

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**RESPUESTA OVARICA Y HORMONAL A DISTINTOS ESQUEMAS DE
SINCRONIZACIÓN DE LA OVULACIÓN EN VACAS DE LECHE**

Por

**GONZÁLEZ GUASQUE, Wilfredo ⁶
MARTINEZ PIÑA, Mauricio ³**



TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: PRODUCCIÓN ANIMAL.



FV-29378

MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2011**

PÁGINA DE APROBACIÓN

TESIS DE GRADO APROBADA POR:

Presidente: Dr. Rodolfo Ungerfeld

Segundo Miembro: Dr. Daniel Cavestany

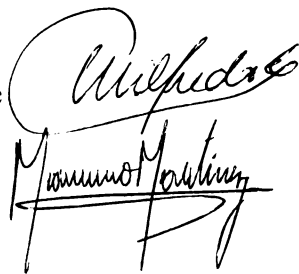
Tercer miembro: Dra- Gretel Ruprechter

Fecha: 9 de marzo de 2012.

AUTORES:

Br. Wilfredo González Guasque

Br. Mauricio Martínez Piña



AGRADECIMIENTOS

A nuestras familias por el apoyo constante durante toda la carrera, sin el cual la misma no hubiera sido posible.

A compañeros y amigos que nos apoyaron con los cuales compartimos experiencias inolvidables.

Al Dr. Daniel Cavestany por su excelente disposición, amabilidad y actitud positiva en todo momento para la realización de esta tesis.

TABLA DE CONTENIDOS

1. PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
2. AGRADECIMIENTOS.....	3
3. TABLA DE CONTENIDOS.....	4
4. LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	5
5. RESUMEN.....	6
6. SUMMARY.....	8
7. INTRODUCCIÓN.....	10
8. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	11
8.1. Ciclo estral.....	11
8.2. Control Neuroendocrino.....	12
8.2.1. Hipotálamo.....	13
8.2.2. Hipófisis anterior.....	13
8.3. Hipófisis posterior.....	14
8.4. Ovario.....	14
8.5. Útero.....	15
8.6. FASES DEL CICLO ESTRAL.....	16
8.7. DINAMICA FOLICULAR.....	18
8.8. ESTRATEGIAS HORMONALES DE REGULACIÓN DEL CICLO.....	20
9. OBJETIVOS.....	26
10. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
11. RESULTADOS.....	30
12. DISCUSIÓN.....	35
13. CONCLUSIONES.....	39
14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1: Esquema de la dinámica folicular en el bovino	20
Figura 2: Esquema del tratamiento de sincronización de celos	28
Figura 3: Cronograma de sangrados y ecografías	28
Figura 4: Niveles de estradiol luego de la administración de Estradiol 17 β (E17), Benzoato de estradiol (EB) o Cipionato de Estradiol (ECP)	31
Figura 5: Concentraciones de progesterona (P4) luego de la administración de P4 parenteral (MAD-4) o intravaginal (DIV)	33
Cuadro 1: Características de los perfiles plasmáticos de E2 (Media \pm EEM) de acuerdo a los distintos tratamientos	30
Cuadro 2: Características de los perfiles plasmáticos de P4 (Media \pm EEM)	32
Cuadro 3: Resultados de cinética folicular, celos y ovulación en los 6 grupos de tratamiento (Media \pm EEM)	34

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar los perfiles plasmáticos de estradiol (E2) y progesterona (P4) y evaluar el tiempo e incidencia de la ovulación y la manifestación del estro después de un protocolo de sincronización de celo utilizando 17 β estradiol (E17), benzoato de estradiol (EB) o cipionato de estradiol (ECP) en combinación con dispositivos intravaginales de progesterona (DIV) o progesterona inyectable (MAD-4). Se utilizaron 30 vacas Holando en ordeño y cíclicas, que fueron presincronizadas con una combinación de GnRH y prostaglandinas (PG). Fueron distribuidos al azar en un arreglo factorial 3x2 según las 3 formulaciones de estrógenos utilizadas y 2 progesteronas. El protocolo fue: Día -19: GnRH, Día -12: PG, Día 0: Estradiol + DIV o MAD-4, el día 8 PG y la eliminación DIV + ECP, Día 9: EB o E17. Para los perfiles de P4 se tomaron muestras en las horas 0, 1, 6, 24 y cada 24 h hasta el día 9, para los perfiles de E2 desde la hora 0 (segundo tratamiento con estradiol) hasta 92 horas con una frecuencia de 4 h. Los ovarios fueron examinados todos los días desde el día 0 hasta 8 y cada 4 h entre los días 9 a 13. Las concentraciones máximas de P4 se alcanzaron 1 h después del tratamiento en ambos grupos ($7,3 \pm 0,7$ ng/mL para el DIV y $16,1 \pm 0,7$ ng/mL para el MAD-4, $P < 0,0001$), y 6 h después del tratamiento llegaron a $5,7 \pm 0,7$ ng/mL y $11,2 \pm 0,7$ ng/mL para el DIV y MAD 4, respectivamente ($P < 0,0001$). Las concentraciones de E2 en todas las vacas fueron $11,6 \pm 9,1$ pg/mL en el día del segundo tratamiento. El valor máximo se alcanzó a las 4 h del tratamiento tanto para E17 como EB y a las 28 h para el grupo de ECP. La concentración máxima fue mayor en el grupo E17 ($641,5 \pm 11,5$ pg/mL) que para EB ($166,5 \pm 11,5$ pg/mL) y ECP ($45,6 \pm 10,9$ pg/mL; $p < 0,0001$). Las concentraciones de E2 volvieron a niveles basales 40 h después para E17, 40 h para EB y 80 h para las vacas ECP. El diámetro folicular en el momento de los tratamientos con P4 fue de $14,9 \pm 1,4$ mm y $14,4 \pm 1,3$ mm para el EB y E17 y de $10,9 \pm 1,4$ mm para los animales ECP ($P = 0,04$). La luteolisis se produjo en el 77,8% de las vacas del grupo EB, en el 33,3% de las E17, y en el 20% de ECP (ns). El diámetro folicular al momento de la PG (tratamiento con ECP día 8 fue de $10,4 \pm 0,9$ mm, sin diferencias entre los grupos, y en el Día 9 (E17 y EB) fue de $12,8 \pm 1,5$ mm, $11,0 \pm 1,4$ mm y $10,7 \pm 1,3$ mm para EB, E17 y vacas ECP, respectivamente, ($P > 0,1$). La ovulación fue detectada en el 100% de las vacas EB, el 77,7% de la E17 y el 50% de las vacas ECP ($P = 0,029$). El celo se observó en el 70% de las vacas EB, el 100% de las

E17 y en el 60% de las vacas ECP (ns). La ovulación se detectó 60 h después del tratamiento con PG, siendo a los $63 \pm 3,7$ h, $52 \pm 4,2$ h y $66,6 \pm 6,0$ h para las vacas en la EB, E17 y los grupos de ECP, respectivamente ($P = 0,1$). Como conclusión se encontraron crecimientos rápidos y pronunciados en las concentraciones de E17, intermedios para EB y más lentos para ECP. Se comprobaron las elevadas correlaciones entre las cinéticas plasmáticas de las distintas formulaciones de estradiol valoradas y la actividad ovárica encontrada. Respecto a la progesterona la formulación inyectable ocasionó aumentos rápidos en la concentración sérica ya a la hora de su administración manteniéndose por encima de 1 ng/mL hasta 192 h en la mayoría de los animales, independientemente del esteroide administrado.

SUMMARY

The objective of this study was to determine the plasma profiles of Estradiol and Progesterone and evaluate time and incidence of ovulation and estrus manifestation after an estrus synchronization protocol utilizing Estradiol 17 β (E17), Estradiol Benzoate (EB) or Estradiol Cipionate (ECP) in combination with a progesterone releasing intravaginal device (DIV) or a parenteral progesterone (MAD-4). Thirty lactating and cycling Holstein cows were presynchronized with a combination of GnRH and Prostaglandins (PG) and then randomly distributed in a 3x2 factorial arrangement of 3 estradiol and 2 progesterone formulations. Pre and Synchronization protocol was: Day -19: GnRH, Day -12: PG, Day 0: Estradiol + DIV or MAD-4, Day 8 PG and DIV removal + ECP, Day 9: EB or E17. For P4 profiles samples were taken at hours 0, 1, 6, 24, and at 24 h until day 9, for E2 profiles from hour 0 (second treatment with Estradiol) to hour 92 with a 4-hour frequency. Ovaries were scanned daily from day 0 to 8 and every 4 hours from days 9 to 13. Cows were cycling and treatment begun at mid-cycle, consequently mean P4 profiles were 4.4 ± 0.3 and 5.2 ± 0.3 for DIV and MAD-4 respectively (ng/mL; $P=0.0913$). Peak concentrations were reached 1 h after treatment in both groups (7.3 ± 0.7 ng/mL for DIV and 16.1 ± 0.7 ng/mL for MAD-4; $P<0.0001$); 6 h after treatment, they were 5.7 ± 0.7 ng/mL and 11.2 ± 0.7 ng/mL for DIV and MAD-4 respectively ($P<0.0001$); they remained similar thereafter. Estradiol concentrations in all cows were 11.6 ± 9.1 pg/mL at the day of the second treatment; peak values were reached 4 h after treatment for E17 and EB groups and at 28 h for ECP groups. Maximum E2 concentrations at peak were greater for E17 group (641.5 ± 11.5 pg/mL) than for EB (166.5 ± 11.5 pg/mL); peak concentrations after ECP were 45.6 ± 10.9 pg/mL ($P<0.0001$). E2 returned to basal 40 hours later for E17, 40 h for EB and 80 h for ECP cows. Follicular diameter at the time of P4 treatments was 14.9 ± 1.4 mm and 14.4 ± 1.3 mm for the EB and E17 cows, and 10.9 ± 1.4 mm for the ECP animals ($P=0.04$). Luteolysis occurred in 77.8% of the EB group, in 33.3% of the E17, and in 20% for ECP (ns). Follicular diameter at PG (and ECP treatment, Day 8) was 10.4 ± 0.9 mm, without group differences; at Day 9 (E17 and EB treatments) was 12.8 ± 1.5 mm, 11.0 ± 1.4 mm and 10.7 ± 1.3 mm for EB, E17 and ECP cows respectively ($P>0.1$). Ovulation was detected in 100% of the EB cows, 77.7% of the E17 and 50% of the ECP cows

($P=0.029$). Estrus was observed in 70% of the EB, 100% of the E17 and 60% of the ECP cows (ns). Ovulation was detected 60 h after PG treatment, being at 63 ± 3.7 h, 52 ± 4.2 h, and 66.6 ± 6.0 h for the cows in the EB, E17 and ECP groups respectively ($P=0.1$). Treatments with ECP resulted in fewer cows showing estrus and ovulation than EB and E17 that had also greater follicle diameters. Ovulation was detected earlier after PG in the E17 cows. MAD-4 provoked greater P4 concentrations than DIV and lasted longer. E2 peaked sooner for E17 and EB than ECP and returned to basal earlier. In conclusion we found rapid and pronounced growth in the concentrations of E17, intermediate for EB and slower for ECP. High correlations between the plasma kinetics of the different formulations of estradiol and ovarian activity assessed were found. Regarding the progesterone the injectable formulation causes rapid increases in serum concentrations within an hour of his administration and remain above 1 ng/ml to 192 hours in most animals, regardless of the steroid administrated.

INTRODUCCIÓN

El control de la dinámica folicular y ovulación se ha desarrollado sustancialmente en los últimos veinte años, a partir de la descripción de las ondas foliculares por ultrasonografía. Actualmente los protocolos hormonales se utilizan en forma creciente para el manejo reproductivo de bovinos de carne y leche.

Diferentes hormonas pueden ser utilizadas para controlar la dinámica folicular. Los estrógenos cumplen distintas funciones en el ciclo estral como ser la estimulación del comportamiento estral, inducción de la luteolisis e inicio de la onda pre ovulatoria de LH. Se ha demostrado que los estrógenos administrados en fase de elevados niveles de progesterona inducen la regresión folicular y la emergencia de una onda folicular sincrónica, mientras que la administración de estrógenos frente a bajos niveles de progesterona induce el pico preovulatorio de LH y la ovulación (Bo et al., 1994).

La problemática de contaminación ambiental con dispositivos de progesterona-progestágenos ha llevado al desarrollo de formulaciones de progesterona natural inyectable de efecto retardado (Cavestany et al., 2008).

El uso de progesterona-progestágenos inhibe la manifestación de celo y ovulación (Moselley et al., 1979). Este tratamiento, sólo o combinado con estrógenos y/o gonadotrofinas no hipofisarias se ha utilizado para sincronizar celos en vacas cíclicas (Miksch et al., 1978), y para inducir y sincronizar celo en animales en anestro (Miksch, 1978; Alberio et al., 1984).

En los animales en anestro posparto, los tratamientos con progesterona-progestágenos imitan la fase luteal corta que se produce previo al reinicio de la actividad sexual cíclica post parto, actúa sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario y se reinicia la actividad sexual cíclica en aquellos animales que tienen una frecuencia pulsátil de LH adecuada para producir la maduración final del folículo dominante (Roche y Mihm, 1996). En los animales con actividad sexual cíclica, la progesterona tiene por finalidad mantener una fase luteal artificial y cuando se combina con estrógenos ocurre la regresión del folículo dominante y el desarrollo sincrónico de una nueva onda (Bo et al., 1994). Luego, al retirar el tratamiento exógeno se producirá una fase preovulatoria simultánea en todas las hembras tratadas. En la mayor parte de estas evaluaciones se han utilizado progesteronas de liberación prolongada en forma de dispositivos intravaginales (DIV) y algunos otros como implantes subcutáneos (Colazo et al., 2002; Martínez et al., 2005).

A nivel comercial se encuentra una amplia gama de preparados de estrógenos, como droga base o sus sales. Los estrógenos esterificados poseen absorción más lenta (absorbidos desde el lugar de inyección y el E-17 β activo es liberado después de la hidrólisis). Cuánto más larga es la cadena del éster, más baja es la solubilidad en agua y más demorará en absorberse la dosis completa (Estradiol 17 β , **E-17 β** C₁₈H₂₄O₂, PM 272,4 kDa; valerato de estradiol, **EV**: C₂₃H₃₂O₃, PM 356,5 kDa; benzoato de estradiol, **EB**: C₂₅H₂₈O₃, PM 376,5 kDa y cipionato de estradiol, **ECP** C₂₆H₃₆O₃, PM 396,6 kDa). Una vez en la circulación, el éster es clivado por una enzima estearasa y la actividad biológica vuelve a ser E-17 β . De esto que la duración de la acción dependa de la absorción y no del metabolismo.

El mecanismo por el cual el estrógeno altera la dinámica folicular sería sistémico más que local (Bo et al., 2000). Así, tomando en conjunto los trabajos realizados por Diskin et al. (2002) se observa que la asociación de estrógenos con progesterona produce una disminución dosis dependiente en la secreción de FSH y en la amplitud de los pulsos de LH, una disminución en la concentración de estradiol en el licor folicular del folículo dominante y el surgimiento de una nueva onda de crecimiento folicular en la mayoría de los animales.

El análisis de los perfiles de liberación sanguínea del estradiol conjuntamente con las nuevas formulaciones de progesterona disponibles comercialmente deben ser probados y evaluadas para determinar las potencialidades de su empleo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Ciclo estral

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

La vaca es poliéstrica continua durante todo el año. La edad de la pubertad, primer estro, está influida por diversos factores, estando comprendida entre los 7 y 18 meses (Arthur, 1991).

Esta primer ovulación generalmente es “silente” ya que para que la hembra muestre síntomas de celo tiene que haber una exposición previa a progesterona (primming), seguido de un aumento de los niveles de estrógenos (Senger, 2003).

Una vez alcanzada la pubertad la ciclicidad solo se ve interrumpida por la gestación, durante las 3 a 6 semanas posteriores al parto, deficiencias nutricionales, condiciones ambientales estresantes así como también en ciertas condiciones patológicas (Arthur, 1991).

La duración del ciclo es en promedio 21 días, el celo dura entre 12 y 18 horas, y la ovulación se produce entre las 24 y 30 horas luego de iniciado el mismo (Hafez y Hafez, 2000).

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

Control Neuroendocrino

La reproducción está regulada por la interacción entre el sistema nervioso y el sistema endocrino (Senger, 2003). El sistema nervioso actúa fundamentalmente traduciendo estímulos externos en señales neuronales que ocasionan un cambio en los órganos reproductivos (Senger, 2003). El sistema endocrino actúa mediante el relacionamiento entre el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal a través de mediadores hormonales (Ungerfeld, 2002).

El hipotálamo se puede definir como el área que rodea la sección inferior del tercer ventrículo cerebral, su origen es enteramente diencefálico. El mismo tiene dos tipos de neuronas, unas (como en cualquier otro centro nervioso autónomo) se ocupan de la integración y conducción de los mensajes nerviosos mientras que las otras funcionan como células endocrinas y envían sus productos de secreción (neurohormonas) a la hipófisis anterior para regular la síntesis y secreción de las hormonas hipofisarias (Ungerfeld, 2002).

La hipófisis es una estructura glandular que se localiza bajo el hipotálamo con el que se une a través de un tallo. Estudios recientes sugieren que ambas estructuras tienen un origen neural común (Kawamura y Kikuyama, 1994). Se subdivide en hipófisis anterior o adenohipófisis y en hipófisis posterior o neurohipófisis. La adenohipófisis es la encargada de la síntesis y secreción de ACTH, GH o STH, TSH, PRL, FSH, LH y MSH. Por otro lado, la neurohipófisis secreta oxitocina y vasopresina (Ungerfeld, 2002).

La regulación de la reproducción, ejercida por el sistema endocrino como mencionamos ut supra, consiste fundamentalmente en la síntesis y liberación de hormonas. Las mismas se pueden clasificar según su origen (Senger, 2003).

Hipotálamo

Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)

El centro tónico y el centro cíclico, del hipotálamo, controlan la liberación de GnRH. Esta es la responsable de estimular la liberación de las hormonas gonadotróficas FSH y LH. Por un lado el centro tónico es el encargado de la secreción basal de GnRH (pequeños pulsos sobre un largo período de tiempo). En contraste el centro cíclico responde en forma dramática a altas concentraciones de estradiol liberando una gran cantidad de GnRH estimulando así el pico de LH, causando la ovulación (Senger, 2003).

Hipófisis anterior

Hormona folículo estimulante (FSH)

Como su nombre lo indica, promueve el crecimiento folicular en el ovario. Es liberada en respuesta a los pulsos de GnRH. Sus concentraciones se elevan en la emergencia de cada onda folicular promoviendo el crecimiento de un grupo de folículos. Más tarde el folículo de mayor tamaño (folículo dominante) secreta inhibina y estradiol causando un feedback negativo sobre la secreción de FSH (Senger, 2003).

Hormona luteinizante (LH)

Su secreción es pulsátil y en respuesta a la GnRH. Ante cada pulso de la misma, la hipófisis responde con un pulso de LH y el folículo responde a este secretando estrógenos. Se conoce que los estrógenos ejercen su efecto estimulador tanto en hipotálamo, estimulando la liberación de GnRH, como en hipófisis, estimulando la secreción de LH, siempre que la P4 este en concentración baja. Finalmente el pico de LH determina la ruptura y luteinización del folículo, produciendo la ovulación (Ungerfeld, 2002).

Hipófisis posterior

Oxitocina

La oxitocina modifica los potenciales umbrales de excitabilidad del miometrio uterino estimulando su tono y contractibilidad. Es sintetizada y almacenada por células del cuerpo lúteo. Este último contiene grandes cantidades de oxitocina que junto con la progesterona y PGF2 α (producida por el endometrio uterino) son las hormonas encargadas de controlar el proceso de luteolisis. (Senger, 2003).

Ovario

Estrógenos (E2)

Son secretados fundamentalmente por los folículos antrales. La mayoría de los andrógenos sintetizados en las células de la teca son convertidos a estrógenos por las células de la granulosa, lo que es regulado fundamentalmente por la FSH (Ungerfeld, 2002). Los estrógenos son los responsables del comportamiento del celo. A nivel del tracto reproductivo producen aumento del flujo sanguíneo (hiperemia), cambios en la conductividad eléctrica de los tejidos, leucocitosis, aumento de la secreción mucosa, induce el crecimiento de las glándulas uterinas y aumenta el tono miometrial. A su vez sensibiliza al útero a la acción de la oxitocina e inducen el pico de LH que lleva a la ovulación. A nivel hipofisario, el aumento de la concentración de estradiol ejerce una retroalimentación negativa sobre la secreción de FSH. Esta última resulta imprescindible para el desarrollo de los folículos de mayor tamaño que en ausencia de un nivel importante de FSH se verán destinados a la atresia y degeneración (Senger, 2003).

Progesterona (P4)

Es la principal secreción del cuerpo lúteo y como su nombre lo indica es la hormona de la preñez. Cumple diversas funciones como ser: estimular la hipertrofia y la actividad secretoria de las glándulas endometriales, estimular el crecimiento alveolar de las glándulas mamarias, estimular la secreción del oviducto y bloquear la motilidad uterina

(Ungerfeld, 2002). A nivel del hipotálamo inhibe la frecuencia y amplitud de los pulsos de GnRH, regulando así la secreción de gonadotrofinas. La exposición a la progesterona sensibiliza el eje hipotálamo-hipofisario a la acción de los estrógenos facilitando el retorno a la ciclicidad luego de un período de anestro o preñez (Senger, 2003).

Inhibina

Es una hormona que juega un rol importante en la regulación de la secreción de FSH, produciendo una retroalimentación negativa sobre esta. La principal fuente de esta hormona en la hembra es la granulosa de los folículos en crecimiento (Ungerfeld, 2002).

Testosterona

Las células tecales de los folículos en crecimiento sintetizan básicamente andrógenos, que son aromatizados a estrógenos por enzimas que contienen las células granulosas del folículo (Ungerfeld, 2002).

Relaxina

En la vaca es sintetizada por el cuerpo lúteo de la preñez. Actúa en el momento del parto induciendo ablandamiento de ligamento ínter pubiano, cérvix, agrandando y distendiendo el canal de parto y también en la disrupción de la pared del folículo lo que facilita la ovulación (Ungerfeld, 2002).

Útero

Prostaglandina F2alfa (PGF2 α)

Es sintetizada y liberada por el útero. Juega un rol importante en la regulación de la vida del cuerpo lúteo. La regresión de este (luteólisis), es un evento clave responsable de la ciclicidad ovárica en muchas especies domesticas. También participa en el parto incrementando la contractilidad miometrial que inicia la salida del feto.

FASES DEL CICLO ESTRAL

El ciclo estral puede ser dividido en dos distintas fases denominadas según la estructura de mayor predominancia en el ovario. Estas divisiones del ciclo estral son: fase folicular y fase luteal. La fase folicular es el periodo comprendido desde la regresión del cuerpo lúteo hasta la ovulación. En general esta fase es relativamente corta, abarcando alrededor de un 20% del ciclo estral. Durante la fase folicular la estructura predominante son los folículos en crecimiento que producen estradiol (principal hormona en esta etapa). Cuando se produce la luteolisis causa una disminución de progesterona. Esta deja de ejercer su efecto inhibitorio sobre el centro cíclico del hipotálamo, lo que lleva a aumentar los pulsos de GnRH por parte del centro cíclico. Esta estimula la producción de gonadotropinas hipofisarias (FSH y LH) lo que lleva a estimular el crecimiento folicular. El folículo dominante comienza a producir mayor cantidad de estradiol ejerciendo retroalimentación positiva sobre el centro cíclico del hipotálamo desencadenando la liberación de gran cantidad de GnRH que estimula el pico de LH produciendo la ovulación (Senger, 2003). La fase luteal es el periodo desde la ovulación hasta la regresión del cuerpo lúteo. Esta fase es mucho más larga que la fase folicular, ocupa cerca del 80% del ciclo estral. Durante esta fase la estructura ovárica dominante es el cuerpo lúteo y la hormona reproductiva predominante es la progesterona. A pesar de este ambiente hormonal, los folículos continúan creciendo y regresan durante esta fase sin producir grandes cantidades de estradiol. Luego de la ovulación, se produce la ruptura de vasos sanguíneos así como la pared folicular, lo que resulta en la formación de una estructura llamada cuerpo hemorrágico. Este es observado hasta uno a tres días posteriores a la ovulación. Hacia el quinto día el cuerpo lúteo comienza a aumentar de tamaño y pierde su apariencia hemorrágica, este sigue creciendo hasta la mitad del ciclo coincidiendo con la máxima producción de progesterona. Esta se mantiene en un nivel elevado hasta el desencadenamiento de la luteolisis hacia el final del ciclo.

Luteolisis

Es la desintegración o destrucción del cuerpo lúteo. Como se dijo anteriormente, ocurre durante un periodo de uno a tres días hacia el final de la fase luteal. Es un proceso mediante el que el cuerpo lúteo sufre una degeneración irreversible caracterizada por una dramática caída de la concentración de progesterona en sangre. Las hormonas que

controlan la luteolisis son oxitocina y progesterona (provenientes del cuerpo luteo) y $\text{PGF2}\alpha$ provenientes del endometrio uterino (Senger, 2003). La $\text{PGF2}\alpha$ es la principal sustancia luteolítica en la mayor parte de las especies domesticas (Goding, 1974). Es producida en el endometrio de un útero que haya recibido el impacto previo de la progesterona durante determinada cantidad de días, aparentemente a partir del estímulo provocado por estrógenos secretados por un folículo en desarrollo (Ungerfeld, 2002). Este estímulo induce un incremento en los receptores uterinos de oxitocina (Flint y Sheldrick, 1986), de forma que permite desencadenar el mecanismo de retroalimentación positiva oxitocina luteal- $\text{PGF2}\alpha$ endometrial (Flint et al., 1990; Zarco et al., 1988). Algo importante a destacar es que varios autores han demostrado que la $\text{PGF2}\alpha$ que sale del útero a través de la vena uterina pasa directamente a la arteria ovárica por la anastomosis arterio venosa existente en los rumiantes (Mapletoft et al., 1976). Esta relación anatómica especial asegura que una alta proporción de $\text{PGF2}\alpha$ producida por el útero será transportada directamente hacia el ovario y el CL sin diluirse en el sistema circulatorio (Senger, 2003)

Otro criterio de división del ciclo estral consiste en tomar como referencia el día del celo (día 0) y a partir de este se lo divide en: proestro, estro, metaestro y diestro. Cada una de estas etapas es una subdivisión de la fase folicular y luteal. Por ejemplo, la fase folicular comprende proestro y estro y la fase luteal incluye metaestro y diestro. El proestro comienza cuando la progesterona declina como resultado de la luteólisis y termina al comienzo del celo. Se extiende de dos a cinco días dependiendo de la especie y se caracteriza por la transición de un periodo de progesterona dominante a un periodo estrógeno dominante. Las hormonas gonadotróficas (FSH y LH) son las responsables de esta transición. El estro es la etapa más fácil de reconocer en todo el ciclo estral. La hormona dominante en esta etapa es el estradiol, que no solo causa cambios fisiológicos en el tracto reproductivo (vulva hiperémica y edematosa con un corrimiento mucoso color clara de huevo), sino que además se produce cambios a nivel de comportamiento como: aumento de la locomoción, vocalizaciones frecuentes, nerviosismo, intento de monta a otros animales así como aceptar la monta, disminución en la producción láctea y en el consumo de alimento. El metaestro es el periodo entre la ovulación y la formación del cuerpo lúteo funcional. Durante el metaestro temprano tanto estrógeno como progesterona están relativamente bajos. El folículo recién ovulado sufre una remodelación tanto estructural como celular, resultando en la formación de una

estructura glandular intraovarica endocrina llamada CL. Esta transición celular es llamada luteinización. El diestro es la etapa más larga del ciclo estral, es el periodo de tiempo en el que el CL está totalmente funcional y la secreción de P4 alta. La duración del diestro está directamente relacionada con el lapso de tiempo en el cual el CL permanece funcional. En hembras poliéstricas dura entre 10 y 14 días.

DINAMICA FOLICULAR

Los estudios de la dinámica folicular ovárica pueden conducir a métodos para mejorar la fertilidad, para sincronizar con mayor precisión el celo y mejorar la respuesta a la superovulación (Lucy et al., 1992). Es un proceso de crecimiento y degeneración folicular que ocurre durante todo el ciclo estral. Es importante diferenciar los conceptos de dinámica folicular del de fase folicular que comprende alrededor de un 20% del ciclo. Este proceso comienza a partir de folículos antrales siguiendo un patrón de ondas que se repite en casi todos los estadios de la hembra bovina, incluyendo el periodo prepuber (Adams et al., 1994; Evans et al., 1994a, 1994b), la preñez (Ginther et al., 1989, 1996) y el periodo posparto (Murphy et al., 1990; Savio et al., 1990a 1990b). Los folículos antrales de distintos tamaños se desarrollan en respuesta a niveles tónicos de FSH y LH. Si se examinan los ovarios en cualquier etapa durante el ciclo estral se encuentra un número significativo de folículos antrales de diversos tamaños. La dinámica de los folículos involucra cuatro procesos, estos son: reclutamiento, selección, dominancia y atresia. El reclutamiento es la fase del desarrollo folicular en la cual un grupo o cohorte de pequeños folículos antrales comienza su crecimiento y a producir pequeñas cantidades de estradiol e inhibina. Un pico transitorio de FSH ocurre, alcanzando las concentraciones máximas 28 h luego de la anterior ovulación. Esto causa la emergencia de hasta 24 pequeños folículos antrales que crecen hasta más de 3 mm de diámetro en un periodo de 48 a 72 h (cohorte) (Ginther y col, 1997). Seguido al reclutamiento un grupo de folículos en crecimiento que no evolucionaron hacia la atresia son seleccionados. Estos pueden llegar a la dominancia o degeneración. Los folículos seleccionados, a medida que avanzan hacia la dominancia, aumentan la producción de E2 e inhibina. Esta última es una hormona proteica que selectivamente inhibe la liberación de FSH por parte del lóbulo anterior de la pituitaria. En esta etapa comienza a cambiar la relación de FSH y LH: mientras que la concentración de FSH

disminuye la LH comienza a aumentar. Esta disminución impide el reclutamiento de un nuevo grupo de folículos pequeños. Luego comienza el proceso de dominancia. En las especies politocas son varios los folículos dominantes, en cambio en las monotocas un solo folículo es seleccionado y va a desarrollar la dominancia. Este folículo dominante alcanza tamaños mucho más importantes que el resto de los otros folículos (de 15 a 20 mm en la vaca) siendo responsable durante su crecimiento de la secreción ovárica de estradiol y de mantener activamente las concentraciones de FSH por debajo del umbral para el crecimiento del resto de los folículos (Ginther y col, 2000). Este aumento en la concentración de estrógenos prepara al centro pre-ovulatorio a liberar el pico de LH y por consiguiente a la ovulación o evoluciona hacia la atresia, todo esto dependiendo del ambiente hormonal y de la etapa del ciclo en la que se encuentre.

Si bien se ha descrito que en el 95% de los ciclos estrales hay dos o tres ondas de desarrollo folicular hay diferencias entre los estudios en cuanto a la preponderancia de animales con dos o tres ondas. La duración del ciclo estral de la vaca depende principalmente de su patrón de desarrollo folicular puede ser de 18 a 20 días (2 ondas) o de 21 a 23 días (3 ondas). Aparentemente no habría diferencias en la fertilidad entre las vacas de 2 y 3 ondas. Un trabajo realizado por Sartori et al. (2004) demostró que la mayoría de las hembras Holstein tienen ciclos estrales de 2 ondas foliculares, tanto vaquillonas como vacas siendo 55,6% y 78,6% respectivamente. Además se observaron ciclos de 3 y 4 ondas en ambas categorías (3 ondas: 33,3% vaquillonas y 14,3% vacas; 4 ondas: 11,1% vaquillonas y 7,1% vacas). Estos datos concuerdan con lo reportado por otros autores (Ginther et al., 1989; Knopf et al., 1989; Ko et al., 1991; Taylor y Rajamahendran, 1991; Wilson et al., 1998a, 1998b; Roth et al., 2000; Invar et al., 2001; Kulick et al., 2001; Townson et al., 2002). En la raza *Bos indicus* también se encontró animales con ciclos de 4 ondas (Bo et al., 1993; Figueiredo et al., 1997; Rhodes et al., 1995; Zeitoun et al., 1996), comenzando en este caso la cuarta onda el día 20 a 21 y el ciclo estral dura 24 a 25 días (Bo et al., 1993; Zeitoun et al., 1996). Distintos factores como el nivel nutricional, estrés calórico y estacionalidad pueden modificar el patrón de desarrollo folicular (Adams y Pierson, 1995; Murphy et al., 1991; Zeitoun et al., 1996).

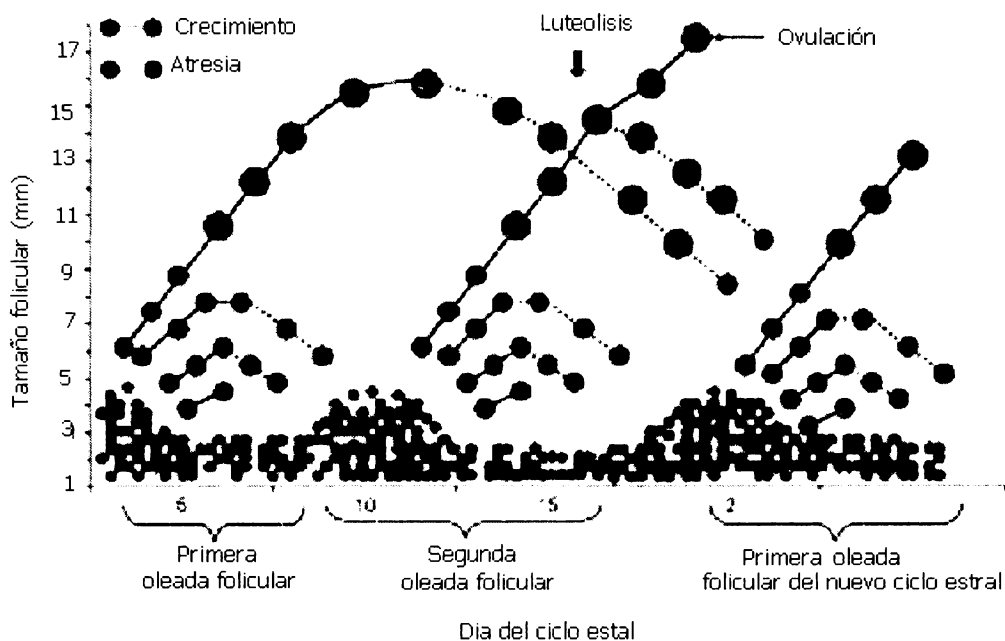


Figura 1: Esquema de la dinámica folicular en el bovino (Lucy et al., 1992)

ESTRATEGIAS HORMONALES DE REGULACIÓN DEL CICLO

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

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

Los estrógenos naturales son esteroides con 18 átomos de carbono y un anillo fenólico A (anillo aromático con un grupo hidrófilo carbono 3) y un grupo hidrófilo beta atómico en el carbono 17 del anillo D. El anillo fenólico A es la estructura responsable de la alta afinidad ligada a receptores de estrógenos. El estradiol 17β es el más potente de los principales estrógenos. Es el principal producto secretado por el ovario y se oxida fácilmente convirtiéndose a estrona en el hígado, y esta circula ligado en más de un 50% a proteínas plasmáticas. La eliminación de los estrógenos esteroideos se da principalmente a través del metabolismo hepático. Los estrógenos y sus metabolitos son eliminados principalmente a través de la orina pero además son eliminados a través de

bilis, donde la mayoría son reabsorbidos desde el tracto intestinal. Debido a su baja solubilidad en agua, los esteres de estradiol se absorben en un intervalo prolongado. Los estrógenos en soluciones oleosas son absorbidos rápidamente, aunque la absorción puede continuar varios días después de su administración IM. Dichos esteres son absorbidos desde el lugar de inyección y el 17β activo es liberado después de la hidrólisis. Un ester es una cadena compuesta principalmente por átomos de carbono que están típicamente adheridos a la hormona esteroidea matriz en la posición del carbono 17. La esterificación del grupo hidroxilo de 17β del estradiol 17β lleva a la protección de este grupo contra el ataque metabólico y prolongan su efecto. Por lo tanto el cipionato de estradiol (C 26 H 36 O₃) producido por la esterificación del estradiol con un ácido ciclopentanopropiónico, tiene una actividad biológica mucho más sostenida que el estradiol 17 beta (C 18 H₂₄ O₂) por otra parte el benzoato de estradiol (C 25 H 28 O₃) se produce por la esterificación del carbono en la posición 3 y tiene un periodo de acción intermedio. Cuanto más larga la cadena del ester, más baja la solubilidad en agua y más demorara en absorberse la dosis completa. Una vez en la circulación, el ester es clivado por una enzima estearasa (lo hidroliza) y la actividad biológica vuelve a ser la del estradiol 17β normal. Por lo tanto la duración de la acción depende de la absorción y no del metabolismo (Bo et al., 2003). Por otro lado, la progesterona, conocida también como P4 (pregn-4-ene-3,20-dione) es una hormona esteroidea. Como otras hormonas esteroideas, la progesterona consiste en 4 hidrocarburos cíclicos interconectados. La misma contiene grupos funcionales de cetona y oxigenados, como también dos ramas de metil, es hidrofílica y su peso molecular es de 314,46 kdal.

Básicamente existen tres estrategias hormonales de regulación del ciclo estral (Lucy, 2004):

- 1) Producir la luteolisis y de esta forma levantar el efecto inhibitorio que la progesterona tiene sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario permitiendo que si existe un folículo dominante en el ovario en este momento el mismo ovule.
- 2) Prevenir la ovulación asegurando concentraciones de progesterona en sangre durante un tiempo determinado, que al disminuir abruptamente (en ausencia de un cuerpo lúteo funcional) desencadena el pico de LH y la ovulación.

- 3) Regular la dinámica folicular de modo de obtener un folículo dominante capaz de ovular en un momento predeterminado con o sin manifestación de signos externos de celo.

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

Ovsynch: dicho protocolo consiste en la administración de una dosis de GnRH al azar, sin conocimiento específico del día del ciclo estral en el que se encuentra. Siete días más tarde se aplica una inyección de PGF2 α ; luego de transcurridas 48 h se vuelve a aplicar otra dosis de GnRH para luego inseminar a tiempo fijo (IATF) entre 16 y 20 h después de la última dosis de GnRH (Pursley et al., 1997). Este protocolo resulta en una mayor precisión en la sincronización, mayores porcentajes de concepción y preñez cuando es realizado entre los días 5 y 12 del ciclo estral (Moreira et al., 2000)

Presynch: este protocolo se realiza con la administración de dos dosis de PGF2 α a intervalo de 14 días entre ellas, siendo la última aplicada 12 días previos a un tratamiento Ovsynch convencional. Este programa hace que las vacas se encuentren entre el día 5 y 12 del ciclo estral al momento del comienzo del Ovsynch.

Selectsynch: se trata de administrar una dosis de GnRH y 7 días después una dosis de PGF2 α luego de la que se realiza detección de celo e inseminación de acuerdo al sistema AM/PM.

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

Heatsynch: consiste en la sustitución de la segunda dosis de GnRH por la administración de una dosis de estradiol.

En un estudio realizado por Sartori et al. (2004) con 29 vaquillonas nulíparas (10 a 16 meses de edad) y 31 vacas Holstein ($55,9 \pm 3,5$ días posparto) en lactación, determinaron los perfiles metabólicos basales de estradiol luego de la ovulación y resultaron menores en vacas que en vaquillonas ($7,9 \pm 0,8$ pg/mL vs $11,3 \pm 0,6$ pg/mL) incluso cuando las

vacas presentaban un mayor tamaño de folículos ovulatorios que en las vaquillonas ($16,8 \pm 0,5$ mm vs. $14,9 \pm 0,2$ mm). Estas diferencias entre las vacas en lactación y vaquillonas no fueron explicadas por la variación en los patrones de ondas foliculares sino que podría atribuirse a un mayor metabolismo esteroideo en vacas en lactación. Así como con el estradiol encontró que las concentraciones basales de progesterona fueron menores para vacas que para vaquillonas ($5,6 \pm 0,5$ vs $7,3 \pm 0,4$ ng/mL).

Vynckier et al. (1990), investigaron las concentraciones en plasma de E17 β durante la inducción de celo en vacas mediante la administración de 10 mg de EB y ECP para determinar el momento de retirada de ambas preparaciones. Se utilizaron 5 animales. Todos estaban con ciclos estrales normales y no se encontraban en lactación. Se procedió a la administración de 25 mg de PGF2 α y desde el momento que se encontraba un folículo dominante por palpación rectal, se recolectaban muestras de sangre cada 2 h, las mismas se dejaban de tomar luego de que el folículo ovulara. A su vez se administraron 10 mg de cada uno de los esteres. El sangrado finalizó con la biopsia tomada del lugar de inyección, que consistía en un gramo de tejido que fue analizado para detección de estrógenos. Los resultados obtenidos fueron que los picos de concentración plasmáticos de E17 β variaron desde 11 a 28 pg/mL y fueron alcanzados entre las 66 y 16 h previo a la ovulación. Estos resultados se acercan a los valores encontrados en otros estudios comparativos, en los cuales las concentraciones máximas obtenidas variaron entre 9 y 25 pg/mL en plasma (Hendricks et al., 1971; Glencross et al., 1973; Chenaunt et al., 1974; Lemon et al., 1974; Dobson et al., 1975; Dobson et al., 1978; Glencross & Pope, 1981; Dieleman, 1984; Schallenberger et al., 1984; Walters & Schallenberger, 1984; Hoffman, 1987). Por otro lado Lammoglia et al. (1998) utilizaron vaquillonas de carne peripuberales (n=57) y vacas multíparas posparto (n=52) para determinar la dosis óptima de EB para inducir y sincronizar el celo. Todas las hembras recibieron durante 7 días un dispositivo intravaginal de P4 (CIDR), el día de inserción fue tomado como el día cero y al sexto día se les aplicó una dosis de PGF2 α de 25 mg. De 24 a 30 h luego de la remoción del CIDR las hembras fueron asignadas al azar donde se les aplicó diferentes dosis de EB: vaquillonas 0, 0,2, 0,38, o 0,75 mg y en vacas 0, 0,25, 0,5, o 1 mg. Además 7 vaquillonas y 7 vacas de cada grupo fueron sangradas cada 4 h durante 76 h al comienzo de la aplicación de EB, el suero fue colectado para el posterior análisis de LH y E17 β . También se realizaron observaciones para signos de celo dos veces al día por 21 días luego de la remoción del CIDR y fueron inseminadas artificialmente de 8 a 20 h luego de la detección del celo. Lo que vieron los

autores fue que el porcentaje de hembras que demostraron comportamiento de celo fue aumentado por el EB. Las mejores respuestas se vieron en vaquillonas con la dosis de 0,38 mg (86%) y en vacas con la dosis de 1 mg (100%). La administración de EB no solo aumentó las concentraciones de estrógenos sino que también las concentraciones de LH y el número de animales que demostraron celo. A su vez hubo un aumento de la tasa de preñez en vacas. De 4 a 28 h luego de la administración de EB la concentración de E17 β aumentaba a medida que aumentaba la dosis de EB. Sin embargo, alrededor de las 28 h de la inyección de EB las concentraciones séricas de E17 β fueron similares para todos los grupos. Esto estaría indicando que una sola inyección de EB podría mantener aumentada las concentraciones de E17 β por encima de 24 h. En definitiva llegaron a la conclusión que la efectividad en la sincronización de celo en vaquillonas peripuberales, así como en vacas posparto, puede ser mejorada mediante la administración de EB de 24 a 30 h luego de la remoción del dispositivo intravaginal (CIDR). También que la dosis mínima efectiva parecería ser de 0,4 mg aproximadamente para vaquillonas y de 1 mg para vacas.

Martínez et al. (2005) realizaron un trabajo donde evaluaron los efectos del E17 β y EB para determinar la liberación de hormonas gonadotróficas, celo y la ovulación en ganado de carne. En el experimento 1 utilizaron 16 vacas ovariectomizadas, las mismas recibieron un tratamiento con CIDR previamente usado el cual permaneció durante 7 días. Se subdividieron en tres grupos al azar, los cuales se les administro 5 mg de E17 β en el día 0 (grupo E0, n=6), 5 mg de E17 β en el día 1 (grupo E1, n=5) o 5 mg de E17 β junto con 100 mg de P4 en el día 0 (grupo EP, n=5). En el experimento 2 utilizaron 40 vaquillonas de carne que al igual que en el experimento 1 fueron tratadas con CIDR. A su vez se administró 5 mg de E17 β junto con 100 mg de P4 en el día 0. El día 7 se removió el CIDR y se inyectó 500 μ g de cloprostenol y fueron subdivididos en 4 grupos al azar: grupo control, y tres grupos restantes que se les administró 1,0 mg de EB a las 12, 24 o 36 h de la extracción del CIDR. A través de este trabajo concluyeron que aquellos animales tratados con E17 β o EB disminuyeron las concentraciones de FSH y LH, pero la LH aumentó sus valores luego de las 6 h a pesar de las altas concentraciones de P4. Seguido a la remoción del CIDR la administración de 1 mg de EB sincronizó efectivamente la liberación de LH y la ovulación (en las vaquillonas) pero el intervalo de la extracción del CIDR hasta la administración de EB afectó el tiempo de ovulación. En otro estudio realizado por Souza et al. (2005) se utilizaron vacas lecheras en lactación con ausencia o presencia de folículos dominantes para caracterizar las

concentraciones circulantes de estradiol 17 β luego del tratamiento con diferentes dosis y tipos de estrógenos. Realizaron dos experimentos. En el experimento 1 (n=12) se les realizó aspiración folicular guiada por ultrasonografía a todos los folículos mayores de 5 mm, durante todo el periodo de muestreo sanguíneo. Con este procedimiento buscaban minimizar la producción endógena de E17 β . Todos los tratamientos con estrógenos comenzaron 48 h luego de la primera aspiración folicular. Luego se organizaron grupos al azar para los diferentes tratamientos: control, E17 β (0,5 mg) o EB (0,5 mg). Siete días después de finalizado el primer ensayo las vacas fueron reasignadas en diferentes grupos al azar: control, E17beta (1,0 mg), EB (1,0 mg) o ECP (1,0 mg). En el experimento 2 (n=24), se evaluaron las concentraciones circulatorias de E17 β lo más cerca al momento de la inseminación artificial, a vacas que recibieron un tratamiento de Ovsynch, con o sin suplementación de E17 β 48 h después de la administración de PGF2 α . Los grupos fueron: control, E17 β (0,5 mg) o E17 β (1,0 mg). En el experimento 1 las vacas tratadas con E17 β tuvieron concentraciones circulatorias más altas de E17 β que las vacas tratadas con ECP y las vacas tratadas con EB tuvieron concentraciones intermedias o moderadas. Los animales tratados con 0,5 mg de E17 β tuvieron un tiempo mucho más corto desde el tratamiento al pico máximo (4 vs. 15 h), mayores concentraciones de E17 β en el pico (8,3 vs. 4,9 pg/mL; P<0,05), y un intervalo más corto desde el tratamiento al retorno al nadir (16 vs. 34 h; P<0,05) todo esto en comparación con las vacas que recibieron 0,5 mg de EB. En la parte b del experimento 1, se encontró que las concentraciones circulatorias de E17 β fueron mayores en las vacas tratadas con E17 β con una diferencia en el pico máximo de 4 a 8 h en comparación con aquellas tratadas con EB y de 4 a 12 h en aquellas tratadas con ECP. En el experimento 2 todas las vacas tratadas con 0,5 mg de E17 β (8 de 8) y la mayoría de las vacas tratadas con 1,0 mg de E17 β (7 de 8) demostraron signos característicos de celo dentro de las 24 h siguientes al tratamiento, mientras que en el grupo control solamente algunas demostraron celo (3 de 8). Las vacas que recibieron 1,0 mg de E17 β presentaron concentraciones séricas elevadas de E17 β a las 4 y 8 h luego del tratamiento a diferencia de las vacas con 0,5 mg de E17 β que presentaron aumentos hasta las 4 h luego del tratamiento en comparación con el grupo control. Además las vacas tratadas con 1,0 mg de E17 β tuvieron concentraciones circulatorias mayores a las 4 y 8 h luego del tratamiento en comparación con las vacas a las cuales se les administró 0,5 mg de E17 β . A través de este trabajo concluyeron que los perfiles plasmáticos de E17 β luego

de una sola inyección de estrógenos están relacionados directamente al tipo y dosis de estrógeno utilizado.

HIPOTESIS

1. Las distintas sales de estradiol afectan de forma diferencial el crecimiento folicular, momento de la ovulación y la expresión de celos en vacas de leche sometidas a protocolos de sincronización de celos y ovulación.
2. Distintas formulaciones de progesterona (intravaginal o inyectable) utilizadas en protocolos de sincronización de celos, ejercen efectos similares en la respuesta ovárica (folicular y luteal) y tasa de ovulación.

OBJETIVOS

1. Evaluar el efecto de diferentes presentaciones de progesterona, administrada en protocolos conjuntamente con formulaciones de estradiol, en el desarrollo folicular, presentación de celos y ovulaciones en vacas lecheras cíclicas.
2. Caracterizar los perfiles plasmáticos de estrógenos y progesterona luego de la administración de distintas sales de estradiol en vacas de alta producción en sistemas pastoriles en condición de lactancia tardía y su vinculación con el desarrollo folicular y sincronía de la ovulación.
3. Establecer y comparar los perfiles sanguíneos de nuevas formulaciones de progesterona de liberación lenta frente a los dispositivos intravaginales.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó en febrero de 2009, en el tambo de la Unidad de Lechería de INIA La Estanzuela (Ruta 50 km 11, Colonia). Se seleccionaron 30 animales cíclicos, 12 primíparas y 18 multíparas de $2,5 \pm 1,7$ (media \pm DS) lactancias, con 224 ± 64 días de paridas y condición corporal de $2,5 \pm 0,3$ (escala de 1 a 5 de Edmonson et al., 1989), 508 ± 53 kg de peso (461 ± 36 kg las primíparas y 539 ± 38 kg las multíparas) con una producción diaria de $12,5 \pm 2,4$ L y se distribuyeron en forma aleatoria en grupos equilibrados, (misma proporción de vacas y vaquillonas). Se realizó un modelo de distribución factorial 3 x 2 en base a tres sales de estradiol y dos progesteronas utilizadas.

El esquema de trabajo fue el siguiente:

Presincronización:

Día -19: administración de 250 μ g cc de un análogo sintético de GnRH (Cistorelina, Fertagyl, MSD, Sinervia, Montevideo, Uruguay).

Día -12: administración de un 150 μ g de d-Cloprostenol (Veteglan, Laboratorios Calier, Montevideo, Uruguay).

Sincronización:

Día 0:

Se colocaron dispositivos intravaginales de 558 mg de progesterona natural (Cronipres[®] M-24, Laboratorio Biogénesis-Bagó, Montevideo, Uruguay) o 200 mg de progesterona natural inyectable (MAD-4, Laboratorio Rio de Janeiro, Santa Fe, Argentina).

Simultáneamente a la colocación del dispositivo o administración de la progesterona de liberación lenta se administraron tres formulaciones diferentes de estradiol: Benzoato de estradiol (BE) (Estradiol 10, Rio de Janeiro, Santa Fe, Argentina) 1 mg; cipionato de estradiol (ECP) (ECP Estradiol, Laboratorios König, Montevideo,

Uruguay) 1 mg; Estradiol 17 β (E17) (Estradiol 17 β , Laboratorio Rio de Janeiro, Santa Fe, Argentina) 1 mg, todos administrados por vía i/m.

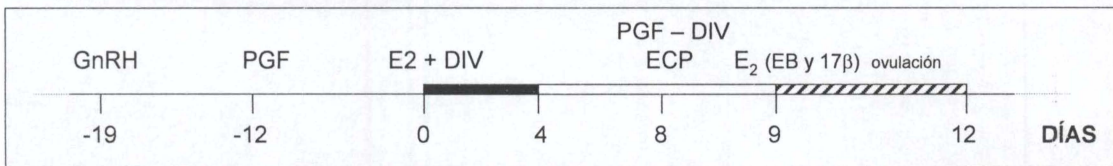
Día 8:

Se procedió a retirar los DIV junto con la administración de PGF2 α s/c (d-Cloprostenol, Veteglan, Laboratorios Calier, Montevideo, Uruguay) y ECP a los grupos correspondientes.

Día 9:

Se administró el BE y E17 a los grupos restantes.

Figura 2: Esquema del tratamiento de sincronización de celos



Diariamente se realizó ultrasonografía transrectal (Aloka SSD-500) con transductor de 5 MHz (Aloka UST-588U-5) y seguimiento del desarrollo folicular y luteal desde la colocación de los dispositivos. A partir del día 9 se realizó seguimiento ecográfico cada 4 h para determinar estructuras ováricas y determinar el momento de la ovulación.

Se realizaron sangrados yugulares con anticoagulante (BD Vacutainer NJ, USA) desde la colocación de los dispositivos o administración de inyectables a las 0, 1, 6, 24, 48, 96, 144, 192, 196, 199 y 202 h para determinar, a través de RIA, niveles plasmáticos de progesterona (a la hora 192 se retiraron los dispositivos). Se efectuaron sangrados cada 4 horas para cuantificar E2, desde el momento previo a la administración de las formulaciones hasta 68 h para el E17 y EB y hasta 92 h para ECP.

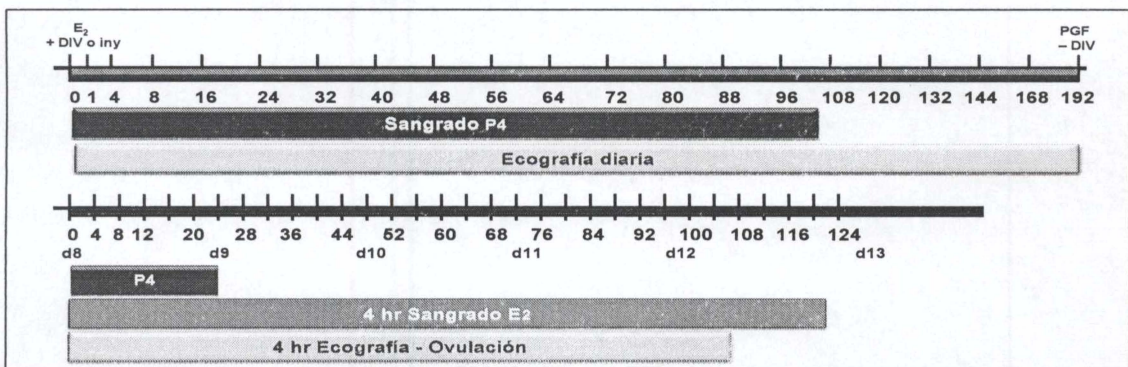


Figura 3: Cronograma de sangrados y de ecografías

La sangre fue centrifugada y el plasma separado y conservado a -20°C hasta su análisis. La determinación de progesterona se realizó en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria por medio de radioinmunoanálisis (RIA) en fase sólida con P4 marcada con ^{125}I (Siemens Healthcare Diagnostics, Montevideo, Uruguay) La sensibilidad del ensayo fue de 0,02 ng/mL y los coeficientes de variación intraensayo para controles bajo (0,8 ng/mL), medio (8,0 ng/mL) y alto (15 ng/ml) fueron de 7,6%, 10,3% y 5,9%, respectivamente. El coeficiente de variación inter-ensayo fue de 9,3%, 11,8% y 6,3% para los mismos controles. Los niveles de estradiol también se determinaron por RIA en fase líquida con doble anticuerpo, previa extracción con éter y resuspensión (Siemens Healthcare diagnostics, Montevideo, Uruguay). Las muestras se analizaron en duplicados desde el inicio del procedimiento. La sensibilidad del ensayo fue de 1,4 pg/mL. La variabilidad estuvo marcada por coeficientes de variación inter-ensayo de 25,5%, 20,3% y 21,6% e intraensayo de 16,4%, 15,7% y 16,7% para controles bajos (7,8 pg/mL), medios (62,5 pg/mL) y altos (250 pg/mL), respectivamente.

Expresión estral

Desde el D7, cada 4 horas y previo al sangrado de los animales se observó el comportamiento de celo que se registró durante 15 minutos. Asimismo se colocó al inicio de los tratamientos dispositivos visuales de registro por presión de monta (Estroprotect, Rockway, EE.UU.) que se evaluaron previamente a cada ecografía.

Análisis Estadístico

Para el análisis de variables continuas con más de una medición durante el transcurso del experimento (concentraciones hormonales y seguimiento folicular) se utilizó un modelo mixto: procedimiento MIXED del paquete estadístico SAS, que incluyó como efectos fijos: tratamiento, día e interacciones. El modelo tomó como efecto aleatorio a la vaca dentro de tratamiento. La estructura de covarianza utilizada fue AR (1) y las medidas repetidas se realizaron sobre la unidad vaca dentro de tratamiento x día. La ocurrencia de la ovulación se analizó acorde al procedimiento GENMOD de SAS. El área bajo la curva como medida global de los perfiles de liberación plasmática de las

formulaciones evaluadas se calculó por el método de trapezoides. Se determinó el nivel de significancia en 5%.

RESULTADOS

ESTRADIOL

Se caracterizaron los perfiles plasmáticos de estradiol con el empleo de distintas presentaciones comerciales conteniendo sales de benzoato, cipionato o estradiol en su forma E17 en vacas cíclicas donde la producción endógena de los folículos en desarrollo participa en los perfiles encontrados y la respuesta reproductiva.

En el cuadro 1 se muestran los niveles plasmáticos de estradiol, donde se presentan los grupos acorde a los esteroides utilizados. Su comportamiento no difirió en relación al tipo de progesterona administrada.

Cuadro 1: Características de los perfiles plasmáticos de E2 (Media \pm EEM) de acuerdo a los distintos tratamientos

	DIV-EB	DIV-E17	DIV-ECP	P4-EB	P4-E17	P4-ECP
Animales (n)	4	5	5	5	4	5
Conc. H ₀ (pg/mL)	16,1 \pm 3,2 ^c	11,5 \pm 3,9 ^c	11,4 \pm 3,9 ^c	12,4 \pm 2,3 ^c	12,3 \pm 5,1 ^c	7,2 \pm 2,0 ^d
Pico máximo (h)	4,0 \pm 0,01 ^c	4,0 \pm 0,01 ^c	32,0 \pm 14,7 ^d	4,0 \pm 0,01 ^c	4,0 \pm 0,01 ^c	32,8 \pm 5,2 ^d
Conc Máx (pg/mL)	183,1 \pm 94,6 ^e	551,7 \pm 154,8 ^f	49,6 \pm 20,0 ^g	153,3 \pm 46,4 ^e	753,6 \pm 73,4 ^f	41,6 \pm 24,1 ^g
Vida Media (h) ^a	35,0 \pm 5,0 ^c	40,0 \pm 22,6 ^c	89,6 \pm 3,6 ^d	39,2 \pm 15,8 ^c	41,0 \pm 17,1 ^c	84,0 \pm 9,4 ^d
ÁBC ^b (pg/mL)	2095,4 \pm 138,6 ^c	545,8 \pm 539,3 ^f	2486,8 \pm 36,4 ^e	2021,9 \pm 123,7 ^c	6703,6 \pm 669,0 ^g	1874,9 \pm 37,1 ^e

^a: Momento a que vuelve el punto base; ^b: Área bajo la curva

^{c, d}: Diferentes letras entre columnas difieren (P<0,05)

^{e, f, g}: Diferentes letras entre columnas difieren (P<0,01)

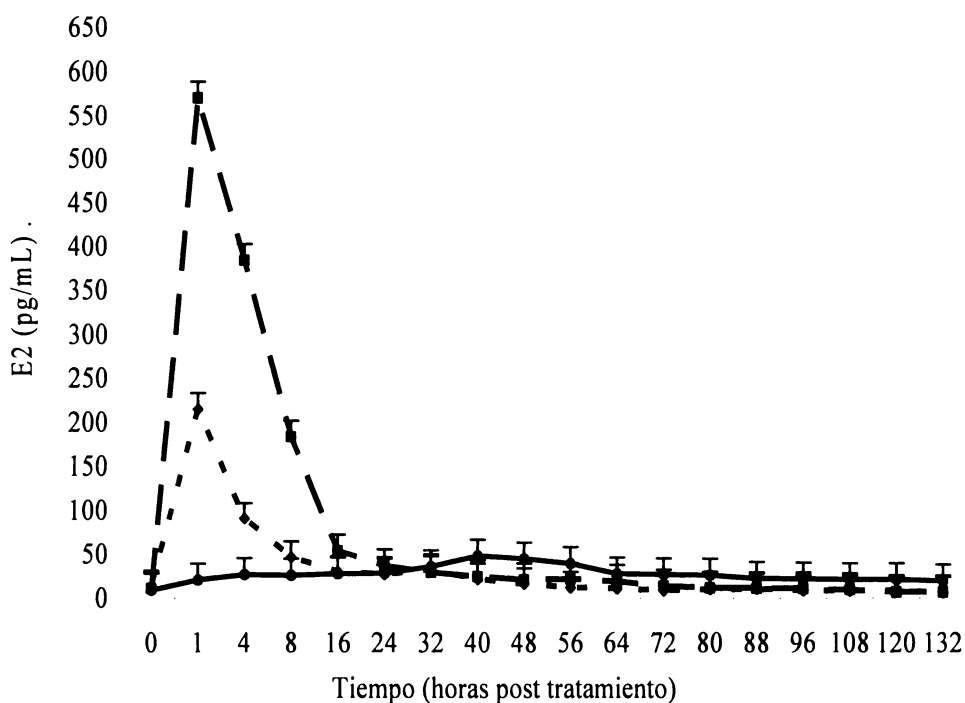


Figura 4: Niveles de estradiol luego de la administración de Estradiol 17 β (E17), Benzoato de estradiol (EB) o Cipionato de Estradiol (ECP)

Las concentraciones de E2 alcanzaron $11,6 \pm 9,1$ pg/mL en el momento del segundo tratamiento (D8 o D9). Los valores máximos se alcanzaron 4 h después del tratamiento para los grupos E17 β y EB y en 32 h para los grupos ECP. El ascenso de los grupos E17 luego de alcanzar el máximo regresó para equipararse a los de EB hacia las 32 h para volver a los valores basales a las 40 h.

Para el E17, luego de alcanzar su valor máximo tuvo un pronunciado descenso desde niveles máximos de $641,5 \pm 11,5$ pg/mL (ambos grupos P4) superando los 100 pg/mL a las 16 h, volviendo a la línea base en forma muy variable entre individuos.

Para el grupo EB el valor máximo fue de $166,5 \pm 11,5$ pg/mL, presentando un comportamiento muy ajustado entre animales, volviendo a valores basales a las 40 h. Las concentraciones máximas para ECP fueron $45,6 \pm 10,9$ pg/mL ($p < 0,0001$) volviendo a valores base después de 80 h.

PROGESTERONA

FACU

Respecto a los perfiles de progesterona plasmática los principales indicadores se sintetizan en el cuadro 2.

Cuadro 2: Características de los perfiles plasmáticos de P4 (Media \pm EEM)

	DIV-EB	DIV-E17	DIV-ECP	P4-EB	P4-E17	P4-ECP
Animales (n)	4	5	5	5	4	5
Conc H ₀ (ng/mL)	5,2 \pm 1,3 ^c	6,5 \pm 2,5 ^c	4,4 \pm 0,7 ^c	4,9 \pm 1,2 ^c	3,9 \pm 3,6 ^c	5,0 \pm 0,6 ^c
Pico máximo (h)	38,6 \pm 36,1 ^c	43,6 \pm 59,4 ^c	58,8 \pm 38,0 ^c	4,0 \pm 2,7 ^d	2,0 \pm 2,2 ^d	2,0 \pm 2,2 ^d
Conc Máx (ng/mL)	7,8 \pm 1,3 ^c	10,9 \pm 6,8 ^c	7,6 \pm 1,0 ^c	10,8 \pm 3,4 ^c	14,1 \pm 6,5 ^c	22,8 \pm 6,9 ^c
Conc Media (ng/mL)	4,8 \pm 1,3 ^c	5,9 \pm 2,0 ^c	5,9 \pm 0,5 ^c	6,1 \pm 2,9 ^c	6,2 \pm 4,1 ^c	8,4 \pm 7,1 ^c
Vida Media (h) ^a	148,0 \pm 71,5 ^c	187,2 \pm 4,5 ^c	199,6 \pm 2,5 ^c	176,8 \pm 30,2 ^c	131,0 \pm 87,1 ^c	178,8 \pm 46,5 ^c
ÁBC ^b (ng/mL)	827,7 \pm 81,6 ^c	1064,7 \pm 119,9 ^c	1193,4 \pm 129,4 ^c	935,3 \pm 87,7 ^c	861,0 \pm 79,0 ^c	1034,1 \pm 88,5 ^c

^a Momento en que las concentraciones descendieron por debajo de 1 ng/mL.

^{c, d}: Diferentes letras entre columnas difieren (P<0,05)

Los niveles plasmáticos alcanzaron valores de 4,4 \pm 0,3 ng/mL y 5,2 \pm 0,3 ng/mL para DIV y MAD-4, respectivamente (P = 0,09). Las concentraciones máximas se alcanzaron 1 h después de la inserción de los dispositivos o inyección intramuscular en ambos grupos (7,3 \pm 0,7 ng/mL para DIV y 16,1 \pm 0,7 ng/mL para MAD-4, P<0,0001), y seis horas después, fueron 5,7 \pm 0,7 ng/mL y 11,2 \pm 0,7 ng/mL para DIV y MAD-4, respectivamente (P<0,0001), y desde ese momento se mantuvieron similares hasta D8.

Los perfiles de progesterona se muestran en la figura 5.

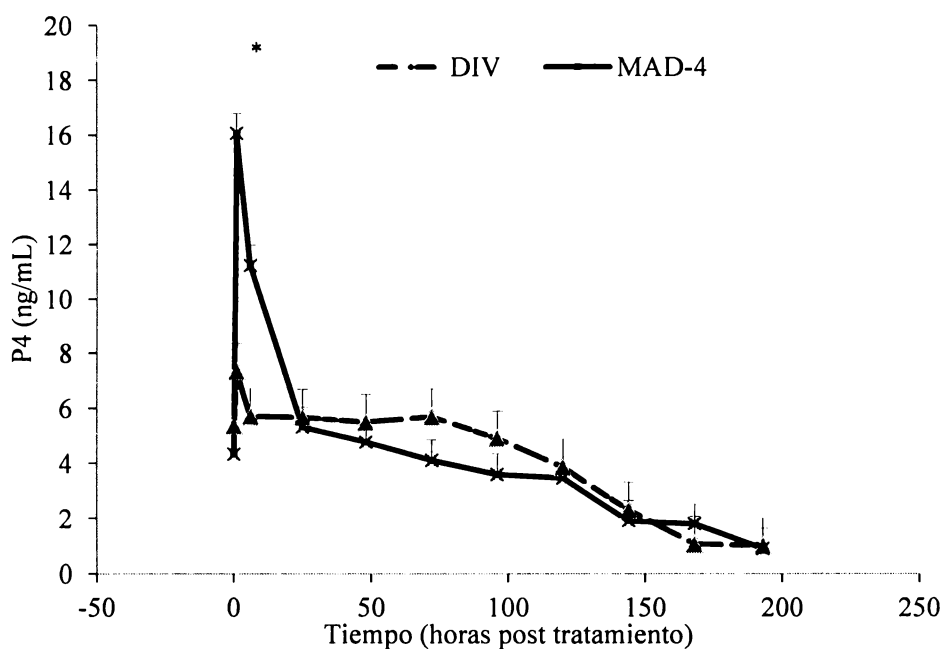


Figura 5: Concentraciones de progesterona (P4) luego de la administración de P4 parenteral (MAD-4) o intravaginal (DIV)

Las dos formulaciones de P4 mantuvieron los niveles plasmáticos por encima de 1 ng/mL por largos períodos, con mayor variabilidad en la respuesta primaria para la presentación inyectable. Los niveles plasmáticos de P4 descendieron más rápidamente en las vacas tratadas con MAD-4 que con DIV, con un promedio entre grupos de $164,4 \pm 56,4$ h para MAD-4 y $178,3 \pm 46,4$ h para DIV.

DESARROLLO FOLICULAR, OVULACIÓN Y MANIFESTACIÓN ESTRAL

Los parámetros de desarrollo folicular, celo y ovulación se muestran en el cuadro 3:

Cuadro 3: Resultados de dinámica folicular, celos y ovulación en los 6 grupos de tratamiento (Media \pm EEM).

Parámetro	DIV-EB	DIV-17 β	DIV-ECP	P4-EB	P4-17 β	P4-ECP
Diámetro (mm) del (FD) al:						
Retiro DIV	11,9 \pm 1,1 ^a	11,1 \pm 2,9 ^a	8,6 \pm 1,9 ^a	11,8 \pm 1,4 ^a	9,0 \pm 2,2 ^a	9,5 \pm 3,0 ^a
Tratamiento E2	13,7 \pm 4,2 ^a	12,4 \pm 3,3 ^a	8,6 \pm 1,9 ^a	12,5 \pm 2,1	9,3 \pm 2,2 ^a	9,5 \pm 3,0 ^a
Intervalo (h) retiro DIV a:						
Ovulación:	62,0 \pm 12,0 ^a	60,8 \pm 13,7 ^a	69,4 \pm 2,2 ^a	67,2 \pm 12,5 ^a	44 \pm 0,2 ^b	80,0 \pm 11,3 ^b
Mediana	60	64	72	72	44	80
Rango	52-76	44-80	56-80	52-80	44	72-88
No resp.	0	0	2	0	2	3
Celo:	64,0 \pm 5,7 ^a	40,8 \pm 19,1 ^b	45,3 \pm 10,1 ^b	51,2 \pm 11,1 ^{a,b}	35,0 \pm 8,2 ^b	46,7 \pm 19,7 ^b
Mediana	64	36	44	56	36	56
Rango	60-68	24-68	36-56	36-64	24-44	24-60
No resp.	2	0	2	0	0	2

a, b: Diferentes letras entre columnas difieren ($P < 0,05$)

El diámetro folicular al momento de los tratamientos de P4 fue de $14,9 \pm 1,4$ y $14,4 \pm 1,3$ mm para EB y E17, y de $10,9 \pm 1,4$ mm para los animales ECP ($P = 0,04$). El diámetro folicular al momento de la PG (D8) fue de $10,4 \pm 0,9$ mm, sin diferencias entre grupos, y para el día 9 (E17 y tratamientos EB) fue de $12,8 \pm 1,5$ mm, $11,0 \pm 1,4$ mm y $10,7 \pm 1,3$ mm para EB, E17 y vacas ECP, respectivamente ($P > 0,1$).

La luteolisis ocurrió en el 77,8% del grupo EB, en el 33,3% de E17, y en el 20% de ECP ($P > 0,1$).

La ovulación se detectó en el 100% de las vacas EB, el 77,7% de la E17 y el 50% de las vacas ECP ($P = 0,029$) Tras seguimiento ultrasonográfico, se encontró que la ovulación se produjo a las 60 h después del tratamiento PG, siendo de $63 \pm 3,7$ h, $52 \pm 4,2$ h y $66,6 \pm 6,0$ h para las vacas en la EB, E17 y ECP, respectivamente ($P > 0,1$).

El comportamiento estral se observó en el 70% del grupo EB, el 100% de la E17 y el 60% de las vacas ECP ($P > 0,1$).

DISCUSIÓN

Las concentraciones circulantes de E17 en los tres tratamientos evaluados difirieron significativamente en varios de los momentos evaluados. Las diferencias temporales en los perfiles de estradiol luego de los tratamientos con diferentes estrógenos son consistentes con resultados publicados por otros autores (Vynckier et al., 1990; Bo et al., 2000.; Haughian et al., 2002; Martínez et al., 2005, Souza et al., 2005). Otros estudios han descrito el perfil de circulación de E17 después del tratamiento con ECP (Haughian et al., 2002), EB (Lammoglia et al., 1998; Martínez et al., 2005) y E17 (Bo et al., 2000; Martínez et al., 2005). Desafortunadamente ninguno de estos estudios se realizó en animales de alta producción en condiciones pastoriles y sólo Haughian et al. (2002) examinaron los perfiles de ECP al inicio de posparto (día 7) en vacas lecheras en producción. Souza et al. (2005) utilizaron animales de alta producción en sistemas confinados. Además, algunos de los estudios caracterizaron los perfiles de estradiol circulante en presencia de E17 endógeno producido por los folículos en desarrollo presentes en los ovarios (Vynckier et al., 1990; Lammoglia et al., 1998; Bo et al., 2000.; Haughian et al., 2002). Dos estudios intentaron eliminar los efectos endógenos de E17 a través de ovariectomía (Martínez et al., 2002, 2005) o por la aspiración de todos los folículos > 5 mm de diámetro (Souza et al., 2005).

Souza et al. (2005) presentaron, en vacas con aspiraciones diarias de folículos mayores de 5 mm, valores que regresaban a los niveles basales a las 24 horas para E17 y 36 horas para EB. La diferencia encontrada en la permanencia de los niveles séricos (de 40 horas en ambos esteroides) podría estar dada por la influencia de la secreción endógena en las vacas cíclicas del ensayo que generaría mayores picos en las concentraciones encontradas así como mantenimiento de los niveles por más tiempo. Muy diferente fue el comportamiento de ECP, donde el pico máximo fue entre 40 y 50 pg/mL a las 32 horas, llegando a niveles basales recién entre las 84 a 90 horas con niveles prácticamente estables hasta ese punto.

Lammoglia et al. (1998) evaluaron las dosis para inducir estro y ovulación en vacas y vaquillonas en anestro en protocolos con progestinas y PGF. Con 1 mg de EB obtuvieron el pico de concentración a las 11 horas en vacas y 17 horas en vaquillonas que volvieron a valores basales a las 28 horas. Esto difiere de los valores encontrados en nuestro ensayo, donde el pico se obtuvo a las 4 h volviendo a valores basales a las 40 h. Esto puede atribuirse a una mayor concentración de E17 endógeno en los animales de

nuestro experimento debido a que se encontraban ciclando. Provocando el pico con anterioridad y un descenso mas prolongado en el tiempo.

Martínez et al. (2005) encontraron concentraciones de estradiol en plasma con pico máximo 6 h después del tratamiento con E17 β que disminuyeron gradualmente a niveles basales a las 36 h. En nuestro trabajo los valores máximos para E17 β se alcanzaron 4 h después del tratamiento para volver a los valores basales a las 40 h de forma muy variable entre individuos.

En nuestro estudio las concentraciones máximas de estradiol fueron para E17 β de 641,5 \pm 11,5 pg/mL (ambos grupos de P4), para el grupo de EB fue de 166,5 \pm 11,5 pg/mL y para ECP fueron de 45,6 \pm 10,9 pg/mL. Estas concentraciones alcanzadas son superiores a lo reportado por otros ensayos, incluso superando en el caso del E17 β los 100 pg/mL a las 16 h.

Vynckier et al. (1990) encontraron concentraciones de estradiol en plasma durante el estro inducido con PGF en valores de 14 \pm 2 pg/mL (rango de 11 a 28 pg/mL), similares a los encontrados luego de una inyección de 1 mg de EB. También reportaron un aumento de 2 a 175 pg/mL después del tratamiento en vacas con 10 mg de EB.

En el estudio de Souza et al. (2005), el tratamiento con 1 mg de EB elevó la concentraciones circulantes de E17 a \sim 10 pg/mL, relación mantenida con dosis menores. Aún más dramáticas fueron las diferencias registradas en vacas de carne post-parto con una elevación de \sim 40 pg/mL (Lammoglia et al., 1998) o \sim 30 pg/mL por Burke et al., (2003) después del tratamiento con 1 mg de EB. Martínez et al. (2005) reportaron una elevación de aproximadamente 100 pg/mL después de 5 mg de EB en vacas ovariectomizadas.

Estas diferencias en las concentraciones máximas de E17 con otros autores puede explicarse debido al mayor metabolismo de los esteroides en vacas lecheras de alta producción (Sangsritavong et al., 2002). Para evitar este efecto, nuestro modelo utiliza animales en momento de lactancia tardía, buscando minimizar la incidencia de un alto metabolismo sobre la concentración y vida media del E17. Además debe tenerse en cuenta los métodos utilizados para las cuantificaciones hormonales así como los tratamientos previamente realizados a las muestras. En el presente trabajo, se empleó radioinmunoensayo en fase líquida con doble anticuerpo, para lo cual se puso a punto la técnica, se ajustó la curva acorde a sueros de concentración conocida y se hicieron diluciones seriadas cuando fue necesario. Previamente se realizó a partir de los sueros extracción de los esteroides con éter y resuspensión.

Bo et al. (2000) utilizaron un método de medición RIA con extracción con éter pero sin resuspensión obteniendo valores de hasta 3.250 pg/mL a las 4 h de la aplicación de 5 mg E17. Además de las apreciaciones respecto al método empleado para las cuantificaciones hormonales y pre-tratamientos utilizados, no se pueden descartar diferencias debidas a distintos estados fisiológicos que no se informan en varios estudios.

Se debe tener presente diferencias químicas al evaluar la respuesta cinética de diferentes presentaciones de esteroides (Souza et al., 2005). El distinto peso molecular (PM) entre productos nos da para E17 β 272,4 kDa (C18H24O2), mientras que el EB tiene un PM de 376,5 kDa (C25H28O3) y el ECP un PM de 396,6 kDa (C26H36O3). Estas diferencias químicas generan que para misma dosis (mg) de preparación un 28% menos de esteroide para EB frente a E17 y 32% menos en el caso de ECP. Esto influenciaría no solo la cantidad total de esteroide determinada y valorada en área bajo la curva de cada presentación sino también las magnitudes máximas encontradas en los picos de concentración. También la polaridad de las moléculas influencia los perfiles encontrados en plasma debido a las diferencias en absorción y metabolismo. La vida media también depende de la estructura y especialmente de la polaridad de la molécula que está directamente vinculada con su tamaño así, moléculas más grandes tienden a ser menos polares, la simetría de los enlaces covalentes (moléculas más simétricas son menos polares) y presencia de anillos aromáticos (dando menos polaridad). Los esteres son cadenas compuestas típicamente adheridas a la hormona esteroide matriz en posición C17. La esterificación del grupo hidroxilo por lo tanto protegerá al grupo frente al ataque metabólico dándole mayor vida media. Situación concordante con los resultados encontrados, donde ECP se mantiene por mayor tiempo en plasma en niveles casi estables luego de alcanzar su punto máximo a las 32 h. Para EB, dada su tamaño más pequeño y menos polar que ECP logra su pico de concentración en situación similar al E17 pero luego desciende drásticamente los niveles, volviendo a valores basales hacia las 40 h. Para E17, molécula más pequeña y no esterificada, rápidamente alcanza su pico máximo volviendo a niveles basales también en forma acelerada al no ser protegida ni estabilizada la molécula a la absorción y metabolismo. Esta situación disímil en los perfiles plasmáticos plantea que cada forma de estradiol generará diferentes efectos sobre las concentraciones de gonadotropina y el desarrollo de los folículos ováricos.

A través de la adición de esteroides se genera la expectativa de que dicho tratamiento produzca un aumento rápido aunque a niveles fisiológicos de la circulación de E17 con la finalidad de producir efectos positivos sobre la fertilidad. En suplementación de protocolos Ovsynch, la adición de 0,5 o 1 mg de E17 8 h antes de la GnRH produjo un aumento del esteroide circulante que fue similar al natural, con mayor pico de concentración en vacas lactantes (Vynckier et al., 1990; Sartori et al., 2004).

Durante el ciclo normal, el pico de concentración de E17 induce la expresión de estro y el aumento de GnRH/LH. Después de eso, hay una rápida disminución en la circulación de E17, alcanzando niveles basales 8 a 10 horas después del comienzo de la oleada de GnRH/LH (Komar et al., 2001; Haughian et al., 2004). Por lo tanto, un rápido retorno a concentraciones basal circulantes de E17 puede ser importante para reducir los posibles efectos negativos de la elevada circulación de esteroides a nivel uterino durante el transporte de esperma, la ovulación, la fertilización y el desarrollo embrionario temprano.

Rogan et al. (2007) diseñaron un experimento con el fin de caracterizar perfiles de liberación de P4 plasmática de distintos dispositivos con cantidades variables de droga. Emplearon vacas lactantes cíclicas presincronizadas con PGF. Encontraron gran equivalencia entre los picos de concentración (ng/mL) entre grupos (Cue-Mate: $5,0 \pm 1,1$; DIB: $3,9 \pm 0,6$, 1,9 g CIDR: $4,6 \pm 0,6$; 1,38 g CIDR $3,7 \pm 0,4$; $P=0,51$) similares a los hallados con el DIV empleado por nosotros a la hora de la colocación de los dispositivos con $7,3 \pm 0,7$ ng/mL pero muy distantes a los $16,1 \pm 0,7$ para MAD-4 ($P<0,0001$).

Las concentraciones máximas se alcanzaron una hora después de la inserción de los dispositivos o inyección intramuscular en ambos grupos y seis horas después, fueron $5,7 \pm 0,7$ ng/mL y $11,2 \pm 0,7$ ng/mL para DIV y MAD-4, respectivamente ($P<0,0001$), y se mantuvieron similares a partir de dicho momento. Es interesante que independientemente de las dosis halladas en los dispositivos utilizados intravaginalmente las concentraciones encontradas en plasma sean similares, seguramente debido a la absorción estable desde la silicona impregnada y que se mantiene en forma similar por 8 a 10 días según resultados de Rogan et al. (2007). Cuando se evaluaron los datos desde la inserción hasta el D7, las concentraciones de progesterona en plasma no difirieron entre los grupos. Tomando los períodos superiores si aparece una predominancia de las presentaciones con mayor contenido de progesterona.

En el caso de la P4 inyectable las concentraciones descendieron con anterioridad al retiro de los dispositivos y en forma errática entre animales, con un promedio entre grupos de $164,4 \pm 56,4$ h mientras que para los DIV $178,3 \pm 46,4$ h, lo cual disminuiría la posibilidad del empleo de la solución inyectable por períodos superiores a los 7 días.

Los datos de luteolisis son coincidentes con aquellos encontrados por Callejas et al. (no publicados) con EB donde, con 2 mg halló 73,7% de regresión luteal y con 5 mg 85,6% y expresan la necesidad de inclusión de PG en protocolos con esteroides.

Referente a la respuesta estral tras la administración de los esteroides, se ha descrito la importancia de una concentración suficiente circulante de E17 para la expresión del estro (Lammoglia et al., 1998). Un estudio de Lyimo et al. (2000) informó una alta correlación entre los niveles séricos de E17 y la conducta estral en vacas Holando en lactancia. Gran cantidad de vacas con desarrollo folicular insuficiente o en estado de anestro producen insuficiente estradiol para generar expresión estral. La adición de esteroides en protocolos de sincronización colabora en la expresividad conductual y es diferencial acorde a los perfiles de liberación de las formulaciones.

En nuestro ensayo con la administración de 1 mg de EB, 1 mg de ECP y 1 mg de E17 β se observó el comportamiento estral en un 70%, 60% y 100% de los grupos respectivamente.

Souza et al (2005) mostraron que a dosis de 0,5 mg (EB, ECP y E17) el comportamiento estral no se manifestaba, excepto con E17, mientras que a 1 mg la respuesta conductual con montaje e hiperactividad se presentaba en una proporción alta de los animales tratados entre las 12 y 36 horas, particularmente en aquellos tratados con E17 y EB.

Las vacas que no muestran comportamiento estral después de tratamientos exógenos con esteroides podrían tener insuficiente producción endógena (falta de un folículo dominante) o excesiva circulación de progesterona (falta de regresión del cuerpo lúteo), así como también excesivo metabolismo que altere los patrones de expresión (Sangsrivong et al., 2002).

CONCLUSIONES

FACU
/

Se encontraron perfiles de liberación sanguínea muy diferentes, con crecimientos rápidos y muy pronunciados en las concentraciones para E17, intermedios para EB y más lentamente para ECP. La respuesta a E17 fue muy variable entre animales con vidas medias diferentes a la publicadas con anterioridad.

Se comprobaron elevadas correlaciones entre las cinéticas plasmáticas de las distintas formulaciones de estradiol valoradas y la actividad ovárica encontrada.

La respuesta ha sido satisfactoria no obstante errante, especialmente en lo referido a la ovulación de los folículos en desarrollo, siendo el EB el que mayor porcentaje de ovulación obtuvo con menor variabilidad.

Respecto a la progesterona, se evaluó el empleo de alternativas al manejo tradicional, la formulación evaluada ocasionó aumentos rápidos en la concentración sérica ya a la hora de su administración manteniéndose por encima de 1 ng/mL hasta 192 horas en la mayoría de los animales, independientemente del esteroide co-evaluado. Considerando las ventajas del menor riesgo de contacto y fácil manejo del fármaco, rápida aplicación al rodeo, evitar pérdidas de dispositivos por montadas o mala colocación, falta de pérdida de dosis, sin necesidad de higienizarlos para reutilización, inexistencia de vaginitis y lesiones del tracto reproductivo, podría ser una alternativa viable en protocolos de sincronización de celos y ovulación. Se presentan algunas limitantes acorde a los perfiles cinéticos registrados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams, GP, Evans, ACO, Rawlings, NC. (1994). Follicular waves and circulating gonadotrophin in 8- month-old prepuberal heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 100: 27-33.
2. Alberio, RH, Palma ,GA, Butler, HM, Schiersmann, G, Torquati, O. (1984). Fertilidad luego de tratamientos con progesterona intravaginal en vacas con ternero al pie. *Revista Argentina de Producción Animal*. 4: 193-200.
3. Arthur, GH, Noakes, DE, Pearson, H. (2004) *Veterinary Reproduction and obstetrics*. 6a. ed. London Interamericana MC Graw-Hill. 868p.
4. Bo, GA, Martinez, M, Nasser, LF, Caccia, M, Tribulo, H, Mapletoft, RJ. (1993). Follicular dynamics in *Bos-Indicus* and *Bos-Taurus* beef cattle under pasture conditions in Argentina. *Proc 10 Congreso Brasileiro de Reproducao Animal, Belo Horizonte*; 2: 221.
5. Bo, GA, Adams, GP, Pierson, RA, Tribulo, HE, Caccia, M, Mapletoft, RJ. (1994). Follicular wave dynamics after estradiol-17 treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology* 41:1555-1569.
6. Bo, GA, Bergfelt, DR, Brogliatti, GM, Pierson, RA, Adams, GP, Mapletoft, RJ. (2000). Local versus systemic effects of exogenous estradiol-17 beta on ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen implants. *Animal Reproductive Science*. 31:141-157.
7. Bo GA, Colazo MJ, Martinez MF, Kastelic JP, Mapletoft RJ. (2003). Sincronización de la emergencia de la onda folicular y la ovulación en animales tratados con progestagenos y diferentes esteres de estradiol. 5° Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina p 12-25.
8. Burke, CR, Mussard, ML, Gasser, CL, Grum, DE, Day, ML. (2003). Estradiol benzoate delays new follicular wave emergence in a dose-dependent manner after ablation of the dominant ovarian follicle in cattle. *Theriogenology*, 60:647-658.
9. Cavestany, D. (2002) Sincronización y/o inducción de celos con o sin inseminación artificial a tiempo fijo en rodeos del Uruguay. XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay, p. 143-163.
10. Cavestany, D, Fernández, D, Salazar, E, Sanchez, A, Leyton, L, Crespi, D. (2008). Determinación de niveles de progesterona en sangre luego de la

- administración parenteral de progesterona en vacas Holando ovariectomizadas o ciclando. XXXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay, p. 218-219.
11. Colazo, MG, Martínez, MF, Whittaker, PR, Kastelic, JP, Mapletoft, RJ. (2002). Estradiol cypionate (ECP) in CIDR-B-based programs for fixed time AI in beef heifers. *Theriogenology*; 57:371 (abstract).
 12. Diskin, MG, Austin, EJ, Roche, JF. (2002). Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 23:211-228.
 13. Edmonson, Lean, Weaver, Farver, Webster, (1989). A body condition scoring chart for Holstein dairy cow. *Journal of Dairy Science* 72: 68-78.
 14. Evans, ACO, Adams, GP, Rawlings, NC. (1994a). Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepuberal heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 100:187-194.
 15. Evans, ACO, Adams, GP, Rawlings, NC. (1994b). Follicular and hormonal development in prepuberal heifers from 2 to 36 weeks of age. *Journal of Reproduction and Fertility* 102:463-470.
 16. Figueredo, RA, Barros, CM, Pinheiro, OL, Soler, JMP. (1997). Ovarian follicular dynamics in Nellore breed (*Bos-Indicus*) cattle. *Theriogenology* 47:1489- 1505.
 17. Flint, APF, Sheldrick, EL. (1986). Ovarian oxytocin and the maternal recognition of the pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility* 76:831-839.
 18. Flint, APF, Sheldrick, EL, McCann, TJ, Jones, DCS. (1990). Luteal oxytocin: characteristics and control of synchronous episodes of oxytocin PGF₂ α secretion at luteolysis in ruminants. *Domestic Animals Endocrinology* 7:111-124.
 19. Ginther, OJ, Knopf, L, Kastelic, JP. (1989). Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biology of Reproduction* 41:247-254.
 20. Ginther, OJ, Kot, K, Kulick, LJ, Matrin, S, Wiltbank, MC. (1996). Relationship between FSH and ovarian follicular waves during the last six month of pregnancy in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 108: 71-279.
 21. Ginther, OJ, Kot, K, Kulick, LJ, Wiltbank, MC. (1997). Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology* 48:75-87.
 22. Ginther, OJ. (2000). Selection of the dominant follicle in cattle and horse. *Animal Reproduction Science* 60-61: 61-79.

23. Goding, JR. (1974). Demonstration that PGF₂ α is the uterine luteolysin in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility* 38:261-271.
24. Hafez, ESE, Hafez, B (2000) *Reproduction in farm animals*. 7a ed. Philadelphia Lippincott. 509 pp
25. Haughian, JM, Ginther, OJ, Kot, K, Wiltbank, MC. (2004). Relationships between FSH patterns and follicular dynamics and the temporal associations among hormones in natural and GnRH-induced gonadotropin surges in heifers. *Reproduction* 127:23-33.
26. Haughian, JM, Sartori, R, Guenther, JN, Gumen, A, Wiltbank, MC. (2002). Extending the postpartum anovulatory period in dairy cattle with estradiol cypionate. *Journal of Dairy Science* 85:3238-3249.
27. Kawamura, K, Kikuyama, S. (1994). Evidence that hypophysis and hypothalamus constitute a single entity from the primary stage of histogenesis. *Development*. 115:1-9
28. Komar, CM, Berndtson, AK, Evans, AC, Fortune, JE. (2001). Decline in circulating estradiol during the periovulatory period is correlated with decreases in estradiol and androgen, and in messenger RNA for p450 aromatase and p450 17 α -hydroxylase, in bovine preovulatory follicles. *Biology of Reproduction* 64:1797-1805.
29. Lammoglia, MA, Short, RE, Bellows, SE, Bellows, RA, MacNeil, MD, Hafs, HD. (1998). Induced and synchronized estrus in cattle: dose titration of estradiol benzoate in peripubertal heifers and postpartum cows after treatment with an intravaginal progesterone-releasing insert and prostaglandin F₂ α . *Journal of Animal Science* 76:1662-1670.
30. Lyimo, ZC, Nielen, M, Ouweltjes, W, Kruip, TAM, Van Eerdenburg, FJCM. (2000). Relationships among estradiol, cortisol and intensity of estrous behavior in dairy cattle. *Theriogenology* 53:1783-1795.
31. Lucy, MC, Savio, JD, Badinga, L, De la Sota, RL, Thatcher, WW. (1992). Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *Journal of Animal Science* 70:3615- 3626.
32. Lucy, MC. (2004). The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems. *Animal of Reproduction Science* 82-83:495-512.

33. Mapletoft, RJ, Lapin, DR, Ginther, OJ (1976). The ovarian artery as the final component of the local luteotropic pathway between a gravid uterine horn and ovary in ewes. *Biology of Reproduction*, 15:414-421.
34. Martinez, MF. (2002); Synchronization of follicular wave dynamics and ovulation for fixed-time artificial insemination in cattle. PhD thesis, University of Saskatchewan. Chapter 5.
35. Martinez, MF, Kastelic, JP, Bo GA, Caccia, M, Mapletoft, RJ. (2005). Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. *Animal of Reproduction Science*, 86:37-52.
36. Miksch, ED, Le Vever, DG, Mukembo, G, Spitzer, JC, Wiltbank, JN. (1978). Synchronization of oestrus in beef cattle II. Effect of an injection of norgestomet and oestrogen in conjunction with a norgestomet implant in heifers and cows. *Theriogenology* 10:201-221.
37. Moreira, F, De la Sota, RL, Díaz, T, Thatcher, WW. (2000). Effect of day of the estrus cycle at the initiation of timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. *Journal of Animal Science* 78:1568-1576.
38. Moseley, WM, Forrest, DW, Kaltenbach, CC, Dunn, TE. (1979). Effect of Norgestomet on peripheral levels of progesterone and estradiol 17 beta in beef cow. *Theriogenology* 11: 331.
39. Murphy, MG, Boland, MP, Roche, JF. (1990). Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in postpartum beef suckled cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 90:523-533.
40. Pursley, JR, Kosork, MR, Wiltbank, MC. (1997). Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *Journal of Dairy Science* 80:301-306.
41. Rhodes, JM, Death, G, Entwitle, KP. (1995) Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahamn heifers. *Animal of Reproduction Science* 38:265-277.
42. Roche, JF, Mihm, M. (1996). Physiology and practice of induction and control of oestrus in cattle. *Proc XIX (vol 1) World Buiatrics Congr., Edinburgh, BCVA (British Cattle Veterinary Association)*, p. 157-163.

43. Rogan, D, Martinez, MF, Bó, GA, Chesta, P, Feresin, F, Mapletoft, RJ. (2007). Progesterone release patterns from Cue-Mate in comparison to other intravaginal progesterone-releasing devices in lactating dairy cows. *Reproduction and Fertility* 19:126-127.
44. Sangsritavong, S, Combs, DK, Sartori, R, Armentano, LE, Wiltbank, MC. (2002). High feed intake increases blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 85:2831-2842.
45. Sartori, R, Haughian, JM, Shaver, RD, Rosa, GJM, Wiltbank, MC. (2004) Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous Cycles of Holstein heifers and lactating cows. *Journal of Dairy Science* 87:905-920.
46. Savio, JD, Boland, MP, Hynes, N, Roche, JF (1990a). Resumption of follicular activity in the early postpartum period of dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 88:569-579.
47. Savio, JD, Boland, MP, Roche, JF, (1990b). Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in postpartum dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 88:581-591.
48. Senger, PL. (2003). Regulation of reproduction: Nerves, Hormones and Target Tissues. Senger P.L, *Pathways to Pregnancy and Parturition*. 2a. ed. Washington. Current Conceptions, p 102-127.
49. Souza, AH, Cunha, AP, Caraviello, DZ, Wiltbank, M.C. (2005). Profiles of circulating estradiol-17 β after different estrogen treatments in lactating dairy cows. *Animal Reproduction* 2:224-232.
50. Ungerfeld, R, (2002) *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo Melibea.584 p.
51. Vynckier, L, Debackere, M, Dekruif, A, Coryn, M. (1990). Plasma estradiol-17 β concentrations in the cow during induced estrus and after injection of estradiol-17 β benzoate and estradiol-17 β cyprionate-a preliminary study. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 13:36-42.
52. Zarco, L, Stabenfeldt, GH, Bosu, S, Bradford, GE, Kindahl, H.(1998) Modification of PGF2 α synthesis and release in the ewe during the initial establishment of pregnancy. *Journal of Reproduction Fertility* 83:527-536.
53. Zeitoun, MM, Rodríguez, HF, Randel, RD. (1996). Effect of season on ovarian follicular dynamics in Brahman cows. *Theriogenology* 45:1577-1581.