

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**TRATAMIENTO CORTO DE 6 DÍAS (J-SYNCH) PARA IATF EN
VAQUILLONAS DE CARNE: EFECTO SOBRE EL FOLÍCULO OVULATORIO
Y EL CUERPO LÚTEO**

por

Romina ARTAGAVEYTIA

Camila BROCHADO

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

Modalidad: Ensayo experimental
Orientación: PRODUCCIÓN ANIMAL

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2016**

1. PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de Mesa:

.....

Segundo Miembro:

.....

Alejo Menchaca

Tercer Miembro:

.....

Fecha:

Autores:

.....

Romina Artagaveytia.

.....

Camila Brochado.

2. AGRADECIMIENTOS

A nuestro tutor, Dr. Alejo Menchaca por habernos brindado la oportunidad de trabajar en este experimento y por el conocimiento transmitido.

A nuestro co-tutor Dr. Richard Núñez por todo el apoyo, ayuda y paciencia en este proceso.

A todo el personal del Instituto de Reproducción Animal Uruguay (IRAUy)

A nuestra casa de estudios Facultad de Veterinaria UdelaR.

A nuestras familias y amigos por acompañarnos en este trayecto.

A Dr. Javier de la Mata, Dr. Guido Kuffo, Dr. Federico Cuadro y José Luis Alvarez que nos acompañaron y ayudaron durante el trabajo experimental

A todo el personal de la estancia "San Sebastián", especialmente a Sandra.

Tabla de contenido

1. PÁGINA DE APROBACIÓN	2
2. AGRADECIMIENTOS.....	3
3. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	5
4. RESUMEN.....	6
5. SUMMARY	7
6. INTRODUCCIÓN	8
7. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
8. HIPOTESIS	16
9. OBJETIVOS.....	16
10. MATERIALES Y MÉTODOS	16
11. RESULTADOS	19
12. DISCUSIÓN	21
13. CONCLUSIONES.....	23
14. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	24

3. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS:

<u>Tabla 1.</u> Respuesta ovárica (Media \pm E.E.) en vaquillonas cíclicas sometidas al protocolo J-Synch o al tratamiento Convencional	19
--	----

FIGURAS:

<u>Figura 1.</u> Diseño experimental	18
<u>Figura 2.</u> Variación del diámetro del folículo dominante (mm) en función de las horas post retiro del DIB para el grupo Control vs J-Synch	20
<u>Figura 3.</u> Concentraciones de progesterona (ng/ml) en función de los días post-ovulación para el grupo Control vs J-Synch	20
<u>Figura 4.</u> Concentraciones de progesterona (ng/ml) en función de los días post-ovulación para el grupo Control vs J-Synch	21

4. RESUMEN

El objetivo de esta Tesis fue determinar el efecto de un tratamiento para prolongar el proestro sobre la actividad ovárica antes y después de la ovulación. Para cumplir este objetivo se realizó un experimento en vaquillonas *Bos taurus* de razas de carne donde se evaluaron dos tratamientos para inseminación artificial a tiempo fijo (IATF). Un grupo recibió un tratamiento convencional con aplicación de estrógenos y un dispositivo de progesterona por 7 días y otro grupo recibió un nuevo tratamiento denominado J-Synch, también a base de estrógenos y progesterona, pero reduciendo la duración del tratamiento con el dispositivo a 6 días y sustituyendo el cipionato de estradiol al retiro por GnRH a las 72 h luego del retiro del dispositivo. Esta modificación permitiría aumentar la duración del proestro definido como el intervalo entre que cae la progesterona y se induce la ovulación. Se utilizaron hembras cíclicas donde todas recibieron un dispositivo intravaginal con 0,5 g de progesterona asociado a una dosis de 2 mg de benzoato de estradiol al momento de colocar el dispositivo. Al retirar el dispositivo se administró una dosis luteolítica de 500 µg de D (+)cloprostenol. En el grupo convencional se utilizó el dispositivo de progesterona por 7 días administrando 0,5 mg de cipionato de estradiol como inductor de la ovulación al momento de retirar el dispositivo. En el grupo J-Synch se utilizó el dispositivo intravaginal de progesterona por 6 días y a las 72 horas de retirado el dispositivo se administró una dosis de 100 µg de acetato de gonadorelina (GnRH) im. Las estructuras ováricas de ambos grupos fueron monitoreadas mediante ultrasonografía cada 12 horas desde el retiro del dispositivo con progesterona hasta la ovulación y luego cada 24 horas durante los 23 días posteriores. Se tomaron muestras de sangre diariamente a cada hembra desde el día del retiro del dispositivo con progesterona hasta 25 días luego de la ovulación. Se comprobó que con el tratamiento J-Synch se logra un proestro más largo con respecto al convencional, con una diferencia de aproximadamente 28 h ($93,7 \pm 12,9$ h vs. $65,0 \pm 13,7$; $P < 0,05$). No se encontraron diferencias entre grupos en el diámetro del folículo ovulatorio y tasa de ovulación. La tasa de crecimiento folicular tendió a ser mayor en el grupo J-Synch ($P < 0,1$) y el tamaño del cuerpo lúteo fue mayor que el grupo Convencional ($P < 0,05$). Las concentraciones séricas de progesterona durante los 12 días luego de la ovulación también fueron mayores ($P < 0,05$) en las vaquillonas que recibieron el tratamiento J-Synch. En conclusión, el tratamiento J-Synch produce un proestro más prolongado que el tratamiento convencional de 7 días, generando un cuerpo lúteo de mayor tamaño y mayor producción de progesterona en la fase luteal subsiguiente.

5. SUMMARY

The aim of the present thesis is to determine the effect of a treatment intended to prolong proestrus on the ovarian activity before and after the ovulation. To accomplish this, an experiment was carried out on beef breeds *Bos taurus* heifers, where the two protocols of fixed-time artificial insemination treatments were evaluated. One group was subjected to a conventional treatment, based on estrogen and the use of a progesterone-releasing device for 7 days. The other group was subjected to a new treatment, J-Synch, also based on estrogen and progesterone, but the use of the device was reduced to a 6-day-treatment and the dose of estradiol cypionate was replaced with GnRH, 72 hours after the removal of the device. This modification would increase the duration of the proestrus, defined as the interval between the drop of the progesterone levels and the induction of the ovulation. Only cycling heifers were part of the study, all of which received an intravaginal progesterone device of 0.5 g associated with 2 mg of estradiol benzoate at the time the device was placed. A luteolytic dose of 500 µg of D(+)cloprostenol was administered following removal of the device. In the conventional group, the progesterone device was used for 7 days associated with a dose of 0.5 mg of estradiol cypionate as an ovulation inducer following removal of the device. In the J-Synch group, the progesterone device was used for 6 days. 72 hours after removal of the device an injectable dose of 100 µg of gonadorelin acetate (GnRH) was administered. The ovarian structures of both groups of heifers were monitored by ultrasound examination every 12 hours after removing the device until the ovulation of all heifers, and after the ovulation every 24 hours for 23 days. Blood samples were taken from every female daily since removal of the device for 25 days after the ovulation. It was found that the J-Synch treatment succeeds in extending proestrus in comparison to the conventional treatment, with a difference of approximately 28 h (93.7 ± 12.9 h vs. 65.0 ± 13.7 P <0.05). No differences were found between groups with regard to the follicular ovulatory diameter and ovulation rate. In the J-Synch group follicular growth rate tended to be superior (P <0, 1) and the size of corpus luteum after ovulation was greater than in the conventional group (P <0, 5). Progesterone serum concentration during the 12 days after ovulation was also higher (P <0, 05) in heifers that received J-Synch treatment. It was concluded that the J-Synch Protocol obtains a longer proestrus length than the 7-day-conventional treatment, generating a larger corpus luteum and therefore greater progesterone production in the next luteal phase.

6. INTRODUCCIÓN

Uruguay es un país mayormente ganadero, con una superficie agropecuaria total de 16.227.088 de hectáreas conformadas por establecimientos criadores, de ciclo completo y engorde o terminación (MGAP, 2011). Solamente los predios criadores constituyen el 53% de todos los establecimientos ganaderos y abarcan más de la mitad de toda el área ganadera nacional. Sin embargo, el índice de procreo promedio de Uruguay durante las últimas décadas se situó en el 63,7%, con un rango de 59,2% a 68,0% (DIEA, 2013). Esto muestra claramente que un incremento en la eficiencia reproductiva tendrá un fuerte impacto en el sector ganadero y en la economía del país. Para la optimización de estos índices se pueden aplicar una serie de tecnologías reproductivas, estas se definen como cualquier práctica, método, técnica o herramienta que impacta en el potencial reproductivo del rodeo (McMillan, 1994). Estas biotecnologías han tenido un importante desarrollo en los últimos años, siendo probablemente las más utilizadas la sincronización del estro e inseminación artificial, ya que se caracterizan por ser de fácil aplicación y no requerir un alto costo. La sincronización de la ovulación y la inseminación artificial, han sido reconocidas como las tecnologías “más poderosas y aplicables” para el mejoramiento genético de los rodeos de cría (Seidel, 1995). La inseminación artificial comenzó a ser utilizada en la década del 50 en EEUU y actualmente es una de las tecnologías más utilizadas en el mundo para el avance genético de los rodeos de cría. Por su parte, la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) es una tecnología reproductiva que consiste en sincronizar la ovulación y poder inseminar sin la necesidad de detección del estro, induciendo además la ciclicidad en vacas en anestro al utilizar herramientas farmacológicas. La utilización estratégica de la sincronización y/o inducción de la ovulación asociado a la IATF es un método muy eficaz también para concentrar anticipadamente los partos y aumentar los kilos de terneros destetados por las distintas categorías, independiente del mejoramiento en el genotipo de los terneros (de Nava y col., 2015). Teniendo en cuenta los sistemas productivos actuales con base pastoril y razas *Bos taurus* como base genética, uno de los factores limitantes para la eficiencia reproductiva es el balance metabólico negativo en el que entra la vaca luego del parto que la conduce a un anestro posparto prolongado (de Nava y col., 2012). Este es uno de los principales motivos necesarios para el diseño de estrategias que permitan inducir la ovulación y favorecer el mantenimiento de la gestación. Dentro de las alternativas más novedosas e interesantes se encuentra la de favorecer el desarrollo del folículo preovulatorio mediante la prolongación del intervalo entre la caída de la progesterona y la ovulación. Este intervalo es llamado “proestro” y los tratamientos son conocidos como “Tratamientos de proestro prolongado” (Bó y col., 2016). Recientemente esta estrategia ha sido propuesta y abordada por el grupo de investigadores con quienes se desarrolló esta tesis, y los experimentos realizados formaron parte de la tesis de Maestría de Javier de la Mata (de la Mata, 2016).

7. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Fisiología reproductiva de la vaca

La hembra bovina es considerada como poliéstrica anual y su ciclo estral dura entre 17 y 23 días. El estro tiene una duración de 6 a 18 horas y la ovulación ocurre entre las 24 y 30 horas de iniciado el estro. Luego de la ovulación le sigue la fase luteal donde se desarrolla el cuerpo lúteo y la concentración plasmática de progesterona aumenta. Si no hay gestación la luteólisis ocurre entre los días 16 a 20 del ciclo. Estos acontecimientos están regulados por una serie de hormonas, que pueden ser secretadas en el hipotálamo, hipófisis, ovarios y útero, esto es conocido como eje hipotalámico-hipofisario-gonadal-uterino (Senger, 2003). Una hormona actúa como un mensajero químico y el tipo de respuesta va a depender de su concentración y el patrón de secreción (Bó y col., 2006). La hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) tiene un rol de importancia en la regulación de la ciclicidad de la hembra (Silverman y col., 1994), siendo un decapeptido sintetizado en los núcleos secretores de neuronas hipotalámicas y liberada al sistema porta hipotálamo-hipofisario, por donde llega a la adenohipófisis para estimular la secreción de hormonas hipofisarias (Page, 1994). La actividad hipotalámica provoca pulsos de GnRH, esos pulsos estimulan la síntesis y liberación, también en forma pulsátil, de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona folículo estimulante (FSH) por parte de las células gonadotropas de la adenohipófisis (Senger, 2003). La FSH actúa estimulando el crecimiento de folículos ováricos antrales y participa junto con la LH, estimulando la síntesis de estradiol en los folículos en desarrollo. Es liberada en mayor cantidad antes del comienzo de cada onda folicular. Sus receptores se ubican en las células de la granulosa del folículo y la unión de la hormona a dichos receptores produce estradiol e inhibina (Ireland, 1987). Los receptores de la LH están ubicados en las células de la teca interna y al unirse con ésta estimula la secreción de andrógenos que pasan a través de la membrana basal a las células de la granulosa donde, por la inducción de FSH, se aromatizan a estrógenos que son liberados al antro folicular y de allí a la circulación general (Ireland, 1987). La frecuencia de los pulsos de LH cambia según el estadio del ciclo estral. Durante la fase luteal, los pulsos de la LH son de baja frecuencia, mientras que en la fase folicular aumenta la frecuencia de pulsos hasta producir un pico preovulatorio de LH desencadenando así la ovulación. Es considerada la principal sustancia luteotrópica en el organismo (Stock y Fortune, 1993).

El principal estrógeno que se secreta en el ovario es el estradiol-17 β . Los estrógenos presentan variadas funciones fisiológicas entre las que se destacan: inducir el comportamiento del estro en la hembra en el sistema nervioso central, producen aumento de la masa del endometrio y del miometrio en el útero, y actúan aumentando la actividad y frecuencia de las contracciones mediante la potencialización de los efectos de oxitocina y de la prostaglandina (Bó y col. 2006). Los estrógenos ejercen además, efectos de retroalimentación negativa o positiva en el control de la liberación de LH o FSH, a partir del eje hipotalámico-hipofisario. Este efecto está íntimamente correlacionado con las concentraciones de progesterona circulante. Durante la fase luteal, es decir cuando hay un cuerpo lúteo (CL) funcional, el efecto del estrógeno sobre las gonadotrofinas es negativo. En cambio, en la fase folicular, al no haber concentraciones altas de progesterona en sangre, tiene efecto de retroalimentación positiva e induce la liberación de LH y FSH (Senger, 2003).

La progesterona es considerada la hormona de la preñez, es secretada por las células del CL, la placenta y las glándulas adrenales (Bó y col., 2006). Tiene como función preparar al útero para recibir al embrión, mantener la gestación mediante el aumento de glándulas secretoras del endometrio y la inhibición de su motilidad (Senger, 2003).

También estimula el comportamiento del estro actuando en forma sinérgica con los estrógenos. Concentraciones elevadas de la misma inhiben el estro y el pico ovulatorio de LH (Bó y col., 2006).

Las prostaglandinas actúan en el sitio donde son producidas, por eso se concluye que no se localizan en ningún tejido en particular. También pueden ser transportadas en la sangre para actuar en un tejido blanco lejos del tejido de producción. Las concentraciones de prostaglandina F2 alpha (PGF2 α) se elevan en ciertas condiciones como el parto, estimulando la dilatación de cérvix y contracción del útero. Esta hormona tiene propiedades luteolíticas y posee un mecanismo de contracorriente por el cual llega desde el endometrio del útero al ovario (Bó y col., 2006). Las hormonas mencionadas forman un conjunto de mensajeros químicos que tienen como rol principal la regulación del ciclo estral, sus diferentes fases y variaciones.

Descripción del ciclo estral

El período comprendido entre dos estros consecutivos define el ciclo estral, en el cuál ocurre una serie de eventos que se repiten continuamente. La ciclicidad se inicia en la pubertad y se prolonga durante toda la vida, pudiéndose observar interrupciones de los ciclos (anestros) por causas fisiológicas o patológicas (Ungerfeld, 2002). La hembra bovina es poliéstrica no estacional, los ciclos se repiten sucesivamente cuando no está gestada durante todo el año. Tiene una duración aproximada de 21 días y puede dividirse en diferentes fases para facilitar su estudio:

- Fase folicular
- Fase periovulatoria
- Fase luteal

La fase folicular se extiende desde la regresión del cuerpo lúteo (CL) hasta la ovulación. Al lisarse el cuerpo lúteo cae abruptamente la concentración de progesterona. Paralelamente a esta caída de la progesterona aumenta la frecuencia de pulsos de LH. Esto ocurre porque al descender las concentraciones de progesterona se elimina la retroalimentación negativa sobre el hipotálamo, desinhibiendo la liberación de GnRH y consecuentemente la síntesis de gonadotrofinas. La caída de la progesterona también determina una retroalimentación positiva GnRH – LH. Esto significa que a cada pulso de GnRH la hipófisis responde con un pulso de LH. Éste aumento en la frecuencia de los pulsos estimula el desarrollo de un folículo dominante y debido a la retroalimentación positiva LH-estrógeno que ocurre al caer las concentraciones de progesterona, dicho folículo responde a los pulsos de LH secretando concentraciones crecientes de estradiol. El estradiol actúa estimulando la secreción de GnRH a nivel hipotalámico causando un aumento de la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH mediante el aumento de los receptores hipofisarios a la hormona (Reeves y col., 1971), por lo que aumenta la secreción de LH. Este mecanismo concluye en una descarga masiva de LH que constituye el pico preovulatorio (Walters y col., 1984).

La fase periovulatoria comienza con el inicio de la manifestación del estro, onda preovulatoria de gonadotrofinas y se produce la ovulación. El intervalo entre el inicio de la luteólisis y el comienzo del estro es de 58-60 h aproximadamente. Las concentraciones de estradiol alcanzan sus máximos valores el día previo al inicio del estro, ésta elevación es la causante del comportamiento de estro y el pico de LH (Bó y col., 2006). El estro posee una duración de 18 \pm 6 h, la vaca manifiesta inquietud, ansiedad, pérdida de apetito, presenta descarga de mucus filante y edema de vulva. En el útero se produce un aumento del tono miometrial. A las 12 a 24 h de comenzado

el estro, el sistema nervioso de la vaca se torna refractario al estradiol dando fin a todas las manifestaciones del mismo (Mihm y col., 2006). El período que transcurre desde la luteólisis hasta la manifestación del estro se denomina proestro (Rippe, 2009) aunque en nuestra tesis este término ha sido utilizado para definir el intervalo entre la caída de progesterona y la ovulación (Bó y col., 2016). Inmediatamente luego de la finalización del estro, ocurre el metaestro. La ovulación ocurre entre 24 a 30 h de iniciadas las descargas preovulatorias de LH y FSH (Bó y col., 2006). La descarga preovulatoria de LH ocurre al comienzo del estro y se cree que podría causar la ovulación, coincidiendo con un pico de FSH, luteinización de las células de la teca y granulosa. La FSH tiene su secreción disminuida, consecuencia del *feed back* negativo del estrogéno y de la inhibina del folículo dominante pero se produce una excepción durante el pico de LH. La PGF2 α también interviene en la ovulación junto con otros mediadores de la inflamación, estimulando las contracciones ováricas que producen la rotura del folículo y la expulsión de ovocito. A la ovulación le sigue una hemorragia profunda y el folículo se llena de sangre convirtiéndose en cuerpo hemorrágico. En las horas siguientes a la descarga de LH preovulatoria no se detectan pulsos de la hormona; sin embargo, la secreción de FSH continúa y se incrementan la concentración basal y la amplitud de los pulsos de FSH, relacionándose esto con la primera onda de crecimiento folicular.

La fase luteal comienza con el pico de LH que determinará la formación de un CL. Inmediatamente antes de la ovulación ocurren cambios en el folículo que determinan que las células de la granulosa pierdan su capacidad de secretar estrógeno y comiencen a producir y liberar progesterona (Hansel y Fortune, 1978). Esto ocurre porque al producirse el pico de LH desaparece el factor inhibidor de la luteinización y comienza a producirse el tejido luteal. Las células de la granulosa se convierten en células luteales grandes (> 15 μ m) y las de la teca en células luteales chicas (< 15 μ m). Las células grandes van a producir progesterona independientemente de LH y van a tener receptores para prostaglandinas, por otro lado, las células luteales chicas dependen de la LH por lo que su producción de progesterona es menor. El cuerpo lúteo madura después del día 5-6 aproximadamente, adquiriendo la capacidad de producir PGF intraluteal.

La progesterona inhibe la síntesis de receptores hormonales para sí misma, para los estrógenos y para la oxitocina a nivel uterino (McCracken y col., 1999; Hunter, 1991;). El estradiol proveniente del folículo dominante interactúa con sus receptores endometriales e induce la síntesis de receptores de oxitocina. La oxitocina hipofisaria circulante se une a esos receptores y activa la fosfolipasa A lo que llevará a la producción de PGF2 α uterina. La PGF2 α al llegar al ovario estimula la liberación de oxitocina por parte del CL, la cual establece un *feedback* positivo con las PGF2 α endometrial, causando la regresión del CL y la finalización de la fase luteal.

Las fases folicular, periovulatoria y luteal son acontecimientos continuos y ordenados que conforman el ciclo estral bovino, durante el cual surgen ondas de desarrollo folicular en ambos ovarios.

Dinámica folicular

Durante el ciclo estral bovino los folículos se desarrollan y regresan en procesos ordenados llamados "ondas de desarrollo folicular", que son el desarrollo armónico y simultáneo de un pool de folículos antrales (terciarios), pasando por las fases de reclutamiento, selección y dominancia folicular (Bó y col., 2006). Esto ocurre al mismo tiempo en ambos ovarios. En los bovinos, durante un ciclo estral estándar se puede observar la presencia de dos o tres ondas foliculares por ciclo (Ginther y col., 1989a.,

Fortune, 1994; Martínez y col., 1999). La primera onda de desarrollo folicular ocurre luego de la ovulación y será anovulatoria, la segunda onda comenzará el Día 9 o 10 para los ciclos de 2 ondas y el Día 8 o 9 en los ciclos de 3 ondas. En los ciclos de 3 ondas la tercera onda emerge en el Día 15 o 16 (Ginther y col., 1989b).

La primera onda coincide con el inicio de la fase luteal, emerge el día 0 coincidiendo con la ovulación y el folículo dominante crece hasta el día 6 aproximadamente, le sigue una fase estática hasta el día 12, a partir del cual comienza la regresión (Ginther y col., 1989b). La emergencia de cada onda de desarrollo folicular es precedida por un aumento de la FSH, este ocurre 2 días antes del inicio de la onda y alcanza su pico máximo un día antes del mismo (Adams y col., 1992). Durante 2 o 3 días todos los folículos crecen pero uno de ellos es seleccionado y se convierte en folículo dominante, mientras que el resto de los folículos (subordinados) se vuelven atrésicos y regresan (Ginther y col., 1996). Esto se llama desviación y ocurre cuando las concentraciones de FSH caen por debajo de los valores necesarios para el desarrollo de los folículos subordinados (Ginther, 2000), eso está explicado por la producción de estradiol-17 β e inhibina por parte de los folículos en crecimiento, suprimiendo las concentraciones circulantes de FSH (Martin y col., 1991, Findlay y col., 1992; Ginther y col., 1996 Gibbons y col., 1997). El crecimiento del folículo dominante está relacionado con la síntesis de receptores de LH. Todos los folículos poseen receptores de LH en las células de la teca y de FSH en las células de la granulosa (Ireland y Roche, 1987); pero solo el folículo dominante adquiere receptores de LH en las células de la granulosa (Ginther y col., 1996). La LH estimula una mayor producción de estradiol que le permitirá al folículo dominante seguir creciendo independientemente de las concentraciones de FSH circulante, pasando a ser LH dependiente (Ginther y col., 2001). Durante la fase luteal debido a la presencia de concentraciones altas de progesterona, la frecuencia de los pulsos de LH disminuye, afectando las funciones metabólicas y regresando el folículo dominante (Stock y Fortune, 1993). La finalización de la secreción de estradiol e inhibina tiene como consecuencia el aumento de las concentraciones de FSH y un nuevo reclutamiento de los folículos de la siguiente onda folicular (Adams, 1998).

Control farmacológico del ciclo estral

El ciclo estral dura 21 días aproximadamente y la oportunidad de servicio muy pocas horas, por lo tanto, la eficiencia y precisión de la detección del estro ha sido un factor clave en el trabajo de inseminación artificial; es ineludible y rutinaria, dos veces al día, mientras dura la temporada de servicio. Esta ha sido, posiblemente, una de las mayores limitantes para la utilización masiva de la inseminación artificial (IA) en rodeos bovinos y ha afectado la difusión de una de las técnicas reproductivas de mayor impacto en la producción bovina (Cutaia y col., 2003).

Desde que se conocen las hormonas que participan en la reproducción, se ha pretendido intervenir, modificar o al menos controlar la actividad reproductiva. La modificación de los ciclos para que todas las hembras presenten estros en un período breve de tiempo pareciera la técnica complementaria ideal para solucionar las limitaciones de la IA. Al nivel de investigación, este objetivo ha estimulado el desarrollo de numerosas líneas de trabajo por más de tres décadas y en los últimos años están siendo incorporadas a nivel comercial con gran éxito (Bó y col., 2007; Menchaca y col., 2013; Bó y col., 2016). En la actualidad es posible realizar la IATF de todo un rodeo en un único día de inseminación, evitando por completo la detección del estro.

Sincronización del estro con prostaglandinas

La propiedad luteolítica de la PGF 2α la hace imprescindible en los tratamientos para sincronizar el ciclo estral en bovinos. Sabemos que tiene algunas limitaciones para utilizarla como hormona única porque sólo actuará en animales que se encuentren con un cuerpo lúteo funcional. Un cuerpo lúteo menor a 5 días es incapaz de responder a PGF 2α . Después de una sola dosis luteolítica de PGF 2α presentarán celo el 60 a 66 % de las hembras que se encuentren ciclando (Momont y Seguin, 1984). Si se administran dos dosis con un intervalo de 11 días, la segunda dosis encontrará a todas las vaquillonas con un cuerpo lúteo funcional y capaz de responder al efecto luteolítico de ésta hormona (Bó y col, 2006). No obstante, recientes trabajos indican que en vacas el intervalo de 14 días resulta en mayor cantidad de animales en estro. El grado de esta sincronía será mayor después de la segunda inyección con respecto a la primera, ello es debido a que hay menor dispersión en cuanto al estadio del ciclo entre las hembras. Sin embargo, no hay sincronía suficiente para la IA a tiempo fijo (Bó y col, 2006). El intervalo entre la administración de una dosis de PGF y la aparición del estro dependerá del estadio de desarrollo folicular al momento de iniciar el tratamiento. Si se encuentra presente en el ovario un folículo dominante en fase de crecimiento o estática temprana, ovulará el mismo folículo a los 3 o 4 días, si por el contrario se encuentra en fase estática tardía este se atresiará y ovulará un folículo de la onda siguiente entre los 5 a 7 días próximos. Para lograr una precisa sincronización sería necesario trabajar no sólo sobre la función del cuerpo lúteo sino también sobre la dinámica folicular (Bó y col., 2006).

Utilización de progesterona y estradiol

Para realizar un control efectivo del desarrollo folicular existen tratamientos hormonales que incluyen GnRH, o progestágenos más estradiol. Existen actualmente en el mercado diferentes dispositivos intravaginales con progesterona. Estos dispositivos son tal vez los que mayor difusión han tenido en los últimos años, tanto en Sudamérica como en Norteamérica. Desde que se crearon estos dispositivos se han desarrollado una gran cantidad de tratamientos. Los primeros tratamientos evaluados fueron los tratamientos de 14 a 21 días que resultaban en una buena sincronía del estro pero baja fertilidad, principalmente debido a la formación de los folículos persistentes. Para inducir la regresión luteal, se combinó a estos dispositivos con una cápsula que contiene 10 mg de benzoato de estradiol (EB) que se administraba en el momento de inserción del dispositivo. Posteriormente, con el aumento del conocimiento y el desarrollo de nuevos trabajos, se optó por recomendar la administración de PGF 2α en el momento de la remoción de los dispositivos y acortar los tratamientos a 7 u 8 días, con la administración de una dosis baja de EB en el momento de la inserción (Día 0; Bó y col., 1995). El tratamiento más utilizado en base a dispositivos de progesterona en Sudamérica consiste en la administración de 2 mg de EB al momento de inserción del dispositivo (Día 0), en el día 7 u 8 el dispositivo es removido y se administra PGF intramuscular, y 24 horas más tarde se administra 1 mg de EB (Bó y col. 2002b); la IATF es realizada entre 52 y 56 horas después de la remoción del dispositivo. El tratamiento fue simplificado por la sustitución de la segunda aplicación de EB 24 horas después de la remoción del dispositivo con 0.5 o 1 mg de cipionato de estradiol administrado al momento de la remoción del dispositivo, sin afectar los porcentajes de preñez (Colazo y col., 2003; Bó y col., 2013).

Tratamientos Cortos

Actualmente existe una amplia gama de tratamientos de IATF disponibles para ser utilizados tanto en rodeos de carne como para producción lechera (Colazo y col., 2009; Bó y col., 2016). Estos se dividen según el tipo de producción (carne o leche) y/o disponibilidad de la hormona utilizada para la sincronización de la ovulación. En producción lechera se utiliza mayormente los protocolos Co-Synch y Ov-Synch que se basan en la hormona GnRH y sus análogos asociados con prostaglandinas. Estos protocolos resultaron en mejores tasas de preñez con la inserción de un dispositivo de progesterona por 7 días (Martínez y col., 2002). De esta manera, el uso de dispositivos con progesterona es necesario en la mayoría de los tratamientos utilizados tanto en Sudamérica como en Norteamérica, asociados a estradiol o GnRH.

En los últimos años se ha avanzado con la estrategia de prolongar el proestro, o el intervalo entre la caída de progesterona y la ovulación. El fundamento para esta propuesta es que existe evidencia de que la tasa de preñez aumenta en la medida que aumenta la duración del proestro (Bridges y col., 2010). El primer tratamiento con este objetivo fue el Co-Synch de 5 días. En este tratamiento se administra GnRH, PGF2 α y el dispositivo de progesterona se mantiene durante 5 días con IATF+GnRH a las 72 horas de retirado el dispositivo (Bridges y col., 2008). Este tratamiento corto causa la prolongación del proestro y aumento de las concentraciones séricas de estradiol preovulatoria resultando en tasas de preñez superiores que el protocolo convencional de 7 días utilizado en EEUU (Bridges y col., 2008, 2010). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos en cuanto a tasa de ovulación y diámetro folicular (Bridges y col., 2014). Recientemente se desarrolló un nuevo tratamiento basado en el uso de EB y un dispositivo con progesterona por 6 días, utilizando GnRH como inductor de ovulación a las 72 h posteriores al retiro del dispositivo intravaginal. Este tratamiento fue denominado "J-Synch" (de la Mata y Bó, 2012). El objetivo también es prolongar el proestro, como se mencionó anteriormente en relación al Co-synch de 5 días que aumenta la fertilidad en la IATF (Bridges y col., 2013). En un primer trabajo donde se comparó ambos tratamientos, J-Synch vs. el Co-Synch de 5 días en vaquillonas de carne, los tratamientos no difirieron en la tasa ovulatoria, diámetro de foliculo ovulatorio y porcentaje de concepción (de la Mata y Bó, 2012; Bó y col., 2016).

Programas de Inseminación Artificial

La inseminación artificial es una técnica que consiste en la deposición del semen por vía instrumental en el útero de una hembra antes de que ocurra la ovulación, más específicamente se debe introducir la mano en el recto de la hembra para poder fijar el cuello uterino y con la otra mano manipular un pistolete o una pipeta introducida para atravesar el canal cervical y depositar el semen en el cuerpo del útero (Bó y col., 2006b). El principal objetivo de la implementación de la inseminación artificial en establecimientos de cría de ganado para carne es el de producir un progreso genético en el rodeo. A pesar de que la IA es una biotecnología reproductiva que se conoce desde hace varias décadas, su implementación en forma masiva es muy reciente y se debe a la utilización de tratamientos que permiten realizar la IA sin la necesidad de detección del estro, técnica conocida como Inseminación artificial a tiempo fijo (IATF).

Los programas de IATF son una excelente herramienta que permite realizar la inseminación evitando la detección del estro. Si bien son tratamientos simples deben realizarse con rigurosidad. Es necesario conocer el establecimiento y los objetivos productivos para determinar si efectivamente la aplicación de esta técnica es lo adecuado. Conocer las características de las hembras con que vamos a trabajar nos permitirá realizar una adecuada selección del protocolo, sabiendo que éste debe

ejecutarse con muy buena eficiencia para optimizar las tasas de preñez. Aunque obtengamos excelentes tasas de preñez hay que tener en claro que los establecimientos de carne no producen, o mejor dicho no venden, tasas de preñez, sino que su resultado se evalúa en kilogramos de ternero o número de terneros. Es por esto que nuestra responsabilidad es coordinar un programa de actividades que contemplen todo lo necesario para que la implementación de los programas de IA tenga la mayor eficiencia posible y se pueda mejorar la productividad de un rodeo de carne (Bó y col., 2016).

8. HIPOTESIS

La prolongación del proestro en un tratamiento corto de 6 días para IATF aumenta el diámetro del folículo ovulatorio, el tamaño del cuerpo lúteo subsiguiente y la concentración de progesterona en sangre.

9. OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el efecto de la prolongación del proestro mediante el protocolo J-Synch sobre la actividad ovárica antes y después de la ovulación.

Objetivo Específico

- Evaluar el efecto de este tratamiento sobre el desarrollo folicular ovulatorio.
- Evaluar el efecto del J-Synch sobre la actividad luteal.
- Evaluar el efecto de este tratamiento sobre la producción de progesterona luteal
- Comparar la respuesta con el tratamiento convencional de 7 días.

10. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales e instalaciones

Este experimento se realizó en el marco de cooperación de Fundación IRAUy y el Establecimiento “San Sebastián” (34° LS, Florida, Uruguay) para poder comparar el tratamiento J-Synch y el convencional evaluando el desarrollo folicular, momento de ovulación, desarrollo luteal y concentración sérica de progesterona. El experimento de esta tesis formó parte del proyecto de Maestría de Javier de la Mata (de la Mata, 2016) y fue financiado por Fundación IRAUy.

Para este trabajo se utilizaron vacas *Bos Taurus* nulíparas (i.e. sin cría y en su primer servicio) con cuerpo lúteo, en condiciones de pastoreo en campo natural y/o campo natural mejorado. Las instalaciones fueron las adecuadas para el manejo con los animales (corrales, huevo, tubo, cepo). Todos los procedimientos, incluyendo los inyectables, aplicación de dispositivos intravaginales, extracción de sangre y ecografía útero-ovárica, fueron aprobados por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de la Fundación IRAUy avalada por la Comisión Nacional de Experimentación Animal.

Tratamientos y grupos experimentales

Se utilizaron 48 vaquillonas cíclicas Hereford x Angus, con un peso promedio de 348 Kg (rango 285–420) y con una condición corporal (CC) promedio de 4,5 (escala 1 a 8). Solo se utilizaron vaquillonas en las que se observó la presencia de cuerpo lúteo en dos ecografías separadas por 11 días y realizadas previas al experimento. Los animales fueron asignados en bloques al azar a dos grupos experimentales: grupo J-

Synch ($n=24$) y grupo convencional ($n=24$). Ambos grupos recibieron un tratamiento para inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), utilizando un dispositivo intravaginal con 0,5 g de progesterona (DIB 0,5, Syntex, Bs. As., Argentina) asociado a una dosis de 2 mg de benzoato de estradiol (Gonadiol, Syntex, Bs. As., Argentina) al momento de colocar el dispositivo. Al retirar el dispositivo se administró una dosis de 500 μ g de D (+)cloprostenol (Ciclase DL, Syntex, Bs. As., Argentina). En el grupo convencional se utilizó el dispositivo de progesterona por 7 días administrando 0,5 mg de cipionato de estradiol (Cipiosyn, Syntex, Bs. As., Argentina) como inductor de la ovulación al momento de retirar el dispositivo. En el grupo J-Synch se utilizó el dispositivo intravaginal de progesterona por 6 días y a las 72 horas de retirado el dispositivo se administró una dosis de 100 μ g de acetato de gonadorelina (GnRH_Gonasyn GDR, Syntex, Bs. As., Argentina) inyectable, prolongando así el proestro. El diseño experimental se observa en la Figura 1.

Ultrasonografía

Las estructuras ováricas (folículos y cuerpo lúteo) fueron monitoreadas mediante ultrasonografía (WED-9618, Well.D, Shenzhen, China), provisto de un transductor lineal de 7,5 MHz, en modo B. Desde el retiro del dispositivo con progesterona y hasta la ovulación se realizó cada 12 horas y luego cada 24 horas desde la ovulación durante los 23 días posteriores. La ovulación se definió cuando el folículo de mayor diámetro que estaba presente dejó de observarse y esto fue confirmado con una siguiente ecografía 12 h más tarde. Para estimar el tamaño de tejido luteal se calculó el volumen de una esfera ($V=4.\pi.r^3/3$), donde el radio se obtuvo del promedio de los diámetros mayor y menor registrados. Cuando los cuerpos lúteos presentaban una cavidad, el volumen de la misma fue restado al volumen total, con el objetivo de obtener una aproximación al volumen de tejido luteal presente en el ovario (mm³).

Obtención de muestras sanguíneas y determinaciones hormonales

Se tomaron muestras de 10 mL de sangre diariamente por punción yugular a cada hembra desde el día del retiro del dispositivo con progesterona y durante los 25 días posteriores. Las muestras fueron extraídas al amanecer y a la misma hora diaria, luego centrifugadas a 3000 RPM durante 20 minutos para separar el suero y congelado a -20 °C para posterior análisis. Las concentraciones séricas de progesterona se determinaron por duplicado (Meikley col., 2001) mediante la técnica de radioinmunoanálisis (RIA) en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, utilizando Kits comerciales DIAsource (DIAsource ImmunoAssays SA, Rue du Bosquet, 21348 Louvain-la-Neuve - Belgium) La concentración mínima detectable fue 0,27 ng/mL y el coeficiente de variación (CV) intraensayo para los controles bajo y alto fue 9,18% y 17,82%, respectivamente. El CV inter-ensayo para los mismos controles fue 10,0% y 24,2%, respectivamente.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante Modelos Lineales Generalizados Mixtos (MLGM), utilizando el software estadístico InfoStat (versión 2015). En el modelo se incluyó el patrón de crecimiento del folículo dominante y las concentraciones séricas

de progesterona en el tiempo. Para el análisis del folículo dominante se consideró como Hora 0 el momento de la remoción de dispositivo y se tomaron las mediciones realizadas hasta el momento de la ovulación. Para el análisis del volumen del cuerpo lúteo y concentración sérica de progesterona se consideró como Día 0 al día de la ovulación y se tomaron las mediciones realizadas hasta el Día 12. El modelo incluyó los factores tratamiento, día y su interacción. Se utilizó como variable aleatoria el número de identificación de cada animal. Cuando se detectaron efectos significativos de tratamiento o su interacción se utilizó la diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher (alfa=0,05) para comparar las medias entre los grupos para cada día por el test de LSD. Los resultados son presentados como media \pm SEM y las diferencias significativas cuando $P < 0,05$, y tendencia cuando $P < 0,1$.

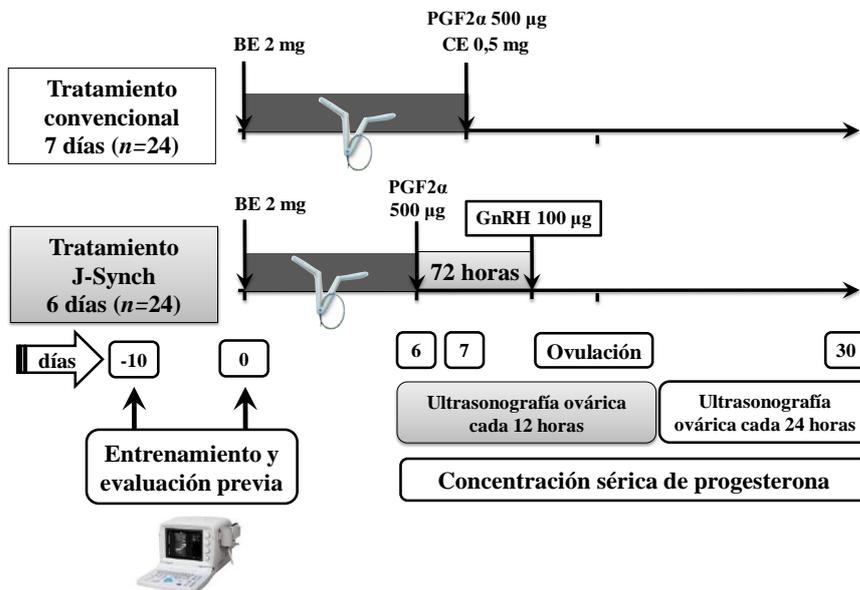


Figura 1. Diseño experimental. BE: Benzoato de Estradiol, PGF2α: Prostaglandina F2α, CE: Cipionato de Estradiol, GnRH: Factor liberador de gonadotrofinas.

11. RESULTADOS

La tasa de ovulación no tuvo diferencia significativa entre grupos experimentales, grupo Convencional 100% (24/24) vs. 87,5% (21/24) obtenida para el grupo J-Synch (Tabla 1). Las hembras que no ovularon fueron descartadas del experimento y por lo tanto sus resultados no se tomaron en cuenta. En aquellas hembras que ovularon, la tasa de crecimiento folicular fue mayor en las vaquillonas del grupo J-Synch ($P < 0,1$; Tabla 1) mientras que para el diámetro del folículo ovulatorio no se detectó diferencia entre grupos (Tabla 1). El intervalo entre el retiro del dispositivo y la ovulación fue mayor ($P < 0,0001$; Tabla 1) en el grupo J-Synch comparado al grupo Convencional, siendo esta diferencia de $28,7 \pm 0,7$ horas entre tratamientos. En el grupo Convencional se obtuvieron diámetros foliculares mayores ($P < 0,05$; Figura 2) a las 12, 24, 36, 48 y 60 horas desde la remoción de los dispositivos, mientras que a las 72 h no se encontraron diferencias entre grupos ($P > 0,1$; Figura 2). Todos los animales que ovularon presentaron cuerpo lúteo post-ovulación y el promedio del volumen luteal fue superior en el grupo J-Synch ($398,7 \pm 10,0 \text{ mm}^3$; Tabla 1) en comparación con el grupo Convencional ($357,3 \pm 10,0 \text{ mm}^3$; Tabla 1), siendo ésta calculada durante los días 4 y 12 ($P = 0,04$).

Tabla 1. Respuesta ovárica (Media \pm E.E.) en vaquillonas cíclicas sometidas al protocolo J-Synch o al tratamiento Convencional.

Variable	Tratamiento	
	J-SYNCH	CONVENCIONAL
Nº de Vaquillonas	24	24
Diámetro FD al retiro del DIB (mm)	$8,3 \pm 1,2^a$	$10,0 \pm 2,4^b$
Diámetro FD a la ovulación (mm)	$13 \pm 1,04^a$	$12,8 \pm 0,95^a$
Hembras ovuladas	21/24 (87,5%) ^a	24/24 (100%) ^a
Intervalo retiro DIB a la ovulación (h)	$93,7 \pm 12,94^a$	$65,0 \pm 13,67^b$
Tasa de crecimiento FD (mm/día)*	$1,3 \pm 0,4^c$	$1,0 \pm 0,4^d$
Diámetro FD al momento del inductor de ovulación (mm)	$12,3 \pm 1,3^a$	$10,0 \pm 2,4^b$
Volumen de CL (mm ³)**	$398,7 \pm 10,0^a$	$357,3 \pm 10^b$
Concentración sérica de P4 (ng/mL)***	$4,69 \pm 0,2^a$	$3,90 \pm 0,1^b$

Letras diferentes indican diferencias significativas (^{a,b} $P < 0,05$) (^{c,d} $P < 0,1$)

* Desde la remoción del DIB hasta la ovulación.

** Desde el Día 4 hasta el Día 12 pos ovulación.

*** Desde la ovulación hasta el Día 12.

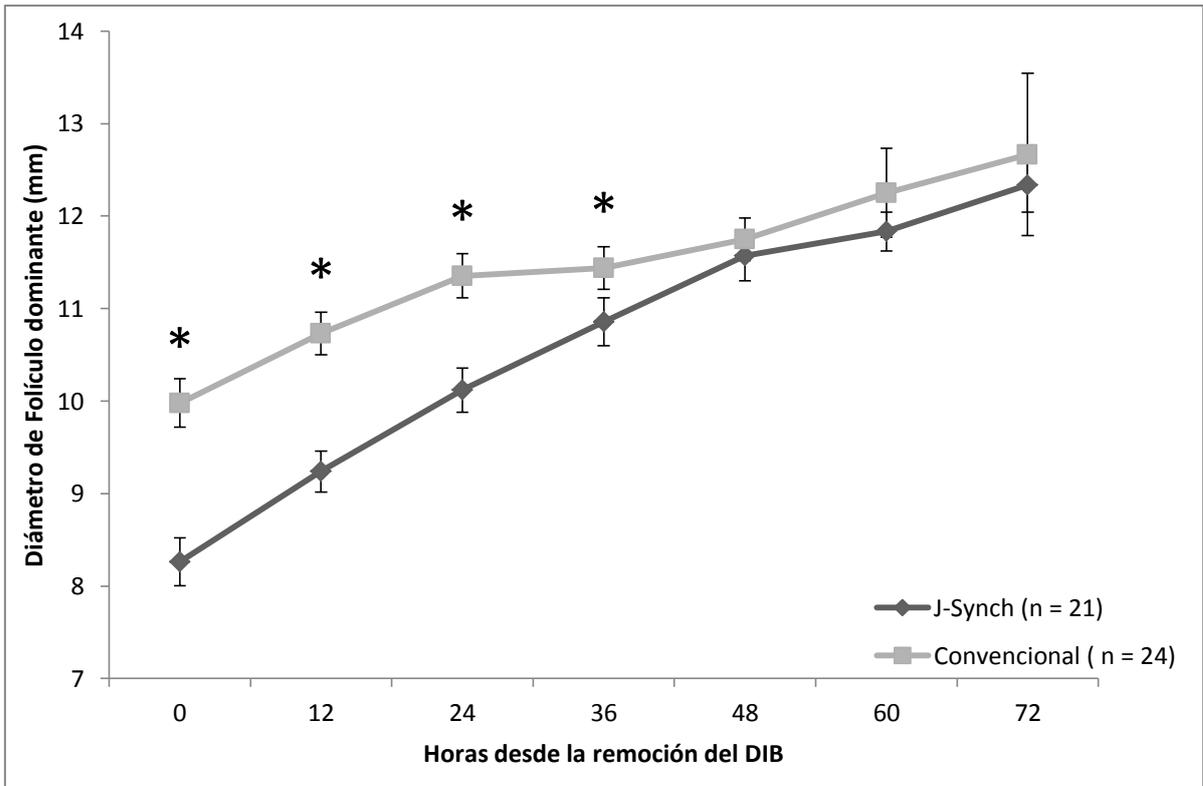


Figura 2. Variación del diámetro del folículo dominante (mm) en función de las horas post retiro del DIB para el grupo Control vs J-Synch

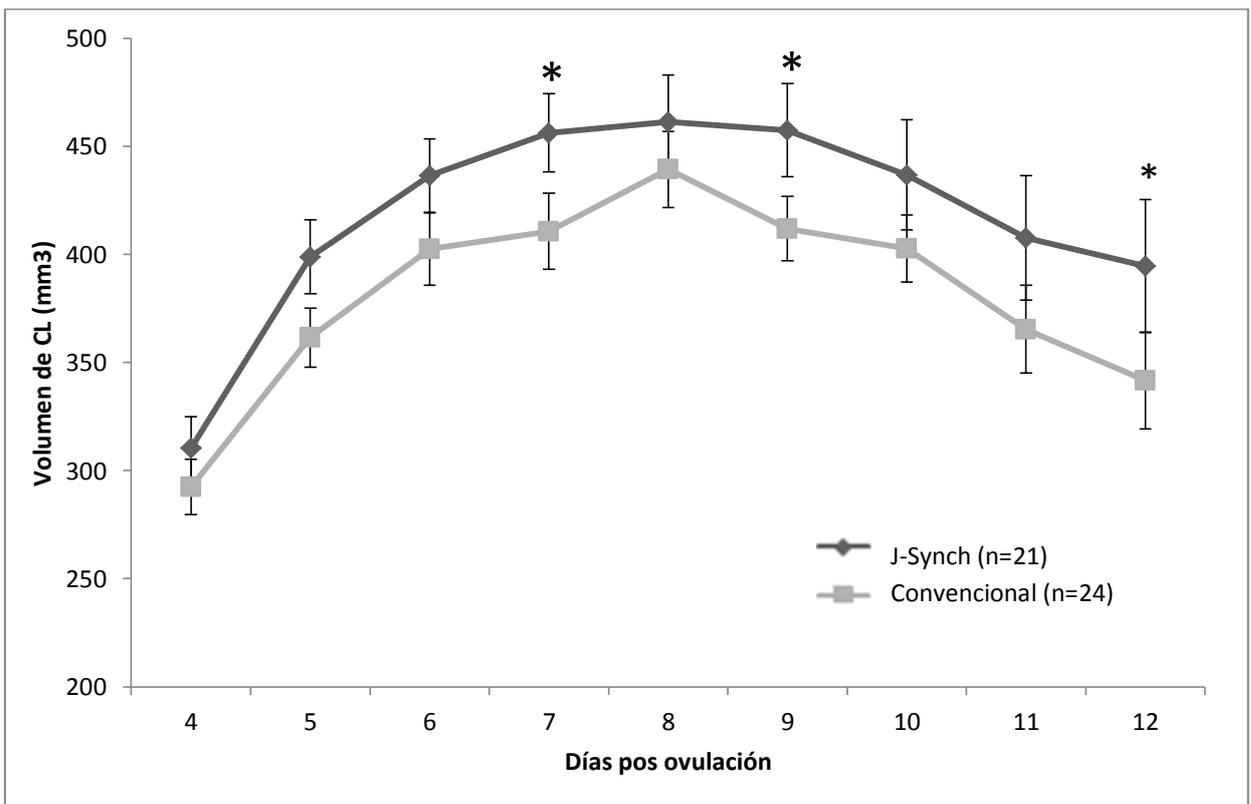


Figura 3. Variación del diámetro del cuerpo lúteo (mm³) en función de los días post ovulación para el grupo Control vs J-Synch.

Las concentraciones séricas de progesterona fueron mayores en el grupo J-Synch desde la ovulación hasta el día 12 de la fase luteal, Figura 3 ($P=0,03$).

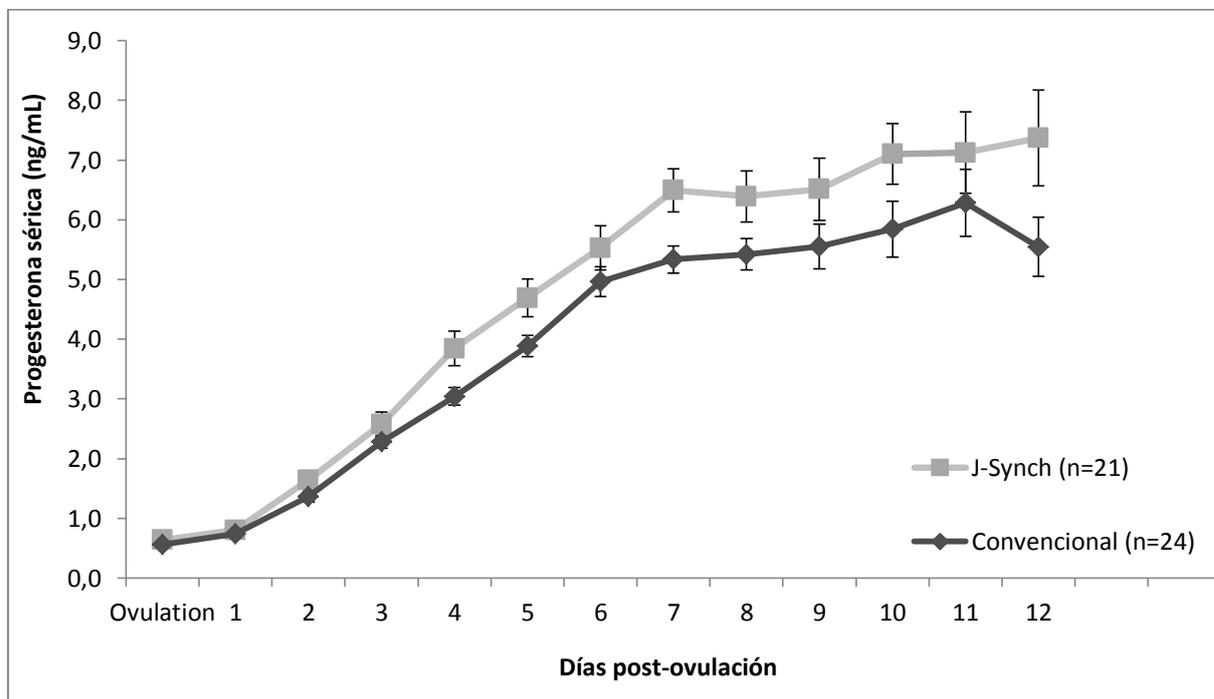


Figura 4. Concentraciones de progesterona (ng/ml) en función de los días post-ovulación para el grupo Control vs J-Synch

12. DISCUSIÓN

No se encontraron diferencias significativas en lo que respecta a tasa ovulatoria entre grupos, siendo 87,5% para las vaquillonas del grupo J-Synch y 100% para el grupo Convencional. Otros autores (de la Mata y Bó, 2012) compararon el protocolo J-Synch vs. el Co-Synch de 5 días, también en vaquillonas de carne, los tratamientos no difirieron ($P>0,1$) en la tasa ovulatoria (91,6% vs. 92,8%). Cabe mencionar que este tipo de variable categórica requiere un mayor número de animales para obtener conclusiones robustas, y por este motivo este no fue un objetivo prioritario en este diseño experimental.

En aquellas vaquillonas que ovularon, las asignadas al grupo J-Synch presentaron mayor duración de proestro en comparación al grupo Convencional, lo que demuestra la aplicación de dicho protocolo para la prolongación del proestro, como ya fue definido anteriormente por otros autores, (de la Mata y Bó, 2012) en donde la duración del mismo en vaquillonas de carne fue de $97,1 \pm 17,4$ h, muy similar a los resultados obtenidos en este trabajo, que reflejan una duración de proestro en el grupo J-Synch de $93,7 \pm 12,94$, con una diferencia de 28,7 horas entre tratamientos. Estos resultados

también concuerdan con los obtenidos en vaquillonas raza Holando-Argentino que reportaron una duración de proestro de $103,8 \pm 3,3$ h (Ré y col., 2014).

Con respecto al diámetro de los folículos dominantes, éstos fueron mayores en las vaquillonas del grupo Convencional durante la mayor parte de la evaluación de la dinámica folicular realizada mediante ultrasonografía, con excepción de las 72 h luego retiro del dispositivo, momento en el cual los diámetros foliculares de ambos grupos se igualaron. A pesar de esto, el diámetro folicular ovulatorio no presentó variaciones significativas entre tratamientos ($P > 0,1$), lo cual no sostiene la hipótesis planteada en cuanto a diámetro ovulatorio. El análisis de los resultados de varios estudios han demostrado que el mayor predictor del porcentaje de concepción, en ganado *Bos taurus* ciclando, es la duración del proestro y no el diámetro folicular como se planteaba anteriormente (Bó y col., 2016).

La prolongación del proestro genera mayores concentraciones séricas circulantes de estradiol producido por el folículo dominante, favoreciendo la madurez folicular y mejorando la fertilidad (Bridges y col., 2008; 2010; 2012; 2014). Esto a su vez guarda relación con una mejor calidad y supervivencia embrionaria (Larimore y col., 2015; Madsen y col., 2015). De acuerdo a lo reportado por Bridges y col. (2010), a diámetros foliculares constantes, los animales que reciben tratamientos de proestro prolongado (entre 2 a 4,7 días) logran mejores tasas de concepción que los animales con tratamientos de proestro corto (< 2 días). La aplicación del protocolo J-Synch aumenta las tasas de preñez en comparación con un tratamiento Convencional en vaquillonas *Bos taurus* para carne, en condiciones nutricionales adecuadas (de la Mata, 2016). Por otro lado la tasa de crecimiento folicular tendió a ser mayor ($P < 0,1$) en el grupo J-Synch que en el convencional, lo que podría sugerir también una mayor actividad estrogénica.

Las concentraciones séricas de progesterona y el volumen luteal fueron superiores en los animales del grupo con tratamiento J-Synch, tal como fue planteado en las hipótesis; el promedio del volumen luteal en el grupo J-Synch fue superior en comparación con el grupo Convencional, siendo ésta calculada durante los días 4 y 12 y las concentraciones séricas de progesterona producidos por el tejido luteal fueron mayores en los animales del grupo J-Synch durante los días de análisis, desde la ovulación hasta el día 12 de la fase luteal.

El efecto beneficioso de alargar el proestro está asociado con mayores concentraciones circulantes de estradiol antes de la ovulación y altas concentraciones de progesterona en fase luteal (Bó y col., 2016). A mayor tamaño de CL se incrementa la producción de progesterona, como lo reportado en estudios previos (Vasconcelos y col., 2001; Busch y col., 2008). Otro beneficio encontrado al alargar el proestro es favorecer la madurez folicular y mejorar la fertilidad (Bridges y col., 2008; 2010; 2012; 2014). Lo que se busca a través del aumento de la secreción de progesterona es ayudar en el mantenimiento de preñez ya que actúa sobre el endometrio y en consecuencia sobre el embrión, muchas pérdidas embrionarias pueden estar dadas por concentraciones inadecuadas de dicha hormona (Spencer y col., 2007; Diskin y col., 2016; Lonergan y col., 2016).

La mejora en la tasa de preñez se propone en un estudio previo (De la Mata, 2016), en el cuál se comparan las tasas de preñez entre un grupo con tratamiento J-Synch y un grupo con tratamiento convencional (DIB 7 días, estradiol y prostaglandina), donde los animales que recibieron un tratamiento J-Synch presentaron una tasa de preñez superior cuando existió un plano de alimentación favorable, esto se relaciona con la prolongación del proestro, el estudio no obtuvo resultados positivos cuando los animales estaban en un déficit nutricional.

13. CONCLUSIONES

El tratamiento J-Synch produce un proestro más prolongado que el tratamiento convencional de 7 días, generando un cuerpo lúteo de mayor tamaño y mayor producción de progesterona en la fase luteal subsiguiente.

14. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) Adams G.P.; Matteri R.L.; Kastelic J.P.; Ko J.C.H.; Ginther O.J. (1992). Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil*; 94:177-188.
- 2) Adams G.P. (1998). Control of ovarian follicular wave dynamics in mature and prepubertal cattle for synchronization and superstimulation. In: *Proceedings of the XX Congress of the World Association of Buiatrics*, Sydney, Australia. Sydney: Australian Association of Cattle Veterinarians. pp. 595-605.
- 3) Baruselli, P.S.; Reis, E.L.; Marques M.O. Técnicas de manejo para aperfeiçoar a eficiência reprodutiva em fêmeas bos indicus. (2004) Grupo de Estudo de Nutrição de Ruminantes – Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal – FCA – FMVZ – UNESP, Botucatu, São Paulo, p.18.
- 4) Bó G.A., Caccia M., Tribulo H., Adams G.P., Pierson R.A., Mapletoft R.J. (1994). Synchronous ovulation in heifers treated with E-17 and CIDR-B vaginal devices. *Proceedings of the Canadian Society Animal Science*, Regina, pp.284.
- 5) Bó G.A.; Adams G.P.; Pierson R.A.; Mapletoft R.J. (1995). Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*; 43:31-40.
- 6) Bó G.A., Alonso A., Caccia M., Carcedo J., Cutaia L., Moreno D., Martínez, M., Baruselli P. (2006) *Fisiología de la Reproducción de la Vaca*. Córdoba. IRAC, 26p.
- 7) Bó G.A., Cutaia L., Tribulo R. (2002b). Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos para carne: algunas experiencias realizadas en Argentina. *Segunda Parte. Taurus*; 15: 17-32.
- 8) Bó G.A., Caccia M., Cutaia L., Moreno D., Tribulo H. (2006b) *Sincronización de Celos e Inseminación Artificial*. Córdoba. IRAC, 1-5p
- 9) Bó G.A., Cutaia L., Peres L.C., Pincinato D., Maraña D., Baruselli P.S. (2007). Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. In: Juengel JL, Murray JF and Smith MF (eds), *Reproduction in Domestic Ruminants VI*, Nottingham University Press, Nottingham 223-236p.
- 10) Bó G.A., Baruselli P.S., Mapletoft R.J. (2013). Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. *Animal Reproduction* 10: 137-142.
- 11) Bó G.A., de la Mata J.J., Ré M., Huguenine E., Menchaca A. (2014). Inseminación Artificial a Tiempo Fijo utilizando tratamientos que acortan el período de inserción del dispositivo con progesterona y alargan el proestro. *Memorias de las 7º Jornadas Taurus de Reproducción Bovina* p 95-100.
- 12) Bó G.A., de la Mata J.J., Baruselli P.S., Menchaca A. (2016). Alternative programs for synchronizing and re-synchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology* 86(1): 388-396..
- 13) Breuel KF, Lewis PE, Inskeep EK, Butcher RL. (1993). Endocrine profiles and follicular development in early-weaned postpartum beef cows *Journal of Reproduction and Fertility* 97: 205–212.
- 14) Bridges G.A., Helser L.A., Grum D.E., Mussard M.L., Gasser C.L., Day M.L. (2008). Decreasing the interval between GnRH and PGF2 α from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology* 69: 843-851.
- 15) Bridges G.A., Mussard M.L., Burke C.R., Day M.L. (2010). Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. *Animal Reproduction Science* 117: 208-215.
- 16) Bridges G.A., Mussard M.L., Pate J.L., Ott T.L., Hansen T.R. and Day M.L. (2012). Impact of preovulatory estradiol concentrations on conceptus development and uterine gene expression. *Animal Reproduction Science* 133: 16-26.

- 17) Bridges G.A., Day M.L., Geary T.W., Cruppe L.H. (2013). Deficiencies in the uterine environment and failure to support embryonic development. *Journal of Animal Science* 91: 3002-3013.
- 18) Bridges G.A., Mussard M.L., Hesler L.A., Day M.L. (2014). Comparison of follicular dynamics and hormone concentrations between the 7-day and 5-day CO-Synch + CIDR program in primiparous beef cows. *Theriogenology* 81: 632-638.
- 19) Busch D.C., Schafer D.J., Wilson D.J., Mallory D.A., Leitman N. R., Haden J. K., Eilersieck M.R., Smith M.F., Patterson D.J. (2008). Timing of artificial insemination in postpartum beef cows following administration of the CO-Synch + controlled internal drug-release protocol. *J Anim Sci*, 86:1519-1525.
- 20) Callejas, S. (2004). Control farmacológico del ciclo estral bovino: bases fisiológicas, tratamientos y resultados *Taurus*, Bs. As., 6(24):22-34.
- 21) Colazo M.G., Kastelic J.P., Mapletoft R.J. (2003). Estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDRB-based, fixed-time AI programs in beef heifers. *Theriogenology* 60: 855–865.
- 22) Colazo M.G., Mapletoft R.J., Martínez M.F., Kastelic J.P. (2009). Selección de los tratamientos hormonales disponibles en el mercado para la sincronización de celos en vaquillonas de carne. Resúmenes en CD-ROM del VIII Simposio Internacional de Reproducción Animal. Pabellón Argentino, Ciudad Universitaria, Córdoba.
- 23) Cutaia L., Moreno D., Villata M.L., Bó G.A. (2001). Synchrony of ovulation in beef cows treated with progesterone vaginal devices and estradiol benzoate administered at device removal or 24 h later. *Theriogenology*; 55:244.
- 24) Cutaia L., Tríbulo R., Moreno D., Bó G.A. (2003). Pregnancy rates in lactating beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and equine chorionic gonadotropin (eCG). *Theriogenology*; 59:216.
- 25) de la Mata J.J., G.A. Bó. (2012). Sincronización de celos y ovulación utilizando protocolos de benzoato de estradiol y GnRH en períodos reducidos de inserción de un dispositivo con progesterona en vaquillonas para carne. *Taurus* 55:17-23.
- 26) de la Mata J.J. (2016). Prolongación del proestro y reducción del periodo de inserción del dispositivo con progesterona en vaquillonas para carne inseminadas a tiempo fijo. Universidad Nacional de Córdoba, pp 38-56
- 27) de Nava, G.; de Olarte, C.; Frade, S.; Reyes, L.; Cavestany, D. (2012). Anestro posparto en vacas de cría. Resultados de la adopción de tecnologías asociadas a inseminación a tiempo fijo o monta natural. *Veterinaria* 48 Suppl .1: 59-65.
- 28) De Nava G. (2015). La IATF como tecnología reproductiva en el manejo de los rodeos de cría. XLIII Congreso Mundial de Buiatría, Paysandú, Uruguay..p 120
- 29) DIEA. (2013). Anuario estadístico agropecuario MGAP. Uruguay Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-anuario-2013,O,es,0> . Fecha de consulta: 7-9-16.
- 30) Diskin M.G., Walters S.M., Parr M.H., Kenny D.A. (2016). Pregnancy losses in cattle: potential for improvement. *Reproduction, Fertility and Development* 28: 83-93.
- 31) Findlay J.K., Robertson D.M., Clarke I.J., Klein R, Doughton B.W., Xiao S., Russel D.L., Shukovski L. (1992). Hormonal regulation of reproduction: general concepts. *Anim Reprod Sci* ; 28:319-328.
- 32) Fortune J.E. (1994). Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod*, 50: 225.
- 33) Gibbons J.R., Wiltbank M.C., Ginther O.J.(1997). Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the FSH surge in heifers. *Biol Reprod* ; 57:1066-1073.
- 34) Ginther O.J., Knopf L., Kastelic J.P. (1989a). Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biol Reprod*, 41:247-254
- 35) Ginther O.J., Knopf L., Kastelic J.P. (1989b). Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fertil*, 87:223-230
- 36) Ginther O.J., Wiltbank M.C., Fricke P.M., Gibbons J.R., Kot K. (1996). Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod*, 55:1187-1194.

- 37) Ginther O.J. (2000). Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim Reprod Sci*, 60-61:61-79.
- 38) Ginther O.J., Beg M.A., Bergfelt D.R., Donadeu F.X., Kot K. 2001. Follicle selection in monovular Species. *Biol Reprod*, 65:638-647.
- 39) Hanlon D.W., Williamson N.B., Wichtel J.J., Steffert I.J., Craigie A.L., Pfeiffer D.U. (1997). Ovulatory responses and plasma luteinizing hormone concentrations in dairy heifers after treatment with exogenous progesterone and estradiol benzoate. *Theriogenology*, 47:963-975.
- 40) Hansel, W. y Fortune, J. (1978). The application of ovulation control. En, *Control of Ovulation* pp.237- 263,(Crightony col., eds) Butterwood, London.
- 41) Hunter, R. A. (1991). "Strategic Supplementation for Survival, Reproduction and Growth of Cattle." *Proc. Grazing Livest. Nutr. Conf.*, August 2–3, 1991. Oklahoma State University, Stillwater, pp 32-47.
- 42) Ireland J.J. (1987). Control of follicular growth and development. *J Reprod Fert*; 34:39-54.
- 43) Ireland J.J. y Roche J.F. (1987). Hypotheses regarding development of dominant follicles during a bovine estrous cycle. In: Roche JF, O'Callaghan D (eds) *Follicular Growth and Ovulation Rate in Farm Animals*, Dordrecht Martinus Nijoff Publishers; pp.1-18.
- 44) Kastelic J.P.; Ginther O.J. (1991). Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis. *Anim Reprod Sci*; 26:13-24.
- 45) Larimore E.L., Amundson O.L., Bird S.L., Funnell B.J., Kruse S.G., Bridges G.A., Perry G.A. (2015). Influence of estrus at fixed-time artificial insemination on early embryonic development in beef cattle. *Journal of Animal Science* 93: 2806-2812.
- 46) Lonergan P., Forde N., Spencer T. (2016). Role of progesterone in embryo development in cattle. *Reproduction, Fertility and Development* 28: 66-74.
- 47) Lucy M.C., Savio J.D., Badinga L., De la Sota R.L., Thatcher W.W. (1992). Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci* 70:3615-3626.
- 48) Madsen C.A., Perry G.A., Mogck C.L., Daly R.F., MacNeil M.D., Geary T.W. (2015). Effects of preovulatory estradiol on embryo survival and pregnancy establishment in beef cows. *Animal Reproduction Science* 158: 96-103.
- 49) Mapletoft R.J., Colazo M.G., Martinez M.F., Kastelic J.P. (2003b). Ésteres de estrógeno para la sincronización de la emergencia de la onda folicular y la ovulación en animales tratados con dispositivos con progesterona. *Simp Intern Reprod Anim*, 5:55-67.
- 50) Martin T.L., Fogwell R.L., Ireland J.J. (1991). Concentrations of inhibins and steroids in follicular fluid during development of dominant follicles in heifers. *Biol Reprod* ; 44:693-700.
- 51) Martinez M.F., Kastelic J.P., Adams G.P., Cook R.B., Mapletoft R.J. (1999). Synchronization of ovulation for fixed-time insemination in heifers. *Theriogenology*, 51:412.
- 52) Martinez M.F., Kastelic J.P., Gregg P., Adams G.P., Byrne C., Walter O.O., Mapletoft R.J. (2002). The use of progestins in regimes for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Theriogenology*, 57:1049-1059.
- 53) McCracken, J. A., E. E. Custer., J. C. Lamsa. (1999). Luteolysis: A neuroendocrine-mediated event. *Physiol. Rev.* 79:263–323.
- 54) McMillan, W.H. (1994). Current and emerging reproductive technologies for beef breeding cows. *The Proceeding of the New Zealand Society of Animal Production*. 54:345-350
- 55) Meikle A., Sahlin L., Ferraris A., Masironi B., Blanc J.E., Rodríguez-Irazoqui M., Rodríguez-Piñón M., Kindahl H., Forsber M. (2001). Endometrial mRNA expression of oestrogen receptor α and insulin-like growth factor-I (IGF-I) throughout the bovine oestrous cycle. *Animal Reproduction Science* 68: 45-56.

- 56) Menchaca A., Núñez R., Wijma R., García Pintos C., Fabini F., de Castro T. (2013). How fertility can be improved in fixed-time AI programs in beef cattle. Resúmenes X Simposio Internacional de Reproducción Animal, IRAC, Córdoba. pp. 103-134.
- 57) MGAP, (2011). Censo General Agropecuario .Uruguay mantiene misma superficie agropecuaria en los últimos 60 años, según datos de MGAP. Fecha de consulta: 10/11/2016
- 58) Mihm D. M., Baker P.J., Smith G.W., Coussens P.M., Evans A., Irelan J.J. (2006). Molecular evidence that growth of dominant follicles involves a reduction in follicle-stimulating hormone dependence and an increase in luteinizing hormone dependence in cattle. *Biol Reprod* 74(6):1051-9
- 59) Momont H.W.; Seguin B.E. (1984). Influence of the day of estrus cycle on response to PGF 2α products: Implications for AI programs for dairy cattle. 10th International Congress on Animal Reproduction; Illinois, U.S.A. 336 p.
- 60) Moreno D., Cutaia L., Villata M.L., Ortisi F., Bó G.A. (2001). Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology*, 55:408.
- 61) Odde K.G. (1990). A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. *J Anim Sci*; 68:817-830.
- 62) Page R.B. (1994). The anatomy of hypothalamo-hypophyseal complex. En: Knobil E., Neill J.D. *The Physiology of Reproduction*, New York, 2ª edición, p 1527-1621.
- 63) Perry G.A. (2015). Influence of estrus at fixed-time artificial insemination on early embryonic development in beef cattle. *Journal of Animal Science* 93: 2806-2812.
- 64) Pinheiro, O. L., Barros, C.M.; Figueiredo, R.A., (1998) Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus are estrus induced with prostaglandin F 2 . Alpha or norgetomet and estradiol valerate. *Theriogenology*. 49: 667-681.
- 65) Ré M., de la Mata J.J. and Bó G.A. (2014). Synchronization of ovulation in dairy heifers using a shortened estradiol-based protocol that provides for a lengthened proestrus. *Reprod. Fert. and Develop.* 26:118
- 66) Reeves J., Arimura A., Schally A., (1971). Changes in pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in anestrus ewes pretreated with estradiol benzoate. *Bio Reprod*; 4: 88-92.
- 67) Rippe Christian A (2009). El ciclo estral, Dairy Cattle Reproduction Conference, Minneapolis, USA, 111p
- 68) Rodríguez-Marínez, H. (2012). Assisted reproductive techniques for cattle breeding in developing countries: A critical appraisal of their values and limitations. *Reproduction Domestic Animals* 47 (Suppl 1):21-26.
- 69) Sartori R, Gumen A, Guenther JN, Souza AH, Caraviello DZ, Wiltbank MC. 2006. Comparison of artificial insemination versus embryo transfer in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 65(7): 1311-1321.
- 70) Seidel, G.E. 1995. Reproductive biotechnologies for profitable beef production. *Proceeding Beef Improvement Federation*, Sheridan, WY, p 28.
- 71) Senger L. Phillip. (2003). Regulation of Reproduction. En: *Pathways to Pregnancy and Parturition*. 2da ed. Washington, Current Conceptions. pp 111-121.
- 72) Silverman A.J., Livine I., Witkin J.W. (1994). The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neural systems: Immunocytochemistry and in situ hybridization. 2da ed. En: Knobil E., Neill J.D. *The Physiology of Reproduction*, New York. P 1683-1711.
- 73) Spencer T.E., Johnson G.A., Bazer F.W., Burghardt R.C., Palmarini M. (2007). Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reproduction, Fertility and Development* 19: 65-78.
- 74) Stock A.E., Fortune J.E. (1993). Ovarian Follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology*, 132:1108-1114.

- 75) Ungerfeld, R. (2002). Control endócrino del ciclo estral. En: Ungerfeld, R. Reproducción en los animales domésticos. Montevideo, Melibea, pp. 39-53.
- 76) Vasconcelos J.L.M., Sartori R., Oliveira H.N., Guenther J.G., Wiltbank M.C. (2001). Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 56: 307-314.
- 77) Walters D.L., Schams D., Schallenberger E. (1984). Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and oxytocin during the luteal phase of the oestrous cycle in the cow. *J Reprod Fert*, 71:479-491.
- 78) Wiltbank M.C., Gumen A., Sartori R., 2002. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* 57:21-52.