

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**Comparación entre una fuente de progesterona inyectable y
un dispositivo intravaginal administradas en un protocolo
Heatsynch en vacas Holando posparto ciclando y en
anestro**

Por



**Gonzalo Costa
Juan Peñagaricano
Ignacio Pombo**

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

Montevideo
Uruguay
2011



FV-28999

Página de aprobación

TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de Mesa:

Dr. Jorge Gil

Segundo Miembro (Tutor):

Dr. Daniel Cavestany

Tercer Miembro:

Dra. Isabel Pereira

Fecha:

31 de mayo de 2011

FACULTAD DE VETERINARIA

Autores:

Aprobado con 9 (nueve) votos

Gonzalo Costa

FACULTAD DE VETERINARIA

Juan Peñaricano

Aprobado con 7 (siete) votos

Ignacio Pombo

F

Aprobado

7 (siete) votos

Agradecimientos

A nuestro tutor Daniel Cavestany por su orientación

Al Laboratorio Rio de Janeiro por el suministro de las drogas

Al personal de INIA la Estanzuela por la buena disposición

Al Dr. Álvaro Freire por su colaboración y apertura del establecimiento “El Caburé” (Young).

Al personal de establecimiento “El Caburé” por la buena disposición.

Al Dr. Marcelo Lust por su colaboración y apertura del establecimiento “La Armonía” (Paysandú), del cual es responsable.

Al personal de establecimiento “La Armonía” por su buena disposición.

A nuestras familias por el constante apoyo.

Tabla de contenido

PAGINA DE APROBACION.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS.....	1
RESUMEN.....	3
SUMMARY	4
INTRODUCCIÓN	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
CICLO ESTRAL	6
Control neuroendocrino.....	6
Control nervioso	7
Control endocrino.....	7
Fases del ciclo estral	10
Dinámica Folicular	14
CONTROL FARMACOLÓGICO DEL CICLO ESTRAL.....	16
Protocolos que regulan la función del cuerpo lúteo	17
Protocolos de sincronización de la ovulación	17
Ovsynch	18
Presynch.....	22
Selectsynch y Cosynch.....	23

Heatsynch	23
Suplementación con progestágenos en protocolos Ovsynch y Heatsynch	28
Resincronización	30
ANESTRO POSPARTO.....	31
Tratamiento del anestro posparto.....	33
Fuentes Alternativas de Progesterona.....	35
OBJETIVOS.....	37
HIPOTESIS.....	37
MATERIALES Y METODOS	38
RESULTADOS.....	43
ENSAYO 1.....	43
Ciclicidad	43
Concentración de progesterona	44
Fertilidad.....	45
ENSAYO 2.....	47
Ciclicidad	47
Fertilidad.....	47
ENSAYO 3.....	49
Ciclicidad	49
Fertilidad.....	50

IATF vs IA con detección de celo	52
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	61
BIBLIOGRAFÍA	62

Índice de cuadros y figuras



Figura 1. Dinámica folicular y progesterona plasmática durante un protocolo Ovsynch comenzado el día 5 del ciclo en una vaca con 2 ondas foliculares	19
Figura 2. Dinámica folicular y progesterona plasmática durante un protocolo Ovsynch comenzado el día 15 del ciclo en una vaca con 2 ondas foliculares	20
Figura 3. Dinámica folicular y progesterona plasmática durante un protocolo Ovsynch comenzado el día 2 del ciclo en una vaca con 2 ondas foliculares	21
Figura 4. Comparación entre los perfiles de progesterona de los tratamientos DIV y MAD 4 en vacas ciclando	44
Figura 5. Comparación entre los perfiles de progesterona de los tratamientos DIV y MAD 4 en vacas en anestro	45
Figura 6. Porcentaje de preñez de vacas tratadas con DIV y MAD 4, según actividad ovárica	48
Figura 7. Porcentajes de preñez según tres niveles de condición corporal.....	49
Figura 8. Porcentaje de preñez de vacas tratadas con DIV y MAD 4, según actividad ovárica	51
Cuadro I. Características de los animales en cada uno de los lotes de tratamiento (ensayo 1).....	38
Cuadro II. Clasificación de los animales según paridad y número de animales ciclando y en anestro de acuerdo a los niveles de progesterona en suero al inicio del tratamiento . (ensayo 1).....	43

Cuadro III. Porcentajes de preñez de acuerdo al tratamiento, paridad y actividad ovárica (ensayo 1).....	46
Cuadro IV. Clasificación de los animales según paridad y número de animales ciclando y en anestro de acuerdo a los niveles de progesterona en suero al inicio del tratamiento (ensayo 2).....	47
Cuadro V. Porcentajes de preñez de acuerdo a tratamiento paridad y actividad ovárica (ensayo 2).....	48
Cuadro VI. Clasificación de los animales según paridad y número de animales ciclando y en anestro de acuerdo a los niveles de progesterona en suero al inicio del tratamiento (ensayo 3).....	50
Cuadro VII. Porcentajes de preñez según tratamiento paridad y actividad ovárica (ensayo 3).....	50

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue comparar los perfiles circulantes de P4 luego de la administración de dos fuentes de progesterona (inyectable e intravaginal) y su fertilidad al ser incluidas en un protocolo de sincronización de celos (Heatsynch). Se evaluó además el desempeño reproductivo posparto de las vacas de acuerdo a su actividad ovárica y paridad. Se realizaron tres ensayos que involucraron un total de 379 vacas primíparas y multíparas, ciclando y en anestro. El protocolo consistió en: Día 0 GnRH, Día 7, PGF2 α ; Día 8 BE; Día 9, detección de celo e IA; Día 10, IATF, con la adición de un dispositivo intravaginal de progesterona entre los días 0 y 7, tratamiento 1, o la aplicación de una progesterona inyectable en base oleosa (MAD 4) el Día 0, tratamiento 2. A los 35 días pos inseminación se realizó diagnóstico de gestación mediante ultrasonografía transrectal. En el ensayo 1 se extrajeron muestras de sangre cada 24 horas entre los días 0 y 7 para determinación de progesterona. En los ensayos 2 y 3 se extrajeron muestras de leche al día 0 con el mismo fin. En el ensayo 1 el tratamiento MAD 4 no logró elevar las concentraciones de P4 a valores ≥ 1 ng/mL en las vacas en anestro hasta el Día 5, el tratamiento DIV mantuvo niveles ≥ 1 ng/mL en vacas en anestro a partir del Día 1. Los porcentajes de preñez a la primera inseminación obtenidos fueron: 20,5% en el ensayo 1, 40,1% en el ensayo 2, y 30,1% en el ensayo 3. No se observaron diferencias en los porcentajes de preñez entre los tratamientos en ninguno de los 3 ensayos. En el ensayo 1 las vacas que estaban ciclando al comienzo del ensayo tuvieron mayores porcentajes de preñez que las que estaban en anestro (10,3% vs 25,4%). En el ensayo tres se observó una tendencia entre tratamiento y ciclicidad ($p = 0,087$) donde las vacas en anestro tuvieron mayor porcentaje de preñez en el tratamiento MAD 4 que en el tratamiento DIV (40,5% vs 17,8%). El desempeño reproductivo de las vacas primíparas y de las multíparas en el ensayo 1 fue similar (23,2% vs 15,6%; $p = 0,39$), así como también en el ensayo 2 (48,7% vs 34,1%; $p = 0,055$). En el ensayo 3 sucedió lo contrario, apreciándose un mayor porcentaje de preñez en las multíparas que en las primíparas (32,2% vs 26,5% $p = 0,56$), aunque las diferencias tampoco fueron significativas. Solamente fueron estadísticamente significativas las diferencias de fertilidad según paridad observadas en el ensayo 2.

Summary

The objective of this study was to compare progesterone profiles and fertility achieved by two progesterone sources (subcutaneous injection and intravaginal device). The reproductive performance was also evaluated considering parity and ovarian activity. These experiments consisted on three trails with 379 primiparous and multiparous, cycling and anestrous, cows. The synchronization protocol consisted in: Day 0 GnRH, Day 7, PGF2 α ; Day 8 BE; Day 9, estrus detection and AI; Day 10, IATF. The insertion of a controlled intravaginal progesterone realizing device between days 0 and 7, treatment 1, or de administration of an oily based progesterone (MAD 4) on day 0, treatment 2. In the trail 1 blood samples were taken every 24 hours between days 0 to 7 for progesterone determination. In trails 2 and 3, milk samples were taken for the same purpose. In the trail 1 the MAD 4 P4 concentrations weren't ≥ 1 ng/mL in anestrous cows. In DIV treatment P4 concentrations were ≥ 1 ng/mL in anestrous cows, from Day 1 to the device removal. The first service pregnancy rates were: 20,45% in trail 1, 40,1% in trail 2, and 30,1% in trail 3. No significant differences were observed between treatments in any of the three trails. In Trail 1 cycling cows at the beginning had better conception rates than anestrous cows at the beginning of the trail (10,34% vs 25,42%). In trail three are a tendency between treatment and ciclicity was observed ($p = 0,087$) where anestrous cows had better conception rates in MAD 4 treatment than in DIV treatment (40,5% vs 17,8%). It was observed a similar performance of primiparous and multiparous cows in trail 1 (23,2% vs 15,6%; $p = 0,39$) as well as in trail 2 (48,7% vs 34,1%; $p = 0,055$). In trail three was observed a different situation with a better performance of multiparous cows in comparison with primiparous (32,2% vs 26,5%; $p = 0,56$). Only the differences observed in trail 2 related to fertility according to parity were statistically significant.

Introducción

La actual realidad de la producción lechera con rodeos de gran tamaño plantea una creciente dificultad en los programas de manejo reproductivo, con pérdidas en la detección de celo e inseminaciones hechas a destiempo. Esto resulta en una disminución de los porcentajes de concepción (Yamada, 2005). A su vez la selección de animales de alta producción trae como consecuencia un rápido metabolismo de las hormonas reproductivas como el estradiol, lo que repercute en una baja expresión de celo (Mcmillan, 2010). Esta situación ha llevado a la aplicación cada vez más frecuente de los programas de manejo reproductivo que tienden a sincronizar el desarrollo folicular a través de la administración de estradiol o GnRH, la vida media del cuerpo lúteo utilizando PGF2 α y la ovulación con o sin expresión de celo aplicando estradiol o GnRH luego de la luteolisis, para permitir de esta manera la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) con niveles aceptables de concepción (Cavaliere, 2006). La suplementación con progestágenos aplicada en protocolos de sincronización y resincronización ha demostrado ser efectiva ya sea concentrando los celos, previniendo ovulaciones prematuras (Cavestany, 2002) o aportando el priming necesario para el reinicio de la actividad ovárica en vacas en anestro (Cutaia y col., 2007). Murugavel y col. (2003) demostraron que un ambiente alto en progesterona al inicio de un protocolo Ovsynch mejora los resultados de fertilidad. Muchos experimentos han reportado efectos beneficiosos de la adición de un dispositivo intravaginal de P4 en un protocolo de sincronización aplicados en vacas ciclando y en anestro (El-Zarkouny y col., 2004, Stevenson y col., 2006, Chebel y Al-Hassan 2010). Por el contrario poca información se encuentra disponible respecto a la administración de P4 inyectable en base oleosa aplicada mediante inyección subcutánea.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Ciclo Estral

Es la serie de eventos fisiológicos que ocurren entre periodos sucesivos de receptividad sexual (celo) y u ovulación (Senger, 2003).

La vaca es poliestrica continua durante todo el año. La edad de la pubertad, primer estro, está comprendida entre los 7 y 18 meses. Una vez alcanzada la pubertad la ciclicidad solo se interrumpe por una gestación, durante las tres semanas posteriores al parto, alta producción láctea, deficiencias nutricionales o condiciones ambientales estresantes. Así como en ciertas condiciones patológicas (Arthur, 1991). La duración del ciclo es en promedio de 21 días, el celo dura entre 12 y 18 horas y la ovulación se produce entre 24 y 30 horas luego de iniciado el mismo (Hafez y Hafez, 2000).

El comienzo y final del estro son momentos perfectamente detectables por lo tanto se los toma como referencia para determinar la duración del ciclo (Arthur, 1991), siendo el día 0 del ciclo el día del celo.

Control neuroendocrino del ciclo estral

La reproducción está regulada por una interacción entre el sistema nervioso y el sistema endocrino (Senger, 2003). Dicha interacción es llevada a cabo fundamentalmente por tres órganos, el hipotálamo, la hipófisis y el ovario, conformando lo que se conoce como eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Ungerfeld, 2002).

El hipotálamo es una porción especializada del encéfalo de origen di encefálico, ubicada en la región ventral del mismo. Está constituido por cuerpos de células nerviosas agrupadas en núcleos. Consta de varios núcleos, cada uno de los cuales tiene un nombre específico. Los núcleos que tienen mayor influencia sobre la reproducción se denominan centro cíclico, centro tónico y paraventricular. Las neuronas de los centros tónico y cíclico producen Hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH). Las neuronas del núcleo para ventricular producen Oxitocina (Senger, 2003).

La hipófisis o pituitaria es una estructura glandular ubicada debajo del hipotálamo con el que está unida mediante un tallo y con el cual algunos estudios indican que comparte origen neural (Kawamura y Kikuyama, 1994). Es la principal glándula endocrina del organismo y se divide en hipófisis anterior y posterior. A la hipófisis posterior, también llamada neurohipófisis, llegan directamente los axones de las neuronas de los núcleos supraópticos y paraventricular del hipotálamo (Ungerfeld, 2002). La hipófisis anterior en cambio se comunica con las neuronas hipotalámicas mediante una modificación especializada de la circulación llamada sistema porta hipotálamo hipofisario el cual permite que muy pequeñas cantidades de hormona liberadora de gonadotrofinas lleguen directamente a las células de la hipófisis anterior sin diluirse en la circulación sistémica (Senger, 2003).

Control nervioso:

El sistema nervioso actúa fundamentalmente traduciendo estímulos externos en señales neuronales que ocasionan un cambio en los órganos reproductivos. Esta acción se lleva a cabo a través de reflejos neurales simples y reflejos neuroendocrinos. En los reflejos neurales simples las neuronas aferentes hacen sinapsis directamente con interneuronas de la medula espinal, las cuales a su vez lo hacen con las neuronas eferentes que llevan el estímulo al órgano blanco que responde. Los reflejos neuroendocrinos son similares a los simples, con la diferencia de que la neurona eferente se dirige desde la medula espinal al hipotálamo donde hace sinapsis con neuronas de este órgano. Las neuronas hipotalámicas liberan a la sangre neuro hormonas que son luego transportadas al órgano blanco (Senger, 2003).

Control endocrino

La regulación ejercida por el sistema endocrino consiste fundamentalmente en la liberación de hormonas. Compuestos producidos por una glándula que ocasionan una respuesta en un órgano blanco. Esta respuesta puede implicar cambios metabólicos, así como también en actividades de síntesis o secreción. Las hormonas que intervienen en la reproducción pueden clasificarse según su origen (Senger, 2003).

Hipotálamo

Hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH)

Su función es provocar la liberación de gonadotrofinas por la hipófisis anterior. Niveles basales de esta hormona son liberados por el centro tónico en forma permanente durante todo el ciclo estral, lo que repercute en constantes liberaciones de gonadotrofinas por la hipófisis, permitiendo así el permanente desarrollo folicular durante el ciclo. El centro cíclico libera importantes cantidades de esta hormona una sola vez durante el ciclo originando el pico pre ovulatorio de LH que desencadena la ovulación (Senger, 2003).

Hipófisis anterior

Hormona folículo estimulante (FSH)

Como su nombre lo indica promueve el desarrollo de una onda de crecimiento folicular. Esta hormona es liberada en respuesta a la GnRH y sus concentraciones plasmáticas se elevan en la emergencia de cada onda folicular promoviendo el crecimiento sincrónico de un grupo de folículos. En un momento dado el folículo de mayor tamaño secreta inhibina y estradiol que ejercen un feedback negativo sobre las concentraciones de esta hormona (Senger, 2003).

Hormona luteinizante (LH)

La LH al igual que la FSH es secretada en respuesta a la GnRH. En etapas tempranas del ciclo juega un rol fundamental en la formación y desarrollo del cuerpo lúteo, luego en una fase más tardía resulta muy importante en el desarrollo del folículo dominante el que adquiere receptores para esta hormona, y finalmente la ovulación del folículo dominante se desencadena como consecuencia de un pico en la concentración de LH liberada por la hipófisis en respuesta a un pico de GnRH liberada por el centro cíclico del hipotálamo (Senger, 2003).

Prolactina interviene en la síntesis y secreción láctea.

Hipófisis posterior:

Oxitocina, estimula el tono y contractibilidad del miometrio y participa en el proceso de luteolisis estimulando la producción de prostaglandinas por el útero.

Ovario:

Estrógenos

Secretados fundamentalmente por el folículo dominante son responsables del comportamiento de celo, provocan cambios a nivel de órganos genitales, sensibilizan al útero a la acción de la Oxitocina e inducen el pico de LH que lleva a la ovulación. Intervienen en la dominancia folicular ejerciendo un feedback negativo sobre la secreción de FSH a nivel hipofisario. La FSH resulta imprescindible para el desarrollo de los folículos de menor tamaño que en ausencia de un nivel importante de esta hormona se verán destinados a la atresia y degeneración (Senger, 2003).

Progesterona

Es responsable por el mantenimiento de la preñez, generando condiciones propicias para la potencial nidación del embrión en caso de haber fecundación. Inhibe la liberación de GnRH por los centros tónico y cíclico del hipotálamo, previendo así la ovulación. La exposición a esta hormona sensibiliza al eje hipotálamo-hipofisario a la acción de los estrógenos facilitando el retorno a la ciclicidad luego de un periodo de anestro o preñez (Senger, 2003).

Inhibina

Actúa en el proceso de desviación del folículo dominante inhibiendo la producción de FSH por la hipófisis anterior.

Testosterona, se aromatizan a estrógenos en las células de la capa granulosa del folículo dominante (Senger, 2003).

Oxitocina

Relaxina, actúa en el momento del parto causando la relajación de los ligamentos pélvicos.

Útero

Prostaglandina F2 α

Principal agente luteolítico, también estimula las contracciones miométricas. Tiene un rol fundamental en la ciclicidad ovárica y el parto (Ungerfeld, 2002).

Los principales mecanismos que regulan la secreción de hormonas de la reproducción son conocidos como procesos de feedback (retroalimentación) positivo y negativo. Mediante estos mecanismos las altas concentraciones en sangre de determinada hormona ejercen un efecto estimulante o inhibitorio tanto sobre los centros tónico y cíclico del hipotálamo como sobre la hipófisis. Este efecto de retroalimentación determina la frecuencia e intensidad de liberación de GnRH por el hipotálamo lo cual está en directa relación con la frecuencia e intensidad de liberación de gonadotrofinas por la hipófisis.

Es así que obedeciendo a lo descrito *ut supra* las altas concentraciones de progesterona ejercen un feedback negativo sobre el hipotálamo y la hipófisis conduciendo a una baja pulsatilidad de GnRH y por consiguiente de gonadotrofinas. Por el contrario al desencadenarse la luteolisis la concentración de progesterona disminuye, aumentando a la vez la de estrógenos que estimulan positivamente a hipotálamo e hipófisis para aumentar la pulsatilidad de GnRH y gonadotrofinas respectivamente (Senger, 2003).

Fases del ciclo estral

El ciclo estral puede dividirse en dos fases tomando como criterio las estructuras predominantes en el ovario durante cada fase. Existe una fase folicular, en la cual la estructura predominante es un folículo dominante y una fase luteal en la cual predomina el cuerpo lúteo.

Otro criterio de división del ciclo estral consiste en tomar como referencia el día del celo (día 0) y a partir de este se lo divide en:

- proestro: abarca los dos a 5 días previos a la presentación del celo, esta etapa se caracteriza por una transición entre un ambiente hormonal alto en progesterona y un aumento en la concentración de estrógenos determinada por el aumento en la frecuencia y pulsatilidad de las gonadotropinas FSH y LH.

- estro: es el periodo en el cual la hembra acepta la monta del macho manifestando un comportamiento caracterizado por un aumento en la actividad física, vocalizaciones frecuentes, disminución en la producción láctea y en el consumo de alimento, además se observa la vulva hiperémica y edematosa con un corrimiento mucoso color clara de huevo. Esta etapa es dominada por los estrógenos que son los responsables del comportamiento característico de celo.

- metaestro: es el periodo de transición entre la ovulación y la formación de un cuerpo lúteo funcional, aquí las concentraciones de estrógenos ya descendieron y la de progesterona no ha aumentado aún. Durante este espacio de tiempo se desarrolla un proceso de remodelación estructural de las células del folículo recientemente ovulado conocido como luteinización. Dicho proceso culmina con la formación de un cuerpo lúteo funcional aproximadamente al día 5 del ciclo.

- diestro: periodo en el cual el cuerpo lúteo es completamente funcional y la secreción de progesterona es alta. Una alta concentración de progesterona provee un ambiente uterino propicio para un adecuado desarrollo embrionario temprano y eventual fijación del concepto al endometrio. Generalmente esta fase dura entre 10 y 14 días.

Si aunamos los dos criterios arriba descriptos, podemos decir que la fase folicular del ciclo (dominada por estrógenos) abarca proestro y estro y la fase luteal (dominada por progesterona) comprende metaestro y diestro.

Fase folicular

La misma se extiende desde el momento de la regresión del cuerpo lúteo hasta la ovulación. Esta fase es relativamente corta abarcando aproximadamente el 20% del ciclo. Durante este periodo el folículo dominante en crecimiento secreta activamente estradiol, hormona predominante en esta etapa.

Esta fase es controlada por el hipotálamo, el lóbulo anterior de la hipófisis y el ovario. Cuando se produce la regresión natural del cuerpo lúteo y el posterior descenso en las concentraciones de progesterona se levanta el feedback negativo que esta hormona ejercía sobre los centros cíclico y tónico del hipotálamo. A consecuencia de esto los episodios de secreción de GnRH por el centro tónico del hipotálamo se hacen más frecuentes lo cual va acompañado de un aumento en la pulsatilidad de las gonadotrofinas liberadas por la hipófisis. Las gonadotrofinas hipofisarias estimulan el crecimiento y desarrollo folicular en el ovario. En la segunda mitad de esta fase se encuentra en el ovario un folículo dominante capaz de producir estradiol. El estradiol ejerce un feedback positivo sobre el hipotálamo y la hipófisis. Cuando el estradiol alcanza determinado nivel activa el centro cíclico del hipotálamo el cual libera una elevada cantidad de GnRH llevando así al pico pre ovulatorio de LH hipofisaria que terminará con la ruptura y ovulación del folículo preovulatorio.

Fase luteal

Es el periodo comprendido entre la ovulación y la regresión del cuerpo lúteo. La fase luteal es mucho más larga que la fase folicular ocupando alrededor del 80% del ciclo. En esta etapa la hormona reproductiva predominante es la progesterona proveniente del cuerpo lúteo. A lo largo de esta fase el crecimiento folicular continúa pero el destino final de estos folículos es la atresia debido al efecto inhibitorio de la progesterona.

Cuando el folículo se rompe en la ovulación los vasos sanguíneos, así como la pared del folículo, sufren una hemorragia que da origen a la formación de la estructura denominada cuerpo hemorrágico. La mencionada formación está presente en el ovario durante los primeros 3 días del ciclo mientras se completa el proceso de luteinización de las células foliculares que culminarán con la formación del cuerpo lúteo. La hormona más importante en la formación del cuerpo lúteo es la LH secretada por la hipófisis anterior. El cuerpo lúteo será completamente funcional a partir del día 5, momento a partir del cual las concentraciones de progesterona irán en aumento aproximadamente hasta el día 10, para mantenerse en un nivel elevado hasta el desencadenamiento de la luteolisis hacia el final del ciclo. Como se expresó anteriormente los altos niveles de progesterona ejercen

una retroalimentación negativa sobre el hipotálamo e hipófisis impidiendo la secreción de gonadotropinas. Así como también generan un ambiente uterino propicio para el eventual desarrollo de una gestación.

Luteolisis

Proceso de destrucción del tejido luteal que determina la culminación de la vida funcional de dicha glándula y marca el fin de la fase luteal del ciclo estral. Este evento tiene lugar en la hembra bovina entre los días 15 y 17 del ciclo.

Uno de los mecanismos por el cual el cuerpo lúteo determina su propia destrucción es inhibir la secreción de LH (principal factor luteotrófico) mediante su principal secreción, la progesterona (Ungerfeld, 2002). Por otra parte la progesterona inhibe la síntesis de receptores para sí misma, para los estrógenos y la oxitocina en el útero (Hunter, 1991). Por tanto dada la disminución de receptores en el útero disminuye también el efecto negativo de la progesterona sobre otros receptores permitiendo de ese modo tanto a los estrógenos como a la oxitocina incrementar su efecto sobre el útero.

La $PGF2\alpha$ es la principal sustancia luteolítica en la mayoría de las especies domesticas (Goding, 1974). Es secretada por el endometrio del útero cuando este estuvo bajo la influencia de la progesterona durante una determinada cantidad de días. Durante el periodo de luteolisis el cuerpo lúteo responde a cada pulso de $PGF2\alpha$ secretando oxitocina. A su vez, aproximadamente la mitad de los pulsos de oxitocina generan una respuesta del endometrio, secretando $PGF2\alpha$ (Hooper y col., 1986). El aumento en los niveles de estrógenos producidos por un folículo en crecimiento estimula la síntesis de receptores uterinos de oxitocina (Flint y Shledrick, 1986), permitiendo que se desencadene el mecanismo de retroalimentación oxitocina luteal- $PGF\alpha$ endometrial (Flint y col., 1990; Zarco y col., 1988). El primer estímulo desencadenante de la luteolisis es la oxitocina hipofisaria que estimula al endometrio una vez que aumentaron sus receptores de oxitocina a secretar $PGF2\alpha$, generándose así la retroalimentación positiva que termina con la actividad lútea (Ungerfeld, 2002).

Dinámica folicular

Es un proceso continuo de crecimiento, desarrollo y atresia de los folículos ováricos (Senger, 2003), el cual sigue un patrón de ondas o períodos de desarrollo que tiene lugar en forma permanente durante toda la vida del animal, incluso durante el período prepuberal (Adams y col., 1994; Evans y col., 1994a, 1994b), la preñez (Ginther y col., 1989, 1996) y el período posparto (Murphy y col., 1990; Savio y col., 1990a, 1990b). El ovario posee un número determinado de folículos antrales de diverso tamaño que se desarrollan hasta cierto punto en respuesta a los niveles tónicos de FSH y LH, estos folículos están siempre presentes (Senger, 2003). Los mencionados folículos atravesarán luego por 4 etapas durante su desarrollo, estas etapas son: reclutamiento, selección, dominancia y atresia o degeneración. El reclutamiento es la fase en que un grupo de folículos antrales pequeños comienza a crecer en respuesta a un pico de FSH. Luego uno de estos folículos (el de mayor tamaño) será seleccionado y comenzará a crecer a un ritmo mayor que los demás. La siguiente etapa es la de dominancia en la que el folículo anteriormente seleccionado induce la atresia de los otros folículos que se denominan subordinados. El folículo dominante entra después en un período de estacionalidad en el cual detiene su crecimiento y dependiendo del ambiente hormonal predominante continúa su camino hacia la ovulación o la atresia, levantándose así su efecto dominante para que surja una nueva onda de crecimiento folicular.

El mismo día de la ovulación un pulso de FSH promueve el inicio de una nueva onda de desarrollo folicular. De esta forma son reclutados un grupo de folículos antrales que comienzan a desarrollarse en respuesta a la FSH. La citada hormona comienza a disminuir sus niveles cuando el folículo más grande alcanza los 4 a 5 mm de diámetro (aproximadamente el día 2 o 3). Esta disminución en la concentración de FSH puede ser explicada por el efecto inhibitorio que tienen sobre ella las hormonas inhibina y estradiol (principalmente producido por el folículo dominante) secretadas por los folículos en crecimiento. A la vez que la concentración de FSH disminuye, el folículo que será dominante comienza a crecer a un ritmo mayor y los subordinados dejan de crecer o lo hacen más lentamente (Ginther, 2000). Este fenómeno se conoce como desviación, en

este momento los niveles de FSH son muy bajos para el desarrollo de los folículos subordinados que se atresian (Ginther, 2000).

El folículo dominante adquiere la capacidad de crecer con bajos niveles de FSH, esto puede estar relacionado con la síntesis de receptores para LH en la capa granulosa del folículo (Ginther y col., 1996). La LH estimulará a las células granulosas a una mayor producción de estradiol que le permitirá seguir creciendo con bajos niveles de FSH (Ginther y col., 2001; Ungerfeld 2002).

Otro elemento que estaría implicado en la selección folicular, sería el sistema IGF (factores de crecimiento similares a la insulina). Este está integrado por los IGF 1 y 2, sus receptores y proteínas fijadoras (IGFBPs) (Schams y col., 2002); pudiendo el IGFBP tener un rol en la desviación folicular por disminuir la biodisponibilidad del IGF-1 e interferir con el crecimiento de los folículos subordinados (Ginther y col., 2001; Callejas., 2004).

La dependencia que el folículo dominante tiene con la LH es lo que en definitiva determina su regresión durante la fase luteal del ciclo. Debido a que los altos niveles de progesterona en esta fase ejercen un efecto adverso sobre la pulsatilidad de LH hipofisaria ocasionando que el folículo detenga su crecimiento y empiece a regresar. Cuando el folículo dominante comienza su regresión se levanta su efecto negativo sobre la secreción de FSH permitiendo el reclutamiento de un nuevo grupo de folículos.

El número de ondas de crecimiento folicular durante un ciclo varía individualmente. Existen ciclos de 2, 3 y hasta 4 ondas. Los ciclos de 2 ondas tienen una fase luteal más corta y el folículo dominante de la segunda onda es el ovulatorio. La duración total de estos ciclos es en promedio de 21 días. Los ciclos de 3 ondas tienen una fase luteal más larga ovulando el folículo dominante de la tercera onda. Su duración promedio es de 23 días. Se han encontrado además animales *Bos indicus* con ciclos de cuatro ondas (Bo y col., 1993; Figueredo y col., 1997; Rhodes y col., 1995; Zeitoun y col., 1996). En estos casos la cuarta onda emerge entre los días 20 a 21 y el ciclo dura 24 a 25 días. Se reportó que el bajo nivel nutricional se asocia a una mayor proporción de ciclos de 3 ondas (Murphy y col., 1991; Ungerfeld, 2002).

CONTROL FARMACOLOGICO DEL CICLO ESTRAL

Las intervenciones hormonales son cada vez más usadas para regular el ciclo estral bovino sobre todo en explotaciones lecheras comerciales (Cavestany, 2002). Lo que se busca con estas intervenciones es aumentar la probabilidad de detectar vacas en celo e inseminarlas en el momento adecuado, y como consecuencia de esto mejorar los porcentajes de preñez (Lucy, 2004), que es en definitiva el objetivo de un programa de manejo reproductivo.

Las hormonas utilizadas para controlar el ciclo estral son idénticas (o sus análogos) a las hormonas reproductivas de la vaca normal (Lucy, 2004).

Existen básicamente tres estrategias hormonales de regulación del ciclo estral (Lucy, 2004):

- 1) Producir la luteólisis y de esta forma levantar el efecto inhibitorio que la progesterona tiene sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario permitiendo que si existiere un folículo dominante en el ovario en este momento el mismo ovule.
- 2) Prevenir la ovulación asegurando concentraciones luteales de progesterona en sangre durante un tiempo determinado las cuales al disminuir abruptamente en ausencia de un cuerpo lúteo funcional desencadenarán el pico de LH y la ovulación.
- 3) Regular la dinámica folicular de modo de obtener un folículo dominante capaz de ovular en un momento predeterminado con o sin manifestación de signos externos de celo.

Los protocolos comúnmente utilizados se basan en alguno de estos principios o en combinaciones de los mismos.

El método más antiguo para la sincronización (Desarrollado en los años '60) bloqueaba la ovulación mediante la administración de progestágenos endógenos. A pesar de que el método proveía de una sincronía aceptable, las tasas de concepción eran bajas. El descubrimiento subsiguiente de la PGF 2α como la luteolisina uterina condujo al desarrollo de nuevos métodos de sincronización en los años '70. Más tarde se combinó

progestágenos endógenos con PGF2 α para mejorar los resultados de ambos métodos. A pesar de una considerable mejora cuando se combinaron progestágenos y PGF2 α , las bajas tasas de concepción, especialmente luego de un tratamiento prolongado con progestágenos, impidieron la total implementación del sistema (Lucy, 2004).

Protocolos que regulan la función del cuerpo Lúteo

Los protocolos de sincronización a base de PGF2 α consisten en una o dos aplicaciones del agente luteolítico precedidas o no por un periodo de detección de celo. Luego de la inyección de PGF2 α el celo se manifiesta en 48 a 72 horas si en el ovario existe un folículo dominante capaz de generar un pico de LH y ovular. De lo contrario la dispersión de los celos puede llegar hasta 7 días dependiendo del grado de desarrollo folicular al momento de la inyección hormonal (Bo y col., 1995). Para ser efectiva la PGF2 α requiere de la presencia en el ovario de un cuerpo lúteo funcional, el cual está presente en animales que ciclan normalmente entre los días 5 y 17 del ciclo estral. Por esta razón frecuentemente se utilizan 2 dosis de agente luteolítico con un intervalo de 11 a 14 días entre cada aplicación. De esta manera los animales que no respondieron a la primera inyección lo harán a la segunda, y aquellos que habían reaccionado la primera vez se encontrarán, al momento de la segunda aplicación de PGF2 α , nuevamente en un momento de su ciclo en el cual son sensibles a la luteolisis (Cavalieri y col., 2006).

Protocolos para sincronización de la ovulación

En un principio el manejo farmacológico del ciclo estral tuvo como objetivo acortar el tiempo durante el cual se detectaba celo y se inseminaba. Hoy en día con el surgimiento de rodeos más grandes con explotaciones más intensivas donde las vacas producen volúmenes realmente importantes el problema de la detección de celo se hace mucho más grave aún. Atendiendo a esta problemática es que han surgido los programas de manejo reproductivo sistemáticos con el fin de mejorar la eficiencia reproductiva del rodeo disminuyendo los días abiertos (tiempo entre el fin periodo de espera voluntario y la concepción). Estos programas se basan en la sincronización de ovulaciones y comportamiento de celo para realizar IATF o acortar al mínimo el periodo de detección de celo (Nebel y col., 1998).

Ovsynch

Mediante la combinación de hormonas fueron diseñados numerosos protocolos para el control del ciclo estral. Fue así que utilizando los conocimientos generados a lo largo de los años sobre la dinámica folicular surgió en EE.UU el protocolo Ovsynch aún utilizado en nuestros días (Pursley y col., 1995). Dicho protocolo consiste en la administración de una dosis de GnRH el día de iniciado el mismo. Siete días más tarde se aplica una inyección de PGF2 α ; luego de transcurridas 48 horas se vuelve a aplicar otra dosis de GnRH para luego inseminar a tiempo fijo entre 16 y 20 horas después de la última dosis de GnRH. Pursley y col., (1997) en otro experimento obtuvieron similares resultados de preñez en vacas sometidas a este protocolo que en vacas sincronizadas con PGF2 α e inseminación bajo detección de celo según el sistema tradicional AM/PM. En un experimento realizado sobre 333 vacas en lactación en 3 tambos ubicados en Wisconsin EE.UU, con el objetivo de evaluar la eficiencia del protocolo Ovsynch integrado a un programa de manejo reproductivo se observó que, si bien los porcentajes de preñez fueron similares entre los grupos Ovsynch y control, los días abiertos fueron menos para las vacas en el grupo Ovsynch (Wiltbank, 1998).

Thatcher y col. (2001) manifiestan que la fertilidad obtenida con un protocolo Ovsynch está influida por el día del ciclo estral en que se comience a aplicar el mismo, y para ilustrar este punto plantean 3 escenarios. En el Escenario 1, (Figura 1) el tratamiento con GnRH se inicia el día 5 del ciclo estral, ya que coincide con la presencia de un folículo dominante que ovulará y formará un cuerpo lúteo en respuesta a la liberación de LH inducida por la administración de GnRH. La GnRH además, incrementa la liberación de FSH que induce el reclutamiento de un nuevo cohorte de folículos en aproximadamente 2 a 3 días (día 7 del ciclo) y uno de esos folículos será *seleccionado* para transformarse en el folículo dominante (Moreira y col., 2000). En el día 12 del ciclo (7 días después de la administración de GnRH), se inyecta una dosis de PG para regresar tanto el CL original existente al día 5 del ciclo como el CL accesorio formado como producto de la ovulación inducida por la GnRH administrada el día 5 del ciclo. El descenso de los niveles de P₄ asociado con la regresión del CL, acelera el crecimiento del nuevo folículo y la segunda inyección de GnRH que se aplica 48 horas después de la PG (día 9 del protocolo) induce

su ovulación entre 24 y 32 horas más tarde (Pursley y col., 1995). Esto posibilita que la IATF se realice a las 16 horas aproximadamente de la segunda GnRH, dando un margen adecuado de tiempo para el transporte y la capacitación espermática.

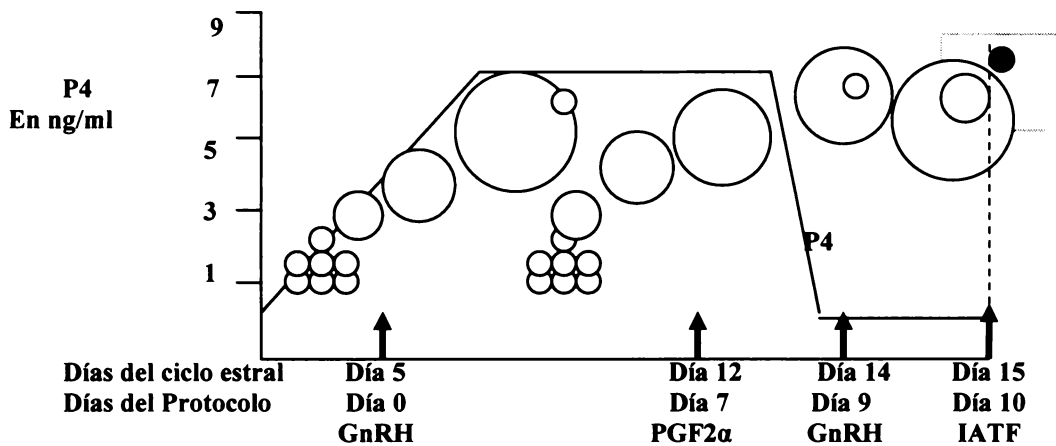


Figura 1. Dinámica folicular y progesterona plasmática durante un protocolo Ovsynch comenzado el día 5 del ciclo en una vaca con 2 ondas foliculares

En el Escenario 2, cuando se inicia el protocolo en un diestro tardío, a los 15 días de comenzado un ciclo estral, una segunda onda folicular está desarrollándose. Este folículo puede o no ovular dependiendo de su estado de madurez. En algunas ocasiones, esta segunda onda folicular es muy pequeña como para ovular y no se desarrolla un nuevo CL. Entre 2 y 4 días después de la inyección de GnRH, la vaca espontáneamente induce la regresión del CL por liberación de PG endógena. Al momento de la inyección de la PG, 7 días después de la GnRH, esta vaca estará regresando el CL de su ciclo anterior y podría estar en celo (Moreira y col., 2000). Algunas vacas pueden no estar sincronizadas y ovularán prematuramente (Figura 2) y si se prosigue con el protocolo, la inseminación será asincrónica (hecha tarde) y la vaca no concebirá.

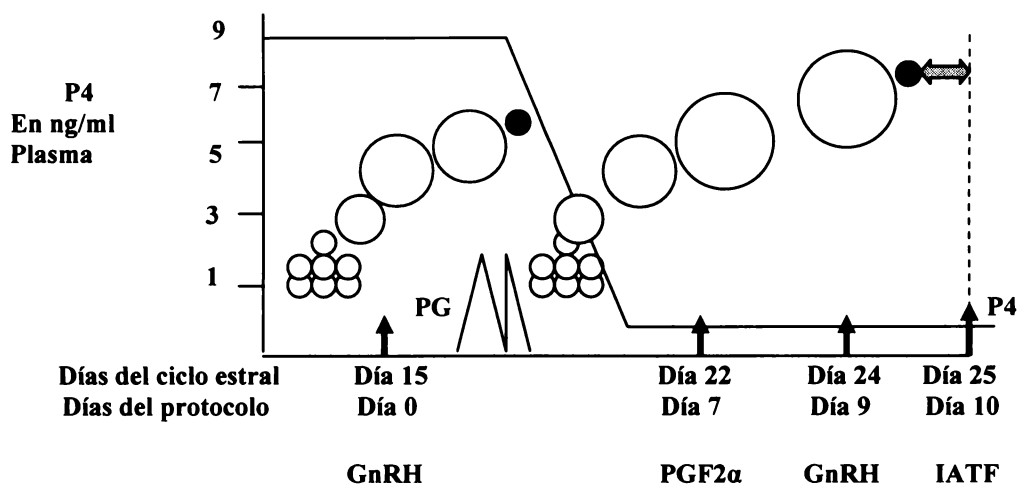


Figura 2. Dinámica folicular y progesterona plasmática durante un protocolo Ovsynch comenzado el día 15 del ciclo en una vaca con 2 ondas foliculares

En el Escenario 3 (Figura 3) se expone lo sucedido cuando se comienza un protocolo IATF en metaestro (Día 2 del ciclo). En este caso, la vaca ya ha estado en celo, ovuló y se están reclutando nuevos folículos. En estos folículos pequeños la inyección de GnRH en el día 2 no tiene efecto (Moreira y col., 2000). Como consecuencia, al administrar la segunda dosis de GnRH (Día 9 del protocolo), el folículo dominante es considerado “viejo”, ya que ha expresado su dominancia por 5 días o más. Diferentes estudios han demostrado que los folículos que ejercen su dominancia por más de 5 días (Austin y col., 1999) así como las vacas que se integran a un protocolo Ovsynch en etapas muy tempranas de su ciclo tienen una menor fertilidad (Moreira y col., 2000; Vasconcelos y col., 1999). En el mismo sentido Taponen y col. (2000) mostraron que si la primera dosis de un protocolo Ovsynch era administrada en metaestro o en proestro los porcentajes de concepción eran menores.

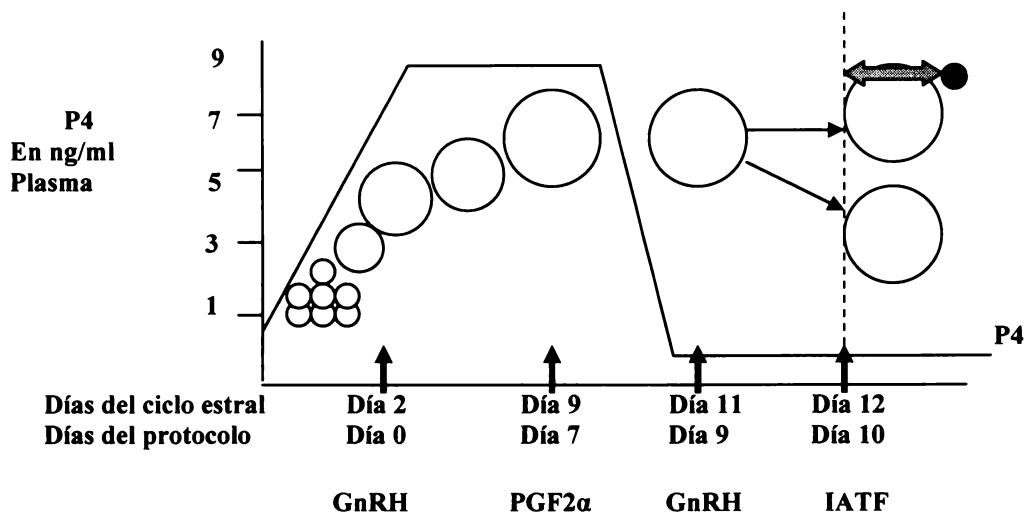


Figura 3. Dinámica folicular y progesterona plasmática durante un protocolo Ovsynch comenzado el día 2 del ciclo en una vaca con 2 ondas foliculares

Este protocolo ha sido integrado exitosamente a los programas de manejo reproductivo con buenos resultados en cuanto a fertilidad y a la disminución de los días abiertos. Sin embargo hay reportes que indican un mejor resultado en vacas primíparas que en multíparas. A los efectos de investigar dicha hipótesis Tenhagen y col. (2004) realizaron un estudio sobre 1584 vacas (583 primíparas y 1001 multíparas) pertenecientes a 3 tambos comerciales. Los animales fueron sincronizados utilizando un protocolo Ovsynch convencional con IATF realizada 16 a 20 horas luego de la segunda dosis de GnRH. Los parámetros analizados fueron: porcentaje de concepción a la primera inseminación y proporción de vacas preñadas a los 200 días de lactancia. El porcentaje de concepción a la IATF resultó mayor en las primíparas que en las multíparas (37,9 vs 31,6%) de igual manera la preñez a los 200 días de lactancia fue mejor para las primíparas (81,8 vs 75,4% para primíparas y multíparas respectivamente). de Nava y col. (2010), realizaron un estudio recopilando los resultados obtenidos durante 4 años de aplicación de un programa de IATF coincidente con el primer día de la estación reproductiva invernal. Se sincronizaron 2659 vacas Holando en producción y ciclando a las que se les aplicó un protocolo Ovsynch +P4 comenzando el día -10 con la administración de una dosis de GnRH (día 0: comienzo de la estación de cría), se insertó un dispositivo intravaginal de P4 entre los días -10 y -3, y la IATF se realizó el día 0, entre 10 y 18 horas luego de la última

inyección de GnRH. Estos investigadores observaron que las tasas de preñez se vieron afectada por el número de lactancia, siendo la tasa de preñez a la IATF de 48,8%, 48,2%, 43,1% y 40,5% para vacas de 1, 2, 3 y 4 o más lactancias respectivamente, esta diferencia se mantuvo en las tasas de preñez acumuladas (incluye los servicios realizados durante un periodo de 30 días pos IATF), siendo de 63,7%, 62,9%, 59,8% y 56,7% para las vacas de 1, 2, 3 y 4 o más lactancias respectivamente. En este sentido Pancarci y col. (2002) comparando dos protocolos de sincronización de ovulación observaron que para ambos tratamientos los porcentajes de concepción en las vacas primíparas era más altos que en las multíparas. Notaron también que a una condición corporal menor a 3 las multíparas tuvieron menor porcentaje de concepción, mientras que las primíparas se mantuvieron bastante constantes cuando su condición corporal oscilaba entre 2,5 y 3 (escala de 1 a 5 de Edmonson y col., 1989)

Este protocolo sirvió como base para el desarrollo de muchos otros tratamientos de sincronización para IATF:

Presynch

Se trata de pre sincronizar las vacas con dos dosis de PGF2 α a intervalo de 14 días, siendo la última aplicada 12 días previos a la aplicación de un tratamiento Ovsynch convencional. Este programa hará que las vacas se encuentren entre los días 5 y 12 del ciclo estral al momento del comienzo del protocolo Ovsynch lo que resultaría en una mayor precisión en la sincronización, con mayores porcentajes de concepción y preñez (Moreira y col., 2000). En esta línea de investigación El-Zarkouny y col. (2004) realizaron un experimento en una población de 630 vacas en lactación pertenecientes a dos rodeos con un rango de 59 a 79 días posparto sometiéndolas a un protocolo Ovsynch e inseminación a tiempo fijo 16 a 20 horas luego de la última inyección de GnRH con o sin pre sincronización. Los resultados demostraron que la pre sincronización mejora los porcentajes de preñez determinados por ultrasonografía a los 29 días luego de la IATF comparado con la aplicación del protocolo Ovsynch en un momento al azar del ciclo estral (46,8 vs 37,5% respectivamente). Navanukraw y col. (2004) también confirmaron esta idea en un ensayo realizado sobre 260 vacas con más de 60 días post parto, en el cual midieron el efecto de

la presincronización en un protocolo Ovsynch. Los porcentajes de preñez a los 42 días fueron 49,6 vs 37,7% para los grupos Presynch y Ovsynch respectivamente.

Selectsynch

Se trata de administrar una inyección de GnRH y 7 días después una inyección de PGF2 α , luego de la cual se realiza detección de celo e inseminación de acuerdo al sistema AM/PM.

Cosynch

Este protocolo es igual al Ovsynch pero con la diferencia de que la IATF se realiza en el mismo día de la aplicación de la segunda dosis de GnRH.

Heatsynch

Consiste en la sustitución de la segunda dosis de GnRH por la administración de una dosis de Estradiol. Stevenson y col. (2004) realizaron un trabajo sobre 106 vacas en lactancia con un rango de 61 a 81 días posparto (al momento de la IATF) mantenidas en confinamiento y alimentadas con una dieta totalmente mezclada, con el objetivo de determinar la factibilidad de sustituir la segunda dosis de GnRH del protocolo Ovsynch por una inyección de 1 mg de cipionato de estradiol (Heatsynch). Otro aspecto a estudiar en esta experiencia fue el efecto de la incorporación de un dispositivo intravaginal de liberación controlada de progesterona (CIDR). Se formaron 4 grupos: 1) Ovsynch, 2) Ovsynch+ CIDR, 3) Heatsynch y 4) Heatsynch + CIDR. El folículo de mayor tamaño fue determinado mediante ultrasonografía 24 horas luego de la administración de la PGF2 α y fue monitoreado cada 6 horas hasta la ovulación. Mas vacas tratadas con estradiol mostraron celo comparado con las tratadas con GnRH pero más vacas tratadas con GnRH tuvieron picos de LH detectables y ovularon. La duración de los picos de LH en los animales tratados con GnRH fue menor que en los animales tratados con estradiol. El tratamiento con progesterona redujo la incidencia de los picos de LH pero no tuvo efecto sobre la presentación del celo y ovulación. El intervalo entre el pico de LH y la ovulación

fue menor en los animales tratados con GnRH que en los tratados con estradiol. El experimento concluyó que la segunda dosis de GnRH del protocolo Ovsynch puede ser sustituida por la administración de una dosis de cipionato de estradiol administrada 24 horas después de la PGF2 α . Se obtuvieron similares resultados en la sincronización, con una proporción levemente mayor de vacas en celo y algo menos de ovulaciones.

Pancarci y col. (2002) evaluaron los porcentajes de concepción cuando el cipionato de estradiol era utilizado para sincronizar la ovulación como parte de un protocolo para inseminación a tiempo fijo en comparación con el protocolo Ovsynch. El experimento fue llevado a cabo en establecimientos comerciales de EE.UU, en los estados de Florida, con 371 vacas, y Texas, con 321 animales. En ambos sitios las vacas eran ordeñadas 3 veces por día con una producción promedio del rodeo de 10129 kg de leche en Florida y 10794 kg en Texas. Tanto en Florida como en Texas los animales permanecieron confinados y alimentados con una dieta totalmente mezclada constituida por la combinación de los siguientes ingredientes: heno de alfalfa, concentrado premezclado, silo de grano, semilla de algodón, grano de cereal molido, silo de sorgo o silo húmedo. En el ensayo realizado en Florida, las vacas fueron agrupadas según paridad (primíparas vs multíparas) y pre sincronizadas con 2 inyecciones de PGF2 α con un intervalo de 14 días. Las multíparas recibieron la primera dosis de PGF2 α a los 40 días posparto mientras que las primíparas la recibieron a los 62 días posparto. 14 días después de pre sincronizadas las vacas se integraron aleatoriamente a un protocolo Heatsynch u Ovsynch. Todas las vacas recibieron tratamiento con somatotrofina bovina para aumentar la preñez a la primera inseminación, comenzando al momento de la IATF y repitiéndose cada 11 días hasta el momento del secado. No se observaron diferencias significativas en los niveles de preñez entre Ovsynch (37,1% \pm 5,8%) y Heatsynch (35,1% \pm 5%). Los porcentajes de preñez a la primera inseminación fueron más altos en primíparas (47,1% \pm 5,6%) que en multíparas (25% \pm 5,7%). Se observó una tendencia a la interacción entre paridad y tratamiento. Dado que, en las primíparas no hubo diferencia entre los porcentajes de preñez entre los tratamientos mientras en las multíparas los niveles de preñez en el tratamiento Heatsynch tendieron a ser menores a los del Ovsynch (30,6% \pm 7,2% vs 19,4% \pm 6,5% para Ovsynch y Heatsynch respectivamente). Con respecto al ensayo realizado en Texas las

vacas fueron pre sincronizadas igual a las del ensayo de Florida comenzando a los 35 días posparto para integrarse a un protocolo Ovsynch o Heatsynch 14 días más tarde. Todas las vacas recibieron tratamiento con somatotrofina bovina cada 11 días desde el día 63 posparto hasta el momento del secado. Aquí tampoco se observaron diferencias significativas en los porcentajes de preñez entre Ovsynch ($28,2\% \pm 3,6\%$) y Heatsynch ($29\% \pm 3,5\%$). No se apreció diferencias significativas entre los porcentajes de preñez de primíparas ($40,6\% \pm 13\%$) y multíparas ($34,7\% \pm 13,2\%$). Las vacas no detectadas en celo entre la primera inyección de PGF2 α de la presincronización y la inyección de PGF2 α integrada dentro de los protocolos Ovsynch o Heatsynch fueron consideradas como potencialmente en anestro. Dentro de este grupo tuvieron mejores resultados de preñez aquellas que estaban en celo al momento de la IATF, $33,6\% \pm 5,9\%$ vs $11,6\% \pm 4,5\%$ y el porcentaje de preñez fue mayor en el tratamiento Ovsynch ($29\% \pm 5\%$) que en el Heatsynch ($15,8\% \pm 5\%$). La presentación de celo al momento de la IATF fue superior en el tratamiento Heatsynch, tanto en las vacas cíclicas como en las que estaban en anestro. Se detectó una interacción entre tratamiento y expresión de celo al momento de la IATF, en la cual, dentro del tratamiento Heatsynch, las vacas detectadas en celo al momento de la IATF tuvieron más altos porcentajes de preñez que aquellas no detectadas en celo en ese momento. Sin embargo en el tratamiento Ovsynch los resultados de preñez fueron similares en las vacas que presentaron celo al momento de la IATF y en las que no lo presentaron. La ocurrencia de celo al momento de la IATF fue mayor en el tratamiento Heatsynch. Más vacas primíparas que multíparas fueron detectadas en celo el día de la IATF.

Stevenson y Phatak (2005) realizaron un trabajo sobre 1846 vacas primíparas y multíparas que tenían en promedio 54 días de lactancia al momento de comenzar el ensayo, eran mantenidas en confinamiento alimentadas con una dieta totalmente mezclada constituida por: alfalfa, grano de soja, silo de cereal, grano de cebada y pulpa de remolacha. Las vacas eran alimentadas y ordeñadas 3 veces al día. Los animales fueron pre sincronizados con 2 dosis de PGF2 α a intervalo de 14 días dándose la segunda dosis 12 días previos al comienzo de los tratamientos. Cuando se compararon los niveles de concepción general entre los protocolos Ovsynch y Heatsynch no se encontraron

diferencias significativas (34,7% vs 27,7% para Heatsynch y Ovsynch respectivamente). El diseño de este ensayo permitía la inseminación cuando el celo fuera detectado previo a la fecha indicada para la IATF. En el tratamiento Heatsynch más vacas fueron inseminadas luego de ser detectadas en celo durante la semana previa a la IATF (57,9%) en comparación con el tratamiento Ovsynch (13,6%). Fue mayor el número de vacas de primera y segunda lactación inseminadas a celo visto en el grupo Heatsynch que en el Ovsynch. El diseño experimental permitió luego comparar los niveles de concepción obtenidos por uno y otro sistema de inseminación. De la comparación de los datos se desprende que los animales servidos luego de ser detectados en celo mostraron valores superiores de concepción a los servidos en un momento predeterminado tanto en el tratamiento Heatsynch (44,6% vs 21,1%) como en el Ovsynch (48,7% vs 24,4%).

Los datos publicados por Kasimanickam y col. (2005) en un trabajo acerca de la fertilidad de la IATF comparada con la inseminación a celo visto en un protocolo Ovsynch o Heatsynch concuerdan con lo observado por Stevenson y col. (2005). Kasimanickam y col. (2005) trabajaron con 535 vacas que tenían 36 días de lactancia al momento de comenzar el ensayo. Todos los animales fueron presincronizados con 2 dosis de PGF₂ α a intervalo de 14 días, luego de lo cual se agruparon por paridad y se asignaron aleatoriamente al tratamiento Ovsynch o Heatsynch. Catorce días luego de la segunda dosis de la presincronización todas las vacas recibieron una dosis de GnRH y 7 días más tarde una inyección de PGF₂. En el tratamiento Ovsynch un grupo fue observado para detectar celo e inseminar bajo el sistema tradicional AM/PM y al resto se les aplicó una dosis de GnRH 48 horas más tarde para ser inseminadas a tiempo fijo 8 horas después. En el tratamiento Heatsynch todos los animales recibieron una inyección de 0,5 mg de cipionato de estradiol 24 horas luego de la tercera dosis de PGF₂ α , en un grupo se detectó celo y se inseminó según el sistema tradicional mientras en el otro se inseminó a tiempo fijo todos los animales 48 horas luego de administrado el estradiol. En el Ovsynch las vacas inseminadas bajo detección de celo (IADC) tuvieron un porcentaje de concepción general mayor que las sometidas a IATF (33,8% vs 21,3%), esta diferencia también se observa en la concepción al primer servicio (35,3% vs 21%). En el grupo Heatsynch sucede algo similar, la concepción general fue de 35,2% para el grupo IADC vs 17,3% para el IATF, y la

concepción al primer servicio fue 36% vs 15,5% para los grupos IADC e IATF respectivamente. A la luz de los resultados obtenidos los investigadores recomiendan incluir en los programas de sincronización de ovulación inseminación a celo visto, para luego si aplicar IATF en las vacas aún no inseminadas.

Si bien los protocolos de sincronización de la ovulación diseñados para ser utilizados con IATF parecen tener menor fertilidad que los métodos basados en la detección de celo, tienen la gran ventaja de alcanzar un 100% de sumisión del rodeo. Este factor cobra mucho valor en sistemas con bajas tasas de detección de celo donde muchos animales no son inseminados impactando negativamente en la performance reproductiva del rodeo (Lucy, 2004). Una de las ventajas de incorporar estradiol a un protocolo de sincronización de ovulación radica en la mayor expresión de síntomas de celo al momento de la IATF lo cual es valorado positivamente por los técnicos inseminadores (Thatcher y col., 2002).

En contraposición con lo expresado en los trabajos anteriores, Cerri y col. (2004) lograron mejores resultados de preñez con IATF que realizando detección de celo y además registraron una mejor performance de las vacas multíparas respecto de las primíparas. Tomaron como población 799 vacas (479 primíparas y 320 multíparas) provenientes de tres rodeos de alta producción ubicados en California, EEUU, que tenían un promedio de 37 días de lactancia. Los animales eran mantenidos en confinamiento y alimentados en los tres lugares una vez al día con la misma dieta totalmente mezclada de manera de alcanzar o exceder los requerimientos para una vaca de 680 kg produciendo 45 kg de leche con un 3,5% de grasa de acuerdo a lo establecido por el NRC 2001. Todos los animales fueron pre sincronizados con dos dosis de PGF2 α a intervalo de 14 días, 14 días luego de la segunda inyección de PGF2 α se les administró una dosis de GnRH y una semana después una nueva inyección de PGF2 α . Luego de la tercera dosis de PGF2 α un grupo fue observado para detectar celo e inseminar durante 7 días y al otro se le aplicó 1 mg de cipionato de estradiol a 24 horas de la última PGF2 α para finalmente realizar IATF 48 horas más tarde. Se extrajeron cuatro muestras de sangre por vaca para medir las concentraciones plasmáticas de progesterona. Estas muestras fueron tomadas el día de la administración de la segunda dosis de PGF2 α , al momento de aplicar la GnRH, cuando se administró la tercera inyección de PGF2 α y 48 horas más tarde. Las vacas fueron

clasificadas como cíclicas o en anestro en base a las concentraciones de las muestras 1 y 2 (se consideró cíclica toda vaca que tuviera un valor \geq a 1 ng/mL). De forma similar las vacas fueron clasificadas según su concentración de progesterona en las muestras 2, 3 y 4 en progesterona alta, si la misma era \geq 1ng/mL, o baja cuando el nivel estaba por debajo de 1 ng/mL. Los datos de preñez a los 58 días, determinados por palpación rectal, fueron más altos en el grupo IATF que en el inseminado bajo detección de celo. Los valores fueron 42,2% para las multíparas y 34,4% para las primíparas mientras que en el grupo bajo detección de celo los resultados fueron de 20,8% y 18,8% respectivamente para multíparas y primíparas. Las vacas cíclicas en ambos tratamientos tuvieron mayor expresión de celo y mejores valores de preñez. Las vacas que respondieron a la pre sincronización y a la luteolisis (progesterona alta en las muestras 2 y 3 pero baja en la muestra 4) tuvieron los más altos niveles de concepción. Se concluyó que el uso de 1 mg de cipionato de estradiol para inducir la ovulación mejoró la performance reproductiva a la primera inseminación posparto.

Suplementación con P4 en protocolos Ovsynch y Heatsynch

Esta alternativa agrega la inserción de un dispositivo intravaginal de P4 por 7 días, desde el inicio del tratamiento hasta el día en que se da la PGF2 α . La suplementación con progesterona aplicada a protocolos de IATF mejora la eficiencia en la ovulación e incrementa los porcentajes de concepción (Cavestany y col., 2008).

Stevenson, Pursley y col., (2006) en un trabajo realizado sobre vacas en lactación ciclando y en anestro, concluyeron que la adición de un dispositivo intravaginal de liberación controlada de P4 durante 7 días en un protocolo Ovsynch mejoró los niveles de concepción y preñez. Esta mejora en la eficiencia reproductiva fue medida mediante los porcentajes de concepción a los 28 días (40% vs 50% respectivamente para Ovsynch y Ovsynch + P4) y a los 56 días (40% vs 50% para Ovsynch y Ovsynch +P4 respectivamente). Los investigadores también observaron una mayor incidencia de pérdidas embrionarias entre los días 28 veintiocho y 56 pos I.A en las vacas en anestro.

En otro ensayo El-Zarkouny y col. (2004) midieron el efecto sobre los porcentajes de preñez que tendría la adición de un dispositivo intravaginal de liberación controlada

(CIDR) a un protocolo Ovsynch aplicado a vacas que no habían sido previamente detectadas en celo. Aquí se trabajó con 262 animales pertenecientes a un solo establecimiento que tenían entre 47 y 67 días posparto al momento de iniciar el trabajo. Por medio de la concentración plasmática de progesterona, se determinó que 66% de ellas estaban en anestro. Los porcentajes de preñez a los 29 y a los 57 días fueron superiores en el grupo Ovsynch+CIDR a los obtenidos en el grupo Ovsynch (59,3% vs 36,3%; y 45,1% vs 19,8%). Se observó también una interesante mejoría en la sobrevivencia embrionaria entre los 29 y 57 días post IA en el grupo Ovsynch + CIDR.

Chebel y Al-Hassan (2010) con el objetivo de evaluar el efecto de la progesterona exógena en los resultados de preñez por inseminación (P/IA) en ganado lechero sometido a un protocolo de sincronización para IATF, realizaron un ensayo sobre vacas en lactación (n=3248) pertenecientes a 7 rodeos comerciales. Los animales se presincronizaron con dos dosis de PGF con un intervalo de 14 días, luego de lo cual se detectó celo y se inseminó los animales que lo demostraron (EDAI). Las vacas no inseminadas fueron sometidas a un protocolo de sincronización para IATF (GnRH día 0, PGF día 7, 72 horas después de la PGF IATF + GnRH). Otro grupo recibió el mismo tratamiento con el agregado de un dispositivo intravaginal de P4 (CIDR) por los primeros 7 días del protocolo.

Los resultados de P/IA para las vacas EDAI determinados a los 40 y 65 días fueron 36,2% y 33,7% respectivamente y las pérdidas embrionarias fueron 8,1%. El tratamiento influyó en la preñez a los 40 días (control=33,3%, CIDR=38,1%) y a los 65 días (control=30,0%, CIDR=35,1%) pero no tuvo efecto sobre las pérdidas embrionarias (8,6%). Las vacas cíclicas; según la concentración de P4 en sangre medida a partir de dos muestra (una tomada al momento de la segunda inyección de PGF 2α del Presynch y la otra al momento de la primera inyección de GnRH) tuvieron mayores porcentajes de preñez que las clasificadas en anestro.

Lima y col. (2009) evaluaron el efecto de la suplementación con progesterona exógena a vacas en lactancia dentro de un protocolo Heatsynch para inseminación a tiempo fijo sobre la preñez por inseminación y las pérdidas embrionarias. Las vacas fueron presincronizadas con dos dosis de PGF 2α a intervalo de 14 días, las vacas que

demonstraron celo fueron inseminadas y las que no lo expresaron luego de 11 días se integraron a un protocolo Heatsynch para inseminación a tiempo fijo. El día de la inyección de GnRH del protocolo se formaron tres grupos, a uno integrado por 440 vacas se le insertó un dispositivo intravaginal de liberación lenta con 1,38 g de P4 (CIDR), a otro con el mismo número de animales se le insertaron dos CIDR y el otro ofició como testigo. Los dispositivos fueron removidos el día 7, momento en el que se administró una inyección de PGF2 α prevista en el protocolo. Se extrajeron muestras de sangre para determinación de las concentraciones plasmáticas de P4 a todas las vacas el día 0 y a un subgrupo de 240 vacas los días 3, 7, 17 y 24, a este subgrupo además se le realizó ultrasonografía al días 0 y 7 para examinar las estructuras ováricas. Los niveles plasmáticos de progesterona al día 17 no difirieron significativamente entre los tratamientos. Los valores de preñez determinada por ultrasonografía a los 33 y 66 días ni las pérdidas embrionarias se vieron afectados por el tratamiento. Se observó una elevación lineal en los niveles de progesterona según la cantidad de CIDR utilizados, y la diferencia fue de 0,9 ng/mL. El grupo control mostró una menor sincronía de los retornos al celo luego de la IATF.

Resincronización

Luego de sincronizar la primera inseminación otro objetivo de los programas de manejo reproductivo es la sincronización del retorno al celo de aquellos animales no preñados al primer servicio. Para esto se emplean múltiples estrategias hormonales durante el diestro o el pro estro siguiente a la primera inseminación, o luego de un diagnostico precoz de gestación a partir de los 28 días. Las re sincronizaciones más tardías han cobrado mayor importancia con el reconocimiento del efecto negativo que las perdidas embrionarias tardías y fetales tempranas generan en el desempeño reproductivo del rodeo (Mcmillan, 2010). Entre las herramientas hormonales aplicadas se encuentran la administración de 1 mg estradiol administrado el día 13 pos estro para sincronizar la emergencia de una onda folicular y el celo subsiguiente (Burke y col., 2000), también puede aplicarse otra inyección de estradiol al día 20 para sincronizar la ovulación entre las 24 y 30 horas siguientes. La adición de un progestágeno puede mejorar la sincronía de ese celo al impedir ovulaciones prematuras (Cavestany, 2002). La re sincronización de vacas en

anestro previamente tratadas con, un dispositivo intravaginal de P4 por 6 días y 1 mg de benzoato de estradiol (BE) 1 días después de su retiro, insertando durante 8 días un dispositivo de P4 usado (comenzando el día 15 de ciclo) junto con la aplicación de 0,5 mg de (BE) al momento de la inserción y 1 mg de BE 24 horas luego de remover el dispositivo mejoró la proporción de vacas no preñadas que retornaron al celo entre los 14 y 28 días comparado con las vacas control no tratadas. Además, el resultado final de preñez en el grupo tratado fue mayor que el del grupo control (95% vs 88%) (McDougall y Loeffler, 2004). Otra alternativa estudiada es aplicar un protocolo de sincronización de ovulación de acuerdo al estado del ciclo estral, a la presencia de ovarios quísticos u anestro determinado mediante ultrasonografía 30 días luego de la primera inseminación. El protocolo Ovsynch mostró tener los mejores resultados cuando las vacas estaban en diestro; en las vacas en proestro el tratamiento más efectivo fue GnRH + Ovsynch (aplicación de una dosis de GnRH 8 días antes de comenzar un protocolo Ovsynch); cuando las vacas estaban en proestro no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados; las vacas que presentaban ovarios quísticos tuvieron mejores resultados de preñez con el tratamiento GnRH + Ovsynch ; los porcentajes de preñez en las vacas en anestro no se analizaron por ser una muestra muy pequeña (Bartolomé y col., 2005).

ANESTRO POSTPARTO

La selección genética por producción de leche en vacas Holstein durante las últimas décadas ha sido relacionada a una disminución en la eficiencia reproductiva a nivel mundial (Lucy, 2001). Vacas con un intervalo más largo entre el parto y la primera ovulación tendrán un intervalo parto concepción mayor perjudicando así la eficiencia reproductiva del rodeo.

La ovulación y el estro luego del parto se ven retrasados cuando el feedback positivo del estradiol sobre la liberación hipofisaria de LH, así como las concentraciones plasmáticas de ciertas hormonas metabólicas (insulina e IGF-I) se encuentran reducidas por una serie de factores ambientales. Algunas de las principales causas de estas señales bioquímicas negativas son: consumo limitado de energía, escasas reservas corporales, partición de

nutrientes incrementada dirigida hacia la producción de leche y enfermedades del periparto y puerperio como ser distocias o infecciones uterinas.

Santos y col. (2009) evaluaron los factores que tienen mayor incidencia en el reinicio de la actividad ovárica posparto en un estudio que abarcó 6396 animales pertenecientes a cuatro tambos. Las variables consideradas fueron: paridad, estación del año en que la vaca parió, condición corporal al parto y al momento de la IA, producción de leche cuando se reasume la actividad ovárica así como a los 65 días posparto. Además se tomaron muestras de sangre al comenzar los trabajos y 14 días más tarde para determinar el retorno a la ciclicidad mediante la concentración plasmática de P4. Los animales se pre sincronizaron con dos dosis de PGF2 α a intervalo de 14 días. Aquellas que demostraron celo en los 12 días siguientes fueron inseminadas y las restantes se sometieron a un protocolo de sincronización de ovulación. Basados en la información obtenida con el procesamiento de las muestras de sangre, los investigadores observaron que más vacas multíparas retornaron a la ciclicidad luego del parto y más vacas cíclicas fueron diagnosticadas preñadas a los 30, y 58 días. Se indica también que los porcentajes de concepción fueron influenciados por la paridad, condición corporal al parto y a la IA, así como por los cambios en la condición corporal luego del parto.

Zhang y col., (2010) llevaron a cabo un estudio para evaluar la relación entre paridad, tiempo de involución uterina y reinicio de la actividad cíclica. Se utilizaron 46 vacas de las cuales 18 eran primíparas, 13 de segunda lactancia y 15 multíparas, la involución uterina y la actividad ovárica fue determinada por ultrasonografía, también se tomaron muestras de leche para medir concentración de estradiol. El experimento mostró que las vacas primíparas tuvieron un periodo más largo de involución uterina con respecto a las de segunda parición y las multíparas. Los días entre el parto y la ovulación, así como también la cantidad de ondas foliculares antes de la primera ovulación fueron mayores en las primíparas que en las multíparas. En resumen hay una relación negativa entre paridad y días de involución uterina posparto y retorno a la ciclicidad luego del parto.

Tratamiento del anestro posparto

Existen diferentes herramientas aplicables en orden de tratar el anestro posparto. Dichas herramientas podrían ser clasificadas en medidas de manejo e intervenciones hormonales

Los tratamientos hormonales que incluyen periodos cortos de administración de progesterona (7 a 9 días) producen que la mayoría de los animales demuestren celo con una subsiguiente fase luteal normal lo que repercute en una mejora en los niveles de preñez (Rhodes y col., 2003). El uso de la progesterona como único tratamiento para vacas en anestro, en algunos trabajos ha resultado en una fase luteal normal con retorno a la ciclicidad (Miksch y col., 1978; Fike y col., 1997). Sin embargo en otros trabajos no se ha logrado el mismo efecto (Saiduddin y col., 1968; Brown y col., 1972; Kyle y col., 1992). Según otro experimento, el tratamiento de vacas lecheras en anestro con un dispositivo intravaginal de liberación controlada (CIDR) durante 7 días seguido de una inyección de PGF2 α , aplicado 12 a 14 días posparto produjo más vacas en celo luego de los 30 días posparto y las mismas tuvieron una fase luteal normal (Darwash y col., 2001).

Los sistemas basados en la alimentación pastoril del ganado (Australia y Nueva Zelandia), donde los animales se encuentran libres en la parcela y donde la detección de celo es relativamente sencilla (tasa de detección promedio de 85%), por lo general optan por un periodo de observación de los animales luego de finalizado su periodo de espera voluntario (tambos de servicio continuo) o al comienzo de la estación de cría (tambos estacionales). Durante este espacio de tiempo se detecta celo y se insemina sin intervención hormonal alguna. Luego de transcurrido un periodo de 30 días las vacas que no mostraron celo son tratadas hormonalmente (Lucy, 2004). Por lo general la elección en estos sistemas es aplicar un dispositivo intravaginal (CIDR) por un periodo de seis a ocho días seguido de una dosis de 1 o 2 mg de benzoato de estradiol aplicado 24 horas luego de remover el dispositivo (Rhodes y col., 2003). En sistemas pastoriles aproximadamente el 85% de las vacas tratadas demuestran celo durante los 7 días posteriores y el 40% de estas quedarán preñadas (Rhodes y col., 2003). Según datos publicados por Mcdougall en 2001 y 2003 la extensión del tiempo de inserción del

dispositivo de 6 a 8 días, con el agregado de 2 mg de estradiol al momento de la inserción del mismo, mejora las tasas de concepción y preñez.

En los sistemas de confinamiento (EEUU, Canadá, Japón), en los que los animales se encuentran sometidos a un mayor estrés metabólico y productivo, las vacas una vez terminado su periodo de espera voluntario o bien al comienzo de la estación de cría, son directamente integrados a un esquema de reproducción programada (Lucy, 2004). El protocolo Ovsynch ampliamente utilizado en los programas de reproducción sistemáticos pueden ser suplementado con progesterona mediante la inserción de un dispositivo intravaginal (CIDR) durante 7 días entre la primera dosis de GnRH el día 0 y la administración de PGF2 α el día 7. Las mejoras en las tasas de preñez en vacas en anestro al agregar un CIDR a un protocolo Ovsynch han sido reportadas por Chebel y col. (2010), El-Zarkouny y col. (2004), Stevenson y col. (2006), entre otros.

En ensayos controlados de campo se comparó las tasas de preñez obtenidas en vacas en anestro tratadas con el siguiente protocolo: una dosis de GnRH al momento de insertar un dispositivo CIDR por 6, 7, u 8 días, una inyección de PGF2 α al retirar el dispositivo, y 24 horas después 1 mg de benzoato de estradiol. Con la aplicación del dispositivo CIDR con benzoato de estradiol. Las tasas de preñez fueron mayores y el intervalo parto concepción fue más corto por la inclusión de GnRH en los dos primeros grupos (Xu y col., 2000) pero no en el tercero (Rhodes y col., 2000).

Dentro de las medidas de manejo tendientes a minimizar el anestro posparto podríamos citar, manejo nutricional y de la condición corporal para lograr un adecuado nivel de reservas corporales al momento del parto que le permitan al animal superar rápidamente el balance energético negativo que se produce ineludiblemente durante las primeras semanas de lactancia.

Otra estrategia de manejo utilizada es reducir la frecuencia de ordeño, de dos a un ordeño diario, esta medida a resultado en una mejora en la performance reproductiva pero el costo de la menor producción de leche repercute en pérdidas económicas al productor por lo que su empleo quedaría descartado (Rhodes y col., 2003).

Crowe (2008) en una revisión sobre el retorno de la actividad ovárica posparto en vacas de carne y leche afirma que para lograr un óptimo retorno de la ciclicidad es imprescindible una adecuada alimentación pre parto en aras de lograr que la condición corporal al parto se ubique entre 2,75 y 3 (escala de 1 a 5).

Fuentes alternativas de P4

La opción más efectiva y ampliamente difundida para la suplementación con progestágenos ha sido la inserción de dispositivos intravaginales de liberación controlada y sus perfiles sanguíneos han sido objeto de numerosos estudios. Aviles, Cutaia y col. en 2003 publicaron un trabajo en el cual se midieron los niveles circulantes de progesterona en vacas ovariectomizadas tratadas con dispositivos intravaginales de 0,5 y 1 g de progesterona y con CIDR durante 7 días. Los resultados de este estudio mostraron que la concentración de progesterona en sangre se mantuvo por encima de 1 ng/mL durante los 7 días de inserción de los dispositivos, los valores máximos se registraron a las 3 horas, siendo de 7,5 ng/mL para el tratamiento DIV, de 7 ng/mL para el CIDR de 0,5 g y de 6 ng/mL para el CIDR de 1,9 g.

En otro estudio realizado sobre vacas Holando y Jersey primíparas en anestro a la tercera semana posparto, Nation y col. (2000) registraron los valores máximos de P4 en sangre 24 horas luego de la inserción de un dispositivo CIDR el cual permaneció insertado en los animales por un lapso de 5 días. Los niveles circulantes fueron descendiendo progresivamente hasta 2,6 ng/mL al día 4, valor en el que se mantuvieron al día 5 cuando se retiró el dispositivo. En la misma línea de investigación Mcmillan y col. en 2001 (citado por Fernández y Salazar 2007) trabajando sobre vacas en anestro registraron el valor máximo de P4 en plasma, 2,5 ng/mL, a las 48 horas de insertado el dispositivo.

Recientemente ha surgido en el mercado una fuente alternativa de suplementación con progestágenos a los ya tradicionales dispositivos intravaginales de liberación controlada. La novedad consiste en la aplicación parenteral de P4 natural en base oleosa de liberación lenta, la cual es administrada mediante inyección subcutánea y mantiene niveles luteal en sangre por al menos 5 días (Cavestany, 2008).

En un experimento diseñado para comparar los niveles plasmáticos de P4 obtenidos mediante la aplicación de la progesterona inyectable comparada con un dispositivo intravaginal (DIV) se determinó que las concentraciones circulantes de P4 se mantuvieron por encima de 1 ng/ml durante largos periodos en ambos casos. Se observó una mayor variabilidad en la respuesta primaria para el caso de la presentación inyectable. Si bien alcanzaron altos niveles a la hora de su administración las concentraciones descendieron previamente al retiro de los dispositivos y en forma errática entre animales; con un promedio entre grupos de $164,4 \pm 56,4$ hrs mientras que para los DIV $178,3 \pm 46,4$ hrs, lo cual disminuiría la posibilidad del empleo de la solución inyectable por períodos superiores a los 7 días (Marcelo Martínez Barbitta; Daniel Cavestany, 2010).

Objetivos

El objetivo de este trabajo fue comparar perfiles circulantes de P4 luego de la administración de progesterona inyectable o con la administración de un dispositivo intravaginal de 500 mg de P4, así como los resultados de fertilidad utilizando ambas fuentes de P4 en un protocolo Heatsynch de sincronización de la ovulación.

Un objetivo secundario fue evaluar el desempeño reproductivo de las vacas según paridad y actividad ovárica en los dos tratamientos.

Hipótesis

La administración de una inyección de progesterona de larga acción en base oleosa producirá los mismos niveles sanguíneos por lo menos durante 5 días que la aplicación de un dispositivo intravaginal. También logrará similares resultados en la sincronización y fertilidad.

Materiales y Métodos

El experimento se compuso de 3 ensayos. El primero fue realizado en el tambo experimental del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) La Estanzuela, ubicada en el Departamento de Colonia. Tomando el mismo como modelo, se llevaron a cabo otros 2 ensayos en tambos comerciales. Uno en el departamento de Rio Negro, en el Tambo “El Caburé” propiedad del grupo inversor New Zeland Farming Sistem, y otro en el departamento de Paysandú, en el tambo “La Armonía” propiedad de la empresa PILI. Los 3 ensayos fueron desarrollados entre mayo y junio del 2010.

Ensayo 1

Animales y metodología

Se utilizó un lote de 88 vacas, 56 primíparas y 32 multíparas, con un peso promedio de 480 kilos, con un promedio de 60 días posparto y una condición corporal promedio al día del comienzo del ensayo de 2,73 (escala del 1 a 5 de Edmonson y col., 1989).

Mediante palpación rectal se determinó el estado de ciclicidad ovárica de las vacas, clasificándolas en cíclicas cuando presentaban estructuras en el ovario (folículo pre ovulatorio o cuerpo lúteo) o en anestro cuando dichas estructuras no estaban presentes. El resultado fue 36 vacas en anestro y 52 ciclando. Tomando como criterio el diagnostico de ciclicidad conformamos dos grupos homogéneos quedando 18 vacas en anestro en cada lote.

En el cuadro I se muestra la distribución de los dos lotes.

Cuadro I. Características de los animales en cada uno de los lotes de tratamiento

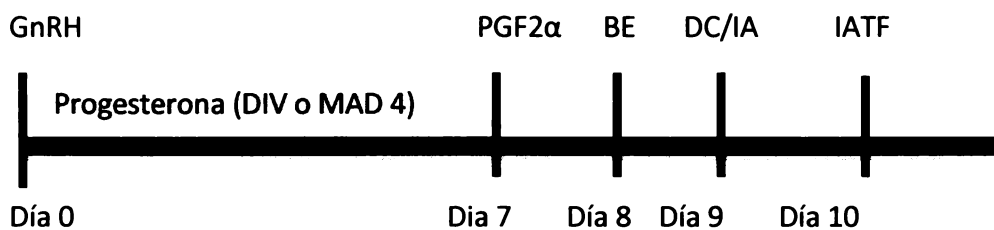
Grupo	Total	n	Lac	SD	CC	SD	Peso	SD	Días	SD
MAD-4	43	18	1,79	1,34	2,73	0,18	488	66	64,3	22,6
DIV	45	18	1,87	1,36	2,73	0,16	472	62	63,7	17,0

Tratamiento

En ambos grupos se aplicó el mismo protocolo de sincronización de celo pero variando la fuente de progesterona entre: un dispositivo intravaginal (DIV) con 500 mg de progesterona (Cronipres, Biogenesis Bagó, Montevideo, Uruguay) y una progesterona inyectable en base oleosa (MAD-4, Laboratorio Rio de Janeiro, Santa Fe, Argentina).

El protocolo consistió en: Día 0, inyección im de 8 µg de un análogo sintético de la GnRH (GnRH, Acetato de Buserelina, Laboratorio Río de Janeiro, Santa Fe, Argentina) y aplicación de la fuente de progesterona; dispositivo intravaginal con 500 mg de progesterona (Cronipres, Biogénesis Bagó, Montevideo, Uruguay) o progesterona inyectable en base oleosa (MAD-4 laboratorio Rio de Janeiro, Santa Fe, Argentina); Día 7, se administró 500 µg im de un análogo sintético de la prostaglandina F2α (Prostaglandina, Cloprostenol, Laboratorio Río de Janeiro, Santa Fe, Argentina) y se retiró el dispositivo intravaginal; Día 8, se administró 1 mg i.m de Benzoato de estradiol (Estradiol 10, Laboratorio Río de Janeiro, Santa Fe, Argentina); Día 9, detección de celo e inseminación; Día 10, IATF.

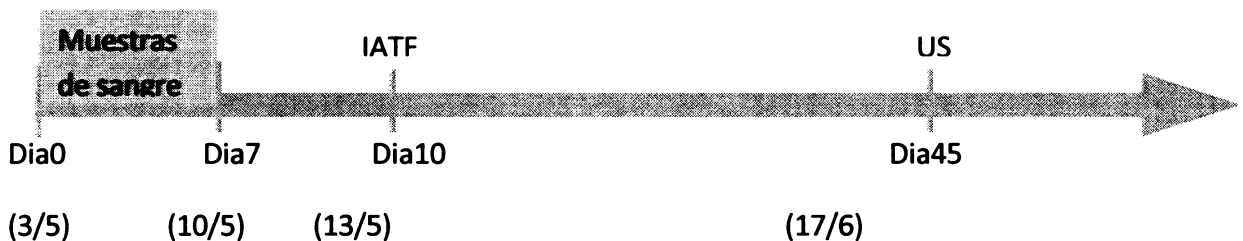
El protocolo de sincronización fue el mismo para los 3 ensayos que componen el experimento. Esquema del protocolo de sincronización.



En ambos grupos se extrajeron muestras de sangre de todos los animales diariamente desde el día 0 al 7 para obtener el perfil de progesterona en sangre. Dichas muestras fueron tomadas mediante la utilización de un tubo heparinizado y al vacío (Vacutainer®), mediante punción yugular. Las muestras se centrifugaron a 3000 RPM durante 10 minutos. Para la obtención del plasma se utilizaron pipetas Pasteur y las muestras fueron

almacenadas en tubos Eppendorf en el freezer hasta su análisis. Los niveles de progesterona se determinaron por un RIA en fase sólida en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria. Se definió como cíclica toda vaca que al Día 0 presentara niveles $\geq 1\text{ng/mL}$ y como en anestro toda vaca que presentara niveles inferiores a 1ng/mL . A los 35 días de realizada la inseminación se realizó el diagnóstico de gestación mediante ultrasonografía transrectal.

En la siguiente línea de tiempo se esquematiza los procedimientos realizados



Abreviaturas

IATF: Inseminación a tiempo fijo

US: Ultrasonografía

Ensayo 2:

Animales y metodología

El trabajo se realizó con 196 vacas, las cuales presentaban una condición corporal promedio al inicio del ensayo de 2,8 (escala del 1 a 5 de Edmonson y col., 1989) y un peso promedio de 437 kg. El grupo estaba conformado por 98 vacas multíparas y 98 primíparas.

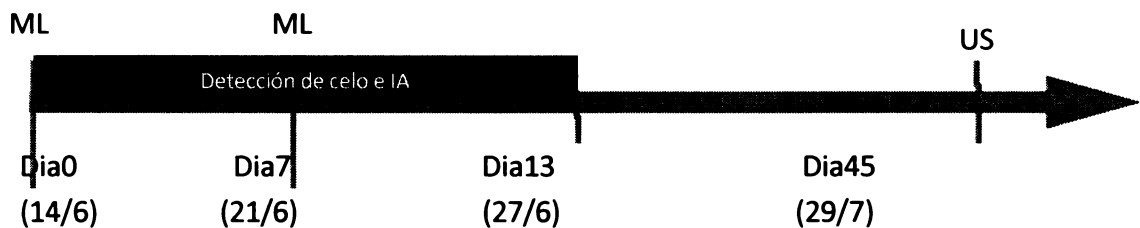
En este caso se utilizó, para determinar la ciclicidad del rodeo al comienzo de ensayo, la medición de los perfiles de progesterona en leche. Para lo cual se extrajo una muestra el día 0.

Tratamiento

El protocolo de sincronización aplicado fue el mismo utilizado en el ensayo 1, pero no se realizó la IATF al día 10.

Otra variación del ensayo tomado como base, fue que se utilizó el sistema tradicional de inseminación, basado en dos detecciones de celo diarias, una a las 6 de la mañana y la otra a las 18 horas, desde el día 0 al 13. Siendo los animales detectados en celo durante la mañana, inseminados en horas de la tarde y aquellos detectados en celo por la tarde, inseminados a la mañana siguiente. A los 35 días de realizada la inseminación se realizó el diagnóstico de gestación mediante ultrasonografía transrectal.

En la siguiente línea de tiempo se esquematizan los procedimientos realizados



Abreviaturas:

US: Ultrasonografía

ML: muestra de leche

Ensayo 3:

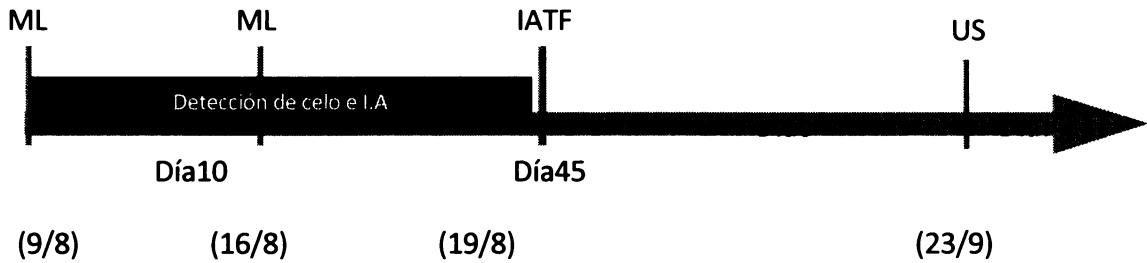
Animales y metodología

Se realizó con 95 vacas de las cuales 33 eran primíparas y 62 multíparas. La condición corporal promedio de los animales al comenzar el ensayo era de 2,5 (escala del 1 a 5 de Edmonson y col., 1989) y un promedio de 84 días posparto. Al igual que en el ensayo número 2 para determinar la ciclicidad al inicio del ensayo se empleó la determinación de progesterona en leche al día 0.

Tratamiento

El protocolo de sincronización aplicado fue el mismo que para los dos ensayos anteriores.

En este caso a pedido del técnico responsable del tambo, se detectó celo dos veces al día y se inseminó de acuerdo al sistema tradicional (AM/PM) desde el inicio del ensayo. No obstante esto, se realizó inseminación a tiempo fijo a todo el ganado no detectado en celo previamente el día 10 del protocolo tal como lo indicaba el esquema original. A los 35 días de realizada la inseminación se realizó el diagnóstico de gestación mediante ultrasonografía transrectal. En la siguiente línea de tiempo se esquematizan los procedimientos realizados



Abreviaturas:

ML: Muestra de leche

US: Ultrasonografía

IATF: Inseminación a tiempo fijo

Análisis estadístico

Los porcentajes de preñez por tratamiento, actividad ovárica y paridad se analizaron por Chi cuadrado y las diferencias entre medias por regresión logística.

Las concentraciones de progesterona por día según tratamiento se analizaron por procedimiento mixto (Proc Mixed, SAS).

Resultados



Ensayo 1

De acuerdo a la concentración plasmática de progesterona al comenzar el ensayo, de los 45 animales del grupo DIV, 29 se encontraban ciclando y 16 en anestro. Con respecto al grupo MAD 4, de las 43 vacas, 30 estaban ciclando y 13 se encontraban en anestro (Cuadro II).

Cuadro II: Clasificación de los animales según paridad y número de animales ciclando y en anestro de acuerdo a los niveles de progesterona en suero al inicio del tratamiento

GRUPO	TOTAL	PRIMIPARAS	MULTIPARAS	ANESTRO	CICLANDO
DIV	45	28	17	16	29
MAD 4	43	28	15	13	30
TOTAL	88	56	32	29	59

A 9 de las 29 vacas (31%) consideradas en anestro por niveles de progesterona en sangre el Día 0, se les palpó un cuerpo lúteo; asimismo a 15 de las 59 (25%) vacas que se consideraron ciclando el Día 0 por tener niveles de progesterona superiores a 1 ng/mL, no se les logró palpar un cuerpo lúteo.

Ciclicidad según paridad

El grado de actividad ovárica del lote al Día 0, discriminando los animales según paridad, indica que una mayor proporción de vacas multíparas se encontraba ciclando al comenzar el trabajo. De un total de 32 vacas multíparas 22 (68,7%) estaban ciclando. Por otro lado de las 56 vacas primíparas 37 (58,9%) estaban ciclando al comenzar el ensayo.

Concentración de progesterona

En ambos tratamientos, los niveles plasmáticos de progesterona tuvieron un comportamiento diferente en las vacas cíclicas y en las que estaban en anestro. Al comparar los dos tratamientos en las vacas ciclando (Figura 4) surge que si bien los niveles de progesterona en el tratamiento DIV fueron superiores al inicio (5,98 ng/mL vs 4,82 ng/mL para los tratamientos DIV y MAD 4 respectivamente), al Día 1 estos niveles eran prácticamente iguales debido a que en el tratamiento DIV los valores fueron disminuyendo progresivamente mientras en el tratamiento MAD 4 las concentraciones aumentaron rápidamente al Día 1. Las muestras correspondientes al segundo día reflejaron una disminución en los valores de progesterona en el grupo MAD 4 ubicándose los mismos apenas por debajo de los registros correspondientes al grupo DIV. Desde el Día 3 hasta al final del ensayo los niveles registrados por el grupo MAD 4 fueron superiores a los del grupo DIV.

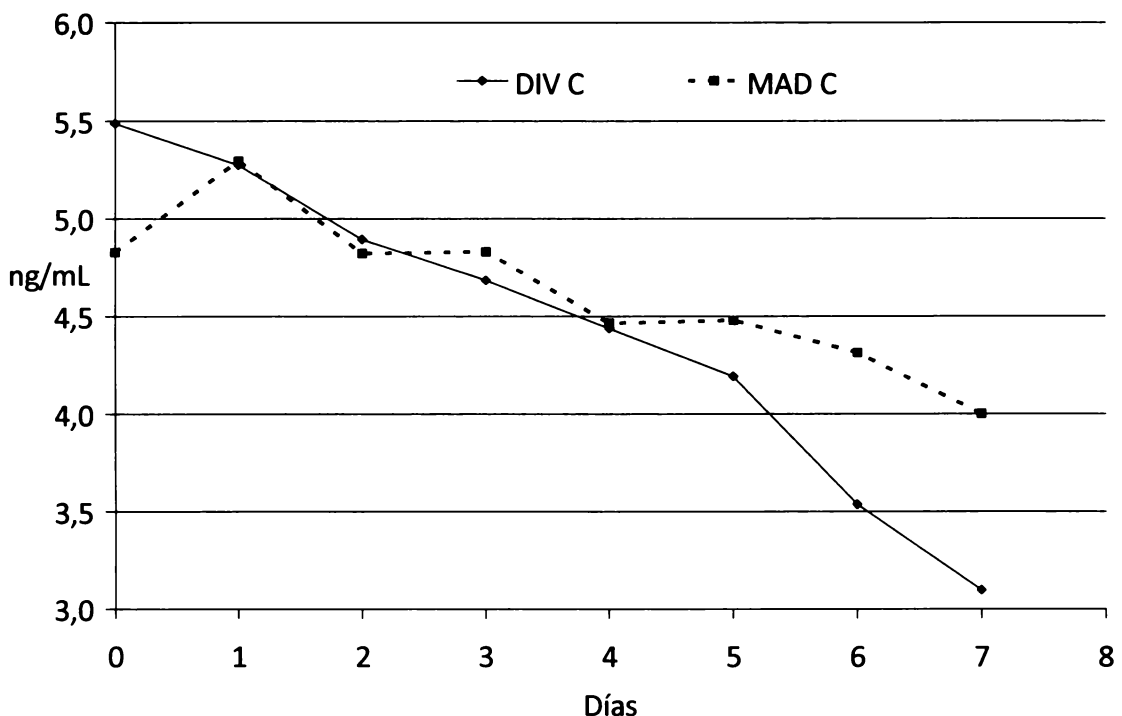


Figura 4: Comparación entre los perfiles de progesterona de los tratamientos DIV y MAD 4 en vacas ciclando

En las vacas en anestro (Figura 5) el tratamiento DIV logró mantener concentraciones por encima de 1 ng/mL a partir del Día 1 y durante los 7 días que se mantuvo colocado el dispositivo. En el grupo MAD 4 las concentraciones fueron menores a 1 ng/mL a lo largo de los 4 primeros días, siendo variables los primeros 3 días luego de lo cual mostraron una tendencia ascendente alcanzando el nivel de 1 ng/mL a partir del día 5. Es apreciable la diferencia en los valores plasmáticos de progesterona entre los dos tratamientos en favor del grupo DIV el cual registró valores superiores al grupo MAD 4 durante 6 de los 7 días de inserción del dispositivo.

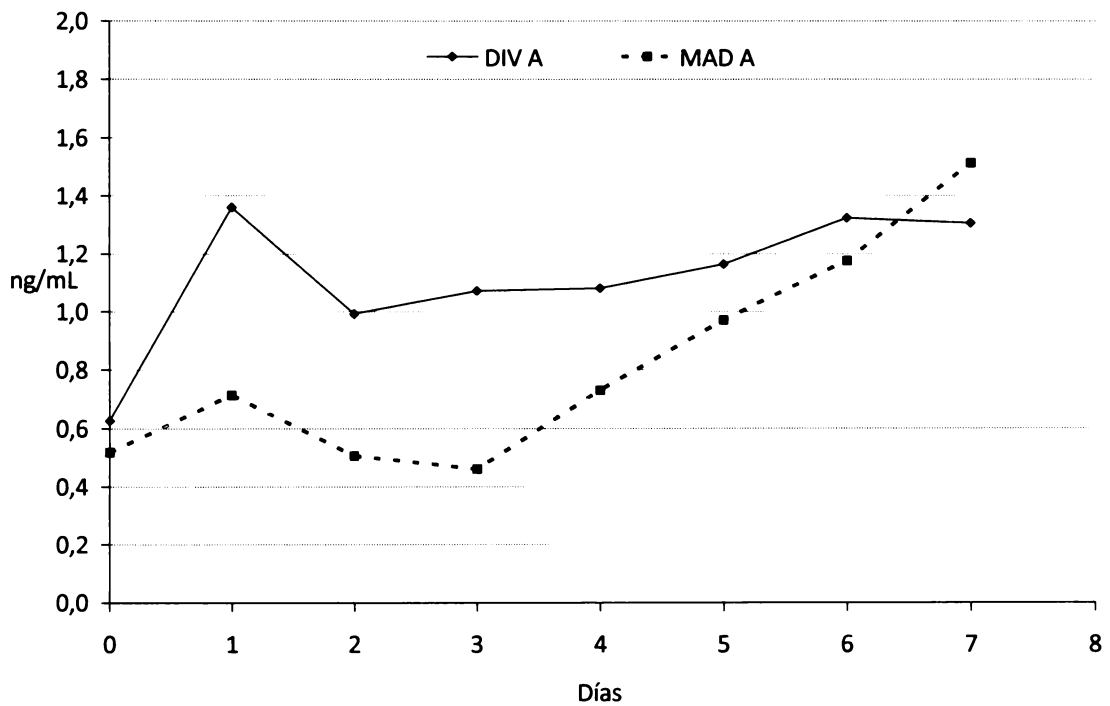


Figura 5: Comparación entre los perfiles de progesterona de los tratamientos DIV y MAD 4 en vacas en anestro

Fertilidad

No se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de preñez de los dos tratamientos (22,2% vs 18,6% para los tratamientos DIV Y MAD 4 respectivamente, $p =$

0,67), y la preñez general fue de 20,45%. No existieron interacciones entre tratamiento y ciclicidad ni entre tratamiento y paridad (Cuadro III).

Cuadro III: Porcentajes de preñez de acuerdo al tratamiento, paridad y actividad ovárica

GRUPO	PRIMIPARAS	MULTIPARAS	ANESTRO	CICLANDO
DIV	22,0 ^a	19,0 ^a	15,1 ^{a,b}	25,8 ^{a,c}
MAD 4	15,4 ^a	14,4 ^a	9,5 ^{a,b}	20,2 ^{a,c}
TOTAL	23,2 ^d	15,6 ^e	10,3 ^f	25,4 ^g

^a: Letras similares entre columnas difieren, $P > 0,1$

^{b,c}: Diferentes letras entre filas difieren, $P < 0,05$

^{d,e}: Diferentes letras entre columnas: $P = 0,08$

^{f,g}: Diferentes letras entre columnas: $P = 0,09$

Al considerar el lote en su conjunto, se aprecia una interacción entre la paridad y la ciclicidad, con efecto sobre la fertilidad. En las primíparas se aprecia una significativa diferencia en los porcentajes de preñez de acuerdo a la actividad ovárica, ya que en las vacas ciclando la preñez fue del 32,7% y en las que estaban en anestro del 4% ($p = 0,017$), por el contrario las multíparas ciclando se preñaron 13,4% mientras que las que estaban en anestro se preñaron el 20%, no siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,67$). En las vacas que al inicio del tratamiento se encontraban en anestro no hubo diferencias significativas en los porcentajes de preñez según paridad ($p = 0,33$). En las vacas que se encontraban ciclando al inicio del tratamiento hubo una tendencia en la preñez a favor de las primíparas ($p = 0,08$). También queda en evidencia que la actividad ovárica al comienzo del protocolo influyó en la fertilidad independientemente del tratamiento utilizado ya que las vacas que estaban ciclando al comienzo del trabajo registraron una tendencia a un mayor porcentaje de preñez (10,3 vs 25,4% para vacas en anestro y ciclando respectivamente $p = 0,09$).

Ensayo 2

Ciclicidad

De los 196 animales tratados, se analizaron estadísticamente 195, ya que el uno debió ser eliminado del ensayo. Según la muestra de leche extraída el Día 0 de los 97 animales del grupo DIV 59 se encontraban ciclando y 38 en anestro. Con respecto al tratamiento MAD 4 de un total de 98 animales, 72 estaban ciclando y 26 en anestro al comenzar el ensayo (Cuadro IV).

Cuadro IV: Clasificación de los animales según paridad y número de animales ciclando y en anestro de acuerdo a los niveles de progesterona en suero al inicio del tratamiento

GRUPO	TOTAL	PRIMIPARAS	MULTIPARAS	ANESTRO	CICLANDO
DIV	97	48	49	38	59
MAD 4	98	49	49	26	72
TOTAL	195	97	98	64	131

Fertilidad

No se encontraron diferencias significativas entre La fertilidad de los dos tratamientos (36,1 vs 35,7 $p=0,95$, para los grupos DIV y MAD 4 respectivamente) y la preñez general fue de 35,9%. Las vacas primíparas mostraron mejores porcentajes de preñez que las multíparas en los dos tratamientos aunque en ningún caso las diferencias fueron estadísticamente significativas (Cuadro V).

Cuadro V: Porcentajes de preñez de acuerdo a tratamiento paridad y actividad ovárica

GRUPO	PRIMIPARAS	MULTIPARAS	ANESTRO	CICLANDO
DIV	39,6	31,3	37,1	33,1
MAD 4	43,0	32,2	44,5	30,6
TOTAL	40,2	31,6	43,7	32,1

No hubo interacción entre paridad y condición corporal, tratamiento y condición corporal, tratamiento y ciclicidad, tratamiento y paridad, ni entre ciclicidad y paridad. Las vacas diagnosticadas en anestro al comenzar el ensayo mostraron una tendencia a tener mayores porcentajes de preñez que las que estaban ciclando en ambos tratamientos, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 6).

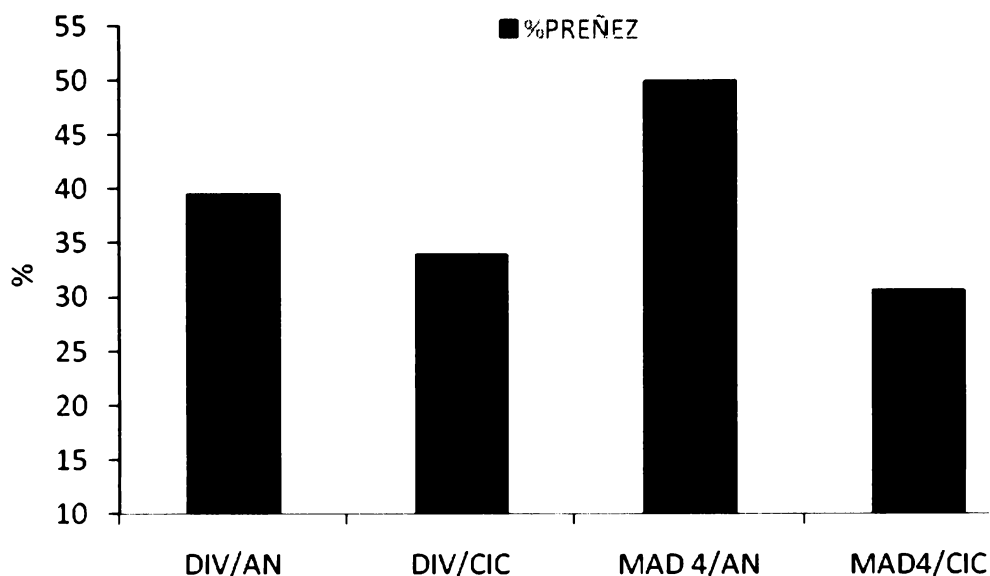


Figura 6: Porcentaje de preñez de vacas tratadas con DIV y MAD 4, según actividad ovárica

Independiente de los tratamientos, al agrupar las vacas en tres niveles de condición corporal (figura 7) notamos una tendencia a tener mejores porcentajes de preñez a una mayor condición corporal, aunque las diferencias no son significativas.

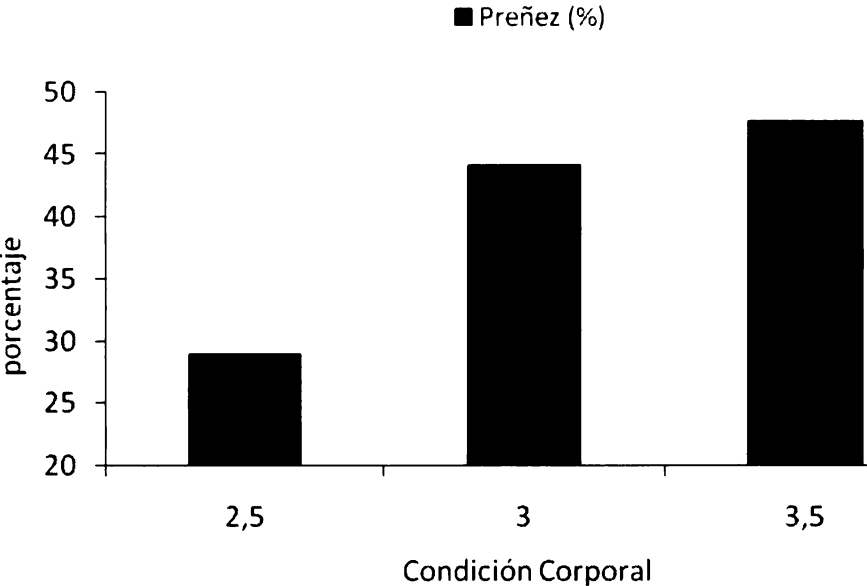


Figura 7: Porcentajes de preñez según tres niveles de condición corporal

Ensayo 3

Ciclicidad

Dos vacas debieron ser excluidas del grupo original por diferentes razones. Al inicio del ensayo, de las 51 vacas pertenecientes al grupo DIV, 24 se encontraban ciclando, y 27 estaban en anestro. Con respecto al grupo MAD 4 de un total de 42 animales 15 estaban ciclando y 27 se encontraban en anestro (Cuadro VI).

Cuadro VI: Clasificación de los animales según paridad y número de animales ciclando y en anestro de acuerdo a los niveles de progesterona en suero al inicio del tratamiento

GRUPO	TOTAL	PRIMIPARAS	MULTIPARAS	ANESTRO	CICLANDO
DIV	51	21	31	27	24
MAD 4	42	13	28	27	15
TOTAL	93	34	59	54	39

Fertilidad

No se observaron diferencia significativas entre los porcentajes de preñez obtenidos entre los dos tratamientos (27,5% vs 33,3% para los grupos DIV y MAD 4 respectivamente, $p=0,54$), y la preñez general fue de 30,1%. No se observaron interacciones entre paridad y ciclicidad, entre tratamiento y paridad, ni entre tratamiento y días posparto.

Cuadro VII: Porcentajes de preñez según tratamiento paridad y actividad ovárica

GRUPO	PRIMIPARAS	MULTIPARAS	ANESTRO	CICLANDO
DIV	11,5	33,9	17,8	27,8
MAD 4	28,5	32,1	40,5	20,1
TOTAL	26,5	32,2	27,8	33,3

Se observó una tendencia a la interacción entre tratamiento y ciclicidad $p= 0,087$. Las vacas que estaban ciclando al inicio no mostraron diferencias significativas de preñez según tratamiento, a diferencia de lo sucedido con las vacas en anestro donde se observó una diferencia significativa a favor del tratamiento MAD 4 (figura 8). No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de preñez de acuerdo a los días posparto

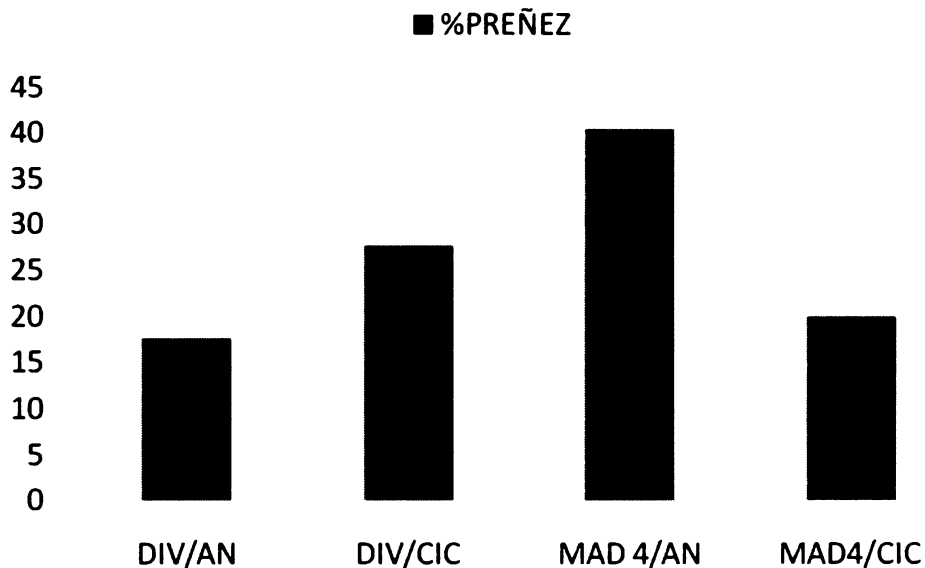


Figura 8: Porcentaje de preñez de vacas tratadas con DIV y MAD 4, según actividad ovárica

Relación entre fertilidad y paridad

A diferencia de lo observado en los ensayos anteriores las vacas multíparas tuvieron mejores porcentajes de preñez, tanto en el tratamiento DIV como en el MAD 4, aunque la diferencia observada no es estadísticamente significativa ($p =0,56$). De las 34 vacas primíparas que integraban el ensayo resultaron preñadas 9 (26,47%), mientras que de las 59 multíparas se preñaron 18 (32,2%). En contraposición con lo observado en los dos ensayos anteriores.

IATF vs IA con detección de celo

(-FAI)

Del total de animales, 24 (25% del total) demostraron celo y fueron inseminados durante los días previos e incluso en la mañana del mismo día programado para la IATF. De estos animales 13 pertenecían al tratamiento DIV y los restantes 11 integraban el grupo de la progesterona inyectable (MAD 4).

Un total de 69 vacas (74,2%) fueron inseminadas a tiempo fijo, de las cuales se preñaron 21 (30,4%). De las 24 vacas inseminadas previamente a la IATF, 6 (24%) fueron diagnosticadas como preñadas de las cuales 4 pertenecían al tratamiento MAD 4 y 2 al DIV.

De las vacas sometidas a IATF, 21 (30,4%) retornaron al celo y fueron inseminadas bajo el método tradicional AM/PM. De las re inseminadas se preñaron 3. Por otro lado de las vacas inseminadas por primera vez bajo detección de celo retornaron 12 pero ninguna resultó preñada.

Discusión

Relación entre ciclicidad y paridad

Una mayor proporción de vacas multíparas se encontraba ciclando al comenzar los trabajos. Este dato concuerda con lo publicado por Santos y col. (2009) quienes evaluaron los factores que tienen mayor incidencia en el reinicio de la actividad ovárica posparto en un estudio que abarcó 6396 animales pertenecientes a cuatro tambos. Los investigadores observaron que más vacas multíparas retornaron a la ciclicidad luego del parto y más vacas cíclicas fueron diagnosticadas preñadas a los 30 y 58 días pos inseminación.

En esta línea de trabajo Zhang y col. (2010) realizaron un ensayo donde se medía la relación entre paridad, involución uterina postparto y reinicio de la actividad ovárica. Este estudio concluyó que las vacas multíparas tuvieron una involución uterina más rápida y un periodo más corto entre el parto y re inicio de la ciclicidad.

Concentración de progesterona

La suplementación con progestágenos apunta a generar un ambiente alto en P4 que ha demostrado ser importante en protocolos de sincronización aplicados al comienzo o al final del ciclo estral (Stevenson y col., 1999; Rivera y col., 2005). En nuestro trabajo se observó un comportamiento diferente frente a la suplementación con progestágenos entre las vacas ciclando y en anestro. También es apreciable un desarrollo diferente de la curva de P4 entre los dos tratamientos. En las vacas ciclando, el tratamiento MAD 4 mostró una elevación rápida en las concentraciones de P4 al Día 1, y en los días siguientes se observó una tendencia decreciente, siendo 4 ng/mL el valor registrado al día 7. Si bien estos valores resultan adecuados pensando en la posible sustitución de los dispositivos intravaginales por una presentación inyectable en base oleosa, es preciso señalar que al referirnos a vacas con actividad ovárica normal resulta imposible diferenciar la progesterona proveniente del cuerpo lúteo de la aportada por una fuente exógena. Por

otro lado la concentración de P4 en las vacas ciclando pertenecientes al tratamiento DIV descendieron progresivamente desde el Día 0, hasta que se retiró el dispositivo el Día 7, momento en el que los valores eran de 3,09 ng/mL. La caída inicial en los niveles plasmáticos de P4 observada en la Figura 4 podría ser provocada por el efecto GnRH que indujo la ovulación en aquellas vacas que tenían en ese momento un folículo dominante mayor a 10 mm, provocando de esta manera que en los días subsiguientes algunos animales se encontraran en etapas tempranas del ciclo cuando las concentraciones de P4 son naturalmente bajas (Pursley y col., 1995). También se observaron diferencias entre los perfiles de P4 de los dos tratamientos en las vacas en anestro. En el tratamiento MAD 4 las concentraciones fueron variables los primeros 3 días luego de lo cual mostraron una tendencia ascendente para superar el nivel de 1 ng/mL a partir del Día 5. El séptimo día se observó en este grupo un marcado aumento de las concentraciones respecto a lo registrado en los días anteriores. Este cambio podría deberse a que algunas vacas clasificadas como en anestro al comenzar el ensayo realmente se encontraban en metaestro, y luego de 7 días presentaban un cuerpo lúteo funcional capaz de elevar los niveles circulantes de P4 en estos animales. Con respecto a lo sucedido con las vacas en anestro en el tratamiento DIV, los niveles de P4 superaron el nivel de 1 ng/mL a partir del Día 1 y durante el resto del tiempo que se mantuvo insertado el dispositivo. Al comparar los dos tratamientos notamos una amplia diferencia entre los niveles de P4 a favor del tratamiento DIV, esta diferencia es más marcada entre los días 1 y 4. Probablemente la liberación controlada mediante un dispositivo intravaginal resultó más efectiva que la presentación inyectable a la hora de mantener concentraciones estables de progesterona por encima de 1 ng/mL en vacas en anestro (Sorensen, 1982; citado por Fernández y Salazar 2007).

El valor máximo alcanzado por el grupo DIV en este ensayo es algo menor que los datos publicados por Aviles, Cutaia y col. en 2003, por otro lado, Nation y col. (2000) obtuvieron valores similares a los nuestros y los datos reportados por Mcmillan y col. en 2001 están por debajo de los valores alcanzados en este ensayo. Aviles, Cutaia y col. (2003) midieron los perfiles circulantes de P4 en vacas tratadas con dispositivos intravaginales de 0,5, 1, y 1,9 g de progesterona; los valores máximos se alcanzaron a las 3 horas de insertado el

dispositivo siendo de 7, 6, y 7,5 ng/mL para los animales tratados con dispositivos de 0,5, 1, y 1,9 g de progesterona respectivamente. Nation y col. (2000) trabajaron midiendo los niveles de P4 en vacas Holando y Jersey, primíparas, en anestro, en la tercera semana pos parto, tratadas con un dispositivo CIDR por 5 días. El valor máximo se logró a las 24 horas de insertado el dispositivo con 4 ng/mL de sangre, luego los niveles fueron descendiendo lentamente, y el día 5 cuando se retiró el dispositivo eran de 2,6 ng/mL. En la misma línea de trabajo Mcmillan y col. (2001) (citado por Fernández y Salazar 2007) utilizando vacas en anestro obtuvieron el máximo valor de P4 en sangre a las 48 horas de insertado el dispositivo siendo el mismo de 2,5 ng/mL.

Sobre las concentraciones plasmáticas de P4 en vacas tratadas con MAD 4 en un trabajo realizado recientemente por Martínez Barbitta y Cavestany, (2010) en el que se compararon los perfiles sanguíneos de P4 en animales tratados con dispositivos intravaginales (DIV) y progesterona inyectable (MAD 4) se observó que tanto los dispositivos como la presentación inyectable lograron niveles mayores a 1 ng/mL durante largos periodos. Sin embargo la presentación inyectable mostró una mayor variabilidad en las concentraciones, las cuales aumentaron rápidamente una hora luego de la administración mostrando un comportamiento algo errático entre animales y descendieron un día antes de la extracción del dispositivo. El tiempo promedio durante el cual los valores circulantes de P4 se ubicaron por encima de 1 ng/mL fue de 164 ± 56 horas para el grupo MAD 4 y de 178 ± 42 horas para el grupo DIV

Fertilidad

Los porcentajes de preñez al primer servicio determinados por ultrasonografía a los 35 días pos IA fueron: 20,5%, en el ensayo número 1, 40,1% en el ensayo número 2 y 30,1% en el ensayo número 3. En ninguno de los 3 ensayos realizados se observaron diferencias en los resultados de fertilidad entre el tratamiento DIV y el tratamiento MAD 4, lo que resulta un dato alentador a la hora de pensar en una posible sustitución de los dispositivos intravaginales por una presentación inyectable de fácil aplicación y que no genera residuos contaminantes para el medio ambiente. Los niveles de preñez obtenidos en nuestro trabajo son mayores que los obtenidos por Kasimanickam y col. (2005) quienes utilizando el mismo protocolo de sincronización, pero sin suplementación con P4,

obtuvieron un 15,5% de preñez al primer servicio. Estos investigadores también evaluaron en este ensayo la fertilidad obtenida aplicando un protocolo Ovsynch y el porcentaje de preñez alcanzado luego de la IATF fue de 21,3%. Stevenson y Phatak (2005) en un trabajo diseñado para comparar dos protocolos de sincronización de la ovulación (Ovsynch vs Heatsynch) registraron valores de preñez de 34,7% y 27,7% para Heatsynch y Ovsynch respectivamente. Es preciso señalar que los experimentos citados precedentemente fueron realizados en EE.UU sobre animales mantenidos en confinamiento, sometidos a un mayor estrés productivo y metabólico comparado con los animales que integran los sistemas de producción uruguayos. Por otro lado en un ensayo acerca de la eficiencia reproductiva utilizando distintos tratamientos de sincronización realizado en 8 tambos comerciales uruguayos sobre 1228 vacas, se logró un 30,7% de preñez con la aplicación de un protocolo Ovsynch e IATF (Cavestany y col., 2000).

Pancarci y col. (2002) trabajando sobre animales confinados y tratados con somatotrofina bovina para mejorar la fertilidad de la primera inseminación reportaron datos de preñez con IATF de $37,1 \pm 5,8\%$ y $35,1 \pm 5\%$ para Ovsynch y Heatsynch respectivamente. En otro ensayo realizado por estos investigadores en similares condiciones los resultados fueron de $28,2 \pm 3,6\%$ y $29 \pm 3,5\%$ para Ovsynch y Heatsynch respectivamente. En los dos ensayos precedentes se aplicó pre sincronización mediante dos dosis de $\text{PGF2}\alpha$ administradas con un intervalo de 14 días y la segunda inyección de $\text{PGF2}\alpha$ fue aplicada 12 días antes del comienzo del tratamiento de sincronización de ovulación (Ovsynch o Heatsynch). Numerosos trabajos afirman que la presincronización mejora la fertilidad de los protocolos de sincronización. El-Zarkouny y col. (2004) realizaron un experimento en una población de 630 vacas en lactación pertenecientes a 2 rodeos, con un rango de 59 a 79 días pos parto, sometiéndolas a un protocolo Ovsynch e inseminación a tiempo fijo 16 a 20 horas luego de la última inyección de GnRH, con o sin pre sincronización. Los resultados demostraron que la pre sincronización mejora los porcentajes de preñez a los 29 días luego de la IATF (46,8%) comparado con la aplicación del protocolo Ovsynch en un momento al azar del ciclo estral (37,5%). Navanukraw y col. (2004) confirmaron esta idea en un ensayo realizado sobre 260 vacas con más de 60 días pos parto, en el cual midieron

el efecto de la pre sincronización en un protocolo Ovsynch. Los porcentajes de preñez a los 42 días fueron 49,6 vs 37,7% para los grupos Presynch y Ovsynch respectivamente.

En el ensayo número 1 la condición corporal de las vacas al comenzar los trabajos era en promedio de 2,73 para ambos tratamientos, en el ensayo número 2 la condición corporal del lote en promedio era de 2,8, distribuyéndose en un rango de 2,5 a 3,5, y en el tercer ensayo el promedio de condición corporal se ubicó en 2,56 puntos (escala de 1 a 5) siendo el valor más bajo de los tres ensayos. De acuerdo a la revisión hecha por Crowe MA (2008) sobre el retorno de la actividad ovárica pos parto en vacas de carne y leche para lograr un óptimo retorno de la ciclicidad lo ideal es lograr una condición corporal al parto que se ubique entre 2,75 y 3,0 (escala de 1 a 5). Pancarci y col. (2002) observaron que las vacas múltiparas tuvieron una fertilidad más baja a una condición corporal por debajo de 3,0. Es posible que la baja condición corporal de los animales al comienzo de las tareas haya influido negativamente en los resultados de fertilidad en el ensayo número 1 y en el ensayo número 3, no así en el ensayo número 2, donde el análisis estadístico de la preñez lograda en tres niveles de condición corporal (2,5, 3,0, y 3,5) no mostró diferencias significativas.

Relación entre ciclicidad y fertilidad

En el ensayo número 1, las vacas que estaban ciclando al comenzar los trabajos mostraron una tendencia a tener mejores resultados de preñez. Esta tendencia se mantuvo independientemente del tratamiento utilizado. Esta observación concuerda con lo ocurrido en un trabajo realizado por Chebel y col. (2010) en el que las vacas clasificadas como cíclicas de acuerdo a sus concentraciones plasmáticas de P4 mostraron mejores datos de preñez a los 40 días que las clasificadas como en anestro 38,2 vs 29,3% y esta diferencia se mantuvo a los 60 días pos IA cuando fue de 35,1 vs 26,1% para las cíclicas y en anestro respectivamente. Por otro lado Stevenson, Pursley y col. (2006) trabajando sobre vacas cíclicas y en anestro registraron mayores pérdidas embrionarias entre los días 28 y 56 pos IA en estas últimas, lo que podría explicar en parte la menor fertilidad de las mismas. En el ensayo 2 de nuestro trabajo se observó una tendencia a tener mejores porcentajes de preñez de las vacas en anestro independientemente del tratamiento utilizado, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. En el ensayo

número 3, se observó una tendencia a la interacción entre tratamiento y ciclicidad. Mientras en las vacas ciclando no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, en las vacas en anestro se aprecia una significativa diferencia de preñez a favor del tratamiento MAD 4. Los datos de preñez según ciclicidad en los ensayos 2 y 3 deben ser tomados con cautela ya que el diagnóstico de la actividad ovárica se basó únicamente en la determinación de progesterona realizada en la muestra de leche extraída el Día 0. Lo que puede inducir a error en aquellos animales que en ese momento se encontraran en metaestro (días 0 a 5 del ciclo) o en proestro (días 18 a 21 del ciclo) momentos en los cuales la concentración de progesterona es naturalmente baja.

Relación entre fertilidad y paridad

Se evidencia en los ensayos 1 y 2 que componen nuestro trabajo una mayor eficiencia reproductiva de las vacas primíparas en comparación con las múltiparas, mientras en el ensayo 3 se aprecia numéricamente un mejor desempeño de las vacas múltiparas aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. En este sentido ha habido reportes que manifiestan una mejor respuesta de las vacas primíparas a protocolos de sincronización de ovulación. Probablemente el mayor estrés productivo y metabólico al que están sometidas las vacas de 2 lactancias o más sea la causa de un detrimento en su función reproductiva. Para evaluar las diferencias en el comportamiento de estas categorías Tenhaguen y col. (2004) realizaron un estudio sobre 1584 vacas (583 primíparas y 1001 múltiparas) pertenecientes a 3 tambos comerciales. Los animales fueron sincronizados utilizando un protocolo Ovsynch convencional con IATF realizada 16 a 20 horas luego de la segunda dosis de GnRH. Los parámetros analizados fueron: porcentaje de concepción a la primera inseminación y proporción de vacas preñadas a los 200 días de lactancia. El porcentaje de concepción a la IATF resultó mayor en las primíparas que en las múltiparas (37,9 vs 31,6%) de igual manera la preñez a los 200 días de lactancia fue mayor para las primíparas (81,8 vs 75,4% para primíparas y múltiparas respectivamente). También de Nava y col. (2010), en un estudio que recopiló los resultados obtenidos durante 4 años de aplicación de un programa de IATF coincidente con el primer día de la estación reproductiva invernal observaron una tendencia similar. La población sobre la que se trabajó en este ensayo fue de 2659 vacas Holando en

producción y ciclando a las que se les aplicó un protocolo Ovsynch +P4 comenzando el día -10 (día 0: comienzo de la estación de cría), se insertó un dispositivo intravaginal de P4 entre los días -10 y -3, y la IATF se realizó el día 0, entre 10 y 18 horas luego de la última inyección de GnRH. Estos investigadores observaron que las tasas de preñez se vio afectada por el número de lactancia, siendo la tasa de preñez a la IATF de 48,8%, 48,2%, 43,1% y 40,5% para vacas de 1, 2, 3 y 4 o más lactancias respectivamente, esta diferencia se mantuvo en las tasas de preñez acumuladas (incluyendo los servicios realizados durante un periodo de 30 días pos IATF), siendo de 63,7%, 62,9%, 59,8% y 56,7% para las vacas de 1, 2, 3 y 4 o más lactancias respectivamente.

Pancarci y col. (2002) comparando dos protocolos de sincronización de ovulación observaron que para ambos tratamientos los porcentajes de concepción en las vacas primíparas eran más altos que en las múltiparas. Notaron también que a una condición corporal menor a 3,0 las múltiparas tuvieron menores porcentajes de concepción, mientras que las primíparas se mantuvieron bastante constantes cuando su condición corporal oscilaba entre 2,5 y 3,0 (escala de 1 a 5). En el ensayo número 3 a diferencia de lo ocurrido en los dos ensayos anteriores se obtuvo un mayor porcentaje de preñez en las vacas múltiparas que en las primíparas. Tal vez la baja condición corporal que presentaba el grupo de primíparas impactó negativamente en su fertilidad determinando que tuvieran un peor desempeño reproductivo comparado con el grupo de múltiparas. Cerri y col. (2004) realizaron un trabajo en el que se evaluó la fertilidad obtenida al aplicar un protocolo Heatsynch con IATF o un protocolo Selectsynch con detección de celo sobre vacas primíparas y múltiparas de alta producción. Los valores de preñez registrados por este autor a los 58 días fueron en el grupo IATF, 42,2% para las múltiparas y 34,4% para las primíparas mientras que en el grupo bajo detección de celo los resultados fueron de 20,8 y 18,8% para múltiparas y primíparas respectivamente.

Resulta interesante señalar que en el ensayo 1 la interacción entre paridad y ciclicidad afectó los porcentajes de preñez. Se vio un mejor desempeño reproductivo de las vacas primíparas cuando estas se encontraban ciclando al comienzo del ensayo, mientras que en las vacas en anestro las múltiparas tuvieron un porcentaje de preñez numéricamente superior que las primíparas aunque la diferencia no fue significativa.

Comparación entre IATF e inseminación a celo visto

La metodología utilizada en el ensayo número 3 nos permite realizar la comparación entre los resultados de fertilidad obtenidos en las vacas inseminadas a celo visto y aquellas sometidas a IATF. De esta comparación surge que 25% de los animales fueron inseminados luego de ser detectados en celo y de este grupo se preñó un 25% comparado con un 30,4% de preñez obtenido a la IATF. Esto demuestra que en nuestras condiciones de producción (con bajas tasas de detección de celo) la inseminación a tiempo fijo muchas veces logra resultados de fertilidad iguales o superiores a los obtenidos con detección de celo.

Stevenson y Phatak (2005) reportan niveles de preñez mayores en vacas inseminadas luego de ser detectadas en celo en el marco de un protocolo Heatsynch (44,6 vs 21,6% para vacas inseminadas a celo visto y a tiempo fijo respectivamente); y la misma tendencia fue apreciada en el grupo asignado al protocolo Ovsynch (48,7 vs 24,4% para vacas inseminadas bajo detección de celo y a tiempo fijo respectivamente). Kasimanickam y col. (2005) observaron también mejores resultados de fertilidad en aquellos animales inseminados luego de ser detectados en celo utilizando tanto un protocolo Heatsynch como un Ovsynch. En el tratamiento Heatsynch los valores obtenidos por este autor son de 36 vs 15,5% para las vacas inseminadas bajo detección de celo e IATF respectivamente, y en el tratamiento Ovsynch se registraron porcentajes de preñez de 35,3 vs 21% para vacas inseminadas a celo visto y a tiempo fijo respectivamente. En contraposición con lo expresado por estos autores el trabajo realizado por Cerri y col. (2004) obtuvieron mejores resultados con IATF que con inseminación bajo detección de celo.

Como se expresó anteriormente, muchos autores han registrado mejores resultados de fertilidad en aquellas vacas inseminadas luego de la expresión del celo en comparación con las vacas inseminadas a tiempo fijo. Aún así, una de las grandes ventajas que tienen los protocolos de sincronización de la ovulación diseñados para ser aplicados con IATF es que alcanzan el 100% de sumisión. Este aspecto cobra especial importancia en sistemas con bajas tasas de detección de celo donde una parte importante de los animales no son

inseminados repercutiendo negativamente en desempeño reproductivo del rodeo, aumentando los días abiertos y bajando los porcentajes de preñez (Lucy, 2004).

Conclusiones

Se observó un desempeño reproductivo diferente de las vacas según su actividad ovárica y paridad en concordancia con lo expresado en la bibliografía. Concluimos que las vacas que ciclan con normalidad previamente al inicio de un programa de manejo reproductivo tienen mayor probabilidad de concebir, y que las vacas primíparas muestran una mejor respuesta a los protocolos de sincronización de la ovulación.

En las vacas en anestro la presentación inyectable logró elevar las concentraciones plasmáticas de P4 por encima de 1ng/mL a partir del quinto día mientras en el grupo DIV los niveles estuvieron por encima de 1 ng/mL a partir del día 1 y durante el resto del tiempo en el que se mantuvo insertado el dispositivo. Esto nos lleva a concluir que la liberación controlada mediante un dispositivo intravaginal resultó más efectiva que la administración inyectable en base oleosa a la hora de mantener niveles de P4 por encima de 1 ng/mL en vacas en anestro.

En lo referente a los porcentajes de preñez obtenidos no se observaron diferencias entre los dos tratamientos en ninguno de los 3 ensayos, lo que deja planteada la alternativa de sustituir los dispositivos intravaginales por una presentación inyectable de liberación lenta, de más fácil aplicación, que no genera residuos contaminantes y obtiene similares resultados en cuanto a fertilidad.

Bibliografía

1. Adams GP, Evans ACO, Rawling NC. (1994) Follicular waves and circulating gonadotrophin in 8- month-old prepuberal heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*; 100: 27- 33.
2. Arthur GH, Noakes DE, Pearson H. (2004) *Veterinary Reproduction and obstetrics*. 6 ed. Ed. Interamericana MC Graw-Hill. London. 868p
3. Aviles M, Cutaia L, Videla Dorna I, Aba M, Bo GA. (2003) Concentraciones plasmáticas de progesterona en vacas ovariectomizadas tratadas con dispositivos intravaginales formulados con diferentes dosis de progesterona. IV Simposio internacional de reproducción animal IRAC Córdoba Argentina
4. Bartolomé JA, Sozzi A, McHale J, Melendez P, Arteche ACM, Silvestre FT, Kelbert D, Swift K, Archbald LF, WW Thatcher. (2005) Resynchronization of ovulation and timed insemination in lacting dairy cows, II: assigning protocols according to stages of the estrous cycle, or presence of ovarian cysts, or anestrous. *Theriogenology*; 63: 1628-1643.
5. Bo GA, Martinez M, Nasser LF, Caccia M, Tribulo H, Mapletoft RJ. (1993) Follicular dynamics in Bos-indicus and Bos-Taurus beef cattle under pasture conditions in Argentina. *Proceedings of the 10 congreso Brasileiro de Reproducao Animal, Belo Horizonte*; 2: 221.
6. Bo GA, Adams GP, Pearson RA, Mapletoft RJ. (1995) Exogenous control of follicular waves emergence in cattle. *Theriogenology*; 43: 31-40.
7. Brown JG, Peterson DW, Foote WD. (1972) Reproductive response of beef cows to exogenous progestogen, estrogen and gonadotropins at various stages postpartum. *Journal of Animal Science*; 35: 362–369.
8. Burke CR, Day ML, Bunt CR, Macmillan KL. (2000) Use of a small dose of estradiol benzoate during diestrus to synchronize development of the ovulatory follicle in cattle. *Journal of Animal Science*; 78: 145-151.

9. Callejas S. (2004) Control farmacológico del ciclo estral bovino: Bases fisiológicas, protocolos y resultados. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar. Fecha de consulta: 20/2/2011.
10. Cavalieri J, Hepworth G, Fitzpatrick LA, Shephard RW, Macmillan KL (2006) Manipulation and control of the estrous cycle in pasture-based dairy cows *Theriogenology*; 65: 45-64.
11. Cavestany, D. (2000) Manejo reproductivo en vacas lecheras. Serie Técnica 115. INIA La Estanzuela, Uruguay, p. 27
12. Cavestany, D. (2002) Sincronización y/o inducción de celos con o sin inseminación artificial a tiempo fijo en rodeos de Uruguay. XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay, p. 143-163.
13. 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. XXXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay, p. 218-219.
14. Cavestany D, Martinz Barbitta M (2010) Perfiles hormonales en protocolos de sincronización de celos con diferentes fuentes de progesterona y estradiol en vacas Holando en pastoreo. INIA, Serie de Actividades de Difusión N° 610, p. 27
15. Cerri R.L, Santos J.E, Juchem O.L, Galvao K.N, and. Chebel R. C. (2004) Timed Artificial Insemination with Estradiol Cypionate or Insemination at Estrus in High-Producing Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*; 87: 3704–3715.
16. Chebel, R, Al-Hassan, M, Fricke, P, Santos, E, Lima, J, Martel, C, Stevenson, J, García, R. (2010) Supplementation of progesterone via controlled internal drug release inserts during ovulation synchronization protocols in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*; 93: 922-931.
17. Cutaia, L., Caccia, M. y Bo, GA (2007) Dinámica folicular ovárica en el ganado bovino: implicancias prácticas en programas de sincronización de celos. XXXV Jornadas Uruguayas de Buiatría Paysandú Uruguay. Disponible en http://www.buiatriapaysandu.org/images/buiatrias/publicacion_2007/Ciclo%20e

stral%20hembra%20bovina%20 Dr.%20Cutaia .pdf. Fecha de consulta: 17 de mayo 2011.

18. Darwash AO, Lamming GE, and Royal MD. (2001) A protocol for initiating oestrus and ovulation early post partum in dairy cows. *Journal of Animal Science*; 72: 539–546.
19. de Nava G.T, Rodríguez Sabarrós M, Romero D, Rodríguez Galluzzo J y Gil A. (2010) Resultados de cuatro años de aplicación de un programa de inseminación a tiempo fijo en vacas lecheras coincidente con el primer día de la estación reproductiva invernal. *Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú*; 38: 106-107
20. Edmonson, Lean, Weaver, Farver, Webster, (1989) A body condition scoring chart for Holstein dairy cow. *Journal of Dairy Science*; 72:68-78.
21. El-Zarkouny SZ, Cartmill JA, Hensley BA and Stevenson JS. (2004) Pregnancy in dairy cows after synchronized ovulation regimens with or without presynchronization and progesterone. *Journal of Dairy Science*; 87: 1024-1037
22. Evans ACO, Adams GP, Rawlings NC. (1994a) Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepuberal heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*; 100: 187-194.
23. Evans AOC, Adams GP, Rawlings NC. (1994b) Follicular and hormonal development in prepuberal heifers from 2 to 36 weeks of age. *Journal of Reproduction and Fertility*; 102: 463-470
24. Fernández, Salazar. (2007) Determinación de niveles de progesterona en sangre luego de la administración parenteral de progesterona y evaluación de diferentes protocolos de sincronización de celos en vaquillonas de la raza Holando. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay, 37p.
25. Figueredo RA, Barros CM, Pinheiro OL, Soler JMP. (1997) Ovarian follicular dynamics in Nellore breed (*Bos-Indicus*) cattle. *Theriogenology* 47: 1489-1505.
26. Fike KE, Day ML, Inskeep EK, Kinder JE, Short RE, Hafs HD. (1997) Estrus and luteal function in suckled beef cows that were anestrous when treated with an

- intravaginal device containing progesterone with or without a subsequent injection of estradiol benzoate. *Journal of Animal Science*; 75: 2009–2015
27. Flint APF, Sheldrick EL, (1986) Ovarian oxytocin and the maternal recognition of the pregnancy. *Journal of Reproduction and fertility*; 76: 831- 839.
 28. Flint APF, Sheldrick EL, McCann TJ, Jones DCS, (1990) Luteal oxytocin: characteristics and control of synchronous episodes of oxytocin and PGF₂ α secretion at luteolysis in ruminants. *Domestic Animal Endocrinology*; 7: 111-124.
 29. Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP. (1989) Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biology of Reproduction*; 41: 247-254.
 30. Ginther OJ, Kot k, Kulick LJ, Matrin S, Wiltbank MC. (1996) Relationship between FSH and ovarian follicular waves during the last six month of pregnancy in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 108: 271-279.
 31. Ginther OJ. (2000) Selection of the dominant follicle in cattle and horse. *Animal Reproduction Science* 60-61: 61-79.
 32. Ginther, O.J., Beg, M.A., Bergfelt, D.R., Donadeu, F.X. and Kot, K. 2001. Follicle selection in monovular species. *Biology of Reproduction*; 65: 638-647.
 33. Goding JR. (1974) Demonstration that PGF₂ α is the uterine luteolysin in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*; 38: 261-271.
 34. Hafez y Hafez B. (2000) *Reproduction in farm animals*. 7a ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA. 509 pp.
 35. Hooper SB, Walkings WB, Thorburn GD. (1986) Oxytocin, oxytocin associated neurophisin, and prostaglandin F₂ α concentrations in the utero-ovarian vein of pregnant and non pregnant sheep. *Endocrinology*; 119: 2590-2597.
 36. Hunter MG. (1991) Characteristics and causes of the inadequate corpus Luteum. *Journal of Reproduction and Fertility*. 43: 91-99.
 37. Kasimanickam R, Cornwell JM, Nebel LR, (2005) Fertility following fixed time AI or insemination at observed estrus in Ovsynch and Heatsynch programs in lactating dairy cows. *Theriogenology*; 63: 2550-2559.
 38. Kawamura K y Kikuyama S. (1994) Evidence that hypophysis and hypothalamus constitute a single entity from the primary stage of histogenesis. *Development*. 115: 1- 9.

39. Kyle SD, Callahan C J, Allrich RD. (1992) Effect of progesterone on the expression of estrus at the first postpartum ovulation in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*; 75: 1456–1460.
40. Lima JR, Rivera FA, Narciso CD, Oliveira R, Chebel RC, Santos JE (2009) Effect of increasing amounts of supplemental progesterone in a timed artificial insemination protocol on fertility of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*; 92: 5436-546.
41. Lucy, M.C. (2001) Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *Journal of Dairy Science*; 84: 1277-1293.
42. Lucy. (2004) Tratamientos para sincronización de celo en vacas de tambo en lactación en sistemas de pastoreo o de feedlot. *Animal Reproduction Science*; 82-83: 495-512
43. Macmillan. (2010) Review: Recent advances in the synchronization of estrus and ovulation in dairy cows. *Journal of Reproduction Development*; 56 Suppl.: S 42-47.
44. McDougall S, (2001) Reproductive performance of anovulatory anoestrus postpartum dairy cows following treatment with two progesterone and oestradiol benzoate-based protocols, with or without resynchrony. *New Zealand Veterinary Journal*; 49: 187-194.
45. McDougall S, (2003) Resynchrony of previously anoestrous cows and treatment of cows not detected in oestrus that had a palpable corpus luteum with prostaglandin F₂α. *New Zealand Veterinary Journal*; 51: 117-124
46. McDougall S, Loeffler SH (2004) Resynchrony of postpartum dairy cows previously treated for anestrous. *Theriogenology*; 61: 239-253.
47. Miksch ED, LeFever DG. Mukembo G, Spitzer JC, and Wiltbank JN. (1978) Synchronization of estrus in beef cattle II. Effect of an injection of norgestomet and an estrogen in conjunction with a norgestomet implant in heifers and cows. *Theriogenology*; 10: 201–210.
48. Moreira F, de la Sota RL, Díaz T, Thatcher WW. (2000) Effect of day of the estrus cycle at the initiation of timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. *Journal of Animal Science*; 78: 1568-1576.

49. Murugavel K, Yántiz JL, Santolaria P, López-Béjar M, López-Gatius F. (2003) Luteal activity at the onset of a timed insemination protocol affects reproductive outcome in early postpartum dairy cows. *Theriogenology*; 60: 583-593.
50. Murphy MG, Boland MP, Roche JF. (1990) Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in postpartum beef suckled cows. *Journal of Reproduction and Fertility*; 90 :523–533.
51. Murphy MG, Enright WJ, Crowe MA, McConnell K, Boland MP, Roche JF. (1991) Effect of dietary intake of pattern of growth of dominant follicles during the estrus cycle in beef heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 92: 333-338.
52. Nation DP, Burke CR, Parton G, Stevenson R and Macmillan KL. (2000) Hormonal and ovarian responses to a 5-day progesterone treatment in anoestrous dairy cows in the third week postpartum. *Animal Reproduction Science*. 63: 13–25.
53. Navanukraw C, Redmer DA, Reynolds LP, Kirsch JD, Grazul-Bilska AT, Fricke PM (2004) A modified presynchronization protocol improves fertility to timed artificial insemination in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*; 87: 1551-1557.
54. Pancarci SM, Jordan ER, Risco CA, Schouten MJ, Lopes FL, Moreira F, Thatcher WW (2002) Use of estradiol cypionate in a presynchronized timed artificial insemination program for lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*; 85: 122-131.
55. Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. (1995) Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF 2 Alfa and GnRH. *Theriogenology*; 44: 915-923.
56. Pursley JR, Kosork MR, Wiltbank MC. (1997) Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *Journal of Dairy Science*; 80: 301-306.
57. Rhodes JM, Death G, Entwistle KP. (1995) Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. *Animal Reproduction Science* 38: 265-277.

58. Rhodes FM, McDougall S, Verkerk GA, Xu ZZ, and Cullum A. (2000) Treatment of the non-cycling cow. Proc. Soc. of Dairy Cattle Vets of the N.Z. Vet. Assoc. 17:125–134.
59. Rhodes FM, McDougall S, Burke CR, Verkerk GA, Macmillan KL (2003) Invited review: Treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. Journal of Dairy Science; 86:1876-1894.
60. Rivera H, Lopez H, and 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. Journal of Dairy Science; 88: 957-968.
- 61.
62. Saiduddin S, Quevedo MM, and Foote WD (1968) Response of beef cows to exogenous progesterone hormone and estradiol at various stages postpartum. J. Anim. Sci. 27:1015–1020.
63. Santos JE, Rutigliano HM, Sá Filho MF (2009) Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. Animal Reproduction Science.; 110 :207-21.
64. Savio JD, Boland MP, Hynes N, and Roche JF (1990) Resumption of follicular activity in the early postpartum period of dairy cows. Journal of Reproduction and Fertility. 88:569–579.
65. Savio JD, Boland MP, Roche JF. (1990b) Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in postpartum dairy cows. Journal of Reproduction and Fertility 88: 581-591.
66. Schams, D., Berisha, B., Kosmann, M. and Amselgruber, V.M. (2002) Expression and localization of IGF family members in bovine antral follicles during final growth and in luteal tissue during different stages of estrous cycle and pregnancy. Domestic Animal Endocrinology 22: 51-72.
67. Senger, P.L (2003) Regulation of reproduction: Nerves, Hormones and Target Tissues. En Senger, P.L Pathways to Pregnancy and Parturition. 2^a ed. Washington. Current Conceptions, pp 102-127.

68. 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 alpha. *Journal of Dairy Science*; 82:506-515.
69. Stevenson JS, Phatak AP (2005) Inseminations at estrus induced by presynchronization before application of synchronized estrus and ovulation. *Journal of Dairy Science*; 88:399-405.
70. Stevenson JS, Pursley JR, Garverick HA, Fricke PM, Kesler DJ, Ottobre JS, Wiltbank MC (2006) Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during Ovsynch. *Journal of Dairy Science*; 89:2567-2578.
71. Stevenson, J, Tiffany, S, Lucy, M. (2004) Use of Estradiol Cypionate as a Substitute for GnRH in protocols for Synchronization Ovulation in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science* 87: 3298-3305.
72. Taponen J, Rodriguez-Martinez H, Katila T (2000) Administration of GnRH during metaestrous in cattle: influence of luteal function and cycle length. *Animal Reproduction Science*; 64:161-169.
73. Tenhagen BA, Surholt R, Wittke M, Vogel C, Drillich M, Heuwieser W (2004) Use of Ovsynch in dairy herds-differences between primiparous and multiparous cows. *Animal Reproduction Science*; 81:1-11.
74. Thatcher WW, Patterson MS, Moreira F, Pancarci M, Jordan ER, Risco CA. (2001) Current Concepts for Estrus Synchronization Timed Insemination. *American Association of Bovine Practitioners. Proc. 34th Annual Convention.* pp 95 -105.
75. Thatcher WW, Moreira F, Pancarci SM, Bartolome JA, Santos JE (2002) Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. *Domestic Animal Endocrinology*; 23:243-254.
76. Ungerfeld, R. (2002) *Reproducción en los animales domésticos.* Montevideo. Melibea. 584 p.
77. Vasconcelos JLM, Silcox RW, Rosa GJ, Pursley JR, Wiltbank MC. (1999) Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after

synchronization of ovulation beginning on different days of estrus cycle. *Theriogenology*; 52:1067-1078.

78. Wiltbank, MC (1998) Improving reproductive efficiency in high producing dairy cattle. *Cattle Practice*. Vol 6 (4), p 261- 273.
79. Xu, ZZ, Burton LJ, McDougall S, and. Jolly PD (2000) Treatment of noncyclic lactating dairy cows with progesterone and estradiol or with progesterone, GnRH, prostaglandin F₂ α and estradiol. *Journal of Dairy Science*. 83:464–470.
80. Yamada K (2005) JSAR Innovative Technology Award. Development of ovulation synchronization and fixed time artificial insemination in dairy cows. *Journal of Reproduction Development*; 51:177-186.
81. Zarco L, Stabenfeldt GH, Bosu S, Bradford GE, Kindahl H. (1988) Modification of PGF₂ α synthesis and release in the ewe during the initial establishment of pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility* 83: 527-536.
82. Zeitoun MM, Rodriguez HF, Randel RD. (1996) Effect of season on ovarian follicular dynamics in Brahman cows. *Theriogenology* 45: 1577-1581.