

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**BIOESTIMULACIÓN EN VAQUILLONAS DE CARNE:  
CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA OVÁRICA**

por

**Nicolás CURBELO  
Gabriel LARRAZ**

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

**MODALIDAD: Ensayo Experimental**

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2010**



## PÁGINA DE APROBACIÓN

TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de Mesa:

  
**Dra. Teresa de Castro**

Segundo Miembro (Co-tutor):

  
**Lic. Rodolfo Ungerfeld**

Tercer Miembro:

**Dr. Danilo Fila**

Autores:

**Gabriel Larraz**

**Nicolás Curbelo**

Fecha:

**17 de setiembre de 2010**

FACULTAD DE VETERINARIA

Aprobado con 10 (diez) 

## **AGRADECIMIENTOS**

**A nuestros familiares y amigos por el apoyo incondicional a lo largo de nuestra formación.**

**A Carolina Fiol y Rodolfo Ungerfeld por ser nuestros tutores.**

**Al Med. Vet. Leonardo Menezes por su gran participación en la fase experimental de este trabajo.**

**A Daniela Carnales, Mariana García, Estefanía Mesa, Fiorella Scaglione, M<sup>a</sup> Laura Núñez, Pilar Alvez y Tatiana Morales por sus aportes para la realización del experimento.**

**A José Hernández, Jorge Olivero y Jorge Rodríguez por colaborar con el manejo de los animales.**

**A Facultad de Veterinaria por permitir la realización del ensayo en el campo experimental N°1.**

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

- Tabla 1.** Proporción acumulada de vaquillonas ciclando, según el tiempo de exposición a novillos androgenizados, en los grupos expuesto (GE) y control (GC). .....25
- Tabla 2.** Diámetro del mayor folículo (promedio), agrupados en períodos de 5 días, para los grupos expuesto (GE) y control (GC), en vaquillonas de carne prepúberes expuestas a novillos androgenizados. ....25

## TABLA DE CONTENIDO

<b>PÁGINA DE APROBACIÓN.....</b>	<b>II</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>III</b>
<b>LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....</b>	<b>IV</b>

	Pág.
<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. SUMMARY .....</b>	<b>2</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>5</b>
<b>4.1. PUBERTAD .....</b>	<b>5</b>
<b>4.1.1. Concepto y definición.....</b>	<b>5</b>
<b>4.1.2. Regulación endócrina del sistema reproductivo .....</b>	<b>5</b>
<b>4.1.3. Dinámica folicular .....</b>	<b>6</b>
<b>4.1.4. Factores que influyen en el inicio de la pubertad .....</b>	<b>7</b>
<b>4.1.4.1. Edad y peso vivo.....</b>	<b>7</b>
<b>4.1.4.2. Nutrición .....</b>	<b>8</b>
<b>4.1.4.3. Genética.....</b>	<b>9</b>
<b>4.1.4.4. Factores ambientales.....</b>	<b>9</b>
<b>4.1.4.5. Factores sociales .....</b>	<b>10</b>
<b>4.2. Bioestimulación.....</b>	<b>11</b>
<b>4.2.1. Definición y usos.....</b>	<b>11</b>
<b>4.2.2. Bioestimulación en bovinos .....</b>	<b>12</b>
<b>4.2.3. Mediadores de los efectos de la bioestimulación.....</b>	<b>13</b>
<b>4.2.4. Factores que influyen en la respuesta a la bioestimulación.....</b>	<b>14</b>
<b>4.2.4.1. Interacción entre la bioestimulación y la nutrición.....</b>	<b>14</b>
<b>4.1.4.2. Animal utilizado para la bioestimulación .....</b>	<b>16</b>
<b>4.1.4.3. Tiempo de exposición.....</b>	<b>16</b>
<b>4.1.4.4. Tipo de exposición.....</b>	<b>18</b>
<b>4.2.5. Mecanismo de acción de la bioestimulación.....</b>	<b>18</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>

<b>5.1. Objetivo general .....</b>	<b>21</b>
<b>5.2. Objetivo particular .....</b>	<b>21</b>
<b>6. HIPÓTESIS .....</b>	<b>22</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
<b>7.1 Animales y manejo .....</b>	<b>23</b>
<b>7.2. Determinación de la actividad cíclica y crecimiento folicular .....</b>	<b>23</b>
<b>7.3. Análisis estadístico .....</b>	<b>24</b>
<b>8. RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>26</b>
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>28</b>
<b>11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>29</b>

## 1. RESUMEN

La bioestimulación es una alternativa eficiente para reducir el período de anestro de los bovinos. La actividad cíclica de vaquillonas es estimulada por el macho mediante estimulación genital, feromonas u otras señales externas poco definidas, y podría ser usado para adelantar la pubertad en vaquillonas. Sin embargo, los mecanismos fisiológicos por los que las hembras responden a la estimulación del macho permanecen desconocidos. El objetivo de este experimento fue determinar si la introducción de novillos androgenizados a vaquillonas en anestro estimula el crecimiento folicular en el ovario. Fueron utilizadas 30 vaquillonas Hereford en anestro (24 meses de edad,  $257,5 \pm 32,5$  kg) y 3 novillos androgenizados. Del día -10 al día 0 todas las vaquillonas pastorearon conjuntamente. El día cero los animales fueron asignados en dos grupos: 1) Expuestas a novillos androgenizados desde el día 0 al 80 (expuestas, EH, n=15); 2) Aisladas de machos (control, CH, n=15). Ambos grupos pastorearon campo natural de muy baja disponibilidad, en dos potreros separados por 600 metros, de tal manera que las hembras del grupo control no pudieran ver ni olfatear a los machos. Fueron realizadas ecografías diarias de los ovarios, a todas las vaquillonas durante cuarenta días (del día -10 al día 30), para determinar el diámetro del folículo mayor, utilizando un ecógrafo Aloka 500 (Aloka, Tokyo, Japón) equipado con una sonda lineal de 5 MHz. Durante el mismo tiempo el comportamiento estral fue determinado en ambos grupos dos veces al día. A partir del día 31 al 80 las ecografías se realizaron cada 10 días para determinar la presencia del cuerpo lúteo. La proporción acumulada de vaquillonas ciclando fue mayor en el grupo estimulado que en el control en el día 60 (33,3% vs 0%,  $P=0,01$ ), 70 (47% vs 0%,  $P<0,005$ ) y 80 (53% vs 0%,  $P=0,001$ ). El folículo de mayor tamaño tuvo mayor diámetro en las expuestas que en las control al día 5 ( $6,2 \pm 0,8$  vs  $5,2 \pm 0,6$ mm;  $P=0,001$ ), 7 y 8 ( $6,7 \pm 0,5$  vs  $5,7 \pm 0,5$ mm;  $P < 0,05$ ) y desde el día 11 al 17 ( $7,7 \pm 0,6$  y  $6,9 \pm 0,5$  mm, en expuestas y control respectivamente  $P < 0,05$ ). Cuando se analizó a intervalos de 5 días el folículo mayor de las vaquillonas estimuladas fue mayor que las control a los 15 ( $6,5 \pm 0,8$  vs  $5,9 \pm 0,6$ mm;  $P < 0,05$ ) y 25 días ( $8,1 \pm 0,5$  vs  $7,4 \pm 0,4$ mm;  $P < 0,01$ ). La exposición de vaquillonas de carne a novillos androgenizados fue efectiva para adelantar el inicio de la actividad cíclica. El desarrollo folicular durante los primeros 20 días de la exposición fue mayor para las vaquillonas expuestas, pero ninguno de dichos folículos ovuló durante ese periodo. Aunque la ovulación se presentó de forma tardía respecto a la introducción de los novillos, lo que posiblemente sea debido al bajo plano nutricional de las vaquillonas, la presencia de estos determinó un adelanto de la actividad cíclica.

## 2. SUMMARY

Biostimulation is an effective alternative to reduce anestrous period length. Heifer cyclic activity is stimulated through male's genital stimulation, pheromones or other less defined external cues, and may be used to advance heifers puberty. However, physiological mechanisms by which females respond to male's stimulation remains unknown. The objective of this experiment was to determine if the introduction of androgenised steers (AS) to anestrous heifers stimulates ovarian follicular growth. Thirty anestrous Hereford heifers (24 mo-old age,  $257.5 \pm 32.5$  kg) and 3 AS were used. From Day -10 to Day 0 (joining with AS) all heifers were grazing together. On Day 0 animals were assigned to two groups: 1) exposed to AS from Day 0 to Day 80 (Exposed, EH,  $n=15$ ), or 2) isolated from males (Control, CH,  $n=15$ ). Both groups grazed low quality native pastures in two paddocks separated by 600m, so CH females could not see or smell the males. Daily ovarian ultrasonographic evaluations were done in all the heifers during 40 d (Day -10 to Day 30) to determine the diameter of the largest follicle. During the same period, estrous behavior was recorded in both groups twice daily. Thereafter, ovaries were scanned every 10 days until Day 80 to determine the presence of corpus luteum. Cumulative proportion of cyclic heifers was greater for EH than CH on Day 60 (33.3 vs 0%,  $P=0.01$ ), 70 (47 vs 0%,  $P<0.005$ ) and 80 (53 vs 0%,  $P<0.001$ ). Maximum FD was greater in EH than in CH by Day 5 ( $6.2 \pm 0.8$  vs  $5.2 \pm 0.6$ mm;  $P=0.001$ ), 7 and 8 ( $6.7 \pm 0.5$  vs  $5.7 \pm 0.5$ mm;  $P<0.05$ ) and from Day 11 to 17 ( $7.7 \pm 0.6$  and  $6.9 \pm 0.5$ mm, EH and CH, respectively;  $P<0.05$ ). When analyzed in a 5 d interval, EH had greater FD than CH by Day 15 ( $6.5 \pm 0.8$  vs  $5.9 \pm 0.6$ mm;  $P<0.05$ ) and Day 25 ( $8.1 \pm 0.5$  vs  $7.4 \pm 0.4$ mm;  $P<0.01$ ). Exposure of anestrous beef heifers to AS was effective to advance the onset of cyclic activity. Follicular development during the first 20 d of exposure was greater for exposed heifers, but none of those follicles ovulated during that period. Although ovulation was delayed probably due to heifers' low nutritional status, presence of AS determined an advancement of cyclic activity.

### **3. INTRODUCCIÓN**

En Uruguay el porcentaje de destete histórico se ha situado en torno al 63%, revelando una baja eficiencia reproductiva de nuestros rodeos de cría y constituyendo la principal limitante de crecimiento en la producción de carne nacional (Orcasberro, 1997). Es sabido que altas tasas reproductivas son fundamentales para conseguir una elevada eficiencia en los sistemas de producción de bovinos de carne (Quadros y Lobato, 2004).

La mayoría de los predios dedicados a la producción de terneros, desarrollan esta actividad en condiciones extensivas, donde se manifiesta una gran dependencia del efecto del clima y pasturas (Quintans et al., 2007). En estas condiciones, se ha observado que en los años "normales" se entoran aproximadamente la mitad de las vaquillonas con 2 a 3 años y la otra mitad con más de 3 años, determinando una ineficiencia en la recría de las hembras de reemplazo (Pereira, 2003). Esto provocaría un exceso de categorías improductivas constituidas por todas las hembras que no han alcanzado el desarrollo adecuado para ser servidas. Para que esto no ocurra, el primer servicio de las vaquillonas debería ser alrededor de los 15 a 18 meses de edad, lo que requiere medidas de manejo ajustadas que aseguren que un alto porcentaje de animales hayan alcanzado la pubertad y estén ciclando normalmente (Quintans et al., 2007). Esto demuestra la necesidad de alcanzar la pubertad a una temprana edad, lo que determinará una mayor productividad de ese animal a lo largo de su vida, tanto en el número de terneros, como en los quilogramos de ternero destetados (Lesmeister et al., 1973).

Por esta situación, el estudio de mecanismos que adelanten la pubertad, y por lo tanto la edad al primer servicio, resulta de sumo interés debido al impacto económico potencial que implica. Una de las estrategias que surge como alternativa en el intento de disminuir la edad a la pubertad en vaquillonas, consiste en recurrir al efecto de la interacción socio-sexual entre dos individuos de la misma especie (Quadros y Lobato, 2004). El efecto estimulador del macho sobre la actividad cíclica de las hembras mediante estimulación genital, feromonas u otras señales externas, es conocido como bioestimulación (Chenoweth, 1983).

La bioestimulación en bovinos, puede ser provocada mediante el contacto con toros, vacas androgenizadas (Burns y Spitzer, 1992) y novillos androgenizados (Ungerfeld, 2009). El efecto de éste fenómeno ha sido más estudiado en vacas posparto, donde la mayoría de los trabajos coincide en que la presencia de machos estimula un adelanto del retorno a la actividad cíclica (Zalesky et al., 1984; Stumpf et al., 1992; Rekwot et al., 2000; Berardinelli et al., 2005b; Roelofs et al., 2007; Landaeta-Hernández et al., 2008). Si bien se ha demostrado un efecto positivo en la exposición de vacas multíparas a toros inmediatamente después del parto, debido a que las vacas primíparas presentan un anestro posparto más prolongado, la exposición de las mismas tendría una mayor respuesta en el adelantamiento de la actividad cíclica (Gifford et al., 1989).

En vaquillonas, varios autores han reportado que la presencia de toros adultos provocó el adelantamiento de la edad a la pubertad en vaquillonas de carne, respecto de las que permanecieron aisladas (Izard y Vandenberg, 1982a, b; Roberson et al., 1991; Rekwot et al., 2000; Quadros y Lobato, 2004). Los mismos

resultados se obtuvieron cuando la exposición fue realizada con novillos androgenizados (Fiol et al., 2010). Por otra parte algunos investigadores no pudieron demostrar dicho efecto (Berardinelli et al., 1978; Roberson et al., 1987; Wehrman et al., 1996; Bastidas et al., 1997).

Existen muchas estrategias para avanzar o regular el inicio de la pubertad, muchas de las que se basan en tratamientos hormonales. Si bien estos mecanismos han sido muy estudiados (Alberio et al., 1987), la demanda de los mercados actuales exige productos limpios, verdes y éticos (Martin et al., 2004), por lo que el desarrollo de alternativas como la estimulación socio-sexual, constituye una estrategia adicional para ser incluida en los sistemas de producción libres de hormona (Fiol et al., 2010).

## **4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1. PUBERTAD**

#### **4.1.1. Concepto y Definición**

El estudio de la pubertad en los animales de producción, fundamentalmente en la hembra, ha sido de gran interés para muchos investigadores. Esto radica en que la pubertad marca el inicio de la vida reproductiva del animal, y mientras más pronto comience dicha etapa, más descendientes producirá el animal a lo largo de su vida (Lesmeister et al., 1973). Por lo tanto, desde hace décadas se han tratado de dilucidar cuáles son los factores que determinan que la pubertad sea alcanzada, así como la manera en que actúan cada uno de estos sobre los mecanismos fisiológicos que regulan la función reproductiva.

La pubertad ha sido definida por diversos autores de diferentes maneras. Hunter (1982) considera que la pubertad es la edad en la que se detecta en la hembra el primer estro y que en el animal no preñado va seguida por una actividad ovárica cíclica y característica. Por su parte, tanto Kinder (1987) como Rovira (1994) definieron a la pubertad como el momento del primer comportamiento estrol acompañado por el desarrollo de un cuerpo lúteo funcional que se mantiene por un período de tiempo propio de cada especie. Arthur (1991) consideró que es la etapa de la vida en que la hembra inicia su madurez sexual y puede reproducirse. Faure (1987) definió pubertad como un proceso gradual que aparece en la etapa de desarrollo somático de un individuo, donde por primera vez se hace factible la reproducción, finalizando con la madurez sexual, proceso caracterizado por la presencia de un marcado incremento de la frecuencia de pulsos de la secreción gonadotrófica (en especial la hormona luteinizante, LH), desarrollo de los genitales y los caracteres sexuales secundarios.

#### **4.1.2. Regulación endócrina del sistema reproductivo**

La regulación del sistema reproductivo resulta de la interacción del sistema nervioso central, la hipófisis y las gónadas. El control endócrino se obtiene mediante el equilibrio entre la síntesis de hormonas, como la testosterona y el estradiol, producidos en testículo y ovarios respectivamente y la retroalimentación negativa de éstas sobre los centros superiores, constituidos por el hipotálamo y la hipófisis (Forsberg, 2002).

El control de la dinámica folicular se basa en respuestas diferenciales de los folículos a las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) (Ginther et al., 1989a). Se ha demostrado que existen incrementos en la concentración de FSH antes de la emergencia de cada onda (Adams et al., 1992). Esta descarga de FSH, responsable del reclutamiento folicular, comienza 2 días antes de la emergencia y alcanza su pico máximo 1 día antes o el día de comienzo de la onda (Adams et al., 1992). El crecimiento de los folículos una vez que ha ocurrido el reclutamiento es dependiente de la FSH hasta que éstos alcanzan un diámetro de aproximadamente 8 mm, momento en que los niveles de FSH son más bajos. A partir de este momento el folículo dominante pasa a ser dependiente de LH para su crecimiento, al mismo tiempo que los folículos subordinados regresan (Ginther et al., 2001). Todos los

folículos poseen receptores de LH en las células de la teca y FSH en las células de la granulosa, pero sólo el folículo dominante adquiere receptores de LH en las células de la granulosa (Ireland et al., 1987). El efecto de la LH en la granulosa es un aumento en la producción de estradiol, lo que permite el crecimiento del folículo aunque disminuyan los niveles de FSH.

En hembras prepúberes, el mecanismo hipotalámico que controla la secreción gonadotrófica, es altamente sensible a los efectos inhibitorios del estradiol. Cuando la pubertad se aproxima esta sensibilidad decrece, permitiendo aumentar las concentraciones de GnRH a niveles suficientes para estimular el crecimiento folicular y producir la primera ovulación. Según Day et al. (1987) el incremento en la secreción de LH ocurre como resultado de la disminución en la sensibilidad a la retroalimentación negativa del estradiol. Para algunos autores, los episodios de liberación de LH se incrementan de manera gradual a partir del nacimiento (Schams et al., 1981; Day et al., 1984).

Se han reportado 2 incrementos de LH, uno temprano entre las 12 y 20 semanas de edad (Schams et al., 1981) y otro aumento gradual coincidente con la pubertad, a las 36 a 52 semanas de edad (Desjardins y Hafs, 1969; Schams et al., 1981). Algunos trabajos también reportaron un incremento precoz de la concentración plasmática de FSH coincidente con la de LH (Schams et al., 1981).

#### **4.1.3. Dinámica folicular**

El estudio del desarrollo folicular en sus comienzos se basó en la observación directa de ovarios mediante el sacrificio de los animales. Rajakoski (1960) postuló una teoría, planteando la existencia de períodos u ondas de crecimiento folicular durante el ciclo estral bovino. En tanto, otros autores, que utilizaban cortes histológicos, cuestionaron la existencia de las ondas y apoyaron la noción de que el crecimiento folicular era continuo e independiente de las fases del ciclo estral (Chourdary et al., 1968; Donaldson y Hansel, 1968; Marion et al., 1968).

Con el advenimiento de la imagenología, específicamente la ultrasonografía en tiempo real, se logró confirmar la teoría de Rajakoski (Savio et al., 1988; Sirois y Fortune, 1988). La ultrasonografía permitió además demostrar que existe un patrón de ondas que se repite en los distintos momentos fisiológicos de la hembra bovina, como ser, el período prepuberal (Adams et al., 1994; Evans et al., 1994), la gestación (Ginther et al., 1989a) y el posparto (Savio et al., 1990).

Se entiende por onda de crecimiento folicular al desarrollo sincrónico de un grupo de folículos individualmente identificables a partir de un diámetro de 4 mm, que ocurre al mismo tiempo en los 2 ovarios (Ginther et al., 1989a). Durante 2 o 3 días todos los folículos crecen y uno de ellos es seleccionado, continúa creciendo y se convierte en folículo dominante, mientras que el resto de los folículos, llamados subordinados, se vuelven atrésicos y regresan. El destino final de este folículo dominante podrá ser la ovulación o la regresión para su reemplazo (Bo y Caccia, 2002).

Evans et al., (1994) mediante la utilización de ultrasonografía, demostraron que el desarrollo folicular en ondas ocurre a partir de las 2 semanas de vida. Este fenómeno se mantiene durante toda la vida del animal. Durante el período

prepuberal existe una sucesión de ondas, cuyos folículos dominantes terminan regresando, siendo remplazados por otro folículo de la onda siguiente. Este proceso continúa hasta que se alcanza la pubertad, momento en que ocurre la primera ovulación, dando comienzo a la etapa cíclica del animal. Esta primera ovulación en la mayoría de los casos se caracteriza por la ausencia de manifestaciones de celo (Morrow, 1969) y un ciclo de corta duración, que es seguido posteriormente por ciclos de duración normal (Evans et al., 1994).

En la mayoría de los casos, en vacas, los ciclos presentan 2 (Ginther et al., 1989a) ó 3 (Savio et al., 1988; Sirois y Fortune, 1988) ondas, aunque no existe consenso sobre cuál de los tipos de ciclo es el predominante. En un estudio realizado por Evans et al., (1994) se encontró que la duración promedio del ciclo ovulatorio corto fue de  $7,7 \pm 0,2$  días, mientras que la duración promedio del ciclo ovulatorio normal fue de  $20,3 \pm 0,5$  días.

En relación al patrón de ondas encontrado en las vaquillonas prepúberes, es decir el crecimiento y regresión de los folículos, éste ocurre de la misma forma que el encontrado en la vaca cíclica y preñada (Hooper, 1993). Esto coincide con lo reportado por Sirois y Fortune (1988) y Ginther et al. (1989a) quienes afirmaron que el patrón de crecimiento y regresión de folículos en el final de la etapa prepuberal y el inicio del período cíclico, es marcadamente similar al de animales adultos.

Las tasas de crecimiento del folículo dominante, así como las de regresión son similares a todas las edades (Evans et al., 1994). En el mismo trabajo, observando la duración de la fase de crecimiento, se vio que la misma tenía una mayor duración en la onda ovulatoria, en vaquillonas que presentan 2 ondas. Asimismo se determinó que, en las vaquillonas de 3 ondas, la fase de crecimiento de la segunda onda se veía acortada. La fase estática durante el crecimiento de las ondas fue mayor en ondas anovulatorias que en las ovulatorias. En cuanto al cuerpo lúteo, se vio que el tamaño del mismo en el ciclo de corta duración fue menor al presente en el ciclo de duración normal. Este menor tamaño repercutió en la secreción de progesterona, la que fue menor respecto de la encontrada en los ciclos de duración normal (Evans et al., 1994).

#### **4.1.4. Factores que influyen en el inicio de la pubertad**

Independientemente del criterio usado para definirla, es sabido que el inicio de la pubertad se ve afectada por distintos factores, entre los que se encuentran edad y peso vivo, nutrición, genética, factores ambientales y factores sociales (Roberson et al., 1987).

##### **4.1.4.1. Edad y peso vivo**

En relación a la interacción de estos factores en el comienzo de la pubertad se debe considerar cuál es el peso y la edad mínima necesaria para que una determinada raza sea susceptible de alcanzar la pubertad. Wiltbank et al., (1966) afirmaron que después que se alcanza un determinado peso, las variaciones en la edad a la pubertad serían consecuencias de otros factores y no debidas a las diferencias en la velocidad de crecimiento. La edad y peso a la pubertad dependen en gran medida del nivel de alimentación posdestete, por lo que éste determinará un adelanto o

atraso en alcanzarla (Rovira, 1994). Si el plano nutricional después del destete es alto, ejercerá una marcada influencia en la edad y peso a la pubertad, llegando a la misma con una menor edad y un mayor peso (Rovira, 1994).

En un estudio realizado por Arije y Wiltbank (1971), trabajando con vaquillonas de carne, de raza Hereford, con moderadas ganancias de peso, reportaron que las mismas alcanzaron la pubertad a los 434 días de edad y 254 kg de peso. En otro trabajo realizado en nuestro país, otros investigadores indicaron que vaquillonas de carne cruce, manejadas en condiciones de pastoreo, alcanzaron la pubertad entre 15 y 17 meses de edad y con 278 a 295 kg de peso vivo (Quintans et al., 2007).

#### **4.1.4.2. Nutrición**

##### *Influencia del nivel nutritivo*

La nutrición representa uno de los factores relacionados a la reproducción que ha sido más estudiado debido a su gran influencia en el inicio de la pubertad (Schillo et al., 1992). El estatus nutricional influye en todo el período comprendido entre el nacimiento y la edad a la pubertad, pero la mayor influencia ocurre en la etapa posdestete del animal (Rovira, 1994).

En el pre-destete ha sido reportada una correlación inversa entre la tasa de crecimiento y la edad a la pubertad (Wiltbank et al., 1966; Arije y Wiltbank, 1971), la que se mantiene también, en la etapa posterior al destete (Wiltbank et al., 1966) aunque en esta última estará más influenciada por el plano nutricional. La correlación negativa entre la tasa de crecimiento y la pubertad, en el período posdestete, se evidenció en las vaquillonas que tuvieron una ganancia diaria de 200 g, pero no en las de 400 g (Wiltbank et al., 1966). Esto sugiere que después de que se alcanza cierto peso crítico, la tasa de crecimiento tiene poco efecto sobre la maduración sexual (Schillo et al., 1992).

##### *Señales metabólicas*

Los nutrientes que ingresan al recién nacido se dirigen exclusivamente al mantenimiento, es decir que la prioridad es mantener las funciones vitales fisiológicas. A medida que el animal comienza a crecer, aumenta el consumo y comienza a generarse un excedente de nutrientes, los que podrán destinarse a funciones fisiológicas no vitales (Senger, 1997). Si bien los excesos de energía son convertidos en grasa (reserva) siendo esto una señal positiva para el inicio de la pubertad, la reproducción constituye una función de baja prioridad a lo largo de toda la vida del animal (Senger, 1997).

El umbral de "engrasamiento" requerido para el inicio de la pubertad no ha sido bien determinado (Senger, 1997). No obstante, el "engrasamiento" por sí solo no promueve el inicio de la pubertad, ya que hembras pueden estar extremadamente gordas a una muy temprana edad y no entrar en pubertad (Senger, 1997). Por lo tanto, la maduración corporal y las reservas de grasa constituyen elementos importantes en la edad del inicio de la pubertad (Senger, 1997). El estado nutricional determina el tamaño corporal y el peso vivo a lo largo de toda la vida (Senger, 1997). En cuanto al mecanismo por el que la nutrición influye en el inicio de la pubertad,

existe evidencia que la frecuencia de pulsos de GnRH está bajo la influencia de glucosa y ácidos grasos libres en sangre (Senger, 1997).

Fitzgerald et al. (1982) y Schillo et al. (1992) concluyeron que el estado nutricional afecta la pulsatilidad de LH de vaquillonas en desarrollo. En 1994 se descubrió una hormona peptídica, denominada leptina que es sintetizada por el tejido adiposo (Senger, 1997). El nivel sanguíneo de leptina en sangre, está por lo tanto directamente relacionado al nivel de engrasamiento del individuo. El descubrimiento de receptores de leptina en el lóbulo anterior de la pituitaria y el hipotálamo, hacen pensar que la misma juega un rol importante en la regulación del inicio de la pubertad (Senger, 1997). La leptina sería una señal que notifica a las neuronas productoras de GnRH que el estatus nutricional es adecuado para dar inicio a la función reproductiva (Senger, 1997).

#### **4.1.4.3. Genética**

La raza del animal es una influencia importante sobre la edad a la que la pubertad es alcanzada, tanto en machos como en hembras. La influencia genética se hace evidente cuando se compara animales de raza pura con híbridas. En general se acepta que la pubertad se retrasa con cruza consanguíneas y se acorta mediante la cruce entre razas (Sorensen, 1991).

Existen rangos de edades característicos para diferentes razas, por ejemplo las razas lecheras alcanzan la pubertad alrededor de los 7 a 9 meses mientras que las razas carniceras británicas alcanzan la pubertad a los 12 a 13 meses. Las razas Bos indicus son más tardías, pudiendo no alcanzar la pubertad incluso hasta los 24 meses (Rovira, 1994). Dentro de las razas carniceras, en particular las británicas, se ha encontrado que las Hereford alcanzan la pubertad a una mayor edad y mayor peso respecto a la Aberdeen Angus y Shorthorn (Wiltbank et al., 1966). La diferencia entre estas razas es más manifiesta cuando se las compara en planos nutricionales bajos que en altos (Wiltbank et al., 1969).

Bellows (1967) encontró que en un plano nutricional moderado y a los 15 meses de edad, el 83% de las terneras Aberdeen Angus habían alcanzado la pubertad mientras que en la raza Hereford tan solo un 44% lo habían logrado. Por otra parte, en un plano nutricional alto y también a los 15 meses, el 100% de las terneras de ambas razas ya habían alcanzado la pubertad. En un trabajo realizado por Gregory et al. (1966) se demostró que después de ajustar la edad a la pubertad por el efecto de heterosis en la ganancia diaria de peso, aún existió diferencia en la edad a la pubertad. Esto permite afirmar que existe vigor híbrido para esta característica, de manera independiente y no solamente debido a las diferentes tasas de crecimiento.

#### **4.1.4.4. Factores ambientales**

Algunos de los factores ambientales que influyen sobre el inicio de la pubertad son la duración del día, la temperatura, la lluvia y la disponibilidad de alimentos, así como los estímulos socio-sexuales.

### *Fotoperiodo*

La reproducción estacional es el resultado de la adaptación de las especies a las condiciones del ambiente, fundamentalmente la alimentación. Para esto es importante que los partos ocurran en momentos de buena disponibilidad de alimento, siendo esto importante tanto para el recién nacido como para la madre (Bronson, 1988a, b). Debido a que la duración del día varía en forma constante de un año a otro, es que fue utilizado por distintas especies como indicador del momento más apropiado para la reproducción.

La mediación entre la luz y el sistema reproductivo está dado por la melatonina, hormona sintetizada por la glándula pineal. La síntesis y liberación de esta hormona está en relación directa a las horas de luz y oscuridad, encontrándose niveles altos en la noche y bajos en el día (Forsberg, 2002). La respuesta a la concentración de melatonina varía según la estrategia reproductiva de las diferentes especies. Para algunas especies como la oveja, el aumento de la concentración es señal de dar comienzo a la estación reproductiva mientras que para otras, como la yegua, lo será su disminución (Arendt, 1986; Hastings et al., 1985).

### *Estación del año*

El inicio de la pubertad posee una fuerte relación con el período del año. La estación del año implica grados de luminosidad, humedad y temperatura, que son características de una determinada época del año, y que de acuerdo con la especie, puede actuar acelerando o retardando el advenimiento de la pubertad. La mayor importancia de que la reproducción ocurra en una determinada estación radica en el intento de lograr la mayor supervivencia de la especie, la depende principalmente de la disponibilidad alimenticia (Bronson, 1988b).

#### **4.1.4.5. Factores sociales**

Existe una serie de factores sociales como la presencia de machos en un grupo de hembras o el tamaño del grupo social, que repercuten en la aparición de la pubertad. La mayoría de estos factores ejercen su acción sobre las neuronas sensitivas de los sistemas óptico y olfatorio, quienes envían sus señales al SNC, donde serán procesadas y éste responderá con una descarga sobre las neuronas hipotalámicas productoras de GnRH. La respuesta global a este proceso es la producción por parte del hipotálamo de altas frecuencias y amplitud de pulsos de GnRH, los que se corresponderán con una alta frecuencia de pulsos de LH (Senger, 1997).

Uno de los mecanismos sociales que repercute en el inicio de la pubertad es la bioestimulación. Esta se define como el estímulo provocado por la presencia de los machos, induciendo el estro y la ovulación mediante estímulos genitales, feromonas u otras señales químicas (Chenoweth, 1983). El fenómeno de la bioestimulación ha sido demostrado en la oveja, cerda y vaca (Senger, 1997) y constituye una ventaja evolutiva ya que si la hembra alcanza la pubertad en presencia de machos, existe una mayor oportunidad de desarrollar una preñez y por ende asegurar la supervivencia de la especie (Senger, 1997).

Existen trabajos en los que se evidencia el fenómeno de la bioestimulación, como los de Watson y Radford (1960) y Shelton (1960) en los que la presencia de machos antes de la época normal de apareamiento estimuló el inicio de los ciclos estrales en ovejas y cabras, así como el de Roberson et al. (1991) quienes exponiendo vaquillonas prepúberes de carne a toros, encontraron que las feromonas del macho incrementaron la proporción de vaquillonas que alcanzaron la pubertad a los 12 a 14 meses.

## **4.2. BIOESTIMULACIÓN**

### **4.2.1. Definición y usos**

Las mayores influencias sobre el rendimiento reproductivo en los predios ganaderos son ejercidas por factores ambientales y de manejo. Es por esto que la utilización racional de medidas de manejo juega un rol importante a la hora de maximizar el rendimiento reproductivo. En la mayoría de los casos, pero más aún en los países subdesarrollados, la no aplicación de tecnologías en las empresas ganaderas ha sido debida a los altos costos (Landaeta-Hernández et al., 2008).

La bioestimulación se define según Chenoweth (1983) como el estímulo provocado por la presencia de los machos, induciendo el estro y la ovulación mediante estímulos genitales, feromonas u otras señales químicas. En los últimos tiempos varios investigadores han centrado su atención en la bioestimulación, debido a que se trata de una tecnología capaz de mejorar los indicadores reproductivos y que reúne algunas de las características buscadas por las empresas agropecuarias, al momento de optar por una determinada tecnología, como ser un relativo bajo costo (Landaeta-Hernández et al., 2008) y su aplicabilidad en los diferentes tipos de sistemas, fundamentalmente en los predios extensivos (Martin, 1995).

La bioestimulación ha presentado respuestas positivas en diferentes especies (Watson y Radford, 1960; Mauleon y Dauzier, 1965; Vandenberg et al., 1976; Zalesky et al., 1984; Berardinelli et al., 1978; Custer et al., 1990; Rekwot et al., 2001). En animales domésticos de importancia económica los efectos de la bioestimulación son más evidentes en ovinos y suinos, donde las técnicas de manejo son comúnmente empleadas para explotar dicho fenómeno (Chenoweth, 1983).

Watson y Radford (1960) y Shelton (1960) reportaron que la presencia de machos ovinos y caprinos, antes de la época normal de apareamiento estimula el inicio de los ciclos estrales en hembras que se encuentran en anestro estacional, al mismo tiempo que Mauleon y Dauzier (1965) y Poindron et al. (1980) encontraron el mismo resultado durante el anestro lactacional de las ovejas. Estos resultados son similares a los reportados por Mellado y Hernández (1996) quienes trabajando con cabras encontraron respuestas positivas a la bioestimulación, en el retorno a la ciclicidad cuando las mismas se encontraban en anestro estacional. En trabajos realizados con cerdas prepúberes, tanto criadas en confinamiento como criadas a campo, se vio que las que fueron expuestas a verracos, alcanzaron la pubertad a más temprana edad que las que no fueron expuestas (Thomson y Savage, 1978; Zimmerman et al., 1969, citados por Izard y Vandenberg, 1982a).

A diferencia de lo encontrado en ovinos, donde existe una gran cantidad de trabajos que coinciden en la respuesta positiva de las hembras a la bioestimulación (Martin et al., 1980; Poindron et al., 1980; Martin et al., 1983, 1986), en bovinos dicho fenómeno ha presentado resultados contradictorios (Alberio et al., 1987; Roberson et al., 1987; Wehrman et al., 1996). Es probable que esta situación se deba a que los trabajos se han realizado en una gran variedad de situaciones como ser, diferente duración e intensidad de la exposición, diferente estado fisiológico del animal estimulado (prepúber, posparto), utilizando distintos animales para bioestimar, así como la combinación de estos, lo que ha impedido llegar a una conclusión consensuada sobre el tema (Alberio et al., 1987)

#### **4.2.2. Bioestimulación en bovinos**

Debido al beneficio potencial que tendría el uso de la bioestimulación como una técnica complementaria para mejorar la eficiencia reproductiva en bovinos, se han evaluado sus efectos tanto sobre el adelanto de la pubertad de las hembras (Berardinelli et al., 1978; MacMillan et al., 1979), la disminución del anestro posparto (Berardinelli y Joshi, 2005b; Burns y Spitzer, 1992; MacMillan et al., 1979) así como la respuesta a la sincronización de celos (Madrigal et al., 2001).

Los efectos de la bioestimulación en bovinos han sido mayormente evaluados en vacas durante el posparto, específicamente sobre la duración del anestro posparto. El anestro posparto constituye la principal limitante para obtener un intervalo interparto entre 12 y 13 meses (Chenoweth, 1983; Alberio et al., 1987; Cupp et al., 1992), fundamentalmente en vacas primíparas (Wiltbank et al., 1970; Gifford et al., 1989), lo que determina la ineficiencia reproductiva.

Existe un gran número de trabajos que han reportado resultados positivos cuando vacas múltiparas ó primíparas lactando fueron expuestas a machos (Alberio, 1987; Gifford et al., 1989; Custer et al., 1990; Cupp et al., 1992; Stumpf et al., 1992; Hornbuckle et al., 1995; Madrigal et al., 2001; Pérez-Hernández et al., 2002; Berardinelli y Joshi, 2005b). Zalesky et al. (1984) y Rekwot et al. (2001) trabajando con vacas de carne múltiparas lactando, encontraron que cuando las mismas fueron expuestas a toros el reinicio de la actividad ovárica cíclica se dio en menor tiempo que cuando no fueron expuestas. Similares resultados obtuvieron Berardinelli y Joshi (2005b) quienes encontraron que una mayor proporción de vacas expuestas a toros acortaron el período de anestro posparto respecto de las vacas que no fueron expuestas. En la misma dirección, la estimulación con toros de vacas primíparas lactando, acortó el intervalo del parto al primer celo (Custer et al., 1990; Fernández et al., 1996, Berardinelli et al., 2005). A pesar de esto, algunos autores no encontraron diferencias en la duración del anestro posparto entre los animales expuestos y no expuestos (Macmillan et al., 1979; Tauck et al., 2006).

El efecto de la bioestimulación sobre el inicio de la pubertad en vaquillonas es otra de las situaciones estudiadas en la búsqueda de mejorar la eficiencia reproductiva. Esto se justifica con el conocimiento de que las vaquillonas que alcanzan la pubertad a una temprana edad, van a obtener una mayor productividad a lo largo de su vida, con un mayor número de terneros destetados y de mayor peso (Lesmeister et al., 1973). Varios trabajos demuestran los efectos positivos de la exposición a los machos sobre el inicio de la pubertad (Izard y Vandenberg, 1982a; Izard y

Vandenbergh, 1982b; Roberson et al., 1991; Rekwot et al., 2000; Quadros y Lobato, 2004; Ungerfeld, 2009; Fiol et al., 2010). La disminución de la edad a la pubertad en vaquillonas expuestas a toros ha sido reportada tanto en vaquillonas *Bos taurus* (Roberson et al., 1991; Rekwot et al., 2000) como en vaquillonas *Bos indicus* (Oliveira et al., 2009). Sin embargo, otros no han encontrado efectos de la bioestimulación sobre el inicio de la actividad cíclica en vaquillonas (Berardinelli et al., 1978; Roberson et al., 1987; Wehrman et al., 1996; Bastidas et al., 1997).

La exposición a machos también ha mostrado efectos positivos sobre la respuesta a la sincronización de celos. En un trabajo realizado con vacas primíparas de carne en lactación, Tauck y Berardinelli (2005) reportaron que las mismas obtuvieron una mayor sincronización de celos en un protocolo de IATF que utilizaba GnRH y PGF<sub>2α</sub> cuando fueron expuestas al efecto bioestimulador del toro. En vaquillonas, la bioestimulación también determinó un aumento en la sincronización, con la utilización de prostaglandinas, cuando las mismas fueron alojadas con vacas androgenizadas durante el intervalo entre inyecciones (Chenoweth, 1983).

A pesar de que existe un número importante de trabajos que respaldan el uso de la bioestimulación como herramienta para mejorar la productividad de los rodeos a través del adelanto en la edad a la pubertad en vaquillonas así como el acortamiento del anestro posparto en vacas, la información con que se cuenta no ha sido suficiente para permitir una adecuada difusión de esta herramienta.

#### **4.2.3. Mediadores de los efectos de la bioestimulación**

El mecanismo exacto por el que la bioestimulación afecta el sistema neuroendócrino que controla la función reproductiva en bovinos, aún no ha sido completamente dilucidado (Izard y Vandenbergh, 1982b; Custer et al., 1990; Burns y Spitzer, 1992; Berardinelli et al., 2005). No obstante, algunos autores han planteado algunas hipótesis que podrían explicar dicho mecanismo. Berardinelli y Joshi (2005b) consideran que el efecto bioestimulador del toro en vacas lactando, podría estar mediado directa o indirectamente por uno ó varios de los siguientes factores: atenuación del efecto de retroalimentación negativa del 17β estradiol, atenuación del efecto de retroalimentación negativo asociado con el vínculo materno y de lactación, reducción del tono de los opioides a nivel hipotalámico y/ó por un efecto directo que estimule los mecanismos hipotalámicos que controlan la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).

En general, diferentes trabajos que investigaron el tema, hacen referencia a un posible mecanismo de "señalización" entre el animal bioestimulador y el receptor (Izard, 1983; Zalesky et al., 1984; Berardinelli y Joshi, 2005a). Esta señal que sería de tipo esteroceptiva, podría jugar un rol importante en la interacción macho-hembra y estaría a cargo de estímulos de tipo olfatorio, entre los que participarían las feromonas (Zalesky et al., 1984). Izard (1983) define a las feromonas como sustancias químicas transportadas por el aire que son secretadas externamente por un animal en la orina, heces o por glándulas cutáneas y que causan una reacción específica en un receptor individual de la misma especie. La reacción involucraría cambios específicos de comportamiento y/o fisiológicos sobre el sistema endócrino o reproductivo del animal receptor (Izard, 1983).

Berardinelli y Joshi (2005a) plantean que las feromonas son señales liberadas en fluidos corporales o productos de excreción, y que serían las responsables de "disparar" el efecto estimulador en bovinos. Dichos autores evaluaron la exposición de vacas primíparas durante el posparto a la presencia directa del toro o indirectamente mediante algunos de sus productos de excreción, y reportaron que dicha exposición adelantó el reinicio de la actividad luteal posparto. Por su parte, Wright et al., (1994) también encontraron efectos positivos sobre la reducción del período de anestro posparto en vacas cuando las mismas recibieron exposición oronasal de mucus cervical proveniente de vacas en celo en comparación a las vacas que fueron tratadas con agua destilada. Tanto el tratamiento oronasal con orina de toros (Izard y Vandenberg, 1982a) como la exposición directa a los machos (Roberson et al., 1991) también fueron efectivos para lograr el adelanto en la edad a la pubertad.

#### **4.2.4. Factores que influyen en la respuesta a la bioestimulación**

Varios factores han mostrado influir sobre la respuesta a la bioestimulación en bovinos, tanto durante el posparto como en la etapa prepuberal de las hembras, alguno de los que serían la interacción entre la bioestimulación y la nutrición, el animal utilizado para la bioestimulación, el tiempo de exposición o el tipo de exposición.

##### **4.2.4.1. Interacción entre la bioestimulación y la nutrición**

Existen varios trabajos que afirman la existencia de una fuerte interacción entre la nutrición y la respuesta a la bioestimulación (Stumpf et al., 1992; Monje et al., 1992; Madrigal et al., 2001; Rekwot et al., 2001).

Cuando se evaluó el efecto de la bioestimulación sobre la disminución del período de anestro posparto se vio que el estatus nutricional juega un rol decisivo, ya que a diferentes condiciones corporales, se evidencian distintas magnitudes de respuesta (Madrigal et al., 2001). Stumpf et al. (1992) afirman que las vacas con moderada condición corporal son más sensibles a la bioestimulación con toro que las vacas con alta condición corporal. Esta interacción se hace evidente en el ensayo realizado por Madrigal et al. (2001), en el que se evaluó el efecto de la interacción condición corporal-bioestimulación con toros, encontrando que las vacas con condición corporal alta y expuestas a toros empezaron a ciclar 9 días antes que las vacas con condición corporal alta aisladas de los machos, 38 días antes que las vacas con condición corporal baja expuestas, y 62 días antes que las vacas con condición corporal baja aisladas. Por su parte, Monje et al. (1992), reportaron que la presencia de toros acortó el periodo entre el parto y el reinicio de la actividad ovárica cíclica solo en vacas que ganaban peso pero no en las que perdían peso durante el período posparto. Sin embargo, si las vacas llegan al parto con alta condición corporal, las mismas presentarán un período de anestro posparto corto, independientemente de si fueron expuestas a toros o no, por encontrarse próximas al reinicio de la actividad cíclica (Rekwot et al., 2001). Por lo tanto, para lograr una respuesta positiva a la bioestimulación en vacas durante el posparto parecería necesario que las mismas presenten una condición corporal moderada y estén ganando peso, puesto que las vacas con muy buena condición reiniciarán la actividad cíclica tempranamente,

mientras que las de pobre condición lo harán tardíamente, no existiendo en estos casos respuesta a la bioestimulación.

Al igual que en vacas durante el posparto, también existe información respecto de la interacción entre la nutrición y la respuesta a la bioestimulación en vaquillonas prepúberes. Roberson et al. (1991), trabajando con vaquillonas prepúberes, evaluaron la interacción entre la nutrición y la respuesta a la bioestimulación, cuando las mismas fueron alimentadas para lograr una ganancia diaria alta (800 g) o moderada (600 g). Éstos observaron que el efecto bioestimulador fue mayor en las vaquillonas que tuvieron una alta ganancia de peso. Coincidiendo con esto, Izard y Vandenberg (1982a) observaron que el peso vivo de vaquillonas expuestas a orina de toro y que no alcanzaron la pubertad fue menor que el de vaquillonas tratadas con agua y que tampoco alcanzaron la pubertad, demostrando que la respuesta a dicha exposición fue dependiente del peso vivo. La respuesta en vaquillonas al efecto de la exposición a machos fue solamente observada en las más pesadas, lo que sugiere la existencia de un umbral de peso vivo necesario para que se manifieste la bioestimulación (Roberson et al., 1991; Quadros y Lobato, 2004). Este umbral planteado por los autores fue estimado por González-Padilla (1975), en 260 kg en vaquillonas de carne prepúberes, ya que tras la inyección de hormonas para inducir la ovulación, una menor cantidad de vaquillonas por debajo de los 260 kg mostraron estró después del tratamiento, respecto de las que se encontraban por encima de dicho peso.

Según Roberson et al. (1991), las tasas de crecimiento que presentan las vaquillonas durante el período de bioestimulación ejercería una mayor influencia sobre la respuesta a la exposición a los machos que el peso vivo que presenten las hembras en ese momento. Éstos observaron que las vaquillonas demostraron la mayor respuesta a la exposición cuando tenían altas o moderadas ganancias de peso, mientras que la magnitud de la respuesta decrecía a medida que las ganancias de peso disminuían. Por su parte, Oliveira et al. (2009) desarrollaron un experimento en el que se incluyeron ambas variables: bioestimulación y suplementación. Dichos autores encontraron que las vaquillonas bioestimuladas que recibieron suplemento tuvieron una mayor ganancia de peso y una menor edad a la pubertad que las que solo fueron estimuladas, demostrando que la alimentación es un factor adicional involucrado en el inicio de la pubertad. No obstante, reportaron que el efecto de la bioestimulación sobre la maduración sexual en vaquillonas Nelore es más evidente, debido a que el porcentaje de preñez en los animales bioestimulados (con o sin suplemento) fue mayor que en los no bioestimulados, incluso en los no bioestimulados que recibieron suplemento. Recientemente Fiol et al. (2010) evaluaron la respuesta a la exposición de vaquillonas de carne de 12 meses peripuberales a novillos androgenizados en el adelanto de la pubertad y si la misma dependía del peso al inicio de la exposición. Para esto, las vaquillonas fueron estratificadas según su peso vivo inicial en alto, medio y bajo. Se encontró que una mayor proporción de vaquillonas de peso alto alcanzaron la pubertad respecto de las de peso vivo medio y bajo, demostrando que la respuesta a la bioestimulación depende del peso vivo.

#### **4.2.4.2. Animal utilizado para la bioestimulación**

Hasta el momento y según nuestro conocimiento, no existen en la literatura trabajos que hayan comparado los efectos de diferentes animales para la bioestimulación. En la mayoría de los experimentos, los autores recurrieron a la utilización de toros, utilizando diversas técnicas para mantener el deseo sexual y evitar la concepción de las hembras, como ser el desvío peneano (Custer et al., 1990; Quadros y Lobato, 2004) o la epididimectomía (Alberio et al., 1987; Landaeta-Hernández et al., 2008).

En ratones, hembras prepúberes expuestas a orina de machos adultos alcanzaron la pubertad a una menor edad, demostrando que la orina del macho contiene algún componente capaz de inducir dicha respuesta positiva (Vandenbergh et al., 1976). Posteriormente, Izard y Vandenbergh (1982a) trabajando con bovinos hipotetizaron que el efecto de la bioestimulación era mediado por feromonas liberadas junto con productos de excreción de los machos, como la orina. Dichos autores encontraron que una mayor proporción de vaquillonas tratadas oronasalmente con orina de toros alcanzaron la pubertad, en comparación a las vaquillonas tratadas con agua.

Burns y Spitzer (1992) plantearon que la producción de feromonas estaría bajo la dependencia de los andrógenos, y obtuvieron resultados positivos sobre la disminución del período de anestro posparto, con la utilización tanto de toros como de vacas tratadas con testosterona. A nivel nacional, varios trabajos evaluaron la utilización de novillos androgenizados (Ungerfeld, 2009, 2010; Fiol et al., 2010) como estímulo tanto en vacas como en vaquillonas prepúberes. Ungerfeld (2009) reportó que la exposición de vaquillonas de carne de 17 a 22 meses de edad, a novillos androgenizados durante un período de 15 días inmediatamente antes de ser servidas con toros, incrementó el porcentaje de preñez al día 75. Por su parte, Fiol et al. (2010) utilizaron novillos androgenizados con el objetivo de adelantar la pubertad en vaquillonas de carne, obteniendo resultados positivos a la bioestimulación. En cabras, Mellado y Hernández (1996) observaron que la utilización de machos castrados androgenizados permitió inducir el estro durante la estación de cría, en relación a las hembras aisladas de los machos. Si bien resta por evaluar si los efectos de la exposición a los novillos androgenizados son similares a los obtenidos con los toros, los diferentes resultados permitirían reafirmar el planteamiento de Burns y Spitzer (1992) en relación a la dependencia de los andrógenos.

#### **4.2.4.3. Tiempo de exposición**

En cuanto al tiempo de exposición requerido para obtener una respuesta positiva a la bioestimulación, no ha sido establecido cual es el tiempo necesario para que la misma se haga evidente. En este sentido, una gran variedad de autores han reportado resultados positivos a cortos (Alberio et al., 1987; Fernández et al., 1996, Ungerfeld, 2009) o largos (Custer et al., 1990; Berardinelli y Joshi, 2005b; Oliveira et al., 2009) períodos de exposición. Sin embargo otros obtuvieron resultados negativos tanto a períodos cortos (Berardinelli et al., 1978; Macmillan et al., 1979; Roberson et al., 1987) como largos (Bastidas et al., 1997).

En el acortamiento del período de anestro posparto, existen ensayos en los que se han empleado períodos largos de exposición y cuyos resultados fueron positivos (Custer et al., 1990; Berardinelli y Joshi, 2005b). Custer et al. (1990) exponiendo

vacas de carne primíparas en lactación a toros maduros por un período de 108 días lograron adelantar el retorno de la actividad ovárica cíclica. Esto coincide con lo observado por Berardinelli y Joshi (2005b) quienes sometieron vacas de primer parto a la exposición con toros por un período de 122 días comenzando el día 15, 35 y 55 posparto, presentando resultados positivos en los primeros 40 días de exposición, independientemente del día de comienzo de la misma. Sin embargo Tauck y Berardinelli (2005) reportaron que la exposición de vacas primíparas en lactación, no disminuyeron el período de anestro posparto cuando fueron expuestas a toros por un período de 95 días.

Mediante la utilización de períodos cortos de estimulación (28 días), Alberio et al. (1987) encontraron un efecto positivo sobre el adelantamiento de la actividad cíclica en el posparto, cuando vacas múltiparas fueron expuestas a toros. Similarmente Berardinelli et al. (2005), exponiendo vacas primíparas lactando por un período de 60 días de exposición demostraron que las mismas acortaron el período entre el parto y la manifestación del primer celo. A diferencia de estos MacMillan et al. (1979) no lograron reducir la duración del anestro posparto, exponiendo vacas múltiparas lactando por un período de 21 días a toros maduros.

La respuesta de adelantar la pubertad mediante la bioestimulación también presenta discrepancias en cuanto al tiempo de exposición adecuado para lograrla. Algunos trabajos mencionan que períodos cortos de exposición son suficientes para disminuir la edad a la pubertad. Ejemplos de esto son los trabajos realizados por Quadros y Lobato (2004) y Fiol et al. (2010), quienes exponiendo vaquillonas de carne prepúberes durante 50 y 35 días respectivamente, evidenciaron un adelantamiento en la edad a la pubertad. En contraposición a esto Berardinelli et al. (1978) no pudieron demostrar dicha respuesta mediante la exposición de vaquillonas prepúberes en un período de 21 días.

La exposición de vaquillonas prepúberes a toros por un período de 105 días logró disminuir la edad a la pubertad (Rekwot et al., 2000), demostrando que largos períodos de exposición también pueden inducir dicha respuesta. El mismo resultado obtuvieron Oliveira et al. (2009) cuando expusieron vaquillonas prepúberes Nelore al efecto bioestimulador del toro por un período de 210 días. Esto difiere con lo encontrado por Bastidas et al. (1997) quienes no evidenciaron una disminución en la edad a la pubertad cuando vaquillonas prepúberes Brahman fueron bioestimuladas con toros por un período de 238 días. En este sentido Roberson et al. (1987) no encontraron diferencia entre la edad a la pubertad de vaquillonas que fueron expuestas a toros por un período de 152 días respecto de las que permanecieron aisladas. Al mismo tiempo Wehrman et al. (1996) tampoco evidenció adelantamiento en la edad a la pubertad, cuando vaquillonas de carne fueron expuestas a toros por un período de 260 días.

La gran variación de resultados encontrados no permiten llegar a una conclusión sobre cual es tiempo de exposición requerido para obtener la máxima respuesta a la bioestimulación, tanto en el acortamiento del anestro posparto como en la disminución de la edad a la pubertad.

#### **4.2.4.4. Tipo de exposición**

Con respecto al tipo de exposición, se han utilizado tanto el contacto directo como el contacto indirecto con el animal bioestimulador. En el caso de la estimulación directa, se han encontrado resultados positivos a la bioestimulación mediante la utilización de toros (Alberio et al., 1987; Custer et al., 1990; Quadros y Lobato, 2004; Berardinelli y Joshi, 2005b; Landaeta-Hernández et al., 2008), novillos (Ungerfeld, 2009; Fiol et al., 2010) o vacas (Burns y Spitzer, 1992) androgenizadas, cuando fueron alojados en conjunto con los animales a bioestimar. Para la estimulación indirecta han sido utilizados diferentes mecanismos que han presentado resultados positivos como ser, la administración oronasal de orina de toro (Izard y Vandenberg, 1982a, b), el alojamiento de hembras en corrales donde previamente estuvieron presentes toros (Berardinelli y Joshi, 2005a), así como la separación de los mismos mediante un alambrado (Roelofs et al., 2007).

Otra consideración del tipo de exposición es si la misma fue realizada en forma continua o intermitente. La mayoría de los investigadores han recurrido para la bioestimulación a la exposición de tipo continua, donde el animal bioestimulador permanece junto a los estimulados (Izard y Vandenberg, 1982b; Zalesky et al., 1984; Cupp et al., 1992; Berardinelli y Joshi, 2005b). Sin embargo otros han optado por un tipo de estimulación intermitente, donde el animal bioestimulador o sus productos de excreción son expuestos por períodos de tiempo limitado (Izard y Vandenberg, 1982a; Fernández et al., 1996; Berardinelli y Joshi, 2005a). Con respecto a la exposición intermitente Berardinelli y Joshi (2005a) realizaron un ensayo en el que la exposición de las vacas consistía en alojarlas diariamente en corrales durante 13,5 horas, en los que previamente habían sido alojados toros durante 10,5 horas. Esto fue realizado durante 70 días obteniendo un resultado positivo a la bioestimulación en el acortamiento del período de anestro posparto. Similarmente Fernández et al. (1996) exponiendo vacas primíparas durante 2 horas por día, cada 3 días, entre el día 30 y 48 posparto, observaron que la exposición intermitente era efectiva en la reducción del período entre el parto y el retorno a la ciclicidad. Esta información permitiría pensar que ambos tipos de exposición serían útiles en el intento de obtener una respuesta a la bioestimulación.

#### **4.2.5. Mecanismo de acción de la bioestimulación**

El estudio de los mecanismos a través de los que la bioestimulación es capaz de provocar cambios fisiológicos y/o comportamentales ha sido muy estudiado en diferentes especies. En general es aceptado que la introducción de machos a un grupo de hembras es capaz de inducir una rápida liberación de LH, comportamiento de monta y/o la ovulación en ratones (Bronson y Desjardins, 1974), ovejas (Martin et al., 1980; Poindron et al., 1980; Hawken et al., 2007) y cabras (Chemineau et al., 1986; Hawken et al., 2009b).

Varios son los trabajos que han reportado que el mecanismo que regula el efecto macho en ovinos, involucra cambios en la frecuencia y amplitud de pulsos de LH (Martin et al., 1980; Poindron et al., 1980; Martin et al., 1983, 1986). Como es sabido, en todos los estados reproductivos, incluyendo el anestro estacional y lactacional así como en la etapa prepuberal, la secreción tónica de LH es caracterizada por la liberación de pulsos discretos de esta hormona, que está

controlada por la liberación discreta de pulsos de GnRH (Poindron et al., 1980). Cuando las ovejas son expuestas a carneros, la liberación de GnRH se incrementa drásticamente, lo que se traduce en un aumento de la producción y liberación de LH, provocando el crecimiento de los folículos del ovario (Ungerfeld, 2007), produciendo presumiblemente altas concentraciones de estradiol que inducen la retroalimentación positiva y el pico preovulatorio de LH (Delgadillo et al., 2009).

Muchos de los trabajos de investigación relacionados al efecto macho han centrado su atención en los aspectos generales, pero relativamente pocos han estudiado la importancia relativa de las diferentes señales socio-sexuales que participan en el efecto macho (Delgadillo et al., 2009). Las primeras evidencias de "señalización" involucran al sistema olfativo. Esto fue evidenciado mediante la aplicación nasal de lana o extractos de lana en ovejas acíclicas, las que incrementaron la secreción de LH y FSH, aumentando el número y tamaño de los folículos de sus ovarios (Cohen-Tannoudji, 1987). Si bien es aceptado que las señales olfativas del macho juegan un rol importante en disparar la ovulación en hembras, existe otro tipo de estímulos no olfatorios, como los visuales y auditivos, que juegan un rol complementario o sinérgico con las señales químicas (Hawken et al., 2009a). No obstante se ha sugerido que los estímulos visuales y auditivos por sí solos son incapaces de sustituir a las feromonas del macho (Hawken et al., 2009a). En este sentido Walkden-Brown et al. (1993) plantearon que la proporción de hembras que ovulan en respuesta al efecto macho se ve optimizada cuando son expuestas a la totalidad de los estímulos socio-sexuales. El hecho que la lana del carnero o el pelo del macho cabrío puedan inducir una rápida respuesta neuroendócrina en las hembras sugiere que el principal estímulo socio-sexual es mediante feromonas (Delgadillo et al., 2009).

Las señales olfativas actúan a nivel cerebral, en los centros que controlan la producción de GnRH, en la primera etapa de regulación del eje reproductivo. Estas señales son conducidas a los centros reguladores de GnRH mediante dos vías, mucosa olfatoria y bulbo olfatorio principal por un lado y órgano vomeronasal y bulbo olfatorio accesorio por otro. Si bien se ha demostrado que en ovinos ambas vías son activadas por la exposición al "olor" del carnero, es aceptado que la vía dominante es mediante el sistema olfatorio principal (Cohen et al., 1986). Las vías aferentes y eferentes en ovinos fueron descritas por Jansen et al. (1998) siendo éstas las responsables de enviar los impulsos a los centros reguladores, que en dicha especie son fundamentalmente el área pre-óptica, el hipotálamo anterior y el hipotálamo medio-basal.

Durante los ciclos estrales normales tanto en la hembra ovina como en la hembra caprina, la alta frecuencia de pulsos de GnRH y por consiguiente de LH, inducen el desarrollo folicular en los ovarios y la producción de grandes cantidades de estradiol, que cuando alcanzan un determinado umbral, inducen el comportamiento estral y la retroalimentación positiva sobre la producción de GnRH. Esta retroalimentación positiva es la responsable de provocar el pico preovulatorio de LH, desencadenando la ovulación y formación del cuerpo lúteo (Delgadillo et al., 2009). Con el efecto macho, la alta frecuencia de pulsos de LH inducida por la introducción del carnero provoca un incremento en el desarrollo folicular en los ovarios (Ungerfeld, 2007), iniciándose probablemente una cascada similar de eventos que termina con la ovulación (Delgadillo et al., 2009). En ovejas esta primera ovulación no va

acompañada de celo, y si es seguida por un ciclo de corta duración, la segunda ovulación también será "silente". A diferencia de esto, en cabras todas las ovulaciones van seguidas de comportamiento estral (Ungerfeld, 2007).

Ésta sucesión de eventos ampliamente aceptada en ovinos, ha sido sugerida para explicar el efecto bioestimulador en bovinos, aunque las bases fisiológicas y/o endócrinas que regulan el efecto toro no han sido suficiente aclaradas (Custer et al., 1990). La mayoría de los autores consideran que los cambios producidos por la exposición al macho, a nivel del sistema reproductivo neuroendócrino provocarían, al igual que en ovinos, la liberación de pulsos consecutivos de hormona liberadora de gonadotrofinas, lo que se traduce en un rápido cambio en las concentraciones de LH y FSH (Fernández et al., 1996; Rekwot, 2001).

A diferencia de lo encontrado en ovinos, donde la respuesta en el aumento en la frecuencia de pulsos de LH fue observada ya a los 2 a 4 minutos posteriores a la introducción de los machos (Martin et al., 1986), en bovinos parecería que dicha respuesta es detectada en un período de tiempo más largo. Fernández et al. (1996) encontraron que vacas primíparas lactando expuestas a toros por 2 horas tuvieron un incremento en la frecuencia de pulsos de LH dentro de las siguientes 6 horas, respecto de las no expuestas.

Con respecto a los cambios producidos a nivel del ovario, en ovinos se ha reportado que el aumento en la secreción de gonadotrofinas determina una mayor tasa de crecimiento folicular, lo que presumiblemente provocaría la producción de altas concentraciones de estradiol, siendo éste responsable de producir la retroalimentación positiva y el pico preovulatorio de LH (Delgadillo et al., 2009). En bovinos la información acerca del cambio en la tasa de crecimiento folicular en respuesta a la exposición a machos es escasa. Algunos autores reportaron un aumento en la tasa de crecimiento de los folículos en respuesta a la bioestimulación (Bastidas et al., 1997; Berardinelli et al., 2009). En un ensayo realizado con vaquillonas prepúberes Brahman, de 13 meses de edad, se observó que la interacción socio-sexual con toros, resultó en un incremento de la actividad cíclica ovárica, manifestándose por un incremento en la población acumulada de folículos grandes y pequeños (Bastidas et al., 1997). Similarmente Berardinelli et al. (2009), reportaron que la exposición de vacas en lactación, a toros, tanto en forma continua como intermitente (6 h ó 12 h por día), por un período de 45 días, determinó un cambio en la dinámica folicular, mediante el acortamiento del intervalo interondas así como el aumento del diámetro del folículo dominante.

Si bien la información parecería indicar que la respuesta ovárica a la bioestimulación en bovinos sería similar a la descrita en ovinos, resulta imprescindible una mayor investigación que permita elucidar los cambios ocurridos así como los mecanismos responsables de dicha alteración.



## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. OBJETIVO GENERAL**

- Contribuir al conocimiento de la respuesta a la bioestimulación en bovinos, mediante la caracterización de su respuesta ovárica.

### **5.2. OBJETIVO PARTICULAR**

- Determinar si la exposición de vaquillonas de carne prepúberes a novillos androgenizados por un período de 80 días induce la actividad ovárica cíclica.
- Determinar si la tasa de crecimiento folicular difiere entre vaquillonas de carne prepúberes expuestas a novillos androgenizados y vaquillonas que permanecieron aisladas de todo contacto con machos.

## **6. HIPÓTESIS**

**Para la realización del ensayo se consideraron las siguientes hipótesis:**

- La exposición de vaquillonas de carne prepúberes a novillos adultos androgenizados, por un período de 80 días, induce el inicio de la actividad ovárica cíclica.**
- La exposición de vaquillonas de carne prepúberes a novillos adultos androgenizados induce un aumento en la tasa de crecimiento de los folículos ováricos.**

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1. ANIMALES Y MANEJO**

El ensayo fue realizado en el Campo Experimental N°1 de Facultad de Veterinaria, situado en Migués, departamento de Canelones, durante los meses de agosto a noviembre de 2009. Los Días -25 y -17 (Día 0= inicio de la exposición a los machos) se realizaron 2 ecografías ováricas transrectales a un lote de 35 vaquillonas de raza Hereford, utilizando un ecógrafo Aloka 500 (Aloka, Tokyo, Japón) equipado con una sonda lineal de 5 MHz. Se seleccionaron 30 vaquillonas de 24 meses de edad y  $257,5 \pm 32,5$  (media  $\pm$  ds) kg de peso vivo que no presentaron cuerpo lúteo (CL) en ninguna de las ecografías. Durante 10 días (Día -10 al Día 0) el lote seleccionado fue manejado en forma conjunta en el mismo potrero.

El Día 0, las vaquillonas fueron adjudicadas homogéneamente de acuerdo a la edad y peso vivo en dos grupos: 1) grupo expuesto: vaquillonas expuestas a novillos androgenizados durante 80 días (GE, n = 15), 2) grupo aislado: vaquillonas que permanecieron aisladas de todo contacto con machos (GC, n = 15). El peso al inicio de la exposición fue de  $257,4 \pm 32,5$  kg y  $258,6 \pm 32,8$  kg y la condición corporal de  $2,8 \pm 0,5$  y  $2,6 \pm 0,3$  (escala 1-8) para GE y GC respectivamente. Ambos grupos pastorearon en potreros de campo natural, separados por una distancia mínima de 600 metros, de forma de evitar el contacto visual, auditivo y olfativo entre GE y GC, a lo largo de los 80 días de la exposición. A su vez, se realizó la suplementación de todas las vaquillonas con fardos de Moha (*Setaria Italica*) de tal forma que la oferta de Kg de materia seca ofrecidos fueran suficientes para cubrir los requerimientos de mantenimiento. Dichos requerimientos fueron estimados en base a tablas (A.F.R.C., 1993), considerándose categoría, peso vivo y la evolución de peso deseada. Se utilizó una oferta de materia seca que permitiera el mantenimiento del peso vivo a lo largo del ensayo, lo que representó aproximadamente 8 Kg de materia seca por animal y por día.

Se utilizaron para la bioestimulación, tres novillos Hereford adultos, los que fueron androgenizados mediante la inyección de propionato de testosterona (600 mg IM, Testosterona ultra lenta, Dispert, Montevideo, Uruguay). Se aplicó la primera dosis una semana antes del comienzo de la exposición (Día -7) y se repitió en forma semanal durante los 80 días del período de exposición.

### **7.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CÍCLICA Y CRECIMIENTO FOLICULAR**

Durante los 10 días de manejo conjunto de las vaquillonas, y a lo largo de los primeros 30 días del periodo de separación (Día -10 al Día 30), se realizaron ecografías ováricas transrectales en todas las vaquillonas en forma diaria, determinando el tamaño del folículo mayor. A su vez, durante el mismo periodo se realizó la detección de celos diaria, dos veces por día (AM/PM), por un período de 40 minutos. En forma posterior (Día 31 al 80) se realizaron ecografías ováricas transrectales cada 10 días para determinar la presencia de CL, y por lo tanto la ocurrencia de ovulación.

### **7.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Las variables analizadas fueron proporción de vaquillonas ciclando y tamaño del folículo mayor. La actividad cíclica se analizó mediante las frecuencias acumuladas de vaquillonas ciclando, a intervalos de 10 días y se comparó usando el estadístico chi-cuadrado (Microsoft Excel, 2007). El diámetro del mayor folículo (media de cada grupo) fue agrupado para su análisis en períodos de 5 días. Las diferencias entre GE y GC se compararon mediante el test t de student (Microsoft Excel, 2007). Los resultados de ciclicidad se presentan en forma de frecuencias acumuladas mientras que diámetro del mayor folículo se presenta como la media  $\pm$  DE.

## 8. RESULTADOS

FAC

Los resultados de ciclicidad se presentan en la tabla 1. Como se puede observar la totalidad de las vaquillonas que ciclaron, pertenecen al GE, no detectándose vaquillonas ciclando en el GC durante todo el período de observación. No se detectaron animales ciclando en ningún grupo hasta el día 40. Al día 50, dos vaquillonas del GE estaban ciclando, aunque no representó diferencias significativas con el GC. La proporción acumulada de vaquillonas ciclando fue mayor en el GE que en el GC al día 60 ( $P= 0,01$ ), 70 ( $P<0,005$ ) y 80 ( $P= 0,001$ ). Al final del experimento 8 de 15 vaquillonas del GE estaban ciclando, en tanto que en el GC ninguna había iniciado la actividad cíclica.

Tabla 1. Proporción acumulada de vaquillonas ciclando, según el tiempo de exposición a novillos androgenizados, en los grupos expuesto (GE) y control (GC).

Día	GE (n=15)	GC (n=15)	P
40	0/15	0/15	-
50	2/15	0/15	<i>ns</i>
60	5/15	0/15	<0,05
70	7/15	0/15	<0,01
80	8/15	0/15	<0,001

Analizando el diámetro de folículo mayor en forma diaria, se encontró que éste fue significativamente superior en las vaquillonas del GE respecto al GC en el día 6 ( $6,2 \pm 0,8$  vs  $5,2 \pm 0,6$ mm;  $P=0,001$ ), 8 y 9 ( $6,7 \pm 0,5$  vs  $5,7 \pm 0,5$ mm;  $P < 0,05$ ) y desde el día 13 al 19 ( $7,7 \pm 0,6$  y  $6,9 \pm 0,5$ mm, en expuestas y control respectivamente  $P < 0,05$ ).

Similarmente el diámetro del mayor folículo observado (media de cada grupo) fue analizado en forma agrupada en períodos de 5 días, durante los primeros 35 días de exposición. Se observó que el GE tuvo un diámetro de folículo mayor superior que las del GC, en el período comprendido entre los días 11 y 15 ( $P < 0,05$ ) y 21 y 25 ( $P < 0,001$ ). Dichos datos se presentan en la tabla 2.

Diámetro del mayor folículo (promedio), agrupados en períodos de 5 días, para los grupos expuesto (GE) y control (GC), en vaquillonas de carne prepúberes expuestas a novillos androgenizados.

Períodos (Días)	Diámetro del mayor folículo (mm)		P
	GE	GC	
0-5	5,6 ± 1,2	5,7 ± 1,1	<i>ns</i>
6-10	5,9 ± 0,7	5,8 ± 0,8	<i>ns</i>
11-15	6,5 ± 0,8	5,9 ± 0,7	<0,05
16-20	7,7 ± 0,6	7,4 ± 0,5	<i>ns</i>
21-25	8,2 ± 0,5	7,4 ± 0,4	<0,001
26-30	8,4 ± 0,7	8,1 ± 1,0	<i>ns</i>
31-35	8,3 ± 1,0	8,00 ± 1,0	<i>ns</i>

## 9. DISCUSIÓN

La exposición de vaquillonas de carne de 24 meses de edad a novillos androgenizados por un período de 80 días provocó el inicio de la actividad cíclica en parte del rodeo. Esto coincide con lo reportado por Quadros y Lobato (2004) quienes observaron que la exposición de vaquillonas de carne de 24,5 meses de edad por un período de 50 días incrementó la proporción de vaquillonas cíclicas al final del experimento. En tanto Fiol et al. (2010) trabajando con vaquillonas de 12 meses de edad expuestas a novillos androgenizados por 35 días encontraron que una mayor proporción de vaquillonas expuestas iniciaron la actividad cíclica, respecto de las que permanecieron aisladas. Por tanto parecería que no son necesarios largos períodos de exposición para obtener una respuesta positiva a la bioestimulación en vaquillonas de carne.

En nuestro experimento, las diferencias entre vaquillonas expuestas y aisladas de machos fueron significativas a partir del día 60 de exposición. A diferencia de esto algunos autores no encontraron respuesta a la exposición a machos en períodos de estimulación cortos (21 días) (Berardinelli et al., 1978) o largos (152 días) (Roberson et al., 1987). Por otra parte, otros autores sí reportaron respuesta a la bioestimulación en vaquillonas de carne, cuando fueron expuestas durante periodos de tiempo cortos (Quadros y Lobato, 2004; Fiol et al., 2010) o largos (Rekwot et al., 2000; Oliveira et al., 2009). Una explicación a la gran variedad de resultados obtenidos podría ser las distintas condiciones bajo las cuales fueron realizados los diferentes experimentos, donde es posible encontrar un gran variedad de combinaciones entre los factores involucrados en la bioestimulación como ser: edad de las vaquillonas, estatus nutricional al inicio y durante la exposición, tipo de exposición empleada (el animal o sus productos de secreción/excreción), duración de la exposición, entre otros. Un aspecto a considerar es que las vaquillonas al inicio y durante el experimento se encontraban en un inadecuado estatus nutricional, evidenciado por la baja condición corporal. Es probable que en esas condiciones el balance metabólico jugara un rol inhibitorio para la función reproductiva, lo que explica que ninguna vaquillona del GC iniciara la actividad cíclica durante el experimento. En adición, podría considerarse que dicho estatus nutricional determinó que el tiempo entre el inicio de la exposición y la evidencia de la respuesta positiva a la bioestimulación se viera incrementado, si se lo compara por ejemplo con lo reportado por Fiol et al. (2010), quienes observaron respuesta positiva a la bioestimulación ya a los 21 días de exposición.

La información obtenida por ultrasonografía sustenta la hipótesis de que la bioestimulación provoca un aumento en la tasa de crecimiento de los folículos, lo que fue evidenciado por el mayor diámetro del folículo mayor alcanzado en el GE. Esto es consistente con lo reportado por Bastidas et al. (1997), quienes encontraron que la acumulación de folículos pequeños y grandes fue superior para las vaquillonas que fueron expuestas a machos respecto de las que permanecieron aisladas, y con lo observado por Atkinson y Williamson (1985) en ovinos, donde las ovejas que fueron expuestas a carneros presentaron folículos medianos y grandes, mientras que las aisladas presentaron solo folículos pequeños y medianos. Similarmente Berardinelli et al. (2009) reportaron que vacas posparto expuestas a toros, alteraron la dinámica de las ondas foliculares, acortando el intervalo interondas e incrementando el mayor diámetro de folículo alcanzado.

## **10. CONCLUSIONES**

En base a los resultados del presente estudio concluimos que la bioestimulación provocada por la exposición de vaquillonas de carne peripuberales a novillos androgenizados fue efectiva en inducir la actividad ovárica cíclica así como en provocar un aumento en el diámetro folicular.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(FAI)

1. Adams, G.P., Matteri, R.L., Kastelic, J.P., Ko, J.C.H., Ginther, O.J. (1992). Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 94:177-188.
2. Adams, G.P., Evans, A.C., Rawlings N.C. (1994). Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 100:27-33.
3. Alberio, R.H., Schiersmann, G., Carou, N., Mestre, J. (1987). Effect of teaser bull on ovarian and behavioural activity of suckling beef cows. *Animal Reproduction Science* 14:263-272.
4. Arendt, J. (1986). Role of the pineal gland and the melatonin in seasonal reproductive function in mammals. *Oxford Review Reproduction Biology* 8:266-320.
5. Arije, G.F., Wiltbank, J.N. (1971). Age and weight at puberty in Hereford heifers. *Journal of Animal Science* 33:401-406.
6. Arthur, G.H., Noakes, D.E., Pearson, H. (1991). *Reproducción y Obstetricia en Veterinaria*. 6ª. ed. Interam. McGraw-Hill. New York, 702p.
7. Atkinson, S., Williamson, P. (1985). Ram-induced growth of ovarian follicles and gonadotrophin inhibition in anoestrous ewes. *Journal of Reproduction and Fertility* 73:185-189.
8. Bastida, P., Ruiz, J., Manzo, M., Silva, O., Guerrero, N., Trocóniz, J. (1997). Efecto de la presencia del macho sobre la actividad folicular y luteal en hembras prepúberes Brahman. *Archivo Latinoamericano de Producción Animal*. 5(Supl.):390-392.
9. Bellows, R.A. (1967). Some factors affecting reproductive performance of beef herds via natural service. *Artificial Insemination Digest March*. 15(3):68.
10. Berardinelli, J.G., Fogwell, R.L., Inskeep, E.K. (1978). Effect of electrical stimulation or presence of a bull on puberty in beef heifers. *Theriogenology* 9:133-141.
11. Berardinelli, J. G., Joshi. P.S. (2005a). Initiation of postpartum luteal function in primiparous restricted-suckled beef cows exposed to a bull or excretory products of bulls or cows. *Journal of Animal Science* 83:2495-2500.
12. Berardinelli, J.G., Joshi, P.S. (2005b). Introduction of bulls at different days postpartum on resumption of ovarian cycling activity in primiparous beef cows. *Journal of Animal Science* 83:2106-2110.
13. Berardinelli, J.G., Tauck, S.A. (2005). Use of bull exposure in a Gonadotropin-releasing hormone-based estrous synchronization protocol that included fixed-time artificial insemination in first-calf suckled beef cows. *Nutrition Conference, Montana State University*.

14. Berardinelli J.G., Joshi, P.S., Tauck, S.A. (2005). Postpartum resumption of ovarian cycling activity in first-calf suckled beef cows exposed to familiar or unfamiliar bulls. *Animal Reproduction Science* 90:201–209.
15. Berardinelli, J.G., Wikinson, J.R.C., Tauck, S.A., Olsen, J.R., Wedlake, R.J. (2009). Duration of Daily Bull Exposure on Follicular Wave Dynamics of Postpartum, Anovular, Suckled Cows. *Biology of Reproduction* 81: 544- 553.
16. Bronson, F.H., Desjardins, C. (1974). Circulating concentrations of FSH, LH, estradiol and progesterone associated with acute, male-induced puberty in female mice. *Endocrinology* 94:1658-1668.
17. Bronson, F.H. (1988a). Mammalian reproductive strategies: genes, photoperiod and latitude. *Reproduction Nutrition Development* 28(2B):335-347.
18. Bronson, F.H. (1988b). Seasonal Regulation of Reproductions in Mammals. En: Knobil, E., *Physiology of reproduction*. New York, Raven vol. 2, p.1831-1871.
19. Burns, P.D., Spitzer, J.C. (1992). Influence of biostimulation on reproduction in postpartum beef cows. *Journal of Animal Science* 70:358-362.
20. Chemineau, P., Normant, E., Ravault, J.P., Thimonier, J. (1986). Induction and persistence of pituitary and ovarian activity in the out-of-season lactating dairy goat after a treatment combining a skeleton photoperiod, melatonin and the male effect. *Journal of Reproduction and Fertility*, 78:497-504.
21. Chenoweth P.J. (1983). Reproductive management procedures in control of breeding. *Animal Production in Australia* 15:28-31.
22. Choudary, J.B., Gier, H.T., Marian, G.B. (1968). Cyclic changes in bovine vesicular follicles. *Journal of Animal Science* 27:469-471.
23. Cohen-Tannoudji, J., Locatelli, A., Signoret, J.P. (1986). Non-pheromonal stimulation by the male of LH release in the anoestrous ewe. *Physiological Behaviour* 36:1921-1924.
24. Cohen-Tannoudji, J., Signoret, J.P. (1987). Effect of short exposure to the ram on later reactivity of anoestrous ewes to the male effect. *Animal Reproduction Science* 13:263-268.
25. Cupp, A.S., Roberson, M.S., Stumpf, T.T., Wolfe, M.W., Werth, L.A., Kojima, N., Kittok, R.J., Kinder, J.E. (1992). Yearling Bulls Shorten the Duration of Postpartum Anestrus in Beef Cows to the Same Extent as Do Mature Bulls. *Journal of Animal Science* 71:306-309.
26. Custer, E.E., Berardinelli, J.G., Short, R.E., Wehrman, M., Adair, R. (1990). Postpartum interval to estrus and patterns of LH and progesterone in first-calf suckled beef cows exposed to mature males. *Journal of Animal Science* 68:1370-1377.
27. Day, M.L., Imakawa, K., García-Winder, M., Zalesky, D.D., Schanbacher, C.D., Kittok, R.J., Kinder, J.E. (1984). Endocrine mechanisms of puberty in heifers. Estradiol negative feed-back regulation of luteinizing hormone secretion. *Biology of Reproduction* 31:332-341.

28. Day, M.L., Imakawa, K., Wolf, P.L., Kittok, R.J., Kinder, J.E. (1987). Endocrine mechanisms of puberty in heifers: Role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback regulation of estradiol on luteinizing hormone secretions. *Biology of Reproduction* 37:1054-1065.
29. Delgadillo, J.A., Gelez, H., Ungerfeld, R., Hawken, P.A.R., Martin, G.B. (2009). The "male effect" in sheep and goats-Revisiting the dogmas. *Behavioral Brain Research* 200:304-314.
30. Desjardins, C., Hafs, V. (1969). Maturation of bovine female genitalia from birth through puberty. *Journal of Animal Science* 28:502-507.
31. Donaldson, L.E., Hansel, W. (1968). Cystic corpora lutea and normal an cystic graffian follicles in the cow. *Australian Veterinary Journal*. 44:304-308.
32. Evans, A.C.O., Adams, G.P., Rawlings, N.C. (1994). Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 100:187-194.
33. Faure, R., (1987). Concentraciones séricas de hormona luteinizante y progesterona e inducción del estro en novillas anéstricas. Disponible en:[http://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/cria/57pubertad\\_en\\_la\\_hembra\\_bovina.htm](http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/cria/57pubertad_en_la_hembra_bovina.htm) Fecha de consulta: 01/07/2010.
34. Fernández, D. L., Berardinelli, J.G., Short, R.E., Adair, R. (1996). Acute and chronic changes in luteinizing hormone secretion and postpartum interval to estrus in first-calf suckled beef cows exposed continuously or intermittently to mature bulls. *Journal of Animal Science* 74:1098-1103.
35. Fiol, C., Quintans, G., Ungerfeld, R. (2010). Response to biostimulation in Peri-puberal beef heifers: influence of male-female proximity and heifer's initial body weight. Disponible en: [doi:10.1016/j.theriogenology.2010.03.015](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.03.015). Fecha de consulta: 01/07/2010.
36. Fitzgerald, J., Michel, F., Butter, W.R. (1982). Growth and sexual maturation in ewes. Dietary and seasonal effects modulating luteinizing hormone secretion and first ovulation. *Biology of Reproduction* 27:864-870.
37. Gifford, D.R., D'occhio, M.J., Sharpe, P.H., Weatherly, T., Pitar, R.Y., Reeve, D.V. (1989). Return to cyclic ovarian activity following parturition in mature cows and first-calf beef heifers exposed to bulls. *Animal Reproduction Science* 19:209-216.
38. Ginther, O.J., Kastelic, J.P., Knopf, L. (1989a). Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Animal Reproduction Science* 20:187-200.
39. Ginther, O.J., Knopf, L., Kastelic, J.P. (1989b). Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biology of Reproduction* 41:247-254.
40. Ginther, O.J., Beg, M.A., Bergfelt, D.R., Donadeu, F.X., Kot, K. (2001). Follicle selection in Monovular Species. *Biology of Reproduction* 65:638-647.
41. González-Padilla, E., Wiltbank, J.N., Niswender, G.D. (1975). Puberty in beef heifers: I The interrelationship between Pituitary, Hypothalamic and Ovarian Hormones. *Journal of Animal Science* 40:1091-1104.

42. Gregory, K.E., Swiger, L.A., Koch, R.M., Sumption, L.J., Ingalls, J.E., Rowden, W.W., Rothlisberger, J.A. (1966). Heterosis effects on growth rate of beef heifers. *Journal of Animal Science* 25:290-298.
43. Hastings, M.H., Herbert, J., Martensz, N.D., Roberts, A.C. (1985). Melatonin and the brain in photoperiodic mammals. *Ciba Foundation Symposium* 117:57-77.
44. Hawken, P.A.R., Beard, A.P., Esmaili, T., Kadokawa, H., Evans, A.C.O., Blache, D. (2007). The introduction of rams induces an increase in pulsatile LH secretion in cyclic ewes during the breeding season. *Theriogenology* 68:56-66.
45. Hawken, P.A.R., Esmaili, T., Scanlan, V., Blache, D., Martin, G.B. (2009a). Can audio-visual or visual stimuli of a prospective mate stimulate a neuroendócrino response in sheep? *Animal* 3:690-696.
46. Hawken, P.A.R., Esmaili, T., Jorre de St Jorre, T., Martin, G.B. (2009b). Do cyclic female goats respond to males with an increase in LH secretion during the breeding season? *Animal Reproduction Science* 112:384-389.
47. Hopper, H.W., Silcox, R.W., Byerley, D.J., Kiser, T.E. (1993). Follicular development in prepubertal heifers. *Animal Reproduction Science* 31:7-12.
48. Hornbuckle, T., Ott, R.S., Ohi, M.W., Zinn, G.M., Weston, P.G., Hixon, J.E. (1995). Effect of bull exposure on the cyclic activity of beef cows. *Theriogenology* 43:411-418.
49. Hunter, R.H.F., (1982). Diferenciación, pubertad y ciclo éstrico. En: Hunter, R.H.F. *Fisiología y tecnología de la reproducción de la hembra de los animales domésticos*. Zaragoza, Acribia, p.1-32.
50. Ireland, J.J. (1987). Control of follicular growth and development. *Journal of Reproduction and Fertility*. 34(Supl.):39-54.
51. Izard, M.K., Vandenberg, J.G. (1982a). The effects of bull urine on puberty and calving date in crossbred beef heifers. *Journal of Animal Science* 55:1160-1168
52. Izard M.K.; Vandenberg J.G. (1982b). Priming pheromones from oestrous cows increase synchronization of oestrus in dairy heifers after PGF-2 $\alpha$  injection. *Journal of Reproduction & Fertility* 66:189-196.
53. Izard, M.K. (1983). Pheromones and Reproduction in Domestic Animals. En: Vandenberg, J.G. (ed.) *Pheromones and Reproduction in Mammals*. New York, Academic Press, p.253-285.
54. Jansen, H.T., Iwa, G.A., Jackson, G.L. (1998). Central connections of the ovine olfactory bulb formation identified using wheat germ agglutinin-conjugated horseradish peroxidase. *Brain Research Bull* 45:27-39.
55. Kinder, J.E., Day, M.L., Kittok, R.J. (1987). Endocrine regulation of puberty in cows and ewes. *Journal of Reproduction and Fertility* 34:167-186.
56. Landaeta-Hernández, A., Meléndez, P., Bartolomé, J., Rae, O., Archbald, L.F. (2008). The effect of bull exposure on the early postpartum reproductive performance of suckling angus cows. *Revista Científica* 18(6):682-691.

7

57. Lesmeister, J.L., Burfening, J.P., Blackwell, R.L. (1973). Date of first calving in beef cow and subsequent calf production. *Journal of Animal Science* 36:1-6.
58. Macmillan, K.L., Allison, A.J., Struthers, G.A. (1979). Some effects of running bulls with suckling cows or heifers during the pre-mating period. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* 7:121-124.
59. Madrigal, M.A., Colín, J., Hallford, D.M. (2001). Influencia de la condición corporal y la bioestimulación sobre la eficiencia reproductiva en vacas de raza Simmental en agostadero. *Veterinaria México* 32(2):87-92.
60. Marion, J.B., Gier, H.T., Chourday, J.B. (1968). Micromorphology of the bovine ovarian follicular system. *Journal of Animal Science* 27:451-465.
61. Martin, G.B., Oldham, C.M., Lindsay, D.R. (1980). Increased plasma LH levels in seasonally anovular Merino ewes following the introduction of rams. *Animal Reproduction Science* 3:125-132.
62. Martin, G.B., Scaramuzzi, R.J., Lindsay, D.R. (1983). Effect of the introduction of rams during the anoestrous season on the pulsatile secretion of LH in ovariectomized ewes. *Journal of Reproduction and Fertility* 67:47-55.
63. Martin, G.B., Oldham, C.M., Cognié, I., Pearce, D.T. (1986). The physiological responses of anovulatory ewes to the introduction of rams—a review. *Livestock Production Science* 15:219-247.
64. Martin, G.B. (1995). Reproductive research on farm animals for Australia—Some long distance goals. *Reproduction, Fertility and Development* 7:967-982.
65. Martin, G.B., Milton, J.T.B., Davidson, R.H., Banchemo, G.E., Lindsay, D.R., Blache, D. (2004). Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Animal Reproduction Science* 82:231-246.
66. Mauleon, P., Dautier, L. (1965). Variations de la Duré de l'anoestrus de lactation chez les brebis de raze Ile-de-france. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique* 6:199-201.
67. Mellado M., Hernández J.R. (1996). Ability of androgenised goat wethers and does to induce estrus in goats under extensive conditions during anoestrus and breeding seasons. *Small Ruminant Research* 23:37-42.
68. Monje, A.R., Alberio, R., Schiersmann, G., Chedrese, J., Carou, N., Callejas, S.S. (1992). Male effect on the post-partum sexual activity of cows maintained on two nutritional levels. *Animal Reproduction Science* 29:145-156.
69. Morrow, D.A. (1969). Estrous behavior and ovarian activity in prepuberal and postpuberal dairy heifers. *Journal of Dairy Science* 52:224-227.
70. Oliveira, C.M.G., Oliveira, B.D., Gambarini, M.L., Viu, M.A.O., Lopes, D.T., Sousa, A.P.F. (2009). Effects of biostimulation and nutritional supplementation on pubertal age and pregnancy rates of Nelore. *Animal Reproduction Science* 113:38-43.
71. Orcasberro, R., 1997. Manejo para mejorar la eficiencia reproductiva de los rodeos de cría. *Revista del Plan Agropecuario* 74:29-34.

72. Pereira G. 2003. La ganadería en Uruguay. Contribución a su conocimiento. Montevideo, DIEA, MGAP; 80p.
73. Perez-Hernandez, P., Garcia-Winder, M., Gallegos-Sanchez, J. (2002). Bull exposure and an increased within-day suckling interval reduced postpartum anoestrous in dual purpose cows. *Animal Reproduction Science* 74:111-119.
74. Poindron, P., Cognie, Y., Gayerie, F., Orgeur, P., Oldham, C., Ravault, J. (1980). Changes in gonadotrophin and prolactin levels in isolated (seasonally or lactationally) anovular ewes associated with ovulations caused by the introductions of rams. *Physiology and Behavior*. 25:227-236.
75. Quadros, S.A., Lobato, J.F. (2004). Bioestimulação e comportamento reprodutivo de novilhas de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia* 33(3):679-683.
76. Quintans, G., Barreto, S., Negrín, D., Ayala, W. (2007). Efecto de la tasa de ganancia invernal en el inicio de la pubertad de terneras de biotipos carnicero en pastoreo. En: XXX Reunión anual de la Asociación Peruana de Producción Animal, Cuzco, Perú. (PB044), p.447.
77. Rajakoski, E. (1960). The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left-right variations. *Acta Endocrinológica Copenhagen* 52(Supl):7-68.
78. Rekwot, P.I., Ogwu, D., Oyedipe, E.O., Sekoni, V.O. (2000). Effects of bull exposure and body growth on onset of puberty in Bunaji and Friesan X Bunaji heifers. *Reproduction Nutrition Development* 40:359-367.
79. Rekwot, P.I., Ogwu, D., Oyedipe, E.O., Sekoni, V.O. (2001). The role of pheromones and bioestimulation in animal reproduction. *Animal Reproduction Science* 65:157-170.
80. Roberson, M.S., Ansotegui, R.P., Berardinelli, J.G., Whitman, R.W., McInerney, M.J. (1987). Influence of biostimulation by mature bulls on occurrence of puberty in beef heifers. *Journal of Animal Science* 64:1601-1605.
81. Roberson, M.S., Wolfe, M.W., Stumpf, T.T., Werth, L.A., Cupp, A.S., Kojima, N., Wolfe, P.L., Kittok, R.J., Kinder, J.E. (1991). Influence of growth rate and exposure to bulls on age at puberty in beef heifers. *Journal of Animal Science* 69:2092-2098.
82. Roelofs, J.B., Soede, N.M., Dieleman, S.J., Voskamp-Harkema, W., Kemp, B. (2007). The acute effect of bull presence on plasma profiles of luteinizing hormone in postpartum, anoestrous dairy cows. *Theriogenology* 68:902-907.
83. Rovira, J. (1994). Pubertad. En: Rovira, J. *Reproducción y Manejo de los Rodeos de Cría*. Montevideo, Hemisferio Sur, p.25-41.
84. Savio, J.D., Boland, M.P., Roche, J.F. (1990). Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in postpartum dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 88:581-591.
85. Savio, J.D., Keenan, L., Boland, M.P., Rache, J.F. (1988). Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 83:663-671.

86. Schams, D., Schallenberg, E., Gombe, S., Karg, H. (1981). Endocrine patterns associated with puberty in male and female cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 30(supl.):103-110.
87. Schillo, K.K., Hall, J., Hileman, S. (1992). Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer *Journal of Animal Science* 70:3994-3996.
88. Senger, P.L., 1997. Puberty. En: Senger, P.L. *Pathways to Pregnancy and Parturition*. Pullman,WA, Current conception, p.128-143.
89. Shelton, M. (1960). Influence of the presence of a male goat on the initiation of estrous cycling and ovulation of Angora does. *Journal of Animal Science* 19:368-368.
90. Sirois, J., Fortune, J.E. (1988). Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biology of Reproduction* 39:308-317.
91. Sorensen, A.M. (1991). *Reproducción animal. Principios y prácticas*. México. D.F., Prensa Técnicas, 241p.
92. Stumpf, T.T., Wolfe, M.W., Wolfe, P.L., Day, M.L., Kittok, R.J., Kinder, J.E. (1992). Weight changes prepartum and presence of bulls postpartum interact to affect duration of postpartum anoestrus in cows. *Journal of Animal Science* 70:3133-3137.
93. Tauck, S.A., Berardinelli, J.G., Geary, T.W., Johnson, N.J. (2006). Resumption of postpartum luteal function of primiparous, suckled beef cows exposed continuously to bull urine. *Journal of Animal Science* 84:2708-2713.
94. Ungerfeld, R (2002). *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo, Melibea, 289p.
95. Ungerfeld, R. (2007). Socio-sexual signalling and gonadal function: opportunities for reproductive management in domestic ruminants. En: Juengel, J.I., Murray J.F., Smith, editors, M.F. *Reproduction in Domestic Ruminants VI*. Nottingham University Press, Nottingham, UK, 2007, p.207-221.
96. Ungerfeld, R. (2009). Short-term exposure of high body weight heifers to testosterone-treated steers increases pregnancy rate during a late autumn-early winter natural service. *Animal Reproduction* 6(3):446-449.
97. Ungerfeld, R. (2010). Exposure to androgenised steers did not improve the fertility obtained in progesterone-based fixed-timed artificial insemination programs in extensively managed cows and heifers. *Animal Production Science* 50:68-71.
98. Vandenberg, J.G., Finlayson, J.S., Dobrogosz, W.J., Dills, S.S., Kost, T.A. (1976). Chromatographic separation of puberty accelerating pheromone from male mouse urine. *Biology of Reproduction* 15:260-265.
99. Walkden-Brown, S.W., Restall, B.J., Henniawati (1993). The male effect in the Australian Cashmere goat. 2. Role of olfactory cues from the male. *Animal Reproduction Science* 32:55-67.

100. Watson, R.H., Radford, H.M. (1960). The influence of rams on the onset of oestrus in Merino ewes in the spring. *Australian Journal of Agricultural Research* 11:66-71.
101. Wehrman, M.E., Kojima, F.N., Sanchez, T., Mariscal, D.V., Kinder, J.E. (1996). Incidence of precocious puberty in developing beef heifers. *Journal of Animal Science* 74:2462-2467.
102. Wiltbank, J.N. (1970). Reserch needs in beef cattle reproduction. *Journal of Animal Science* 31:755-762.
103. Wiltbank, J.N., Gregory, K.E., Swiger, L.A., Ingalls, J.E, Rothlisberger, J.A., Koch, R.M. (1966). Effects of heterosis on age and weight at puberty in beef heifers. *Journal of Animal Science* 25:744-751.
104. Wiltbank, J.N., Kasson, C.W., Ingalls, J.E. (1969). Puberty in crossbreed and straightbred beef heifers on two levels of feed. *Journal of Animal Science* 29:602-605.
105. Wright, I.A., Rhind, S.M., Smith, A.J., Whyte, T.K. (1994). Female-female influences in the duration of the post-partum anoestrous period in beef heifers. *Animal Production* 59:49-53.
106. Zalesky, D.D., Day, M.L., Garcia Winder, M., Imakawa, K., Kittok, R.J., D'Occhio, M.J. Kinder, J.E. (1984). Influence of exposure to bulls on resumption of estrous cycles following parturition in beef cows. *Journal of Animal Science* 59:1135-1139.