH, Baruselli, ES. (2009) Actualización sobre protocolos de IATF en bovinos de leche utilizando dispositivos con progesterona. *Taurus (Bs As)*; 11:20-34.
13. Callejas, SS, Alberio, RH, Cabodevila, J, Dulout, F, Aller, JF, Catalano, R. (2002) Evaluación de la administración de diferentes dosis de progesterona para controlar la onda de crecimiento folicular en vacas cíclicas. *Rev. Arg. Prod. Anim.*; 22:285-286.
14. Cavestany, D, Fernández, D, Salazar, E, Sánchez, A, Leyton, L, Crespi, D. (2008) Determinación de niveles de progesterona en sangre luego de la administración parenteral de progesterona en vacas Holando ovariectomizadas o ciclando. *Jornadas Uruguayas de Buiatría XXXVI, Paysandú, Uruguay*, 218-219.
15. Cavestany, D, Fernández, D, Salazar, E, Sánchez, A, Leyton, L, Crespi, D. (2008) Evaluación de una progesterona inyectable de liberación lenta en el programa Ovsynch en vaquillonas Holando. *Jornadas Uruguayas de Buiatría XXXVI, Paysandú, Uruguay*, 179-180.
16. Chebel, RC, Santos, JEP, Reynolds, JP, Cerri, RLA, Juchem, SO, Overton, M. (2004) Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*; 84:239-255.
17. Crowe, MA. (2008) Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.*; 43:20-28.
18. De la Sota, RL, Lares, S, Fernández-Francia, G, Formia, N (2003). Sincronización y resincronización de celos en ganado de leche. En: Ungerfeld, R. *Reproducción en los animales domésticos, Tomo II, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay, Melibea*, 467-473.
19. De Rensis, F, Peters, AR. (1999) The control of follicular dynamics by PGF 2α , GnRH, hCG and oestrus synchronization in cattle. *Reprod. Domest. Anim.*; 34:49-59.
20. De Rensis, F, Scaramuzzi, RJ. (2003) Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow: a review. *Theriogenology*; 60:1139-1151.
21. Diskin, MG, Mackey, DR, Roche, JF, Sreenan, JM. (2003) Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*; 78:345-370.

22. Diskin, MG, Morris, DG. (2008) Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod. Domest. Anim.*; 43:260-267.
23. Dobson, H, Smith, R, Royal, M, Knight, C, Sheldon, I. (2007) The high-producing dairy cow and its reproductive performance. *Reprod. Domest. Anim.*; 42:17-23.
24. Dobson, H, Walker, SL, Morris, MJ, Routly, JE, Smith, RF. (2008) Why is it getting more difficult to successfully artificially inseminate dairy cows?. *Animal*; 2:1104-1111.
25. Findlay, JK, Robertson, DM, Clarke, IJ, Klein, R, Doughton, BW, Xiao, S, Russel, DL, Shukovski, L. (1992) Hormonal regulation of reduction: general concepts. *Anim. Reprod. Sci.*; 28:319-328.
26. Fortune, JE, Sirois, J, Quirk, SM. (1988) The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. *Theriogenology* 29:95-109.
27. Fourichon, C, Seegers, H, Malher, X. (2000) Effect of disease on reproduction in the dairy cow: ameta-analysis. *Theriogenology*; 53:1729-1759.
28. Garnsworthy, PC, Sinclair, KD, Webb, R. (2008) Integration of physiological mechanisms that influence fertility in dairy cows. *Animal*; 2:1144-1152.
29. Ginther, OJ, Kastelic, JP, Knopf, L. (1989) Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.*; 20:187-200.
30. Ginther, OJ, Kot, K, Kulick, LJ, Martin, S, Wiltbank, MC. (1996) Relationships between FSH and ovarian follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle. *J. Reprod. Fert.*; 108:271-279.
31. Ginther, OJ, Kot, K, Kulick, LJ, Wiltbank, MC. (1997) Emergence and deviation of follicles during development of follicular waves in cattle. *Theriogenology*; 48:75-87.
32. Ginther, OJ. (2000) Selection of the dominant follicles in cattle and horses. *Anim. Reprod. Sci.*; 60-61:61-79.
33. Ginther, OJ, Beg, MA, Bergfelt, DR, Donadeu, FX, Kot, K. (2001) Follicle selection in monovular species. *Biol. Reprod.*; 65:638-647.
34. Giraldo, JJ. (2008) Sincronización y resincronización de celos y de ovulaciones en ganado de leche y carne. *Rev. Lasallista*; 5:90-99.

35. Grummer, RR. (2007) Strategies to improve fertility of high yielding dairy farms: management of the dry period. *Theriogenology*; 68:281-288.
36. Hafez, ESE, Hafez, B. (2002) Reproducción e inseminación artificial en animales, 7^a. ed, México, McGraw-Hill Interamericana, 519 p.
37. Hernandez, J, Shearer, JK, Webb, DW. (2001) Effect of lameness on the calving-to-conception interval in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; 218:1611-1614.
38. Humblot, P. (2001) Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. *Theriogenology*; 56:1417-1433.
39. Huszenicza, G, Janosi, S, Kulcsar, M, Korodi, P, Reiczigel, J, Katai, L, Peters, AR, De Rensis, F. (2005) Effects of clinical mastitis on ovarian function in post-partum dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.*; 40:199-204.
40. Inskeep, EK, Dailey, RA. (2005) Embryonic death in cattle. *Vet. Clin. N. A. Food. Anim. Pract.*; 21:437-461.
41. Ireland, JJ. (1987) Control of follicular growth and development. *J. Reprod. Fert.*; 34:39-54.
42. Kawate, N, Itami, T, Choushi, T, Saitoh, T, Wada, T, Matsuoka, K, Uenaka, K, Tanaka, N, Yamanaka, A, Sakase, M, Tamada, H, Inaba, T, Sawada, T. (2004) Improved conception in timed-artificial insemination using a progesterone-releasing intravaginal device and ovsynch protocol in postpartum suckled Japanese Black beef cows. *Theriogenology*; 61:399-406.
43. Knopf, L, Kastelic, JP, Schallenberg, E, Ginther, OJ. (1988) Ovarian follicular dynamics in heifers test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Domest. Anim. Endocrinol.*; 6:111-119.
44. Kulick, LJ, Kot, K, Wiltbank, MC, Ginther, OJ. (1999) Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology*; 52:913-921.
45. Lamb, GC, Stevenson, JC, Kesler, DJ, Garverick, HA, Brown, DR, Salfen, BE. (2001) Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F₂ α for ovulation control in postpartum suckled beef cows. *J. Anim. Sci.*; 79:2253-2259.
46. Larson, LL, Ball, PJH. (1992) Regulation of estrous cycle in dairy cattle: A review. *Theriogenology*; 38:255-267.

47. Littell, R, Henry, P, Ammerman, C. (1998) Statistical analysis of repeated measures using SAS procedures. *J. Anim. Sci.*; 76:1216-1231.
48. Lof, E, Gustafsson, H, Emanuelson, U. (2007) Associations between herd characteristics and reproductive efficiency in dairy herds. *J. Dairy Sci.*; 90:4897-4907.
49. Lucy, MC. (2000) Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J. Dairy Sci.*; 83:1635-1647.
50. Lucy, MC. (2001) Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J. Dairy Sci.*; 84:1277-1293.
51. Lucy, MC. (2008) Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for postpartum nutrition and reproduction. *Reprod. Domest. Anim.*; 43:31-39.
52. Macmillan, KL, Taufa, VK, Barnes, DR, Day, AM. (1991) Plasma progesterone concentration in heifers and cows treated with a new intravaginal device. *Anim. Reprod. Sci.*; 26:25-40.
53. Martínez, MF, Adams, GP, Bergfelt, D, Kastelic, JP, Mapletoft, RJ. (1999) Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in heifers. *Anim. Reprod. Sci.*; 57:23-33.
54. Martínez, MF, Kastelic, JP, Bo, GA, Caccia, M, Mapletoft, RJ. (2005) Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotropin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. *Anim. Reprod. Sci.*; 86:37-52.
55. McDougall, S, Compton, CWR, Annis, FM. (2004) Effect of exogenous progesterone and oestradiol on plasma progesterone concentrations and follicles wave dynamics in anovulatory anoestrus post-partum dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.*; 84:303-314.
56. Meléndez, P, Bartolome, J, Archbald, LF, Donovan, A. (2003) The association between lameness, ovarian cysts and fertility in lactating dairy cows. *Theriogenology*; 59:927-937.
57. Mihm, M, Baguisi, A, Boland, MP, Roche, JF. (1994) Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rates in beef heifers. *J Reprod Fert*; 102:123-130.
58. Mihm, M, Austin, EJ. (2002) The final stages of dominant follicle selection in cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.*; 23:155-166.

59. Moreira, F, de la Sota, RL, Diaz, T, Thatcher, WW. (2000) Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. *J. Anim. Sci.*; 78:1568-1576.
60. Mulligan, FJ, Doherty, ML. (2008) Production diseases of the transition cow. *Vet. J.*; 176:3-9.
61. Murphy, MG, Boland, MP, Roche, JF. (1990) Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in postpartum beef suckler cows. *J. Reprod. Fertil.*; 90:523-533.
62. Nation, DP, Burke, CR, Parton, G, Stevenson, R, Macmillan, KL. (2000) Hormonal and ovarian responses to a 5-day progesterone treatment in anoestrous dairy cows in the third week post-partum. *Anim. Reprod. Sci.*; 63:13-25.
63. Nebel, RL, Jobst, SM, Dransfield, MBG, Pansolfi, SM, Bailey, TL. (1997) Use of a radio frequency data communication system, HeatWatch, to describe behavioral estrus in dairy cattle. *J. Dairy. Sci.*; 80(Suppl 1):179 (abstract).
64. Odde, KG. (1990) A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. *J. Anim. Sci.*; 68:817-830.
65. Pérez Marín, CC, Rodríguez Artilles, I, España España, F, Dorado Martín, J, Hidalgo Prieto, M, Corral Peña, S, Sanz Parejo, J. (2004) Dinámica folicular ovárica en vacas repetidoras: estudio ecográfico y perfil de progesterona. *Arch. Zoot.*; 53:35-46.
66. Perry, GA, Smith, MF, Lucy, MC, Green, JA, Parks, TE, MacNeil, MD, Roberts, AJ, Geary, TW. (2005) Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 102:5268-5273.
67. Peter, AT, Vos, PLAM, Ambrose, DJ. (2009) Postpartum anestrus in dairy cattle. *Theriogenology*; 71:1333-1342.
68. Peters, AR, Ball, PJH. (1991) Reproducción del ganado vacuno, Zaragoza, Acriba, 222 p.
69. Pierson, RA, Ginther, OJ. (1987) Ultrasonographic appearance of the bovine uterus during the estrous cycle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; 190:995-1001.
70. Pursley, JR, Mee, MO, Wiltbank, MC. (1995) Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂ α and GnRH. *Theriogenology*; 44:915-923.

71. Pursley, JR, Wiltbank, MC, Stevenson, JS, Ottobre, JS, Garverick, HA, Anderson, LL. (1997) Pregnancy rates per AI for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronizes estrus. *J. Dairy Sci.*; 80:295-300.
72. Rivera, H, Lopez, H, Fricke, PM. (2005) Use of intravaginal progesterone-releasing inserts in a synchronization protocol before timed AI and for synchronizing return to estrus in holstein heifers. *J. Dairy Sci.*; 88:957-968.
73. Roche, JF, Crewe, MA, Boland, MP. (1992) Postpartum anestrous in dairy and beef cows. *Anim. Reprod. Sci.*; 28:371-338.
74. Roche, JF. (2006) The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Anim. Reprod. Sci.*; 96:282-296.
75. Roche, JR, Friggens, NC, Kay, JK, Fisher, MW, Stafford, KJ, Berry, DP. (2009) Invited review: body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *J. Dairy Sci.*; 92:5769-5801.
76. Roth, Z, Arav, A, Bor, A, Zeron, Y, Braw-Tal, R, Wolfenson, D. (2001) Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction*; 122:737-744.
77. Roelofs, J, Lopez-Gatius, F, Hunter, RHF, van Eerdenburg, FJCM, Hanzen, C. (2010) When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. *Theriogenology*; 74:327-344.
78. Saacke, RG, Dalton, JC, Nadir, S, Nebel, RL, Bame, JH. (2000) Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Anim. Reprod. Sci.*; 60-61:663-677.
79. Sakase, M, Seo, Y, Fukushima, M, Noda, M, Takeda, K, Ueno, S, Inaba, T, Tamada, H, Sawada, T, Kawate, N. (2005) Effect of CIDR-based protocols for timed-AI on the conception rate and ovarian functions of Japanese Black beef cows in the early postpartum period. *Theriogenology*; 64: 1197-1211.
80. Sakase, M, Kawate, N, Nakagawa, C, Fukushima, M, Noda, M, Takeda, K, Ueno, S, Inaba, T, Kida, K, Tamada, H, Sawada, T. (2007) Preventive effects of CIDR-based protocols on premature ovulation before timed-AI in Ovsynch in cycling beef cows. *Vet. J.*; 173:691-693.
81. Sanchez, T, Wehrman, ME, Kojima, FN, Cupp, AS, Bergfeld, EG, Peters, KE, Mariscal, V, Kottok, RJ, Kinder, JE. (1995) Desage of the synthetic progestin,

- norgestomet, influences luteinizing hormone pulse frequency and endogenous secretion of 17 β -estradiol in heifers. *Biol. Reprod.*; 52:453-464.
82. Sangsritavong, S, Combs, DK, Sartori, R, Armentano, LE, Wiltbank, MC. (2002) High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*; 85:2831-2842.
 83. Santos, JE, Cerri, RL, Ballou, MA, Higginbotham, GE, Kirk, JH. (2004) Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*; 80:31-45.
 84. Sartori, R, Haughian, JM, Shaver, RD, Rosa, GJ, Wiltbank, MC. (2004) Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J. Dairy Sci.*; 87:905-920.
 85. Seguin, B. (1987) Control of the reproductive cycle in dairy cattle. *Proceedings of the Annual Meeting of the Society for Theriogenology*, 300-308.
 86. Shehab-El-Deen, MA, Leroy, JL, Fadel, MS, Saleh, SY, Maes, D, Van Soom, A. (2010) Biochemical changes in the follicular fluid of the dominant follicle of high producing dairy cows exposed to heat stress early post-partum. *Anim. Reprod. Sci.*; 117:189-200.
 87. Sheldon, IM, Cronin, J, Goetze, L, Donofrio, G, Schuberth, HJ. (2009a) Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol. Reprod.*; 81:1025-1032.
 88. Sheldon, IM, Price, SB, Cronin, J, Gilbert, RO, Gadsby, JE. (2009b) Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle. *Reprod. Domest. Anim.*; 44:1-9.
 89. Sirois, J, Fortune, JE. (1988) Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.*; 39:308-317.
 90. Smith, VG, Chenault, JR, McAllister, JF, Lauderdale, JW. (1987) Response of postpartum beef cows to exogenous progestogens and gonadotropin releasing hormone. *J. Anim. Sci.*; 64:540-551.
 91. Somoza, GM (2002) Eje Hipotalamo-Hipofisario. Hormona Liberadora de Gonadotrofinas (GnRH). En: Ungerfeld, R. *Reproducción en los animales*

- domésticos, Tomo I, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay, Melibea, 15-21.
92. Sorensen, AM. (1982) Reproducción animal: principios y prácticas, McGraw-Hill, México, 432 p.
 93. Spencer, TE, Sandra, O, Wolf, E. (2008) Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction*; 135:165-179.
 94. Stevenson, JS, Kobayashi, Y, Thopson, KE. (1999) Reproductive performance of dairy cows in various programmed breeding systems including ovsynch combinations of gonadotropin releasing hormone prostaglandin F2 α . *J. Dairy Sci.*; 82:506-515.
 95. Stoke, AE, Fortune, JE. (1993) Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinol.*; 132:1108-1114.
 96. Tanaka, T, Arai, M, Ohtani, S, Uemura, S, Kuroiwa, T, Kim, S, Kamomae, H. (2008) Influence of parity on follicular dynamics and resumption of ovarian cycle in postpartum dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*; 108:134-143.
 97. Thatcher, WW, Macmillan, KL, Hansen, PJ, Drost, M. (1989) Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology*; 31:149-164.
 98. Thatcher, WW, Drost, M, Savio, JD, Macmillan, KL, Schmitt, EJ, Entwistle, KW, De la Sota, RL, Morris, GR. (1993) New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*; 33:27-49.
 99. Thatcher, WW, Schmitt, EP, de la Sota, RL, Burke, J, Risco, C, Staples, CR, Drost, M. (1995) Dinámica y control del desarrollo folicular y luteal en bovinos para optimizar la fertilidad. *Jornadas Uruguayas de Buiatría XXIII*, Paysandú, Uruguay, C1-C17.
 100. Thatcher, WW, Moreira, F, Santos, JEP. (2000) Strategies to improve reproductive management of dairy cows. *Adv. Dairy Tech.*; 12:177-193.
 101. Twagiramungu, H, Builbault, LA, Dufour, JJ. (1995) Synchronization of ovarian follicular waves with gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: a review. *J. Anim. Sci.*; 73:3141-3151.

102. Ungerfeld, R (2002a) Hipófisis y gondotrofinas. En: Ungerfeld R. Reproducción en los animales domésticos, Tomo I, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Melibea, 23-28.
103. Ungerfeld, R (2002b) Hormonas gonadales. Otras hormonas vinculadas a la reproducción. En: Ungerfeld R. Reproducción en los animales domésticos, Tomo I, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Melibea, 29-35.
104. Ungerfeld, R (2002c) Control endócrino del ciclo estral. En: Ungerfeld R. Reproducción en los animales domésticos, Tomo I, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Melibea, 39-53.
105. Vasconcelos, JLM, Silcox, RW, Rosa, GJM, Pursley, JR, Wiltbank, MC. (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.
106. Vasconcelos, JLM, Sartori, R, Oliveira, HN, Guenther, JG, Wiltbank, MC. (2001) Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*; 56: 307-314.
107. Walsh, SW, Williams, EJ, Evans, ACO. (2011) A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*; 123:127-138.
108. Wolfenson, D, Thatcher, WW, Savio, JD, Badinga, L, Lucy, MC. (1994) The effect of a GnRH analogue on the dynamics of follicular development and synchronization of estrus in lactating cyclic dairy cows. *Theriogenology*; 42:633-644.
109. Wolfenson, D, Inbar, G, Roth, Z, Kaim, M, Bloch, A, Braw-Tal, R. (2004) Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology*; 62:1042-1055.
110. Xu, Z, Garverick, HA, Smith, GW, Smith, MF, Hamilton, SA, Youngquist, RS. (1995) Expression of FSH and LH receptors mRNA in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol. Reprod.*; 53:951-957.