

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

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

Por

**Diego FERNANDEZ
Ernesto SALAZAR**



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

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2007**

071 TG
Determinación d
Fernández, Diego



TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de Mesa:

Dr. Eduardo Blanc



Segundo Miembro:
(Orientador)

Dr. Daniel Cavestany



Tercer Miembro:

Dr. Daniel Elhordoy

Fecha:

17 de octubre de 2007

Autores:

Diego Fernández

Ernesto Salazar

AGRADECIMIENTOS

A Daniel Cavestany por su constante apoyo y dedicación a éste trabajo.

A Daniela Crespi por su colaboración en este trabajo.

Al laboratorio Rio de Janeiro, Santa Fé, Argentina, por el suministro de las drogas y los análisis de progesterona

Al personal de campo del INIA La Estanzuela.

Al Ing. Agr. Ludwig Leyton de la Facultad de Agronomía (Universidad de El Salvador) por su colaboración en el trabajo de campo.

A la Facultad de Veterinaria que contribuyó en nuestra formación.

A nuestras familias y amigos por estar siempre con nosotros.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	3
REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	5
CONTROL NEUROENDOCRINO DEL CICLO ESTRAL	5
Hipotálamo	5
Hipófisis	5
Ovarios	6
Útero	6
CICLO ESTRAL	7
Fase folicular o de regresión lútea	7
Fase periovulatoria (estro y metaestro)	8
Fase luteal (diestro)	8
DINAMICA FOLICULAR BOVINA	9
HORMONAS QUE INTERVIENEN EN LA REPRODUCCION	12
Hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH)	13
Hormona folículo estimulante (FSH)	13
Hormona luteinizante (LH)	13
Estrógenos	13
Progesterona	13
Prostaglandina	14
PROTOCOLOS DE SINCRONIZACION DE CELOS	14
PROTOCOLOS QUE REGULAN EL CUERPO LUTEO	14

PROTOCOLOS QUE REGULAN LAS ONDAS FOLICULARES	16
Ovsynch	16
Presynch	18
Heatsynch	18
Cosynch	19
Selectsynch	19
PROTOCOLOS QUE CREAN UNA FASE LUTEAL ARTIFICIAL	19
Progesterona y progestágenos	19
COMBINACIÓN DE ESTOS PROTOCOLOS	22
Combinación de progestágenos y GnRH	22
Combinación de progestágenos y E ₂	23
RESINCRONIZACION	24
MATERIALES Y METODOS	25
RESULTADOS	30
Ensayo 1	30
Ensayo 2	32
Sincronización	32
Actividad ovárica	33
Fertilidad	34
Niveles plasmáticos de progesterona	35
Ensayo 3	35
DISCUSION	37
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	44

TABLA DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. Esquema de sangrados realizados en vacas previamente ovariectomizadas.....	26
Figura 2. Protocolo de sincronización de estro para el grupo 1 (Ovsynch) y grupo 2 (Ovsinch + P4).....	28
Figura 3. Niveles de progesterona durante 9 días en vacas ovariectomizadas.....	31
Figura 4. Curvas individuales de progesterona para las cuatro vacas ovariectomizadas.....	32
Figura 5. Porcentaje de vaquillonas que mostraron celo antes de la segunda inyección de GnRH al día 9.....	33
Figura 6. Porcentajes de estructuras ováricas (folículos y cuerpos lúteos) a los días 0 y 7 del tratamiento, para los grupos Ovsynch (OV) y Ovsynch + P4 (OVm).....	34
Figura 7. Porcentaje de detección de celo luego de la administración de PG.....	36
Cuadro I. Porcentaje de preñez al celo natural, al tiempo fijo y preñez general para vaquillonas de los grupos Ovsynch y Ovsynch + P4.....	35

RESUMEN

Los objetivos fueron evaluar la duración y magnitud de niveles plasmáticos de progesterona, luego de la administración parenteral de una progesterona (P4) natural, en vacas Holando ovariectomizadas. La misma progesterona, a igual concentración y dosis, fue utilizada al comienzo de un protocolo Ovsynch (Ovsynch+P4) en un grupo de vaquillonas Holando, y se comparó a un protocolo Ovsynch tradicional. También, se investigó la eficiencia de sincronización, detección de celo y fertilidad, en vaquillonas Holando con antecedentes de subfertilidad luego de la administración de una única dosis de Prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PG), e inseminación a celo detectado. Las 4 vacas ovariectomizadas, recibieron en el día 0, la administración subcutánea de 100 mg de una P4. La extracción de sangre, se realizó antes del día 0 y luego a 1, 4, 8 y 12 horas después. El día 2 a las 24 horas de la primera, la segunda 6 horas más tarde y la tercera a las 6 horas. Los 7 días siguientes, 2 muestras cada 12 horas. Un total de 111 vaquillonas Holando, fueron divididas en dos grupos. Un grupo control (n=56) recibió una combinación de GnRH, PG y GnRH, a los días, 0, 7, y 9 respectivamente; el grupo tratado (n=55), recibió el mismo protocolo, más la administración parenteral de 100 mg de P4, junto con la GnRH al día 0. La detección de celo fue realizada durante 5 días, comenzando en el día 4 del protocolo, seguida de inseminación artificial, y los animales que no presentaron celo, fueron inseminados a tiempo fijo (IATF), 12 horas después de la segunda GnRH. La adición de P4 en vacas ovariectomizadas, causó un incremento de progesterona en plasma por encima de 1 ng/ml durante 52 horas; llegando a un pico máximo a las 8 horas de 2,01 ng/ml. El grupo Ovsynch presentó 48% de celo entre los días 4 y 9, y 57% de preñez general. El grupo Ovsynch+P4 presentó 21% de celo entre los días 4 y 8, y 27% de preñez general. Por lo tanto, en este último grupo con la adición de progesterona, se logró una mejor sincronización, pero una baja fertilidad. Las vaquillonas sincronizadas con PG, presentaron 30,7% de celo entre los días 2 y 6 con 62,5% de concepción, resultando no ser un protocolo útil para sincronización de celo en vaquillonas.

SUMMARY

The objectives were to evaluate the duration and magnitude of plasmatic levels of progesterone, after the parenteral administration of natural progesterone (P4), in ovariectomized Holstein cows. The same progesterone at the same dose and was used at the beginning of an Ovsynch protocol (Ovsynch+P4) in a group of Holstein heifers and compared with a traditional Ovsynch. The efficiency of the estrus synchronization and fertility of Prostaglandin (PG) was evaluated in a group of Holstein heifers with history of infertility. The 4 ovariectomized cows received, at day 0 100 mg of P4 subcutaneously and blood samples were taken at days -1, 0, 1, 4, 8, and 12 hours. On day 2 to 9, samples were taken at 12-h interval at the morning and afternoon. A total of 111 Holstein heifers were divided in two groups, a control group (n=56) that received a combination of GnRH, PG and GnRH at days 0, 7, and 9 (Ovsynch protocol); treated group (n=55) received the same protocol plus the administration of 100 mg of P4 subcutaneously at the time of the first GnRH (Ovsynch+P4 group). Heat detection was done during 5 days, starting at day 4 after the initiation of the protocol, followed by artificial insemination (AI). Animals not showing estrus were inseminated at a fixed time 12 hours after the second GnRH. The administration of P4 in ovariectomized cows caused a rise in P4 plasma levels >1 ng/ml during 52 hours, reaching a peak (2.01 ng/ml) at 8 hours of administration. In the heifers, 48% of the animals in the Ovsynch group showed heat between days 4 and 9, and the pregnancy rate was 57%. In the Ovsynch+P4 group, 21% of the heifers showed heat before day 9 and pregnancy rate was 27% ($P<0.01$). Thus, the addition of P4 in an Ovsynch protocol resulted in better synchronization but lower fertility. From the heifers with a history of low fertility synchronized with P4, only 30.7% showed heat between days 2 and 6 after treatment, and conception rate was 62.5%. We concluded that this was not a good protocol for this category of animals.

1. INTRODUCCIÓN

Las limitantes de la detección de celos en el ganado han hecho que se desarrollen diferentes estrategias para obtener la mayor cantidad de animales inseminados en el menor tiempo posible. La detección de celo lleva mucho tiempo y mano de obra, depende de las influencias ambientales y suele ser ineficiente e imprecisa. Por lo tanto, la razón primaria para sincronizar el estro, en vacas, es facilitar el uso de la inseminación artificial (IA) (Xu y Burton, 1999). Por otra parte, programas de tratamientos que aseguran concentraciones circulantes elevadas de progesterona sincronizan tanto la emergencia de una nueva onda de folículos ováricos como la ovulación y que utilizan la IA a tiempo fijo (IATF) sin detección de celo pueden resultar en un desempeño reproductivo satisfactorio. Los protocolos Ovsynch/IATF (Pursley y col, 1995) pueden resultar en un importante incremento en los programas reproductivos, al obviar el problema de la detección de celo. No obstante, este método no asegura la sincronización de la ovulación en todos los animales, ya que aproximadamente un 10% de estos tiende a mostrar celos más temprano con respecto al momento de la inseminación a tiempo fijo (Stevenson y col, 1999). Cuando el protocolo de Ovsynch se inicia al principio del ciclo estral, los animales tratados con GnRH, producen menos progesterona (P4) antes del tratamiento con prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PG), tienen una concentración muy alta de estradiol (E2) al celo y un intervalo corto desde la administración de la PG al celo (Stevenson y col, 1998). Por otro lado, el inicio de un protocolo Ovsynch en estadios tardíos del ciclo estral, producen una regresión de cuerpo lúteo (CL) antes de la administración de la PG y la asincronía entre la ovulación y el tiempo de la ovulación (Moreira et al., 2000). La P4 previene la ovulación de los folículos maduros (Sirois y Fortune, 1990); manteniendo altas concentraciones de P4 entre la primera GnRH y la administración de la PG, se puede prevenir la ovulación prematura. Por lo tanto, al iniciar el protocolo Ovsynch en un ambiente de alta progesterona se incrementa la fertilidad del tratamiento (Murugavel y col, 2003). La progesterona natural (principalmente intravaginal) o progestinas sintéticas (en la comida o en implantes) ha sido usada en los protocolos de sincronización en vacas de carne (Thompson y col, 1999; Penny y col, 2000) y vacas lecheras (Xu y Burton, 2000). No hay información al respecto del uso parenteral de progesterona en un protocolo de Ovsynch en vacas lecheras ciclando y su efecto en los

niveles de progesterona durante un protocolo de sincronización de celo. Los objetivos de nuestro trabajo son los siguientes:

- a. Evaluar la duración y magnitud de los niveles P4 luego de la administración parenteral de 100 mg de P4 en vacas ovariectomizadas.
- b. Comparar la eficiencia de la sincronización de celo y la fertilidad en vaquillonas Holando con una combinación de GnRH, PG y GnRH (Ovsynch) y con un Ovsynch modificado con 100 mg de P4 parenteral administrada subcutáneamente al comienzo del tratamiento.
- c. Evaluar la eficiencia de la sincronización y detección de celos y la fertilidad en vaquillonas Holando por medio de una inyección única de PG.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Control neuroendocrino del ciclo estral

El ciclo estral está regulado por una interacción hormonal regida por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario-útero (H-H-O). En presencia de los factores liberadores del hipotálamo, las hormonas de la glándula hipófisis y los ovarios ejercen un control mutuo sobre sus concentraciones en la sangre. Las complejas interacciones entre las hormonas del eje H-H-O y el útero involucran un mecanismo de control positivo y negativo para mantener el ciclo estral de la vaca. Las principales hormonas secretadas por esas estructuras son la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), la hormona folículo estimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH), el estradiol (E2), la progesterona (P4) y la prostaglandina F2 (PG).

2.1.1. Hipotálamo

Forma la base del cerebro, y sus neuronas producen la hormona liberadora de gonadotropina o GnRH. El GnRH, en la eminencia media, difunde a los capilares del sistema porta hipofisiario y de aquí a las células de la adenohipófisis en donde su función es estimular la síntesis y secreción de las hormonas hipofisiarias, FSH y LH.

2.1.2. Hipófisis

Está formada por una parte anterior o adenohipófisis y una posterior o neurohipófisis. La adenohipófisis produce varios tipos de hormonas, de las cuales la FSH y LH cumplen un papel relevante en el control neuroendocrino del ciclo estral. La FSH es la responsable del proceso de esteroidogénesis ovárica, crecimiento y maduración folicular y la LH interviene en el proceso de esteroidogénesis ovárica, ovulación, formación y mantenimiento del cuerpo lúteo. Estas hormonas son secretadas a la circulación en forma de pulsos y son reguladas por dos sistemas, el tónico y el cíclico. El sistema tónico produce el nivel basal circulante, siempre presente, de hormonas hipofisarias las

cuales promueven el desarrollo de los elementos germinales y endocrinos de las gónadas. El sistema cíclico opera más agudamente, siendo evidente por solo 12 a 24 horas en cada uno de los ciclos reproductivos de la hembra. El modo cíclico tiene por función primaria causar la ovulación. La neurohipófisis almacena la oxitocina producida en el hipotálamo. Esta hormona tiene varias funciones como son intervenir en el mecanismo del parto, bajada de la leche, transporte espermático e intervendría en el proceso de luteólisis.

2.1.3. Ovarios

Son glándulas exocrinas (liberan óvulos) y endocrinas (secretan hormonas). Entre las hormonas que producen los ovarios podemos citar a los estrógenos, la progesterona y la inhibina. Los estrógenos, hormonas esteroideas, son producidos por el folículo ovárico y tienen acciones sobre los distintos órganos blanco como son las trompas de Falopio, el útero, la vagina, la vulva y el sistema nervioso central, en el cual estimulan la conducta de celo y el hipotálamo donde ejercen un "feedback" negativo sobre el centro tónico y positivo sobre el centro cíclico. La progesterona, hormona esteroidea, es producida por el cuerpo lúteo por acción de la LH. Los efectos de la progesterona se observan después que el tejido blanco ha estado expuesto durante cierto tiempo a la estimulación de los estrógenos. Esta preparación por los estrógenos conduce a un efecto sinérgico. Esta hormona prepara el útero para el implante del embrión y para mantener la gestación. A nivel hipotalámico ejerce un efecto feedback negativo sobre el centro tónico. La inhibina, hormona proteica, es producida por el folículo ovárico (células granulosas) e interviene en el mecanismo de regulación de la secreción de FSH. Ejerce un feedback negativo a nivel hipofisario, produciendo una menor secreción de FSH.

2.1.4 Útero

El útero es la fuente más importante de la prostaglandina F₂ (PG) en el ganado vacuno, la cual está asociada con la regresión del CL y con la recuperación del útero posparto. Después del celo, el útero secreta PG para inducir la regresión del CL y así iniciar un nuevo ciclo estral, si la vaca no se preña. En caso que la vaca resulte gestante, la liberación de la PG por el útero es inhibida y el CL se preserva para mantener la preñez (Hafez, 1989; Arthur y col.,1991).

2.2 Ciclo Estral

Se denomina ciclo estral a la serie de eventos que llevan a la ovulación (acompañada de síntomas de celo) y la formación del cuerpo lúteo. Dura en promedio 21 días, el celo dura entre 6 y 18 horas y la ovulación tiene lugar entre 24-30 horas después de comenzado el celo (Hafez. y Hafez, 2000).

El ciclo estral se puede dividir en tres fases (Hafez y Hafez, 2000):

- 1) Fase folicular o de regresión lútea (proestro)
- 2) fase periovulatoria (estro y metaestro)
- 3) fase luteal (diestro).

El día 0 del ciclo estral es el día del celo, signo visible a simple vista; sin embargo desde el punto de vista fisiológico, la descripción se realizará a partir de la destrucción del cuerpo lúteo y finalizará en la destrucción del cuerpo lúteo del próximo ciclo.

2.2.1 Fase folicular o de regresión lútea

Este período, cuya duración es de 3 días, comienza con la regresión del cuerpo lúteo del ciclo anterior y finaliza con la manifestación de celo. Al producirse la destrucción del cuerpo lúteo tenemos una caída en los niveles de progesterona y posteriormente una pérdida de tejido luteal, siendo la PG de origen uterino el principal luteolítico en los animales domésticos y en la mayoría de los roedores. Como consecuencia de la caída de los niveles de progesterona, disminuye el feedback negativo que dicha hormona tenía a nivel hipotalámico y comienzan a aumentar la frecuencia pulsátil de las hormonas gonadotróficas (FSH y LH) y se estimula el crecimiento folicular con el desarrollo de un gran folículo y el aumento en los niveles de estradiol. Cuando los estrógenos alcanzan cierto nivel, se estimula la receptividad al macho y comienza el período de celo o estro. Esta fase comienza con la receptividad al macho (se deja montar por vacas y toros), e

involucra todos los cambios que permiten la ovulación y comienzo de la formación del cuerpo lúteo.

2.2.2. Fase periovulatoria (estro y metaestro)

Durante el estro, cuya duración es de 18 ± 6 hs, la vaca manifiesta inquietud, ansiedad, brama con frecuencia y pierde el apetito; en el caso de las vacas lecheras, se reduce su producción. Las vacas presentan descarga de mucus con mínima viscosidad (filante), cuyo olor atrae y excita al toro (presencia de feromonas), edema de vulva y en el útero se produce un aumento del tono miométrial, detectado fácilmente por palpación transrectal. Durante esta fase, los estrógenos en altas concentraciones alcanzan el umbral de estimulación del centro cíclico hipotalámico, estimulando a las neuronas hipotalámicas a producir el pico de GnRH y en consecuencia el pico de LH. Con respecto a la FSH, disminuye su secreción, consecuencia del feedback negativo estrogénico y de la inhibina, con excepción del momento en que se produce el pico preovulatorio de LH, en que puede aparecer un pico de FSH. Posteriormente, 4 a 12 hs después de la onda de LH, se incrementan la concentración basal y la amplitud de los pulsos de FSH, relacionándose esto con la primera onda de crecimiento folicular. Luego de 12 a 24 hs de comenzado el celo, el sistema nervioso de la vaca se torna refractario al estradiol y cesan todas las manifestaciones psíquicas del mismo.

El período inmediato a la finalización del celo, es el metaestro. En este período ocurre la ovulación de la vaca, a diferencia de las otras especies que lo hacen durante el celo, y comienza la organización celular y desarrollo del cuerpo lúteo. La ovulación ocurre 28 a 32 hs de iniciado el celo y es desencadenada por el pico preovulatorio de LH. A la ovulación sigue hemorragia profunda y el folículo se llena de sangre convirtiéndose en cuerpo hemorrágico.

En la formación del cuerpo lúteo (luteinización) se producen una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que permiten que las células foliculares se transformen en células luteales, cambios que finalizan al séptimo día con un cuerpo lúteo funcional.

2.2.3. Fase luteal (diestro)

Esta fase se caracteriza por el dominio del cuerpo lúteo. El mantenimiento del cuerpo lúteo, así como la síntesis de progesterona está ligada a la hormona LH que es progesterotrófica y luteotrófica.

Otras hormonas que intervendrían en la síntesis de progesterona, son la FSH y la PG. La FSH se uniría a receptores ubicados en el cuerpo lúteo y provocaría un aumento en la secreción de progesterona. En lo referente a la PG además de estimular a las células luteales para producir progesterona, aumentaría el flujo sanguíneo a nivel ovárico con el efecto positivo que esto significa sobre la síntesis y secreción de progesterona.

Si el huevo no es fecundado, el cuerpo lúteo permanece funcional hasta el día 15-20, después del cual comienza a regresar en preparación para un nuevo ciclo estral.

(Ginther y col., 1989; Hafez, 1989).

2.3. Dinámica Folicular Bovina

Se conoce como dinámica folicular al proceso de crecimiento y regresión de folículos antrales que conducen al desarrollo de un folículo preovulatorio. Entre 1 y 4 ondas de crecimiento y desarrollo folicular ocurren durante un ciclo estral bovino, y el folículo preovulatorio deriva de la última. Para describir la dinámica folicular bovina es necesario definir conceptos de reclutamiento, selección y dominancia:

Reclutamiento: es el proceso por el cual una cohorte de folículos comienza a madurar en un medio con un aporte adecuado de gonadotrofinas que le permiten avanzar hacia la ovulación.

Selección: Es el proceso por el cual un folículo es elegido y evita la atresia con la posibilidad de llegar a la ovulación.

Dominancia: Es el proceso por el cual el folículo seleccionado domina ejerciendo un efecto inhibitorio sobre el reclutamiento de una nueva cohorte de folículos. Este folículo alcanza un tamaño marcadamente superior a los demás, es responsable de la mayor secreción de estradiol y adquiere la capacidad de continuar su desarrollo en un medio hormonal adverso para el resto de los folículos. La causa por la cual regresa el folículo dominante de las primeras ondas (1 de 2 ondas y 2 de 3 ondas) sería la presencia de una baja frecuencia de los pulsos de LH debido a los altos niveles de progesterona, que

provocarían una menor síntesis de andrógenos y en consecuencia una menor síntesis de estradiol que iniciarían la atresia folicular. (Ginther y col., 1989; Hafez, 1989).⁴

La dinámica de una onda de crecimiento folicular durante el ciclo estral consiste en una serie de procesos donde al final se desarrolla un folículo maduro llamado “dominante”, el cual tiene la capacidad de ovular.

El desarrollo de los folículos en los ovarios se inicia durante la vida fetal, alcanzando durante la madurez del animal una progresión dinámica de eventos que se suceden en ondas de crecimiento y regresión de esos folículos durante el ciclo estral.

El ganado bovino usualmente presenta 2 ó 3 ondas de crecimiento folicular durante un ciclo estral. Sin embargo, también se ha observado animales que presentan entre 1 y 4 ondas. Cada onda se caracteriza por la emergencia de un grupo de folículos con un diámetro de 4 mm que crecen por pocos días. Posteriormente, se produce la desviación folicular caracterizada porque el folículo más grande continúa creciendo y los otros regresan. El folículo que continua desarrollándose se lo denomina dominante e inhibe el crecimiento de los demás folículos, llamados subordinados. El crecimiento de los folículos pertenecientes a una onda es desencadenado por un aumento en la concentración de FSH, que comienza a disminuir cuando el folículo más grande tiene un diámetro de 4-5 mm. Posteriormente, a medida que se produce el crecimiento de los folículos, los niveles de FSH van disminuyendo a consecuencia de la inhibina producida por los mismos. A medida que se acerca el momento de la desviación folicular, el folículo de mayor tamaño secreta grandes cantidades de estradiol, lo que sumados a la inhibina generan un ambiente fuertemente inhibitorio sobre la secreción de FSH. El diámetro promedio del folículo de mayor tamaño al momento de la desviación folicular ha sido determinado en aproximadamente 8,5 mm, tiempo en el cual adquiere la capacidad de ser dominante. De esta forma, (Austin y col, 1999) han definido al folículo dominante como aquel que tiene un diámetro mínimo de 8,5 mm y una diferencia $\geq 1,5$ mm con respecto al folículo que le sigue en tamaño. La regresión de los folículos de menor tamaño al momento de la desviación folicular es atribuida a una inadecuada concentración de FSH; no obstante, esta baja concentración hormonal es requerida para el continuo crecimiento del folículo de mayor tamaño.

La LH estaría involucrada en el proceso de selección del folículo dominante; así, se ha observado un pequeño aumento transitorio, pero significativo, de dicha hormona en el momento de la desviación folicular para la primera y segunda onda de crecimiento folicular. Estos autores concluyeron que las células granulosas del folículo dominante adquieren receptores para LH justo antes de comenzar con la desviación folicular, lo que sumado al aumento transitorio de dicha hormona, constituye uno de los primeros pasos conocidos que pueden ser asignados a una cascada de eventos que conducen a la desviación folicular durante la continua disminución en los niveles de FSH. La LH, según el modelo propuesto por (Ginther y col., 1989) se uniría a los receptores de las células granulosas y se produciría estradiol; hormona que induciría importantes cambios en el mecanismo de desviación folicular, como son: un aumento de la actividad de la enzima aromatas, estimular la expresión de receptores para LH y aumentar la sensibilidad para las gonadotrofinas.

Otro factor que estaría involucrado 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); 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. Contrariamente, un aumento de la actividad proteolítica sobre el IGFBP 4-5 con la consecuente disminución del IGFBP 4-5 en el folículo dominante se traduciría en una mayor disponibilidad de los IGFs que permitirían el continuo crecimiento de dicho folículo. En coincidencia con esto Austin y col. (1999) determinaron que el folículo dominante tuvo la menor concentración de IGFBP 2, 4 y 5, observado en el 100% de los animales para los dos primeros y en el 83,3% para el último. Estos factores, tienen actividades parácrinas y autócrinas, las cuales incluyen un aumento en el crecimiento de las células, en la producción de estradiol y de la sensibilidad en las células granulosas a la FSH. (Ginther y col., 1989) en función de trabajos propios y revisados, establecieron que el aumento transitorio de LH estimula el sistema IGF y la esteroideogénesis. Al comienzo de la desviación folicular, el folículo de mayor tamaño es capaz de utilizar los bajos niveles de FSH, posiblemente potenciados por el efecto local del estradiol y del IGF-1. El segundo gran folículo no alcanza el desarrollo del folículo de mayor tamaño y en consecuencia no puede responder a los bajos niveles de FSH. Así, la desviación es establecida antes que el

segundo gran folículo pueda desarrollarse al estado que le permitiría asumir las características bioquímicas propias del folículo dominante. Complementando lo descrito precedentemente, (Austin y col., 1999) establecieron que el crecimiento folicular se caracteriza por: 1) aumento en el diámetro folicular, estradiol y al menos inicialmente en la producción de inhibina y activina A, 2) disminución en la concentración de folistatina y 3) mantenimiento de baja cantidades de IGFBPs y un bajo porcentaje de apoptosis en las células granulosas. Los folículos destinados a sufrir atresia se caracterizan por pérdida en la capacidad para producir estradiol y un aumento en la producción de IGFBPs. Con respecto a la folistatina, es una proteína que se fija a la activina; en consecuencia, cambios en su concentración podría alterar la cantidad de activina A biológicamente activa. De esta forma una menor concentración de folistatina produciría aumento de activina A que facilitaría el crecimiento folicular a pesar de los menores niveles circulantes de FSH. En síntesis, Austin y col. (1999) concluyeron que los cambios intrafoliculares más tempranos observados en el folículo destinado a ser dominante fueron un aumento en la capacidad para producir estradiol y un mantenimiento de bajos niveles de IGFBPs.

El número de ondas presentes en cada ciclo varía de 1 a 4. La mayor parte de las hembras presentan 2 ó 3 ondas. En un ciclo estral con 2 ondas de crecimiento folicular, la maduración del segundo folículo dominante coincide con la regresión del cuerpo lúteo y culmina con ovulación del mismo. En otros casos se presentan 3 ondas de crecimiento folicular y coinciden con un ciclo estral de mayor duración, debido a que se posterga el celo al no ovular el segundo folículo dominante y, en consecuencia, el tercer folículo requiere de un tiempo para madurar y poder ovular. La tasa de crecimiento (mm/día) del folículo dominante es mayor en la primera onda de crecimiento folicular que aquella que se desarrolla en la mitad de la fase luteal, indicando que el nivel de progesterona afecta dicha tasa de crecimiento, tal cual fue observado por Callejas y col. (1995)

Al producirse la luteólisis, se produce un aumento en la frecuencia de liberación de LH y FSH, permitiendo que el folículo dominante de la última onda de crecimiento continúe su desarrollo y ovule.

2.4. Hormonas que intervienen en la reproducción

2.4.1. Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)

La aplicación de la GnRH y sus análogos se basa principalmente en su habilidad para estimular y producir picos de LH y FSH desde la hipófisis anterior. Este pico de LH induce ovulación en vacas, cuyas ondas preovulatorias de LH son muy cortas (Hafez, 1989).

2.4.2. Hormona Folículo Estimulante (FSH)

Estimula el crecimiento y la maduración de los folículos de Graaf, representando el factor principal para inducir el crecimiento en el ovario (Hafez, 1989). En presencia de la LH estimula la producción de E2, a partir de las células de la granulosa del folículo (Morrow, 1986). La estimulación vista en los folículos después del tratamiento con GnRH se da más bien por la liberación de FSH que este produce (Cline, 2002).

2.4.3. Hormona Luteinizante (LH)

Los niveles basales de LH actúan junto a la FSH para inducir la producción de E2 de los folículos en desarrollo (Hafez, 1989). Estimula la secreción de P4 a partir de las células luteínicas del ovario. La ovulación de folículos maduros, maduración de ovocitos y formación y mantenimiento del CL, son las principales funciones de la LH (Morrow, 1986).

2.4.4. Estrógenos

Los estrógenos se producen en la teca interna y las células de la granulosa del folículo ovárico, con el control de la FSH y la LH. Son responsables del comportamiento estral, aunque pequeñas cantidades de P4 o una preexposición a la misma, potencia su efecto. Estimulan la actividad miométrial y sensibilizan al útero a los efectos de la PG y oxitocina durante el estro y el parto, además de participar en la maduración del folículo de Graaf y provocan el pico preovulatorio de LH (Morrow, 1986).

2.4.5. Progesterona

La progesterona (P4) es producida por el CL del animal cíclico y por el CL y la placenta durante la gestación, siendo necesaria para el mantenimiento de la preñez (McDonald, 1991).

2.4.6. Prostaglandinas

Las prostaglandinas son compuestos derivados del colesterol y el ácido araquidónico es el precursor de las prostaglandinas más relacionadas con la reproducción, en particular la PG y PGE (Hafez y Hafez, 2000), las cuales son producidas en el útero (McDonald, 1991). La PG tiene efecto luteolítico en animales domésticos y esta capacidad ha sido explotada extensivamente como una herramienta para manipular el ciclo estral en los animales domésticos (Morrow, 1986).

3. PROTOCOLOS DE SINCRONIZACIÓN DE CELO

La sincronización de celo y ovulación en un grupo de hembras permite predecir el momento del estro con una seguridad razonable (Britt, 1984). Esto reduce el tiempo requerido para su detección o en algunos casos hace posible la inseminación en un momento fijo sin la detección del estro (Hafez y Hafez, 2000). El control de los eventos reproductivos puede lograrse a través de la administración farmacológica de agentes biológicos activos, los cuales están basados o son hormonas naturales que la hembra bovina produce y libera en diferentes momentos de su ciclo estral (Cline, 2002).

Los protocolos de sincronización de celo que se utilizan en bovinos se dividen en cuatro grandes categorías:

1. Protocolos que regulan el cuerpo lúteo (PG y sus análogos)
2. Protocolos que regulan las ondas foliculares (GnRH y sus análogos y estrógenos)
3. Protocolos que crean una fase luteal artificial (Progesterona y progestágenos)
4. Combinaciones de estos protocolos.

3.1. Protocolos que regulan el cuerpo lúteo (PG y sus análogos)

Desde que se descubrió que al suprimirse la liberación de P4 por el CL se activaban los mecanismos que desencadenaban la ovulación (Hansel y col., 1961) y que la PG producida por el útero provocaba la luteolisis (Gutknecht y col., 1969), la regulación de la fase luteal del ciclo estral fue el primer método de sincronización de celos (Inskoop, 1973).

El requisito fundamental para que las hembras respondan adecuadamente a los protocolos con PG es que se encuentren ciclando, ya que la presencia de un cuerpo lúteo es necesaria para que la PG ejerza su acción, los protocolos basados solamente en el uso de PG no son efectivos en vacas en anestro (Day, 1998). Estudios realizados por Nelson (1978) demostraron que el CL de la vaca permanece, durante los 3 a 4 primeros días de existencia, relativamente libre del efecto luteolítico de la PG; sin embargo a partir del 5° día ésta puede provocar una regresión luteal. La aplicación de esta droga alrededor del día 16 o 17 del ciclo, no ocasionaría ningún desplazamiento del estro siguiente, ya que en ese punto ocurre la liberación de PG endógena y la luteólisis ya ha comenzado. Ya que un cuerpo lúteo es necesario para que la PG ejerza su acción, los protocolos basados solamente en el uso de PG no son efectivos en vacas en anestro ni en vaquillonas prepúberes (Day, 1998). Por otra parte, en vacas en lactación la respuesta a ésta hormona es más errática que en vaquillonas (Cavestany, 2002).

El tratamiento con PG puede ser empleado con distintos protocolos, que incluyen 1 o 2 dosis por animal seguidas por la inseminación con o sin previa detección de celo.

La utilización del tratamiento con 1 dosis de PG permite ahorrar la mitad del sincronizante empleado que en los tratamientos convencionales con 2 inyecciones. El porcentaje de respuesta, tras una sola inyección de PG entre los días 7 a 16 es de 60-70 % (Cavestany, 2002). A nivel nacional, Cavestany (1995) y Cavestany y col. (2006) reportaron con una dosis de PG en vacas y vaquillonas Holando niveles de celo inducido entre un 50-60%. Bosch y col. (1976) y Alberio (2003) sugieren que la PG, administrada en un programa de 2 inyecciones con un intervalo de 11 días, puede constituirse en un eficiente método para controlar el estro en vaquillonas cuyos ciclos sexuales se distribuyen al azar. La aplicación de la segunda dosis produce la luteólisis en aquellos animales que no respondieron a la primera aplicación (por encontrarse en fases donde la PG no ejerce su acción luteolítica) ya

que los mismos al momento de la segunda dosis presentaran un CL funcional y por lo tanto responderán al efecto luteolítico de la PG. Cooper (1974), Nelson (1978) y Bavera (2000) utilizando dos dosis de PG aplicadas con un intervalo de 10-12 días, encontraron que era posible obtener una sincronización de celo prácticamente en todos los casos, o al menos, en aquellos en que había un ciclo normal. Esto explica que los animales al momento de la segunda inyección (10 a 12 días posteriores) tendrán un CL funcional, por lo que la luteólisis, luego de la segunda dosis de PG, será del 90% a 100%, siempre que el rodeo esté ciclando regularmente y posea un buen plano nutricional.

En vacas en producción los cambios metabólicos y hormonales asociados con la lactación alteran el desarrollo folicular del ovario con reducción de los niveles de E2 y alteración del patrón de desarrollo folicular (De la Sota y col., 1993), por lo que entran en celo más tarde que vaquillonas y vacas no lactando. Debido a esto un intervalo de 14 días entre inyecciones en vacas en producción resultan en un mayor porcentaje de preñez y disminución de días abiertos (Ferguson y Galligan, 1993). Como animales que no han culminado su desarrollo presentan ciclos estrales de más corta duración, se ha recomendado un intervalo de menor duración en vaquillonas (Cavestany, 2002).

La utilización de PG para la sincronización de celos no tiene suficiente precisión como para obtener un porcentaje de concepción aceptable si se quiere combinar con IATF. Esto se debe a que éste tratamiento no sincroniza el crecimiento folicular y la onda preovulatoria de LH (Larson y Ball, 1992).

3.2. Protocolos que regulan las ondas foliculares (GnRH y sus análogos y estrógenos)

La inyección de GnRH o sus análogos seguida por la administración de PG 7 días más tarde ha sido bastante efectiva en la sincronización de celos (Tatcher y col., 1989; Twagiramungu y col., 1995; Wolfenson y col., 1994). En contraste con la sincronización con PG solamente, la combinación de GnRH y PG tiene la ventaja de sincronizar el desarrollo folicular, la secreción de estradiol y la luteólisis en una manera secuencial, lo cual contribuye a una mayor precisión en la manifestación de celo.

3.2.1. Ovsynch

Pursley y col., (1997) desarrollaron un esquema de sincronización de ovulación con GnRH para IATF (Ovsynch). La primera inyección de GnRH es seguida de una inyección de PG 7 días más tarde y una segunda inyección de GnRH 48 horas más tarde. El protocolo Ovsynch ha sido mucho más eficaz en vacas lecheras en lactancia que en vaquillonas. A pesar de que se desconoce la causa de esta discrepancia, la ovulación luego de la primera inyección de GnRH ocurrió en el 85% de las vacas pero solo en el 54% de las vaquillonas. Además, 19-20% de las vaquillonas mostraron estro antes de la inyección de PG, lo cual redujo dramáticamente la fertilidad a la IATF. Resultados de laboratorios de estos autores confirmaron que el tratamiento con GnRH provoca la ovulación del folículo dominante solo en el 56% de las vaquillonas y por lo tanto, no induce de manera uniforme la emergencia de una nueva onda folicular. Esto resulta en bajas tasas de preñez en vaquillonas luego de la IATF. Se ha demostrado que el estadio del ciclo estral al momento del inicio del programa Ovsynch afecta la tasa de preñez. Los animales en los que se inicia un programa Ovsynch entre los días 1 y 4 o los días 13 y 17 del ciclo tienen tasas de preñez mucho más bajas que los que se inician en otros momentos. Cuando se comienza el programa Ovsynch durante el metaestro, puede que el folículo dominante no responda al tratamiento inicial con GnRH y comience a sufrir atresia al momento aproximado en que se inyecta la PG. Los días 13 a 17, el folículo dominante de la segunda onda puede no ovular en respuesta al primer tratamiento con GnRH y ante la ausencia de la ovulación, la PG endógena podría causar luteolisis y ovulación temprana del folículo dominante (en relación a la IATF) causando por lo tanto infertilidad. Ovsynch fue el primer protocolo desarrollado para sincronizar la ovulación satisfactoriamente para permitir una IATF en vacas en lactación (Pursley y col., 1995). Desafortunadamente, las vaquillonas de razas lecheras responden pobremente al Ovsynch, mostrando porcentajes de preñez por IA de 20% a 40% menores que las vaquillonas inseminadas a celo visto (Schmitt y col., 1996; Pursley y col., 1997a). Hay diferencias en la dinámica folicular entre vacas lactantes y vaquillonas. Las vaquillonas tienen una tasa más rápida de crecimiento folicular que las vacas en lactación (Pursley y col., 1995), y una alta frecuencia de ciclos con tres ondas foliculares (Savio y col., 1988). Estos factores pueden reducir la frecuencia de vaquillonas que sincronizan exitosamente después de la primera dosis de GnRH del protocolo Ovsynch (Pursley y col., 1997b). El protocolo Ovsynch también es utilizado para la resincronización, ya que la primer dosis de

GnRH es inocua para las vacas preñadas (Chebel y col., 2003), por lo que puede ser dada a todos los animales aproximadamente una semana antes del diagnóstico de gestación. Las vacas que se diagnostican vacías pueden ser inyectadas con PG y a las 48 horas inyectadas con una segunda dosis de GnRH antes de la IATF. Si el diagnóstico a través de ultrasonografía es realizado por ejemplo al día 28 post inseminación, la reinseminación se realizaría al día 30 o 31 (Chebel y col., 2003).

3.2.2. Presynch

La presincronización con una o dos dosis de PG con 14 días de diferencia y comenzar el programa Ovsynch 12 o 14 días después de la segunda dosis de PG mejora las tasas de preñez (Bartolome y col., 2001) (Moriera y col., 2001). En un estudio reciente se noto que la presincronización con PG aumento la tasa de preñez en 11% a 13% en bovinos de leche LeBlanc, (2001). Se han investigado los efectos de la presincronización con PG antes de un protocolo Cosynch sobre la sincronía de celo, el CL, los diámetros foliculares preovulatorios y la tasa de preñez luego de la IATF en vaquillonas de carne (Colazo y col., 2001). La presincronización redujo la proporción de vaquillonas en celo antes de la IATF, lo cual sugiere que este enfoque podría ser útil en la aplicación exitosa de programas Cosynch u Ovsynch en vaquillona.

3.2.3. Heatsynch

Uno de los usos del E2 como parte de los sistemas de sincronización de celo es su capacidad para inducir el pico de LH mediante la estimulación de GnRH a nivel hipotalámico (Thatcher y col., 2001). El método consiste en una inyección de GnRH, seguida a los 7 días por una inyección de PG y una inyección de E2 24 horas después de la PG. Los tratamientos a base de E2 durante el diestro tardío y el proestro (bajos niveles de P4) inducirán el pico preovulatorio de LH y FSH (Kinder y col., 1991; Stumpf y col., 1991). El pico preovulatorio inducido por la inyección de E2 en el proestro dura aproximadamente 10 horas (Short y col., 1979), lo que es similar al pico espontáneo. De hecho, este pico de LH es de una mayor duración a aquel inducido por la GnRH. El estro se presenta a las 29.0 ± 1.8 horas después de la inyección de E2.

3.2.4. *CoSynch*

Este protocolo de sincronización de la ovulación es igual al Ovsynch, pero la diferencia está en que la IATF se realiza el mismo día que se administra la segunda inyección de GnRH, con lo que se disminuye el movimiento del ganado a tres oportunidades (Geary y Whittier, 1999). DeJarnette y Marshall (2003) y Portaluppi y Stevenson (2005) reportan con el uso del protocolo Cosynch en vacas en ordeño una concepción de 23%.

3.2.5. *SelectSynch*

Es usado para sincronizar el estro más que la ovulación, por lo que igual requiere de la detección del mismo. Consiste en una primera inyección de GnRH, que causa la ovulación y la ocurrencia de una nueva onda folicular, seguida 7 días después por una inyección de PG para regresar el CL formado. El folículo podrá ovular naturalmente sin que sea necesaria la aplicación de una segunda dosis de GnRH. Posteriormente se realiza detección de celo e IA luego de las 12hrs de detectado el mismo (Thatcher y col., 2001). La mayoría de las vacas ciclando entran en celo luego de las 36 a 71 hrs después de la inyección de PG. Si no se realiza un programa de presincronización, algunas vacas pueden entrar en estro antes de la inyección de PG (Thatcher y col., 2001).

3.3. Protocolos que crean una fase luteal artificial (Progesterona y progestágenos)

3.3.1. *Progesterona y Progestágenos*

Las vacas con altas concentraciones de P4 antes de la inyección de PG para sincronizar el estro tienen tanto una tasa de detección de celos mayor (Rosenberg y col., 1990), como una tasa de concepción más alta (Folman y col., 1990).

La P4 natural y varios progestágenos sintéticos han sido utilizados para extender la fase luteal del ciclo estral y poder sincronizar el celo en bovinos (Dick, 1998). Se da el nombre genérico de progestágenos a un grupo de compuestos que tienen acción similar a la P4; dentro de estos compuestos se encuentran los progestágenos de administración oral como el Acetato de Melengestrol (MGA), los implantes subcutáneos de Norgestomet y los

dispositivos intravaginales con progesterona natural (Bo y col., 1998) o progestágenos (Medroxiprogesterona, MAP; Cavestany, 2000). Estos actúan simulando la acción de un CL natural, bloqueando la liberación de GnRH por el hipotálamo y el pico preovulatorio de LH durante el período de permanencia del implante. Otra característica de los progestágenos es que la sincronización que logran es más compacta que la obtenida con PG, por lo que facilitan la implementación de la IATF (Scena, 1998). Los tratamientos largos con progestágenos (más de 14 días) permiten la regresión espontánea del CL, logran una excelente sincronización de los celos, pero el porcentaje de concepción disminuye; la razón de esta disminución de la fertilidad es el resultado de un crecimiento folicular anormal (Lucy y col., 1990; Sirois y Fortune, 1990) que resulta en la formación de folículos persistentes envejecidos (Sanchez y col., 1993; Mihm y col., 1994; Anderson y col., 1995; Thatcher y col., 2001). Wiltbank y Kasson (1968) y Roche (1974a, 1974b) encontraron que animales tratados con progestágenos por menos de 14 días no redujeron sus porcentajes de concepción. Los tratamientos de sincronización en los cuales se incluye una fuente de P4 (Crestar o Norgestomet, CIDR, esponjas intravaginales con MAP), dan mejores resultados (Cavestany y col., 1997).

La utilización de P4 y estrógenos (E2) para suprimir el desarrollo del folículo dominante y de ésta manera sincronizar el desarrollo de una nueva onda folicular fue investigada en varios experimentos (Bo y col., 1995; Bo y col., 1996). Las conclusiones más importantes fueron que el tratamiento con progestágenos y estradiol-17 beta, administrados en cualquier momento del ciclo estral inducen el crecimiento sincrónico de una nueva onda folicular, aproximadamente 4 días más tarde (Bo y col., 1995). La administración de progestágenos es un método efectivo para el tratamiento del anestro y es una de las más importantes ventajas de su inclusión en protocolos de sincronización en vacas en anestro. La terapia con progestágenos no solo soluciona la falta de expresión de estro a la primer ovulación e induce una fase lútea normal en lugar de corta, pero también tiene un rol específico en aumentar la frecuencia de los pulsos de LH, con esto ayuda a aumentar el número de animales que ovulan (Mackey y col., 2000). Este aumento en la pulsatilidad de LH estimula el desarrollo del folículo dominante. Los progestágenos también hacen una estimulación en los centros hipotalámicos para la expresión de estro y la liberación de GnRH que induce el pico de LH. La remoción de la fuente de progestágeno es seguida por estro, ovulación y una

fase lútea de duración normal en un gran porcentaje de animales tratados (Rhodes y col., 2003). Este protocolo se basa en la administración oral de MGA durante 14 días y la inyección de PG 17 días después de finalizada la suplementación con MGA (Brown y col., 1988). El estro se presentará en los 7 días siguientes a la finalización de la suplementación (Patterson y col., 1989; Odde, 1990; King y Odde, 1993) y es de baja fertilidad debido a la larga duración del tratamiento con progestágenos por lo que las hembras no serán servidas en éste estro. La inyección de PG 17 días después de la última suplementación con MGA (aproximadamente 10 a 16 días después del estro infértil), cuando la mayoría de las hembras están en la mitad de su ciclo estral, induce un celo de alta fertilidad (Day, 1998). Un mayor conocimiento de la dinámica folicular revela que la persistencia del folículo dominante era la causa para la baja fertilidad. Posteriormente se desarrollaron programas que controlan el desarrollo folicular, el largo de la fase lútea y el momento de la ovulación (Lucy y col., 2004).

Los niveles plasmáticos de P4 en vacas, luego de ser tratadas con una fuente exógena de progesterona han sido estudiados principalmente con el uso de CIDR y acetato de melengestrol. Recientemente se realizaron ensayos que determinaron la concentración de progesterona plasmática, luego de la inserción de dispositivos intravaginales con 0.5 y 1.0 g de progesterona por 7 días, y con la utilización de CIDR también por 7 días en vacas ovariectomizadas (Cutaia y col, 2003). En dicho ensayo, los niveles máximos de P4 se obtuvieron a las tres horas de haber colocado el dispositivo, y con valores de 7,5 ng/ml para el DIB; y de 7.0, y 6,0 ng/ml para el CIDR de 0,5 g y 1,0 g respectivamente. Para estos tres ensayos las concentraciones de P4 se mantuvieron por encima de 1 ng/ml hasta el día 7 en el que se retiró el dispositivo.

También se han determinado niveles de progesterona en vacas en anestro, primíparas a la 3ª semana post parto de raza Fresian y Jersey, luego de la colocación de un CIDR por 5 días (Nation y col, 2000). En este estudio los niveles de P4 eran de 2,8 ng/ml a los 45 minutos posteriores a la aplicación del dispositivo, se mantuvo así las 5 horas siguientes, presentando la mayor concentración plasmática de la hormona a las 24 horas con 4,0 ng/ml. Estos niveles descendieron al cuarto día (2,6 ng/ml), permaneciendo igual al quinto día en el que se retiró el CIDR; a las 4 horas los niveles eran de 0,3 ng/ml. Trabajos similares al

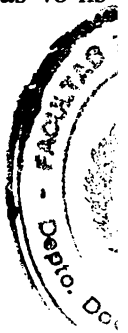
anterior en vacas en anestro mostraron la mayor concentración de P4 en plasma a las 48 hs con niveles de 2,5 ng/ml (Macmillan y col, 2001).

3.4. Combinación de estos protocolos

3.4.1. Combinación de progestágenos y GnRH

Alternativamente, los progestágenos pueden ser usados conjuntamente en tratamientos con GnRH y PG para asegurar una fuente de P4, prevenir ovulaciones prematuras y activar la respuesta cíclica en vacas en anestro (Thatcher y col., 2001). Ha sido desarrollado un protocolo con el objetivo de acortar el período de administración de P4 sin comprometer la fertilidad y mejorar la sincronización del estro al sincronizar el desarrollo folicular. En esencia la suplementación con P4 por 7 días y la PG al día 7 sincronizan el desarrollo folicular y la inyección de GnRH al día 11 induce la ovulación, desarrollo del CL, emergencia de una nueva onda folicular, entonces la PG administrada al día 18 inducirá la regresión del CL coincidentemente con el desarrollo del folículo dominante sincronizado (Kojima y col., 2000). El uso de PG para inducir la luteólisis durante el tratamiento con P4 acorta el periodo de exposición a la P4 y previene la disminución en las tasa de concepción después de los tratamientos con P4 (Macmillan y Peterson, 1993). Un protocolo Ovsynch modificado con el agregado de un implante de Norgestomet entre el día 0 y 7 del mismo fue probado por Stevenson y col. (1997) en vacas de carne en anestro y -ciclado, obteniendo una tasa de preñez de 62% y 59% respectivamente. Por lo tanto, al iniciar el protocolo Ovsynch en un ambiente alto en P4 se incrementa la fertilidad del tratamiento (Murugavel y col., 2003).

Una de las soluciones para mejorar la respuesta a la sincronización es presincronizar a los animales con dos dosis de PG 26 y 12 días antes de la primer dosis de GnRH, para que se encuentren en una etapa favorable del ciclo al comienzo del protocolo Ovsynch, de esta manera aumentamos el porcentaje de animales que responderán de buena forma a la sincronización, evitando ovulaciones prematuras u ovulaciones de ovocitos envejecidos.



3.4.2. *Combinación de progestágenos y E2*

En protocolos de sincronización, los estrógenos se utilizan en la forma natural (17- β estradiol) o sus derivados, sales de benzoato de estradiol o cipionato de estradiol. El agregado de E2 exógeno a los programas de sincronización mejora la expresión del celo. La inducción del estro conductual es un uso frecuente del E2, pero aunque la administración del mismo puede inducir un pico preovulatorio de LH, éste no siempre resulta en ovulación, ya que la maduración folicular crítica necesaria no es estimulada por éste.

El tratamiento con E2 exógeno causa atresia del folículo dominante existente y sincroniza la emergencia de la onda folicular en vacas cíclicas tratadas con P4 (Bo y col., 1995). El intervalo a la emergencia de una nueva onda folicular es dependiente de la dosis y del momento del tratamiento en relación a la emergencia del folículo dominante (Diskin y col., 2002; Burke y col., 2003). El efecto supresor del E2 sobre el desarrollo folicular está bien documentado (Bo y col., 1994; Burke y col., 2000; Martínez y col., 2005).

El E2 también causa regresión luteal cuando se inyecta temprano en el ciclo estral (Lucy y col., 2004). Las vacas inseminadas siguiendo el protocolo de heatsynch tienen mayores porcentajes de concepción, es posible que el E2 suplementario durante el proestro beneficie la fertilidad en vacas lecheras de alta producción (Cerri y col., 2004).

Los principales componentes de éste programa son: la inserción de un dispositivo liberador de P4 intravaginal por 7 a 8 días que inducirá la aparición del ciclo estral en vacas en anestro luego de su retiro (Fick y col., 1997) y provee suficiente P4 para prevenir la aparición del estro. Una inyección de E2 al momento de la colocación del dispositivo vaginal, inducirá la atresia de los folículos, resultando en la emergencia de una nueva onda folicular aproximadamente 4 días después (Bo y col., 1995; Bo y col., 1996; Burke y col., 1997a; Burke y col., 1997b). La inyección de PG al momento que es removido el dispositivo causa la regresión del CL presente y una segunda inyección de E2 24hrs después para inducir estro y ovulación en vacas en anestro (Mc Dougall y col., 1992; Macmillan y col., 1995; Day y col., 1997; Fick y col., 1997) y para mejorar la precisión de la sincronización en vacas cíclicas y en anestro (Day y col., 1997; Martínez y col., 1998).

4. RESINCRONIZACIÓN

Existen muchas combinaciones de tratamientos, pero la mayoría de los mismos consisten en inyecciones de E2 los días 13 y 20 luego de la IATF, con o sin la adición de un progestágeno entre ambas inyecciones. El E2 al día 13 provoca la regresión del folículo dominante y reinicia una nueva onda folicular. La otra inyección al día 20 sincroniza las ovulaciones para que estas ocurran entre las 24 y 48 horas siguientes. La adición de un progestágeno puede mejorar la sincronía de ese celo al impedir ovulaciones prematuras (Cavestany, 2002). La inyección de E2 al momento de la inserción y de la remoción de la fuente de P4 aumenta la probabilidad de identificar las vacas vacías alrededor de 2 días después de la segunda inyección de E2 (Macmillan y col., 1997). Una de las interrogantes acerca de la resincronización de los retornos es si ésta podría afectar la preñez en curso. Stevenson y col. (2003) en cuatro ensayos realizados, no encontraron evidencia de que la implementación de un protocolo de resincronización pudiese interrumpir preñeces tempranas. Esta aseveración fue válida tanto para vacas como para vaquillonas. Macmillan y col., (1997) encontraron que la preñez no se vio afectada luego de la administración de E2 los días 12, 13 y 14 luego de una IA, así como la inserción y remoción de un CIDR® usado no comprometió la capacidad del CL de producir P4 o mantener preñeces que ya estaban establecidas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS



El presente trabajo consistió en 3 ensayos, lo cuales fueron realizados en el tambo experimental de INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay; entre el 15 de mayo y 26 de junio de 2006.

5.1. Ensayo 1

La determinación de los niveles sanguíneos de P4, se realizó en 4 vacas, boca llena, secas, de 550 a 600 Kg de peso vivo y 3,5 de condición corporal (escala de 1 a 5 de Edmonson y col., 1989). Estos animales fueron ovariectomizados 30 días antes del comienzo del ensayo. Se tomo una muestra de sangre de cada una de las vacas mediante punción yugular 24 hs después de la ovariectomía.

El día 0 del protocolo, se realizó la inoculación subcutánea de 100 mg de una progesterona natural en base oleosa (4-pregnano-3.20-diona, Progesterona; Laboratorio Río de Janeiro, Argentina). Dicha inoculación fue realizada por el mismo operario en todas las vacas a nivel del cuello. La extracción de sangre se realizó en todas las vacas con la siguiente frecuencia: una muestra previa a la inoculación de P4 para la determinación de niveles basales; luego cuatro extracciones: a la hora, a las cuatro, ocho y doce horas. El día dos, se realizaron tres extracciones; una a las 24 horas de la primera, la segunda 6 horas más tarde y la tercera a las 6 horas. Los 7 días siguientes se extrajeron 2 muestras cada 12 horas. El esquema de sangrados, se muestra en la figura 1.

Las muestras de sangre se obtuvieron en tubos heparinizados y al vacío mediante punción yugular. Las muestras fueron centrifugadas dentro de los 30 minutos de obtenidas a 3000 RPM durante 15 minutos. El plasma fue obtenido utilizando pipetas Pasteur y almacenado en crioviales a temperatura de -20°C hasta su análisis. La determinación de progesterona plasmática fue analizada por radioinmunoanálisis (RIA) con un Kit comercial (Coat-a-Count, DPC, USA).

Ovariectomía

Sangrados Sangrados Sangrados Sangrados

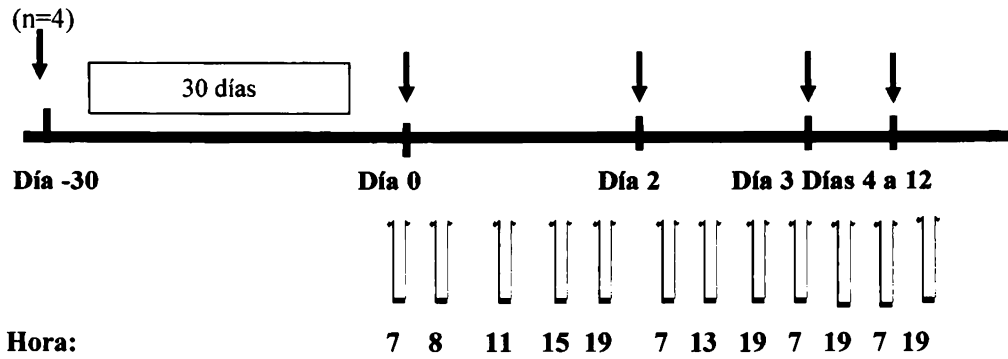


Figura 1. Esquema de sangrados realizados en vacas previamente ovariectomizadas

5.2. Ensayo 2

Para este ensayo se utilizaron 111 vaquillonas de raza Holando, de 22.2 ± 0.4 meses de edad, 373.5 ± 4.1 Kg de peso y de 2.7 ± 0.04 (media \pm EEM) de condición corporal, (escala de 1 a 5 de Edmonson y col., 1989), las cuales se dividieron en dos grupos. El primer grupo con 55 vaquillonas fue sometido a un protocolo Ovsynch (Ov) para sincronización de celo. El segundo grupo de 56 animales fue sometido a un protocolo Ovsynch modificado (OVm), con la adición de 100 mg de progesterona administrada por vía subcutánea.

Los tratamientos se realizaron en base a una combinación de 10 mg de Buserelina (GnRH) y 150 mg de Cloprostenol (PG) (Laboratorio Río de Janeiro, Argentina). De acuerdo al siguiente esquema:

Grupo 1: Ovsynch (n=55)

- *Día 0*: Inyección de GnRH
- *Día 7*: Inyección de PG
- *Día 9*: Inyección de GnRH
- *Día 10* (15 horas después de la inyección de GnRH): IA sin detección de celo

Grupo 2: Ovsynch modificado con P4 parenteral (n = 56)

- *Día 0:* Inyección de GnRH + inyección subcutánea de 100 mg de análogo de progesterona en base oleosa
- *Día 7:* Inyección de PG
- *Día 9:* Inyección de GnRH
- *Día 10* (15 horas después de la inyección de GnRH): IA sin detección de celo

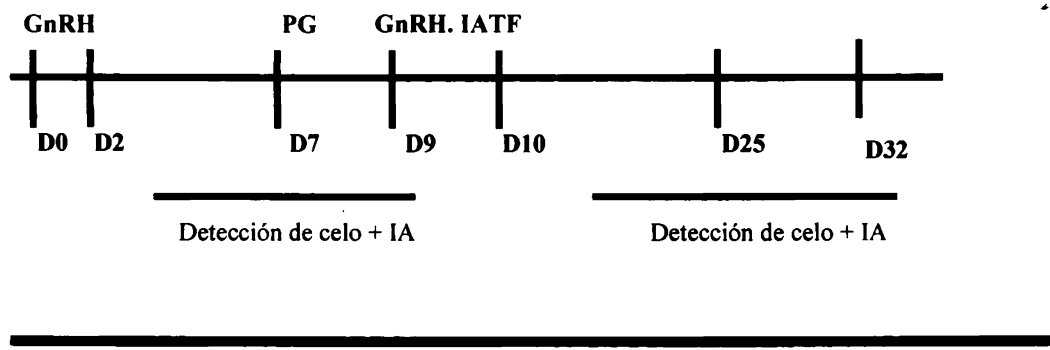
En ambos grupos, al día 0 del protocolo se realizó ultrasonografía ovárica para comprobar la actividad ovárica en las vaquillonas y determinar el diámetro del folículo dominante y la presencia de un cuerpo lúteo (CL). Dicha ultrasonografía se repitió al día 7 para observar cambios en la dinámica folicular. Se utilizó un ecógrafo Aloka 500 (Aloka CO. Ltd., Tokio, Japón) con un transductor lineal rectal de modo B, de tiempo real, con una frecuencia de 5 MHz.

Se extrajeron muestras de sangre en los dos grupos al día 0 y 7 para la determinación de progesterona. Las muestras de sangre se obtuvieron en tubos heparinizados y al vacío mediante punción yugular. Las muestras fueron centrifugadas dentro de los 30 minutos de obtenidas a 3000 RPM durante 15 minutos. El plasma fue obtenido utilizando pipetas Pasteur y almacenado en crioviales a temperatura de -20°C hasta su análisis. La determinación de progesterona plasmática fue analizada por radioinmunoanálisis (RIA) con un Kit comercial (Coat-a-Count).

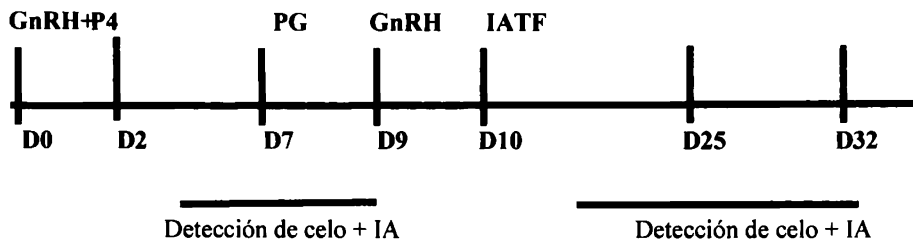
Los tratamientos se realizaron en dos días, para evitar que un elevado número de animales a inseminar en el día de la IATF pudiera afectar la respuesta. Todos los tratamientos se realizaron de tarde y la IATF se realizó de mañana. La inseminación artificial fue llevada a cabo por el mismo operario en todas vaquillonas. Luego de los 4 días de la administración de la primera GnRH se comenzó a detectar celos dos veces por día, inseminándose las vaquillonas que presentaron celo, sobre la base del esquema AM/PM, es decir los animales detectados en la mañana se inseminaban en la tarde y viceversa. La detección de celos continuó hasta los 25 días posteriores a la IATF. Se realizó un diagnóstico precoz de

gestación mediante ultrasonografía a los 30 días. Ambos protocolos se sintetizan en la figura 2.

GRUPO 1: Ovsynch (n=56)



GRUPO 2: Ovsynch MODIFICADO + P4 (n = 55)



Abreviaturas:

- GnRH: Acetato de Buserelina. Dosis: 2.5 cc intramuscular.
- PG: Cloprostenol. Dosis: 2 cc intramuscular.
- P4: Progesterona 40. Dosis: 10 cc subcutáneo.
- IATF: Inseminación artificial a tiempo fijo.

Figura 2. Protocolo de sincronización de estro para el grupo 1 (Ovsynch) y grupo 2 (Ovsynch + P4)

5.3. Ensayo 3

Se utilizaron 26 vaquillonas de 36.6 ± 0.3 meses de edad, 497.8 ± 9.3 Kg de peso, y 2.6 ± 0.1 de condición corporal (escala de 1 a 5 de Edmonson y col., 1989), a las cuales se le inyectó una dosis de 150 mg de Cloprostenol (PG) (Laboratorio Río de Janeiro, Santa Fé, Argentina).

El día 0 del protocolo se administró 2 cc intramuscular de PG. Entre los días 1 y 6 se realizó la detección de celo dos veces por día, inseminándose las vaquillonas que presentaron celo, sobre la base del esquema AM/PM, es decir los animales detectados en la mañana se inseminaban en la tarde y viceversa.

Se detectó celo entre los días 15 y 23 luego de la primera inseminación para detectar retornos. Se realizó ultrasonografía entre los días 25 y 30 luego de la inseminación para determinar preñez. Se utilizó un ecógrafo Aloka 500 (Aloka CO. Ltd., Tokio, Japón) con un transductor lineal rectal de modo B, de tiempo real, con una frecuencia de 5 MHz.

5.4. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el procedimiento Proc Freq (SAS, Statistical Analysis System, V 8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2003)) y las frecuencias comparadas por el test de chi-cuadrado.

6. RESULTADOS

6.1. Ensayo 1

En todas las vacas ovariectomizadas utilizadas para el ensayo, las concentraciones plasmáticas de progesterona en las muestras de sangre tomadas luego de la ovariectomía y previo a la inoculación de P4 parenteral, se encontraron en valores $\leq 0,02$ ng/ml, o sea por debajo de los niveles basales de 1 ng/ml, indicando que podían ser utilizadas para el ensayo. A la hora de la inoculación aun no se apreciaron cambios en los niveles de P4 en plasma. En la tercer muestra, a las cuatro horas, ya se encontraban niveles por encima de 1 ng/ml (concentración promedio de todas las vacas 1,67 ng/ml), alcanzando el pico de mayor concentración a las 8 h (2,005 ng/ml), que coincide con el máximo valor de P4 en tan solo una vaca (2,26 ng/ml). Las concentraciones plasmáticas de progesterona fueron descendiendo, llegando a valores por debajo de los basales a las 48 h y continuaron en descenso hasta las 106 h (0,34ng/ml); de ahí en más, los valores de progesterona se mantuvieron constantes en el rango de 0.28 ng/ml hasta el final del ensayo a las 232 hs. En la figura 3 se muestran estos resultados. Existieron diferencias individuales, en donde una vaca alcanzó su pico máximo de progesterona en plasma a las 8 h (2,26 ng/ml), a las 12 h ya presentaba niveles de 0,68 ng/ml. Las tres vacas restantes tuvieron la máxima concentración de progesterona a las 12 h, (1,74; 1,90; y 3,12 ng/ml). Estas últimas tres vacas presentaron valores menores a 1 ng/ml a las 60 h. En la figura 4 se muestran estos resultados.

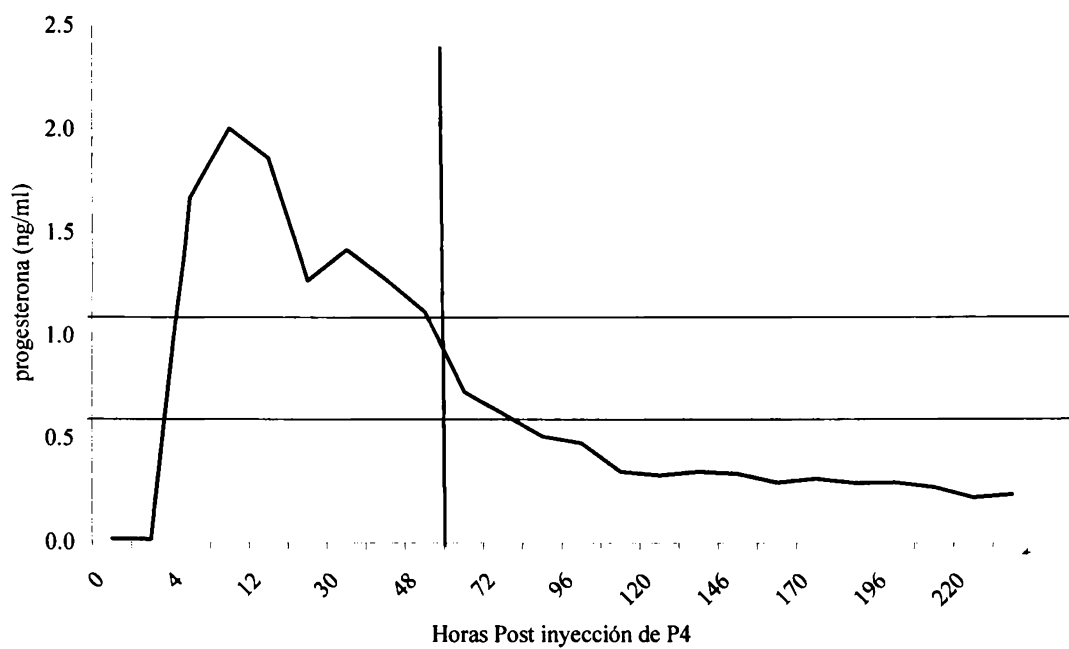


Figura 3. Niveles de progesterona durante 9 días en vacas ovariectomizadas.

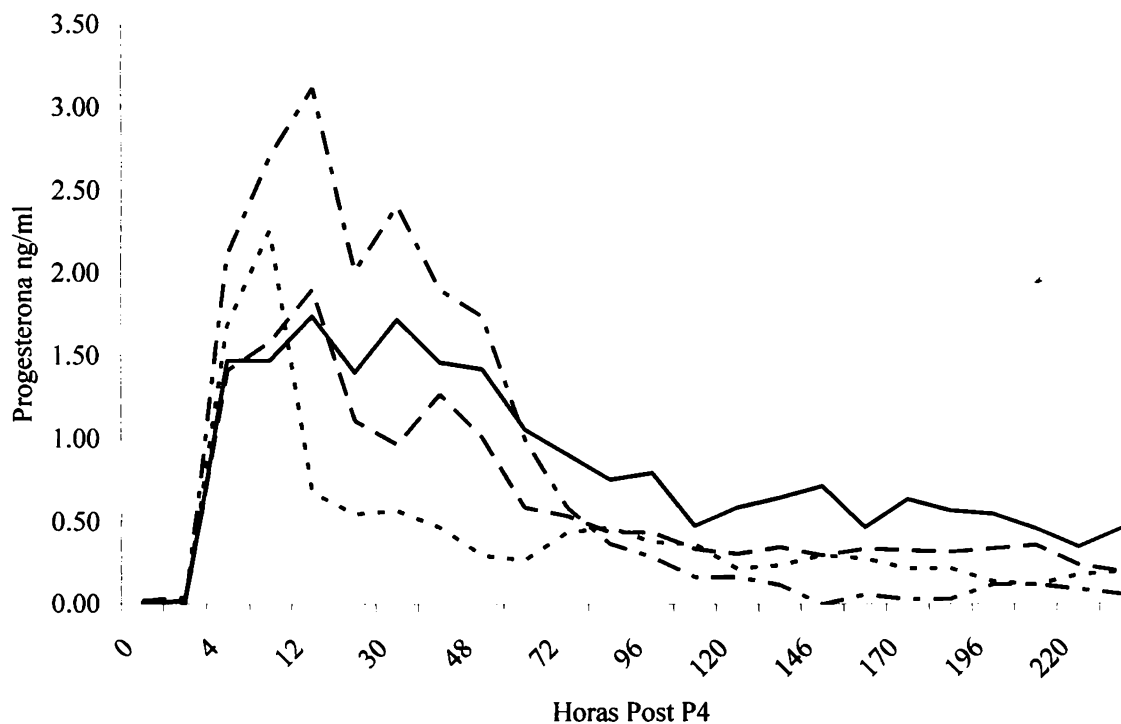


Figura 4. Curvas individuales de progesterona para las cuatro vacas ovariectomizadas

6.2. Ensayo 2

6.2.1 Sincronización

Un 35% de las vaquillonas mostraron celo y fueron inseminadas antes del tiempo fijo (15 horas después de la segunda inyección de GnRH). De éstas, 69% correspondieron al grupo Ovsynch tradicional y 31% al grupo Ovsynch + P4 ($P < 0.01$). En la figura 5 se muestran esos resultados.

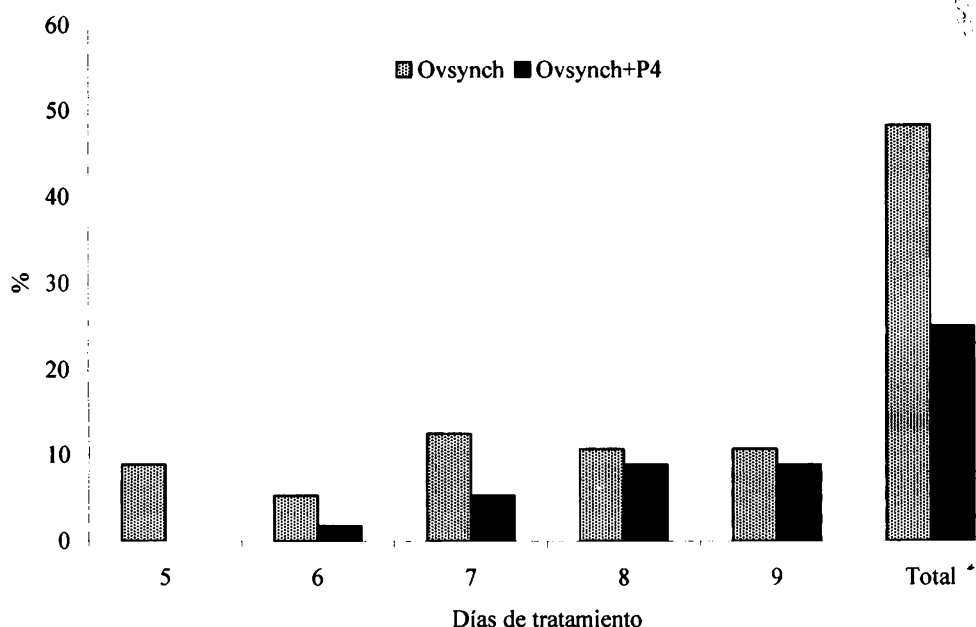


Figura 5. Porcentaje de vaquillonas que mostraron celo antes de la segunda inyección de GnRH al día 9

Como se aprecia en la figura, una sola vaquillona mostró celo el día 6 luego de la inyección de P4, 3 el día 7, 4 el día 8 y 4 el día 9.

6.2.2. Actividad ovárica

Al día 0 (comienzo del tratamiento), 52% de las vaquillonas tenían folículos menores a 10 mm, 38% folículos de entre 10 y 15 mm y 10% folículos mayores a 15 mm, mientras que 39% no tenían un cuerpo lúteo y 61% tenían cuerpo lúteo. Al día 7 (día de la inyección de PG), 45% de las vaquillonas tenían folículos menores a 10 mm, 48% folículos de entre 10 y 15 mm y 7% folículos mayores a 15 mm, mientras que 17% no tenían un cuerpo lúteo, 59% tenían un cuerpo lúteo y 24% tenían 2 cuerpos lúteos. Esto confirma que todas las vaquillonas estaban ciclando y que hubo una buena respuesta a la sincronización. No existieron diferencias significativas entre tratamientos en las estructuras ováricas al día 0 ni al día 7. En la figura 6 se muestran los porcentajes de las distintas estructuras ováricas a los días 0 y 7 para el grupo Ovsynch y Ovsynch + P4.

No se registraron diferencias estadísticas entre grupos en estos dos días, lo que demuestra que la adición de la progesterona inyectable no afectó la dinámica folicular. No se incluyeron en este análisis las vaquillonas que ovularon antes del día 7.

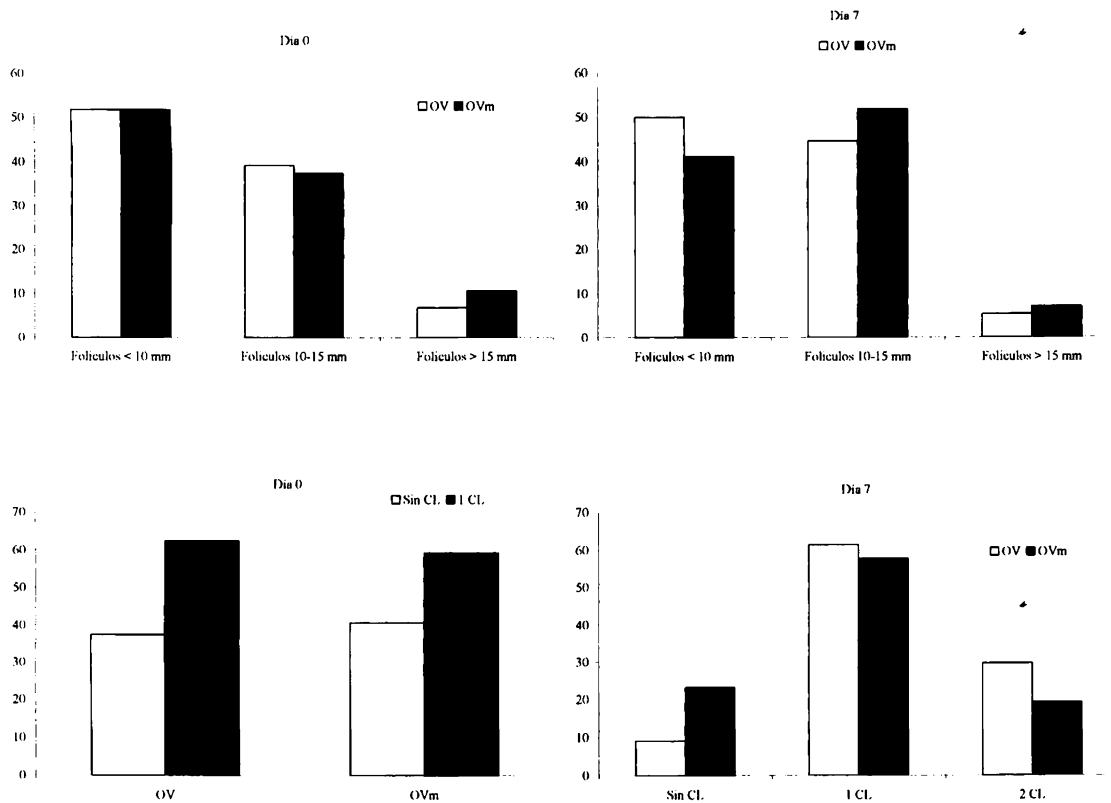


Figura 6. Porcentajes de estructuras ováricas (folículos y cuerpos lúteos) a los días 0 y 7 del tratamiento, para los grupos Ovsynch (OV) y Ovsynch + P4 (OVm)

6.2.3. Fertilidad

La fertilidad del tratamiento se determinó solamente luego de la primera inseminación, fuera luego de un celo natural o a tiempo fijo. Los resultados se resumen en el siguiente cuadro.

Cuadro I. Porcentaje de preñez al celo natural, al tiempo fijo y preñez general para vaquillonas de los grupos Ovsynch y Ovsynch + P4

Tratamiento	N	% de preñez celo natural	% de preñez tiempo fijo	% de preñez general
Ovsynch	56	44 ^a 12/27	69 ^a 20/29	57 ^a 32/56
Ovsynch + P4	55	42 ^a 5/12	23 ^b 10/43	27 ^b 15/55
<i>Total</i>	<i>111</i>	<i>44</i> <i>17/39</i>	<i>42</i> <i>30/72</i>	<i>42</i> <i>47/111</i>

^{a, b}: Diferentes letras entre filas difieren, $P < 0.01$

6.2.4. Niveles plasmáticos de progesterona.

No existió diferencia significativa entre los niveles de progesterona tanto al día 0, como al día 7.

6.3. Ensayo 3

El día 2, luego de la administración de PG una sola vaquillona manifestó celo; el día 3, cinco vaquillonas; y el día 4 dos vaquillonas mostraron celo, de un total de 26. Por lo tanto, el 30,7 % de las vaquillonas demostraron estro entre los días 2 y 4 posteriores a la administración de PG. Los resultados, se representan en la figura 7. La tasa de concepción para este grupo de vaquillonas fue de 62,5 %.

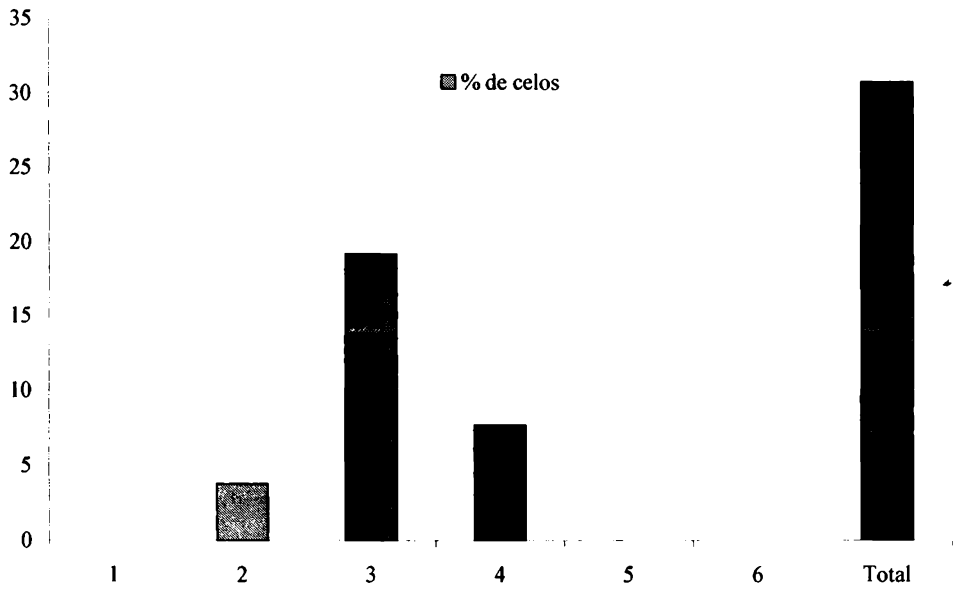


Figura 7. Porcentaje de detección de celo luego de la administración de PG

7. DISCUSIÓN

La administración parenteral de progesterona, puede tener efectos beneficiosos al eliminar la necesidad de administrarla impregnada en un dispositivo (vaginal o subcutáneo) el que luego debe ser removido y eliminado con el consiguiente problema de contaminación ambiental. Para que la vía inyectable pueda sustituir la aplicación local, ésta debe asegurar niveles luteales en sangre durante un período de tiempo que no puede ser menor a los 5 días.

El presente ensayo se diseñó para evaluar los niveles circulantes de P4 luego de la administración de una droga experimental diseñada para liberar la P4 lentamente y por lo tanto asegurar un período de tiempo prolongado de niveles luteales en sangre. No se logró alcanzar concentraciones plasmáticas de progesterona por encima de 1 ng/ml por al menos durante 5 días, que permitan, en un futuro, utilizar esta hormona por vía parenteral en protocolos de sincronización de celos; de manera similar como es usada en dispositivos intravaginales, donde probó ser beneficiosa para crear ambientes altos de progesterona que son necesarios en programas iniciados al comienzo o al final del ciclo estral, tanto en vacas en anestro, como en vaquillonas (Stevenson y col, 1999; Rivera y col, 2005).

No es posible comparar la duración de niveles elevados (≥ 1 ng/ml) de progesterona en plasma, en animales que fueron tratados con P4 por vía parenteral, con aquellos tratados con P4 a través de implantes o dispositivos intravaginales. En estos últimos la hormona es liberada en forma preestablecida, manteniendo niveles elevados de progesterona en plasma, hasta que dicha fuente es removida (Sorensen, 1982); lo que no es posible realizar con la administración de P4 en forma parenteral.

Al no existir trabajos que hayan utilizado progesterona exógena en base oleosa, inyectada por vía subcutánea en vacas ovariectomizadas, no podemos comparar los resultados obtenidos. Sí hay ensayos en los cuales se midieron niveles plasmáticos de progesterona en vacas ovariectomizadas luego de colocación de un CIDR, con una concentración de 1,9; 1,0; y 0,5 g de progesterona (Cutaia y col, 2003). En dicho ensayo, los niveles máximos de P4 se obtuvieron a las tres horas de haber colocado el dispositivo, y con valores de 7,0, y

6,0 ng/ml para el CIDR de 0,5 g y 1,0 g respectivamente. Para estos tres ensayos las concentraciones de P4 se mantuvieron por encima de 1 ng/ml hasta el día 7 en el que se retiró el dispositivo.

También se han determinado niveles de progesterona en vacas en anestro, primíparas a la 3ª semana posparto de raza Fresian y Jersey, luego de la colocación de un CIDR por 5 días (Nation y col, 2000). En este estudio los niveles de P4 fueron de 2,8 ng/ml a los 45 minutos posteriores a la aplicación del dispositivo, se mantuvo así las 5 horas siguientes, presentando la mayor concentración plasmática de la hormona a las 24 h con 4,0 ng/ml. Estos niveles descendieron al 4º día (2,6 ng/ml), permaneciendo igual al 5º día en el que se retiró el CIDR; a las 4 h los niveles eran de 0,3 ng/ml. Trabajos similares al anterior en vacas en anestro mostraron la mayor concentración de P4 en plasma a las 48 h con niveles de 2,5 ng/ml (Macmillan y col, 2001).

En todos los ensayos anteriormente descritos, los picos de progesterona en plasma fueron mayores a los de nuestro ensayo.

Los resultados obtenidos en el grupo 1 (Ovsynch), en el porcentaje de vaquillonas que presentaron celo antes de la IATF fue de un 48%. Este resultado es explicado por la etapa del ciclo estral que presentaban las vaquillonas al momento de la primer administración de GnRH; que a pesar de que todas las vaquillonas se encontraban ciclando al inicio del tratamiento, no todas estaban en el momento óptimo del ciclo estral para iniciar el protocolo de sincronización. En un protocolo Ovsynch se busca mediante la inyección de GnRH en distintos estadios del ciclo estral inducir la ovulación de un folículo dominante, sincronizar una nueva onda folicular y 7 días más tarde se administra prostaglandina para regresar el cuerpo lúteo original y el recientemente formado, seguido de una segunda inyección de GnRH 48 horas después para inducir la ovulación sincrónica 28-32 horas más tarde. Al día 7 la ecografía ovárica demostró que el 91% de la vaquillonas se encontraban en fase luteal del ciclo estral, donde el 61% presentaban 1 CL, el 31% 2 CL y el 9% restante sin CL pero presentaban folículos de diferentes diámetros, lo que indica que estaban ciclando. Por lo tanto las vaquillonas que presentaban 2 CL al día 7, posiblemente se encontraban en diestro temprano al inicio del protocolo y la GnRH indujo la ovulación

de un folículo dominante y la formación de cuerpo lúteo accesorio. Las vaquillonas que presentaron 1 CL al día 7 probablemente estaban en metaestro al momento de la primera inyección, no respondiendo a la ovulación de un folículo ya que estarían en fase de reclutamiento folicular; o haberse encontrado en proestro, donde con la administración de GnRH se induce la ovulación y luteinización del folículo dominante, formando un cuerpo lúteo accesorio en el momento en que el cuerpo lúteo natural del ciclo anterior regresó al día 7. Por lo tanto el inicio de un protocolo Ovsynch durante el metaestro o el proestro coincide con ambientes bajos de progesterona que comprometen la fertilidad (Twagiramungu y col., 1995; Macmillan y Thatcher, 1991). Las vaquillonas que no presentaron cuerpo lúteo al día 7 es debido a que al inicio del tratamiento con GnRH se encontraban en diestro tardío, en donde el folículo dominante puede no ovular, y ante la ausencia de ovulación la prostaglandina endógena puede causar luteólisis y ovulación temprana del folículo dominante (Martinez y col., 2000). La respuesta al protocolo Ovsynch se optimiza cuando éste se inicia en un diestro temprano (entre día 5 y 12) en donde la tasa de ovulación es más alta en respuesta a la GnRH. Esto se cumple principalmente en vacas cuyo ciclo estral son de 2 ondas foliculares ya que más animales tendrán un folículo dominante al momento de la inyección de GnRH. En cambio en vaquillonas que generalmente presentan 3 ondas foliculares por ciclo, estarán en emergencia o dominancia temprana de la tercera onda en los días 14 y 17. Debido a que la inyección inicial de GnRH no indujo ovulación, estos animales tendrán una regresión normal del cuerpo lúteo 2-4 días más tarde; tales vacas mostraran celo y ovularan antes de la administración de la PG o de la segunda GnRH (Diskin y col, 2002).

En el grupo 2 (Ovsynch + P4), al día 7 la ecografía ovárica demostró que el 77% de la vaquillonas se encontraban en fase lútea del ciclo estral, donde el 58% presentaban 1 CL, el 19% 2 CL y el 23% restante sin CL pero presentaban folículos de diferentes diámetros, lo que indica que estaban ciclando. No se registraron diferencias estadísticas entre grupos en estos dos días, lo que demuestra que la adición de la progesterona inyectable no afectó la dinámica folicular.

Un total de 12 vaquillonas presentaron celo antes de la IATF, que representan el 21%; por lo que hubo una diferencia significativa con el grupo 1. Esto es debido posiblemente a

niveles elevados de progesterona exógena que alteran la función ovárica, suprimiendo el estro y evitando la ovulación. Por lo tanto con el uso de progestágenos al inicio de un protocolo Ovsynch se previene la ovulación de folículos maduros, manteniendo altas concentraciones de P4 entre la primera GnRH y la administración de PG, previniendo la ovulación prematura.

La tasa de concepción fue un 30% más baja en el grupo Ovsynch + P4; diferencia que se manifiesta cuando se compara la tasa de preñez en vaquillonas que recibieron IATF (69% grupo 1 y 23% grupo 2), ya que no existió diferencia significativa en las que fueron inseminadas a celo detectado entre ambos grupos (44 y 42% para el grupo 1 y 2 respectivamente, $P < 0,001$).

La tasa de preñez en nuestro ensayo, (57% Ovsynch tradicional), fue algo mayor a otros estudios, que obtuvieron 35,1% de preñez en vaquillonas (Pursley y col, 1997) y 47,8% en vacas lactando (Cavestany y Galina, 2000); y similar a los resultados obtenidos por Cavestany y col, (2002) con una concepción de 63% en vaquillonas de carne; estos últimos dos fueron realizados en las mismas condiciones ambientales y manejo. Debe tenerse en cuenta que las vaquillonas que mostraron celo antes del día 9 fueron inseminadas. Existió diferencia significativa entre la tasa de preñez cuando se inseminó a celo detectado, con respecto a la IATF, 44% vs. 69% respectivamente; mostrando valores similares a otros estudios en que manifiestan una tasa de concepción de 20-40% más baja en vaquillonas que reciben IA a celo detectado (Schmitt y col., 1996; Pursley y col., 1997a). Resultados similares fueron obtenidos por Pursley y col. (1997b) en vacas y vaquillonas, en las cuales el grupo control inseminado a celo detectado tuvo una tasa de preñez de más del doble (74.4%) que la del grupo Ovsynch inseminado a tiempo fijo (35.1%).

El grupo Ovsynch modificado no pudo ser comparado al no encontrarse un tratamiento similar en la bibliografía; pero si hay muchos trabajos que utilizaron una fuente exógena de progesterona al inicio de un protocolo Ovsynch. Un protocolo Ovsynch modificado con el agregado de un implante de Norgestomet entre el día 0 y 7 del mismo fue probado por Stevenson y col. (1997) en vacas de carne en anestro y ciclando, obteniendo una tasa de preñez de 62% y 59% respectivamente. Martínez y col. (2002) con un protocolo Ovsynch + CIDR por 7 días obtuvieron un 65% de preñez en vaquillonas de carne y un 52% de preñez en un protocolo similar, pero usando acetato de melengestrol durante 6 días.

Hubieron diferencias en la tasa de concepción para las vaquillonas inseminadas a celo detectado que para las inseminadas a tiempo fijo (figura 5), estos valores son inferiores a los obtenidos por Viñoles y Cavestany (1996) que fueron de 67% para las vaquillonas inseminadas a celo visto y de 68% para las inseminadas a tiempo fijo y los obtenidos por Martínez y col. (2002) que fueron de 67,2% para las vaquillonas de carne inseminadas a celo visto y de 61,1% para las inseminadas a tiempo fijo.

En lo que se refiere a la baja tasa de concepción en la IATF, esta podría deberse a la presencia de niveles suprabasales de P4 en plasma al momento de la IA. Debido a que los tipos y dosis de progestinas utilizadas para controlar el ciclo estral en bovinos, suelen ser menos eficaces que la progesterona endógena en la supresión de LH, la alta frecuencia de pulsos de LH, resultan en el desarrollo de folículos persistentes, que contienen oocitos envejecidos que llevan a mala fertilidad (Savio y col, 1993). La presencia de niveles suprabasales de P4, se lograría confirmar, detectando los niveles plasmáticos de dicha hormona en las vaquillonas a partir del día 8, o sea, luego de la administración de PG. En nuestro ensayo se determinó P4 en plasma al día 0 y 7 en ambos grupos, no existiendo diferencia significativa al comparar los resultados entre uno y otro grupo al mismo día.

Por lo tanto, un protocolo Ovsynch sincroniza tanto el desarrollo folicular como la regresión del cuerpo lúteo y para que este sea efectivo depende de la regresión del folículo dominante luego de la primera inyección de GnRH; por lo que, para aumentar la precisión del reclutamiento folicular, se podría haber usado en nuestro ensayo un protocolo de presincronización que nos permita aumentar la probabilidad de tener un folículo dominante mayor a 10mm (Thatcher y col, 2002), que será inducido para ovular luego de la primera inyección de GnRH, y asegurarse que habrá un cuerpo lúteo durante el periodo de sincronización.

Los resultados obtenidos en cuanto al porcentaje de vaquillonas que manifestaron celo hasta 6 días posteriores a la administración de PG, fueron relativamente menores (30,7%), comparados con resultados obtenidos por Elving y col., (1975); Cavestany, (1995) y Lucy y col., (2001); donde los porcentajes de vaquillonas que mostraron celo fueron de 85, 50 y 49

%, para cada ensayo respectivamente. A pesar del bajo porcentaje de vaquillonas que fueron inseminadas entre los días 2 y 6 luego de la inyección de PG, el porcentaje de concepción fue aceptable, alcanzando un 62,5 %. Para los ensayos de Elving y col., (1975); Cavestany, (1995) y Lucy y col., (2001) anteriormente mencionados, los porcentajes de concepción fueron de 31, 78 y 70 % respectivamente. Por lo tanto, la tasa de concepción de éste método es similar a la del celo natural (en comparaciones dentro de cada rodeo) (Cavestany, 2002).

Se debe tener en cuenta que varios factores influyeron en el resultado de la sincronización del estro. En primer lugar a las vaquillonas utilizadas en este ensayo no se les realizó ultrasonografía ovárica para comprobar ciclicidad y conocer el estadio del ciclo estral en que se encontraban. Esto último es muy importante ya que el tratamiento con PG para sincronizar el celo tiene algunas limitaciones: los animales deben estar ciclando y en un estadio apropiado de su ciclo estral. La PG no es efectiva para la inducción de la luteólisis hasta 5 o 6 días después del celo y, si el tratamiento se administra cuando el ciclo estral está avanzado, puede que la luteólisis ya haya comenzado con prostaglandina endógena (Seguin, 1987). En segundo lugar dichas vaquillonas de 6 dientes presentan antecedentes de poca manifestación de celo y algunas de ellas han sido inseminadas pero sin concebir (se trataba de animales ofrecidos al servicio el año anterior y no inseminados o inseminados y no preñados), indicando tal vez problemas en la manifestación de celo o en la fertilidad. A pesar de esto en nuestro ensayo el 62% de las vaquillonas que mostraron celo entre los 2 y 6 días posteriores a la administración de PG concibieron, descartando así la existencia de posibles problemas de fertilidad de este grupo de vaquillonas. Por lo que debe manejarse la posibilidad de fallas en la detección de celo, ya sea por problema de manejo o porque las vaquillonas presentan celos irregulares, cortos y menos intensos, debido a las concentraciones plasmáticas bajas de estrógenos (López y col., 2004).

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, creemos conveniente el uso de técnicas como el tacto rectal o ultrasonografía ovárica, para detectar el momento del ciclo y la presencia de cuerpo luteo para la implementación de un protocolo de sincronización de celo con una sola dosis de prostaglandina. Además, una única administración de prostaglandina para sincronizar estro, no sería una herramienta útil para casos en los que existan problemas

en la detección de celo y tampoco sería una solución para vaquillonas con este tipo de antecedentes reproductivos.

8. CONCLUSIONES

Se pudo observar que existió una diferencia importante en el número de vaquillonas que mostraron celo antes del día 7 entre ambos grupos; 40% para el grupo Ovsynch y un 7% para el grupo Ovsynch + P4. Esto nos permite suponer que la sincronización fue buena en este último grupo, indicando que existieron niveles de P4 en plasma por encima de los valores basales (>1 ng/ml) durante al menos 7 días; pero que no se correlacionan con los resultados obtenidos en el primer ensayo. En consecuencia, se podría asumir que, con una misma concentración de progesterona natural (100 mg) aplicada por vía parenteral (subcutánea), tanto en vacas ovariectomizadas como en vaquillonas, la duración de los niveles plasmáticos de progesterona por encima de los rangos basales (> 1 ng/ml) sea posiblemente diferente. Esto, tal vez este dado por la diferencia de peso entre ambas categorías de animales, lo que permite suponer que exista una relación de dosis de progesterona por kilo de peso vivo y que por lo tanto, pueda explicar la tan corta duración de niveles elevados de progesterona plasmática en vacas ovariectomizadas, y la hipotética presencia de valores suprabasales al momento de la IATF en vaquillonas sometidas a un protocolo Ovsynch con la administración de 100 mg de P4 subcutánea al inicio del mismo.

La utilización de una única dosis de PG como método de sincronización de celos, no resultó ser una herramienta útil en un rodeo de vaquillonas con antecedentes de problemas reproductivos. Para este caso creemos conveniente la utilización de técnicas que nos permitan detectar el momento del ciclo estral, así como también la implementación de otros métodos de sincronización que nos permita realizar IATF, y así evitar el inconveniente de la detección de celo.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Alberio RH. (2003). Nuevas biotecnologías reproductivas. Aspectos biológicos y económicos. 5^{to} Simposio de Reproducción Animal. Ed. Comunicarte. Córdoba. Argentina. 293-322.
2. Anderson N, Schirck FN, Butcher RL, Inskoop EK. (1995). Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biol Reprod*; 52:1129-1135.
3. Arthur GH, Noakes DE, Pearson H. (1991). *Reproducción y obstetricia en veterinaria*. 6^o ed. Ed. Interamericana MC Graw-Hill. London. England. 626 pp.
4. Austin EJ, Mihm M, Ryan MP, Williams DH, and Roche JF. (1999). Effect of duration of dominance of ovulatory follicle on onset of estrus and fertility in heifers. *J Anim Sci*; 77:2219-2226.
5. Bartolome JA, Sheerin P, Luznar S, Melendez P, Kelbert D, Risco CA, Thatcher WW, Archbald LF. (2002). Coception Rate in Lactating Dairy Cows using Ovsynch after Presynchronization with PG2 α or Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH). *The Bovine Pract*; 36:35-38.
6. Bo GA, Adams GP, Caccia M, Martinez M, Colazo M, Mapletoft R. (1998). Actualización del control del ciclo estral bovino. IV Jornadas CABIA, Buenos Aires, Argentina, pp. 13-24.
7. Bo GA, Caccia M, Martínez M, Mapletoft RJ. (1996). Follicle wave emergence after treatment with estradiol benzoate and CIDR-B vaginal devices in beef cattle. *Proceedings of the 13th ICAR, Sydney, Australia*. 7-22.
8. Bo GA, Adams GP, Pearson RA, Mapletoft RJ. (1995). Exogenous control of follicular waves emergence in cattle. *Theriogenology*; 43:31-40.
9. Bosch AR. (1976). Sincronización del estro, fertilidad en vaquillonas con un análogo sintético de la prostaglandina F2 alfa. *Gaceta Veterinaria*; 38:329-333.
10. Britt JH. (1984). Limitations on the pharmacological control of reproduction. *Proceeding. 10th Int. Congr on Anim Reprod & AI*; IV-31.
11. Brown LN, Odde KG, King ME, Lefever DG, Neubauer CJ. (1988). Comparisson of melengestrol acetate-prostaglandin F2 α to Synchro-Mate B for estrus synchronization in beef heifers. *Theriogenology*; 30:1-12.

12. Burke CR, Day ML, Bunt CR, Macmillan KL. (2000). Use of a small dose of oestradiol benzoate during diestrous to synchronize development of the ovulatory follicle in cattle. *J. Anim. Sci*; 78:145-151.
13. Caccia M, Bo GA. (1998). Follicle wave emergence following treatment of CIDR-B implanted beef cows with estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology*; 49:341.
14. Cavestany D, Cibils J, Freire A, Sastre A, Stevenson JS. (2003). Evaluation of two different oestrus-synchronization methods with timed artificial insemination and resynchronization of returns to oestrus in lactating Holstein cows. *Anim Reprod Sci*; 77:141-155.
15. Cavestany D, de Nava G, Galina CS. (2000). Sincronización de celos con inseminación a tiempo fijo como alternativa para incrementar la eficiencia reproductiva en programas de inseminación artificial en vacas lecheras bajo condiciones de pastoreo. XXX World Buiatrics Congress.
16. Cavestany D, Foote RH. (1985). Prostaglandin F2 alpha used for cows with unobserved estrus in a large commercial herd monitored by milk progesterone assay. *Cornell Vet*; 75:393-397.
17. Cavestany D, Negrin N, Negrin R, Groth, JF. (2002). Response of beef heifers and non-suckling beef cows to different oestrous synchronization protocols. *Anim Sci*; 4:547-552.
18. Cavestany D. (2002). Sincronización y/o inducción de celos con o sin inseminación artificial a tiempo fijo en rodeos del Uruguay. Costos y variaciones en las respuestas. Primera parte: Fundamentos Teóricos. XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay. 143-10.
19. Cerri RLA, Santos JEP, Juchem SO, Galvao KN, Chebel RC. (2004). Timed artificial insemination with estradiol cypionate or insemination at estrus in high-producing dairy cows. *J Dairy Sci*; 87:2868–2873.
20. Cline MA. (2002). Efficacy of synthetic gonadotropin releasing hormone analogs for control of ovulation during estrus synchronization protocols. MSc thesis. Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, VA, USA.

21. Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ. (2003). Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-timed AI programs in beef heifers. *Theriogenology*; 60:855–865.
22. Cooper MJ. (1974). Control of oestrus cycles of heifers with a synthetic prostaglandin analogue. *Vet Rec*; 95:200-203.
23. Chebel RC, Santos JE, Cerri RL, Galvao KN, Juchem SO, Thatcher WW. (2003). Effect of resynchronization with GnRH on day 21 after artificial insemination on pregnancy rate and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Theriogenology*; 60:1389–1399.
24. Day ML, Burke CR, Taufa VK, Day AM, Macmillan KL. (2000). The strategic use of oestradiol to enhance fertility and submission rates of progestin-based estrus synchronization programs in lactating dairy herds. *J. Anim. Sci*; 78:523-529.
25. Day ML. (1998). Practical manipulation of the estrous cycle in beef cattle. *The Bovine Proceedings, USA* 31:51-60.
26. De la Sota RL, Lucy MC, Staples CR, Thatcher WW. (1993). Effect of recombinant bovine somatotropin (Sometribove) on ovarian function in lactating and non lactating dairy cows. *J. Anim. Sci*; 76:1002-1013
27. DeJarnette JM, Salverson RR, Marshall CE. (2001b). Incidence of premature estrus in lactating dairy cows and conception rates to standing estrus or fixed-time inseminations after synchronization using GnRH and PG2 α . *Anim Reprod Sci*; 67:27-35.
28. Dick A. (1998). Control de servicios artificiales en el tambo con el uso de progestágenos. CABIA. IV Jornadas, Bs As, Argentina. pp. 67-76.
29. Diskin MG, Austin EJ adn Roche JF. (2002). Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domest Anim Endocrinol*; 23:211-228.
30. Edmonson AJ, Lean LJ, Weaver LD, Farver T, Webster G. (1989). A body condition scoring chart for Holstein dairy cow. *J. Dairy Sci*; 72:68-78.
31. Ferguson SD, Galligan DT. (1993). Reproductive programs in dairy heírd. *Proc. Central Veterinary Conference, Kansas City, MO, USA*; 1:161 – 178.
32. Fick KE, Day ML, Inskeep EK, Kinder JE, Lewis PE, Short RE, Hafs HD. (1997). Estrus and luteal function in suckled beef cows that were anestrous when treated

- with and intravaginal device containing progesterone with or without a subsequent injection of estradiol benzoate. *J Anim Sci*; 75:2009-2015.
33. Folman Y, Kaim M, Herz Z, Rosenberg M. (1990). Comparison of methods for the synchronization of estrous cycles in dairy cows. 2. Effects of progesterone and parity on conception. *J Dairy Sci*; 73:2817-2825.
 34. Fortune JE, Rivera GM and Yang MY. (2004). Follicular development: The role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim Reprod Sci*; 82-83:109-126.
 35. Geary TW, Whittier JC. (1999). Various protocols for synchronization of estrus or ovulation using GnRH and prostaglandin. Beef Program Report. The Dept of Animal Sciences Colorado State University.
 36. Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. (1996). Selection of the dominant follicle in cattle. Review. *Biol Reprod*; 55:1187-1194.
 37. Ginther OJ, Kastelic JP, Knopf L. (1989). Intraovarian relationships among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers. *Theriogenology*; 32:787-795.
 38. Gutknecht GD, Cornette JC, Pharris BB. (1969). Antifertility properties of prostaglandin F₂ α . *Biol Reprod*; 1:367-371.
 39. Hafez ES. (1989). Reproducción e inseminación artificial en Animales. 5^o ed. Ed. Interamericana MC Graw-Hill. México D.F. México. 677 pp.
 40. Hafez ESE y Hafez B. (2000). Reproduction in farm animals. 7a ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA, USA. 509 pp.
 41. Hansel W, Malven PV, Black DL. (1961). Estrous cycle regulation in the bovine. *J Anim Sci*; 20:621-625.
 42. Inskeep EK. (1973). Potential uses of prostaglandins in control of reproductive cycles of domestic animals. *J Anim Sci*; 36:1149-1157.
 43. Kinder JE, Garcia-Winder M, Imakawa K, Day ML, Zalesky DD, D'Occhio ML, Stumpf TT, Kittok RJ, Schanbacher BD. (1991). Circulating concentrations of 17-estradiol influence pattern of LH in circulation of cows. *Domest Anim Endocrinol*; 8:463-469.

44. Kojima FN, Salfen BE, Bader JF, Ricke WA, Lucy MC, Smith MF, Patterson DJ. (2000). Development of an estrus synchronization protocol for beef cattle with short-term feeding of melengestrol acetate: 7-11 Synch. *J Anim Sci*; 78:2186-2191.
45. Larson LL, Ball PJH. (1992). Regulation of estrous cycles in dairy cattle: A review. *Theriogenology*; 38:255-267.
46. LeBlanc S (2001). The Ovsynch Breeding Program for Dairy cows – A review and economic Perspective. *The Bovine Pract*; 35:13-21.
47. Lopez H, Satter LD, Wiltbank M. (2004). Relationship between level of milk production and estrous behaviour of lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci*; 81:209-223.
48. Lucy MC, Savio JD, Badinga L, De la Sota RL, Thatcher WW. (1992). Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci*; 70:3615-3626.
49. Lucy MC, Thatcher WW, Macmillan KL. (1990). Ultrasonic identification of follicular populations and return to estrus in early postpartum dairy cows given intravaginal progesterone for 15 days. *Theriogenology*; 34:325-340.
50. Mackey DR, Sreenan JM, Roche JF, Diskin MG. (2000). The effect of progesterone alone or in combination with estradiol on follicular dynamics, gonadotropin profiles, and estrus in beef cows following calf isolation and restricted suckling. *J Anim Sci*; 78:1917–1929.
51. Macmillan KL, Thatcher WW. (1991). Effect of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicle in cattle. *Biol Reprod*; 45:883-889.
52. Martínez MF, Kastelic JP, Adams GP, Mapletoft RJ. (2002). The use of a progesterone-releasing device (CIDR) or melengestrol acetate with GnRH, LH or estradiol benzoate for fixed time AI in beef heifers. *J Anim Sci* 80:1746-1751.
53. McDonald LE. (1991). *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*. 4º Ed. Ed. Interamericana MC Graw-Hill, España, Madrid, pp. 1-541.
54. Mihm N, Curran N, Hyttel P, Boland MP, Roche JF. (1994). Resumption of meiosis in cattle oocytes from preovulatory follicles with a short and a long duration of dominance. *J Reprod Fertil* 13:14(Abstr.).

55. Moreira F, Orlandi C, Risco CA, Mattos R, Lopes F, Thatcher WW. (2001). Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*; 84:1646–1659.
56. Morrow DA. (1986). *Current Therapy in Theriogenology*. 2° Ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia. United States of America. 1104 pp.
57. 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. *J Dairy Sci*; 87:1551-1557.
58. Murugavel K, Yániz LJ, 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.
59. Nelson. (1978). Posibilidad de empleo de las prostaglandinas. *Gaceta Veterinaria*; 40:792-799.
60. Penny CD, Lowman BG, Scott NA, Scott PR. (2000). Repeated oestrus synchronization of beef cows with progesterone implants and the effects of a gonadotrophin-releasing hormone agonist at implant insertion. *Vet Rec*; 146:395-398.
61. Portaluppi MA, Stevenson JS. (2005). Pregnancy rates in lactating dairy cows after presynchronization of estrous cycles and variations of the Ovsynch protocol. *J Dairy Sci*; 88:914–921.
62. Pursley JR, Kosorok MR, Wiltbank MC. (1997a). Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J Dairy Sci*; 80:301-306.
63. Pursley JR, Wiltbank MC, Stevenson JS, Ottobre JS, Garverick HA, Anderson LL. (1997b). Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J Dairy Sci*; 80:295-300.
64. Pursley, JR, M. C. Wiltbank, J. S. Stevenson, J. S. Ottobre, H. A. Garverick, and L. L. Anderson. (1997). Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J Dairy Sci*; 80:295–306.
65. Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using $PG_{2\alpha}$ and GnRH. *Theriogenology*; 44:915-923.

66. Rhodes FM, McDougall S, Burke CR, Verkerk GA, Macmillan KL. (2003). Invited review: treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. *J Dairy Sci*; 86:1876–1894.
67. Roche JF. (1975). Control of the time of ovulation in heifers with progestational and gonadotropic releasing hormone. *J Reprod Fertil*; 43:471-477.
68. Rosenberg M, Kaim M, Herz Z, Folman Y. (1990). Comparison of methods for the synchronization of estrous cycles in dairy cows. 1. Effects on plasma progesterone and manifestation of estrus. *J Dairy Sci*; 73:2807-2815.
69. Sanchez T, Wehrman ME, Bergfeld EG, Peters KE, Kojima FN, Cupp AS, Mariscal B, Kittok RJ, Rasby RJ, Kinder JE. (1993). Pregnancy rate is greater when the corpus luteum is present during the period of progestin treatment to synchronize time of estrus in cows and heifers. *Biol Reprod*; 49:1102-1107.
70. Savio JD, Thatcher WW, Morris GR, Entwistle K, Drost M, Mattiacci MR. (1993). Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. *J Reprod Fertil*; 98:77 - 81.
71. Scena C. (1998). Uso de implantes progestágenos subcutáneo para inducir y sincronizar celos en rodeos de cría. CABIA, Bs As, Argentina; pp. 59-68.
72. Schmitt EJP, Díaz T, Drost M, Thatcher WW. (1996). Use of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle. *J Anim Sci*; 74:1084-1091.
73. Seguin B. (1997). Strategies for estrus control to improve dairy reproductive performance. *Proc Ann Meeting Society for Theriogenology*; pp. 320-331.
74. Short RE, Randel RD, Staigmiller RB, Belows RA. (1979). Factors affecting estrogen-induced LH release in the cow. *Biol Reprod*; 21:683-689.
75. Sirois J, Fortune JE. (1990). Lengthening the bovine estrus cycle with low concentration of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology*; 127:916-925.
76. Stevenson JS, Hoffman DP, Nichols DA, Mckee RM, Krehbiel CL. (1997). Fertility in estrus-cycling and non cycling virgin heifers and suckled beef cows after induced ovulation. *J Anim Sci*; 75:1343-1350.

77. 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. *J Dairy Sci*; 82:506-515.
78. Stevenson JS, Mee MO. (1991). Pregnancy rates of Holstein cows after post insemination treatment with a progesterone releasing intravaginal device. *J Dairy Sci*; 74:3849-3856.
79. Stumpf TT, Wolfe MW, Day ML, Stotts JA, Wolfe PL, Kittok RJ, Kinder JE. (1991). Effect of 17-beta-estradiol on the preovulatory surge of LH in the bovine female. *Theriogenology*; 36:201-207.
80. Taylor C, Rajamahendran R. (1991). Follicular dynamics, corpus luteum growth and regression in lactating dairy cattle. *Can J Anim Sci*; 71:61-68.
81. Thatcher WW, Moreira F, Pancarci SM, Bartolome JA, Santos JEP. (2002). Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. *Domest Animal Endocrinol*; 23:243-254.
82. Thatcher WW, Patterson MS, Moreira F, Pancarci M, Jordan ER, Risco CA. (2001). Current concepts for estrus synchronization and timed insemination. *AABP. Proc. 34th Annual Convention*. 95 -105.
83. Thatcher WW, Risco CA, Moreira F. (1998). Practical Manipulation of the Estrous Cycle in Dairy Animals. *AABP Proceedings. 31st Annual Convention*. pp 34 -50.
84. Thatcher WW, Driancourt MA, Terqui M, Badinga L. (1991). Dynamics of ovarian follicular development in cattle following hysterectomy and during early pregnancy. *Domest Anim Endocrinol*; 8:223-234.
85. Thompson KE, Stevenson JS, Lamb GC, Grieger DM, Löest CA. (1999). Follicular, hormonal, and pregnancy responses of early postpartum suckled beef cows to GnRH, norgestomet, and prostaglandin F2a. *J Anim Sci*; 77:1823–1832.
86. Twagiramungu H, Guilvault LA, Duffour JJ. (1995). Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle:a review. *J Anim Sci*; 73:3141-3151.

87. Viñoles C, Cavestany D. (1996). Sincronización de Celos e Inseminación a Tiempo Fijo en Vaquillonas Holando. Primer Congreso Uruguayo de Producción Animal. 2 al 4 de octubre. Montevideo. 241.
88. Wiltbank JN, Kasson CW. (1968). Synchronization of estrus in cattle with an oral progestational agent and an injection of an estrogen. *J Anim Sci*; 27:113-116.
89. Wolfenson D, Thatcher WW, Savio JD, Badinga L, Lucy MC. (1994). The effect of GnRH analogue on the dynamics of follicular development and synchronization of estrus in lactating dairy cows. *Theriogenology*; 42:633-644.
90. Xu ZZ, Burton LJ. (2000). Estrus synchronization of lactating dairy cows with GnRH, progesterone, and prostaglandin F2 α . *J Dairy Sci*; 83:471-476.
91. Xu ZZ, Burton LJ. (1999). Reproductive performance of dairy heifers and estrus synchronization and fixed-time artificial insemination. *J Dairy Sci*; 82:910-917.