



**UNIVERSIDAD DE LA RÉPUBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**EFFECTO DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO SOBRE LOS  
PERFILES  
ENDÓCRINOS, ESTRUCTURAS OVÁRICAS Y FERTILIDAD  
EN VACAS ADULTAS**

por

**ANDREA ALVEZ**

**TESIS DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**URUGUAY**

**2019**





**UNIVERSIDAD DE LA RÉPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**EFFECTO DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO SOBRE LOS  
PERFILES  
ENDÓCRINOS, ESTRUCTURAS OVÁRICAS Y FERTILIDAD  
EN VACAS ADULTAS**

por

**ANDREA ALVEZ**

---

Carolina Viñoles

---

Ana Meikle

2019

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE  
DEFENSA DE TESIS**

**Daniel Cavestany; MS, PhD**

**Departamento de reproducción. Facultad de Veterinaria**

**Universidad de la República – Uruguay**

**Elsa Garófalo; MS, PhD**

**Departamento de bioquímica, biología molecular y celular. Facultad de Veterinaria**

**Universidad de la República – Uruguay**

**Raquel Pérez Clariget; MS, PhD**

**Departamento de producción animal y pasturas. Facultad de Agronomía**

**Universidad de la República – Uruguay**

**2019**



FACULTAD DE VETERINARIA  
Programa de Posgrados

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS  
DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

EFFECTO DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO SOBRE LOS  
PERFILES ENDÓCRINOS

Por: Dra. Andrea Lorena Álvarez Cerizola

Directora de Tesis: Dra. Carolina Viñoles  
Codirectora de Tesis: Dra. Ana Meikle

Tribunal

Presidente: Dr. Daniel Cavestany

Segundo Miembro: Dra. Elsa Garófalo

Tercer Miembro: Dra. Raquel Pérez Clariget

Fallo del Tribunal: APROBADA con MENCIÓN

Salón de Posgrados  
Viernes 26 de abril de 2019

## DEDICATORIA

A mis padres por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que incluye este. Me formaron con reglas y algunas libertades, pero al final de cuentas, me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos. Muchas gracias

## AGRADECIMIENTOS

Quiere agradecer a las instituciones que han hecho posible la realización de mi tesis con su apoyo económico y/o logístico: ANII, INIA Tacuarembó, Facultad de Veterinaria y Polo Agroforestal de Bañado Medina perteneciente a Facultad de Agronomía.

A Carolina Viñoles por su contribución en mi formación profesional en destrezas prácticas y teóricas para realizar esta tesis, y orientarme, motivarme y exigirme lo necesario para cumplir con las obligaciones del caso y hacer posible la finalización del trabajo A Ana Meikle por brindar su tiempo en corregir la tesis y orientarme.

A Ximena por el apoyo al trabajo de campo que fue fundamental y por el procesamiento de muestras en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de Facultad de Veterinaria.

Al personal de INIA Tacuarembó y Polo Agroforestal de Bañado Medina.

A mi familia por apoyarme en el transcurso de mi carrera y formarme en valores.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN.....	12
EFICIENCIA REPRODUCTIVA DE LA VACA DE CRÍA.....	12
Impacto de la nutrición en la madurez sexual de las terneras .....	12
Hormonas metabólicas y sus efectos sobre la reproducción .....	15
DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO .....	17
Estructuras ováricas, hormonas esteroideas y fertilidad.....	18
Recuento de folículos antrales, concentraciones de hormona antimüleriana y fertilidad.....	20
PÉRDIDAS REPRODUCTIVAS DE LA VACA DE CRÍA .....	21
Síndrome de subfertilidad.....	22
Desarrollo folicular y concentraciones de progesterona en vacas subfértiles .....	22
Debilidades de los modelos de estudio de la vaca subfértil .....	23
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
HIPÓTESIS .....	26
OBJETIVOS .....	26
ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN .....	27
MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
Diseño experimental .....	27
RESULTADOS.....	32
DISCUSIÓN.....	37
CONCLUSIONES.....	42
PERSPECTIVAS A FUTURO.....	42
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	43

## **ABREVIATURAS**

Adipo R1 y R2 receptores de adiponectina 1 y 2

ANOVA análisis de varianza

AMH hormona antimülleriana

CL cuerpo lúteo

DEP diferencia esperada de progenie

FSH hormona folículo estimulante

GH hormona de crecimiento

GHr receptor de la hormona de crecimiento

GnRH hormona liberadora de gonadotrofinas

IGF-I factor de crecimiento insulínico tipo I

IGF-II factor de crecimiento insulínico tipo II

IGFBPs 1-6 proteínas de unión 1 a 6 de los factores de crecimiento insulino  
símiles I y II

IFNT interferon tau

IA Inseminación artificial

LH hormona luteinizante

PGF2- $\alpha$  prostaglandina F 2 alfa

RFA recuento de folículos antrales

RIA radioinmunoanálisis

## RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue evaluar si el crecimiento y desarrollo en la etapa juvenil en bovinos afecta la composición corporal, las concentraciones de hormonas metabólicas y el funcionamiento de las estructuras ováricas en la etapa de madurez y pueden explicar diferencias en fertilidad. Se realizó un diseño longitudinal que evaluó la fertilidad de las vacas Hereford en la etapa juvenil y de madurez. Las vacas se clasificaron como: 1) fértiles si quedaron preñadas a la primera inseminación a los 25 meses de edad y en  $\geq$  tres de cinco servicios en la etapa de madurez (60 a 76 meses de edad), y 2) subfértiles si habiendo manifestado celo a intervalos regulares de 18-24 días durante el período de inseminación, no quedaron preñadas luego de tres inseminaciones y se preñaron o no con monta natural (27 meses de edad) y quedaron preñadas en  $\leq$  dos de cinco servicios en la etapa de madurez. Los grupos experimentales ( $n = 5$  fértiles y  $n = 6$  subfértiles) se definieron a los 76 meses de edad, momento en el cual se evaluó retrospectivamente la evolución de peso vivo desde el nacimiento. A los 90 meses se sincronizaron los celos de las vacas con dos dosis de prostaglandina a intervalo de 14 días. Se evaluaron las estructuras ováricas, concentraciones hormonales y composición corporal. Los datos fueron analizados por ANOVA, considerándose significativos valores de  $P < 0,05$ . Las vacas fértiles ganaron más peso desde el nacimiento al destete ( $0,54 \pm 0,03$  kg / día) y fueron más pesadas al destete ( $140 \pm 8,6$  kg) comparadas con las subfértiles ( $0,46 \pm 0,02$  kg / día y  $106 \pm 7,8$  kg;  $P < 0,05$ ). En la etapa de madurez las vacas fértiles tuvieron mayor área del ojo de bife ( $76,7 \pm 3,1$  vs  $66,9 \pm 2,9$  cm<sup>2</sup>,  $P < 0,05$ ) y tendieron a tener mayor espesor de grasa subcutánea ( $11,1 \pm 2,5$  vs  $8,7 \pm 2,3$  mm,  $P < 0,1$ ) respecto a las subfértiles. Las vacas fértiles tuvieron mayores concentraciones de IGF-I ( $160 \pm 4,3$  vs  $148 \pm 4,0$  ng / mL,  $P < 0,05$ ) y adiponectina ( $7,5 \pm 0,5$  vs  $5,9 \pm 0,5$  ng / mL,  $P < 0,05$ ) y menores concentraciones de progesterona del día 8 al 18 del ciclo estral ( $5,19 \pm 1,08$  vs  $7,58 \pm 0,96$  ng / mL,  $P < 0,01$ ) respecto a las subfértiles. No se observaron diferencias en las estructuras ováricas ni en las concentraciones de AMH entre grupos. Concluimos que el desarrollo en la etapa juvenil podría jugar un papel importante en la programación del desarrollo de tejidos y órganos con repercusiones en la eficiencia reproductiva de las vacas para carne en la etapa de madurez.

## SUMMARY

The objective of this thesis was to evaluate whether growth and development in the juvenile stage in the bovine affects body composition, metabolic hormone concentrations and the functioning of ovarian structures in the maturity stage and can explain differences in fertility. A longitudinal design was carried out that evaluated the fertility of Hereford cows in the juvenile and mature stage. The cows were classified as: 1) fertile if they became pregnant at the first insemination at 25 months of age and in  $\geq$  three of five services at the stage of maturity (60 to 76 months of age), and 2) subfertile if having manifested estrus at regular intervals of 18-24 days during the insemination period, they were not pregnant after three inseminations and were pregnant or not with natural mating (27 months of age) and were pregnant in  $\leq$  two of five services at the maturity stage. The experimental groups ( $n = 5$  fertile and  $n = 6$  subfertile) were defined at 76 months of age, at which time the evolution of live weight from birth was retrospectively evaluated. At 90 months, the estrus of the cows was synchronized with two doses of prostaglandin at an interval of 14 days. Ovarian structures, hormonal concentrations and body composition were evaluated. The data were analyzed by ANOVA, considering significant values of  $P < 0.05$ . Fertile cows gained more weight from birth to weaning ( $0.54 \pm 0.03$  kg / day) and were heavier at weaning ( $140 \pm 8.6$  kg) compared to subfertiles ( $0.46 \pm 0.02$  kg / day and  $106 \pm 7.8$  kg;  $P < 0.05$ ). In the maturity stage the fertile cows had greater area rib eye area ( $76.7 \pm 3.1$  vs  $66.9 \pm 2.9$  cm<sup>2</sup>,  $P < 0.05$ ) and tended to have a greater thickness of subcutaneous fat ( $11.1 \pm 2.5$  vs  $8.7 \pm 2.3$  mm,  $P < 0.1$ ) with respect to subfertiles cows. Fertile cows had higher concentrations of IGF-I ( $160 \pm 4.3$  vs  $148 \pm 4.0$  ng / mL,  $P < 0.05$ ) and adiponectin ( $7.5 \pm 0.5$  vs  $5.9 \pm 0.5$  ng / mL,  $P < 0.05$ ) and lower progesterone concentrations from day 8 to 18 of the estrous cycle ( $5.19 \pm 1.08$  vs  $7.58 \pm 0.96$  ng / mL,  $P < 0.01$ ) with respect to subfertiles cows. No differences in ovarian structures and concentrations of AMH between groups were observed. We conclude that the development in the juvenile stage could play an important role in the programming of the development of tissues and organs with repercussions on the reproductive efficiency of the cows for meat in the maturity stage.

## INTRODUCCIÓN

### Eficiencia reproductiva de la vaca de cría

La vaquillona es la que determina la eficiencia reproductiva global del sistema criador, por lo que es clave que los reemplazos tengan un adecuado desarrollo al momento del primer servicio, para que lleguen ciclando regularmente y se preñen en los primeros 21 días del período de servicios (Cushman et al., 2013). Esta característica es determinante de la longevidad y productividad del rodeo, ya que se repite a lo largo de la vida de la vaca. La vida útil de la vaca en el rodeo, y el peso total de los terneros destetados durante éste período son componentes que describen la eficiencia reproductiva y el ingreso económico del sistema (Cundiff et al., 1992; Perry y Cushman, 2013). La selección por características fenotípicas asociadas a la fertilidad es altamente deseable, pero presenta dificultades ya que son de baja heredabilidad y se expresan tarde en la vida del animal. La búsqueda de parámetros fenotípicos y genéticos que tengan una alta correlación con la fertilidad y se expresen temprano en la vida del animal es constante, y se han descrito potenciales herramientas de selección temprana de reemplazos más fértiles que pueden colaborar en ésta tarea (Santa Cruz et al., 2018).

### Impacto de la nutrición en la madurez sexual de las terneras

El primer paso para alcanzar la preñez es la ocurrencia de la pubertad. La nutrición, la edad y la genética influyen en el desencadenamiento de la pubertad, principalmente como reguladores de la maduración del eje hipotalámico – hipofisario – gonadal (Perry, 2016). La pubertad es un proceso fisiológico complejo que requiere la maduración del sistema neuroendocrino y el subsecuente inicio de la liberación episódica y frecuente de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) y de la hormona luteinizante (LH; Cardoso et al., 2018). Mientras que la restricción energética durante el período juvenil retrasa la pubertad, altas tasas de ganancia de peso durante éste periodo facilitan el desarrollo puberal a través de la programación de los centros hipotalámicos que son la base del proceso puberal (Cardoso et al., 2018). La edad en que las vaquillonas comienzan con ciclos estrales regulares se correlaciona con las ganancias de peso vivo que logran desde el nacimiento hasta la pubertad (Plasse et al., 1968; Arije y Wiltbank, 1971; Patterson et al., 1992). El biotipo materno (cruzas vs razas puras) determina mayores pesos al destete de las terneras, por el aumento de la ingesta y eficiencia de conversión energética de los alimentos (Do Carmo et al., 2016).

En animales en pastoreo, la nutrición pre y pos-destete afectan la edad a la pubertad (Schillo et al., 1992). Las terneras que nacen al principio de la estación reproductiva son más pesadas y altas al destete que terneras nacidas más tarde, lo que representa una importante ventaja al inicio el período de recría (Wiltbank et al., 1985; Roberts et al., 2017). Las terneras que se desarrollan solamente a campo natural tienen pérdidas de peso de hasta un 20 % durante los 100 días que dura el invierno, y su lento crecimiento impide que alcancen el 65% del peso adulto a los dos años de edad (Quintans et al., 1994). La mayoría de los trabajos publicados a nivel nacional e internacional se han enfocado en los cambios nutricionales de las vaquillonas en la etapa pos-destete (7 a 12 meses de edad) y su impacto en la edad a la pubertad. Trabajos recientes se han enfocado en la ventana de 6 a 9 meses de la ternera, encontrando que un plano nutricional alto en ese período permite que alcancen la pubertad antes de los 300 días de edad (Gasser et al. 2006; Cardoso et al., 2018). Trabajos nacionales coinciden con éstos hallazgos, y sugieren que el plano nutricional pre-destete es muy relevante y puede tener efectos de largo plazo en la eficiencia reproductiva de esa futura vaca de cría (Guggeri et al., 2014, Guggeri et al., 2018). Recientemente, en condiciones nutricionales no restrictivas se ha descrito que la ganancia pre-destete de las terneras, es la característica que tienen mayor correlación genética con la preñez de la vaquillonas (Boldt et al., 2018). El incremento en el plano nutricional en el periodo pre-destete tiene impacto positivo en el peso al destete de las terneras. Este efecto se puede lograr de forma indirecta, a través de la producción de leche de las madres cuando el plano nutricional elevado afecta al par vaca-ternero (Do Carmo et al., 2018; Gutiérrez et al., 2013) o de forma directa, a través de estrategias de alimentación diferencial de los terneros (Guggeri et al., 2014). Este último trabajo demostró que mayores tasas de ganancia de peso de las terneras, se asociaron con mayor altura y mayor área de ojo de bife, diferencias que se observaron hasta los 18 meses de edad. Sin embargo, no hubo diferencias en la deposición de grasa subcutánea. Terneras que tienen mayor crecimiento y desarrollo alcanzan antes la pubertad, comparadas con terneras más livianas (Guggeri et al., 2014). Altos pesos al destete permiten una recría más acelerada de las terneras, y es un requisito fundamental cuando el objetivo es realizar el entore con 14 meses de edad (Viñoles et al., 2009). Sin embargo, existe una fuerte interacción con el plano nutricional pos-destete, para alcanzar el peso objetivo para cada biotipo un mes antes de iniciar el período de servicios.

El impacto de la nutrición invernal pos-destete sobre la tasa de ganancia de peso y la manifestación de la pubertad, fue descrito en la década de los 60 (Wiltbank et al., 1969). La aplicación de diferentes estrategias nutricionales pos-destete, que permitan lograr altas tasas de ganancia de peso, se asocian con altos pesos al inicio de la época de servicios y una menor edad a la pubertad (Houseknecht et al., 1988a; Buskirk et al., 1995). En condiciones

pastoriles, la obtención de tasas de ganancia de peso de 100-200 g/día en el primer invierno de vida, reduce los costos de la recría de las vaquillonas y permite que sean servidas con 24 meses de edad (Viñoles et al., 2009). La estrategia nutricional denominada “stairstep”, es aplicada en la fase prepuberal de desarrollo de las terneras y consiste en una restricción de energía seguido de la realimentación durante 2 meses (en primavera) antes de que comience la época de servicios (Lohakare et al., 2012). Esta estrategia es aplicada regularmente cuando los pesos al destete de las terneras no son limitantes, y permite lograr los pesos objetivo pre-servicio con 14 meses de edad, asociadas a performances reproductivas comparables a los de vaquillonas que no fueron restringidas (Cardoso et al., 2014). La restricción calórica en el período peri-puberal asociado a un alto plano nutricional posterior, permiten aumentar el número de folículos primordiales al servicio, lo cual permitiría incrementar la longevidad de la vaca en el rodeo de cría (Amundson et al., 2015).

Independientemente de la edad al primer servicio (14 o 24 meses), la recomendación es que las vaquillonas sean alimentadas para lograr un 60 a 65 % de su peso vivo adulto (Day y Nogueira, 2013). Sin embargo hay diferencias raciales en la proporción del peso vivo adulto para alcanzar la pubertad; en las razas de carne Europeas es un 60%, para razas doble propósito (carne/leche) 55% y para ganado *Bos indicus* 65% (Larson, 2007; Diskin y Kenny, 2014). El porcentaje del peso adulto necesario para alcanzar la pubertad, depende además de cada biotipo, y de la selección que se ha realizado para mantener éste parámetro controlado. El manejo de las vaquillonas debe optimizar la nutrición, a niveles compatibles con un desarrollo adecuado que permita que alcancen la pubertad un mes antes de la fecha de inicio del servicio, con la finalidad de que queden preñadas temprano, paran un ternero vivo y queden preñadas a principios de la siguiente temporada de cría como vaca de primera cría (Larson et al., 2016). Trabajos previos destacan el impacto que tienen dos aspectos en la vida productiva de la vaca: 1) realizar el primer servicio con 13-15 meses y 2) que la concepción ocurra temprano en la estación reproductiva (Lesmeister et al., 1973). Las hembras que se preñaron más temprano, parieron y se volvieron a preñar más temprano en los años sucesivos y destetaron terneros más pesados en comparación con las hembras que concibieron más tarde, por lo que resultaron más productivas (Day y Nogueira, 2013; Diskin y Kenny, 2014).

El plano nutricional que reciben los animales en crecimiento o en producción, determina el flujo de nutrientes para las diferentes funciones del organismo (Short et al., 1990). El balance energético se refleja en la concentración de hormonas metabólicas, que tiene acciones en diferentes órganos y tejidos, afectando el sistema nervioso central, el músculo y huesos y el tracto reproductivo (folículos y útero; Garcia-Garcia, 2012).

## Hormonas metabólicas y sus efectos sobre la reproducción

El crecimiento y la reproducción está regulados por el eje somatotrófico, integrado por la hormona de crecimiento (GH) y su receptor (GHR), los factores de crecimiento insulino similares I y II (IGF-I y II), su receptor y las seis proteínas de unión (IGFBP1-6; Laron, 2001). El IGF-I medido en sangre es producido mayormente por el hígado (Yakar et al., 1999; Fenwick et al., 2008), aunque también es producido en órganos relacionados a la reproducción como son el hipotálamo, ovarios, oviductos y útero (Spicer and Echternkamp, 1995; Daftary y Gore, 2005) y es modificado por la variación en la proteína o energía consumida por el animal (Breier et al., 1988; Houseknecht et al., 1988b; Spicer et al., 1990). Las concentraciones de IGF-I están asociadas al momento en el cual las vaquillonas alcanzan la pubertad, que señalizan directa o indirectamente en las neuronas hipotalámicas (Brito et al., 2007; Kiess et al., 1998; Laron, 2001; Stevens et al., 1990; Straus, 1984). Los folículos ováricos expresan el receptor de IGF-I, y su acción en las células granulosa es estimular su proliferación y la producción de estradiol y la calidad ovocitaria (Mani et al., 2010). En humanos, se ha descrito que el IGF-I estimula la producción de progesterona por el cuerpo lúteo (Meiyu et al., 2011)m . En animales en crecimiento, hay un efecto positivo de la dieta sobre los perfiles de hormonas metabólicas. Dietas altas en fibra y energía promueven mayores concentraciones circulantes de IGF-I y área de ojo de bife en vaquillonas respecto a dietas de baja energía y fibra (Houseknecht et al., 1988a). Terneras sometidas a altos planos nutricionales pre-destete, tienen mayores concentraciones de IGF-I y mayor expresión del transcripto de GHR en hígado, además estos animales presentaron mayor expresión del transcripto de IGF-I en útero, asociados a altas concentraciones de progesterona al momento del reconocimiento materno de la preñez (Guggeri et al., 2018). Por lo tanto, la nutrición a edades tempranas tiene un efecto de largo plazo sobre el funcionamiento del eje somatotrófico, con posibles implicancias en el desarrollo embrionario temprano.

En vacas en lactación, el reinicio de los ciclos estrales está determinado por el estatus energético (plano nutricional + reservas corporales), el número de partos (vacas de primera cría tienen agregados los requerimientos para el crecimiento) y la presencia de la cría [vacas para carne vs leche; (Meikle et al., 2018)]. En vacas lecheras posparto, la disminución en las concentraciones de IGF-I junto a otros metabolitos circulantes (glucosa, insulina) asociado a la movilización de reservas corporales juega un rol importante en la duración del anestro (Lonergan et al., 2016). El IGF-I endocrino se ha asociado con varios

parámetros reproductivos, como la edad al primer parto (Yilmaz et al., 2006), la tasa de concepción al primer servicio (Patton et al., 2007; Velazquez et al., 2008), las ovulaciones gemelares (Echternkamp et al., 2004; Velazquez et al., 2008) y el desarrollo embrionario previo a la implantación (Velazquez et al., 2005, Velazquez et al., 2008). Las vacas multíparas y las de mayor condición corporal, tuvieron mayores niveles de IGF-I, asociado a intervalos parto a concepción más cortos respecto a las primíparas y las de menor condición corporal (Meikle et al., 2004). Vacas que reciben dietas con mayor nivel de energía, tienen mayor expresión del transcrito de IGF-I en el endometrio, respecto a las que reciben dietas con menores niveles de energía, por lo que el plano nutricional también afecta el ambiente uterino (Astessiano et al., 2017).

El tejido adiposo es un órgano especializado endocrino y parácrino. Responde a los nutrientes y las demandas de energía al secretar una variedad de factores específicos llamados adipoquinas (Dupont et al., 2014). La familia de adipoquinas incluye a la leptina y la adiponectina. Niveles fisiológicos de leptina y adiponectina son fundamentales para mantener la integridad del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, los procesos ovulatorios regulares, la implantación exitosa de embriones y la preñez (Tersigni et al., 2011; Garcia-Garcia, 2012). La regulación de éstas hormonas es interdependiente (cada hormona afecta la síntesis y secreción de la otra) para facilitar el diálogo cruzado entre los tejidos que regulan el metabolismo (hígado, páncreas, tejido adiposo; Meikle et al., 2018). Se ha descrito una relación inversa de la leptina y adiponectina con la cantidad de tejido adiposo y el nivel de ingesta. Mientras la leptina tiene una asociación positiva con el nivel de ingesta y la condición corporal, la adiponectina tiene una asociación negativa (Dupont et al., 2014). La leptina juega un rol crítico en hacer convergen la información nutricional al eje neuroendócrino y controla el proceso de la pubertad (Cardoso et al., 2018). Bajos niveles de adiponectina, en animales obesos, se asocian con resistencia a la insulina, y problemas reproductivos asociados con ésta enfermedad metabólica (Dupont et al., 2014). La adiponectina ejerce su acción uniéndose a sus dos receptores específicos AdipoR1 y R2 (Dupont et al., 2014). En rumiantes se encontró que estos dos receptores se expresan en el ovario (folículos pequeños y grandes y cuerpo lúteo)(Maillard et al., 2010), en los embriones (Maillard et al., 2010) y el tejido mamario (Ohtani et al., 2011). Otros órganos relacionado a la reproducción que también expresan estos dos receptores, incluyen el hipotálamo (Psilopanagioti et al., 2009), hipófisis (Psilopanagioti et al., 2009), el oviducto (Archanco et al., 2007), el endometrio (Astessiano et al., 2017; Hehenkamp et al., 2006) y la placenta (La Marca y Volpe, 2006). Vacas lecheras que tienen un mejor balance energético (multíparas vs primíparas y sometidas a altos vs bajos planos nutricionales) tienen más concentraciones circulantes de leptina, y una mayor expresión de Adipo R1 y R2 en útero (Meikle et al., 2004; Astessiano et al., 2017). Existe evidencia de que la adiponectina puede regular la función ovárica y afectar el

desarrollo embrionario en etapas tempranas de su desarrollo, durante el período pre-implantación (Palin et al., 2012).

El eje reproductivo (hipotálamo-hipófisis-gonadal) tiene diferentes mecanismos de detección de nutrientes que permiten monitorear el estado nutricional y procesar la información para promover la respuesta reproductiva apropiada. El descubrimiento de las hormonas metabólicas y su asociación con parámetros de fertilidad, llevó a plantear diversas hipótesis respecto a su utilidad como herramientas indirectas de selección (Davis et al. 1995; Wood et al., 2004). Sin embargo, y a pesar de su relevancia como sensores del metabolismo, hoy se reconoce que su rol es permisivo.

### Desarrollo embrionario temprano

Una vez que la ovulación y la fertilización han ocurrido, la adecuada funcionalidad del oviducto y el útero son esenciales para el mantenimiento de la preñez (Meikle et al., 2018). El embrión resultante ingresa al útero aproximadamente 4 días después en estadio de mórula, formando un blastocisto el Día 6–7. Este blastocisto contiene capas de dos células, la masa celular interna y una capa de células de trofocotodermo, que rodean una cavidad de blastocelo. Después de salir de la zona pelúcida, el blastocisto se convierte en un concepto ovoide y luego en un concepto tubular (que contiene el embrión propiamente dicho y las membranas extraembrionarias), que comienza a alargarse en el Día 12-14, formando un concepto filamentososo (Degrelle et al., 2005; Forde y Lonergan, 2017). Al contrario de lo que sucede en los primates y el ratón, en la mayoría de los rumiantes la unión del concepto y la placentación no ocurre inmediatamente después de la fertilización, sino que el concepto pasa un período prolongado dentro de la luz uterina antes de desarrollar una unión definitiva con el endometrio uterino (Bazer, 1975; Bridges et al., 2013). Se deben lograr cuatro pasos antes de que el embrión pueda adherirse al útero, que son: desarrollo dentro de los límites de la zona pelúcida, eclosión del blastocito de la zona pelúcida, reconocimiento materno de la preñez, formación de las membranas extraembrionarias (Senger, 2003). En ese período pre-implantación existe un diálogo entre el concepto en desarrollo y el útero materno, el embrión envía una señal de reconocimiento materno de la preñez, que provoca cambios en la regulación de la expresión génica de las células epiteliales y del estroma uterino (Forde y Lonergan, 2017). El reconocimiento materno de la preñez se puede definir como el proceso fisiológico mediante el cual el concepto indica su presencia a la madre y evita el inicio de los mecanismos moleculares que provocan la regresión del cuerpo lúteo. La señal anti-luteolítica que permite el reconocimiento materno de la preñez en rumiantes es el interferón tau (IFNT), producido por las células mononucleares del trofocotodermo del concepto (Spencer et al., 2007; Bazer et al., 2008; Bazer et al., 2017).

La mayoría de los trabajos sobre desarrollo embrionario temprano y la señalización embrión-útero en rumiantes, se han llevado a cabo utilizando al ovino como modelo experimental. La Figura 1, resume los cambios relativos en el desarrollo embrionario después de la fertilización en relación con la ubicación en el tracto reproductivo de la oveja y los niveles circulantes de hormonas esteroideas ováricas (Spencer et al., 2004).

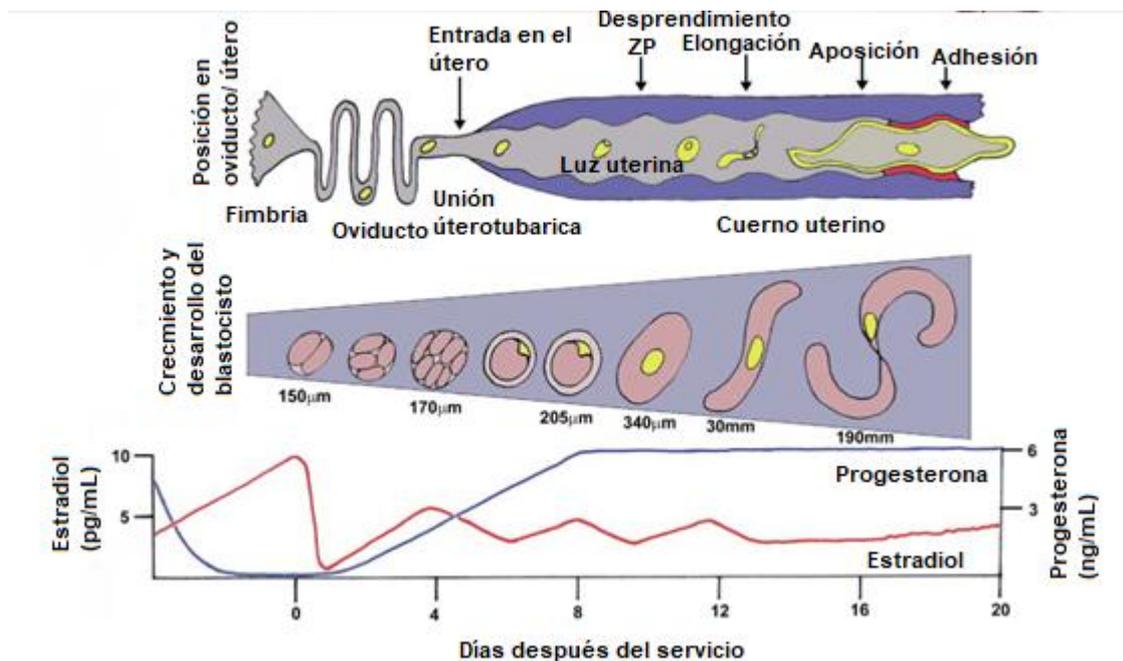


Figura 1. Cambios relativos en el desarrollo embrionario después de la fertilización en relación con su ubicación en el tracto reproductivo de la oveja y los niveles circulantes de hormonas esteroideas ováricas (Spencer et al., 2004). -1

### Estructuras ováricas, hormonas esteroideas y fertilidad

El diámetro folicular se ha asociado en forma positiva con la adquisición de competencia ovocitaria y mayor crecimiento y desarrollo embrionario, ya que el cuerpo lúteo que se origina de estos folículos secreta mayores concentraciones de progesterona que mejora el porcentaje de preñez (Perry et al., 2007). Los cambios morfológicos, histológicos y bioquímicos que ocurren en el tracto reproductivo, son modulados por las concentraciones fluctuantes de estradiol y progesterona, que actúan sobre sus receptores en los tejidos blanco (Meikle et al., 2018). Por lo tanto, su funcionalidad puede ser modificada por cambios en el crecimiento del folículo pre-ovulatorio y su asociada secreción de estradiol, así como del cuerpo lúteo que se forma posteriormente y su secreción de

progesterona (Meikle et al., 2018). Además, los cambios en el balance estradiol/progesterona en el líquido folicular afectan la calidad ovocitaria y la fertilidad (Revelli et al., 2009).

La progesterona producida por el cuerpo lúteo está implicada en varias funciones uterinas que incluyen la secreción de proteínas uterinas, resultando en el mantenimiento de un óptimo ambiente uterino para el desarrollo embrionario normal (Imakawa et al., 2017). El momento en que la progesterona aumenta es importante, ya que actúa en los receptores de progesterona en el útero para alterar el patrón de secreción uterina (Kerbler et al., 1997; Wathes et al., 2003). Las concentraciones de progesterona en la fase luteal temprana (días 3-7) determinan el desarrollo embrionario y mantenimiento de la preñez (Walsh et al., 2011). El tratamiento con progesterona en el ganado del día 2 al 5 (fase luteal temprana) incrementa 10 veces la elongación del embrión el día 14 (Kerbler et al., 1997; Wathes et al., 2003), mientras que un aumento más tardío en la progesterona no tiene efecto marcado en el desarrollo embrionario (Garrett et al., 1988; Wathes et al., 2003).

La concentración de progesterona está determinada por un balance entre su producción por el cuerpo lúteo y el metabolismo hepático (Wiltbank et al., 2014). La concentración de la progesterona circulante está inversamente relacionada con el nivel de consumo de la dieta en ovinos (Williams y Cumming, 1982; Parr et al., 1993) y bovinos (Sangsritavong et al., 2002) y ello se debe al incremento en la tasa de clearance metabólica (Miller et al., 1999; Parr et al., 1993; Sangsritavong et al., 2002).

Sin embargo, los niveles circulantes de la hormona no necesariamente reflejan su acción a nivel del tejido donde se desarrolla su acción. La acción de la progesterona en el útero está mediada por interacciones con su receptor intracelular (Clark et al., 1992; Sosa et al., 2004) y la respuesta celular a las hormonas esteroideas depende de la cantidad de receptores (Sosa et al., 2004). En ovejas sub-nutridas las concentraciones circulantes de progesterona fueron mayores comparadas con las ovejas alimentadas a niveles de mantenimiento (Sosa et al., 2004). Sin embargo, esto se asoció con una menor expresión del receptor de progesterona, menor concentración de progesterona en el tejido endometrial y mayores pérdidas embrionarias en ovejas sub-nutridas comparadas con ovejas alimentadas a niveles de mantenimiento (Lozano et al., 1998; Sosa et al., 2004).

## Recuento de folículos antrales, concentraciones de hormona antimülleriana y fertilidad

Los animales nacen con el pool de folículos primordiales que gastarán a lo largo de su vida productiva (Erickson, 1966). Los folículos primordiales, tiene una alta correlación con el número de folículos antrales, y pueden ser determinados por ultrasonografía en diferentes momentos de la vida del animal (Ireland et al., 2008). El recuento de folículos antrales (RFA;  $\geq 3$  mm) es muy variable entre individuos (5 a 50), pero altamente repetible en el mismo animal y está asociada con el número de folículos morfológicamente saludables contenidos en el ovario (Ireland et al., 2009; Ireland et al., 2011). Además, el RFA es una característica de heredabilidad moderada, con estimaciones de  $0,31 \pm 0,14$  y  $0,25 \pm 0,13$  para vacas lecheras de Irlanda y EEUU; respectivamente (Walsh et al., 2014). Por lo tanto el RFA cumple con tres características relevantes para ser usado como criterio de selección: 1) se expresa temprano en la vida del animal, 2) es altamente repetible y 3) tiene heredabilidad moderada.

El recuento de folículos antrales (RFA) está asociado con la fertilidad en el bovino (Jimenez-Krassel et al., 2009). Vacas lecheras con mayor RFA tienen mayores tasas de preñez, un intervalo parto concepción más corto y requieren menos servicios por concepción comparadas con vacas que tiene menor RFA (Evans et al., 2010). El RFA de más de 2 mm o igual a 2 mm también se ha utilizado para clasificar vacas lecheras con mejores índices reproductivos, teniendo las vacas con mayor RFA un intervalo parto-primer estro más corto respecto a las de menor RFA (Martinez et al., 2015). La ventaja de incluir a los folículos de 2 mm en el recuento, radica en que representan un alto porcentaje de la población medible por ultrasonografía (90%), y que al ser menos dependientes de las concentraciones de FSH para su crecimiento, pueden ser medidos en cualquier momento del ciclo estral (Martinez et al., 2015). En vaquillonas con mayor RFA, se han observado mayores concentraciones de progesterona, asociadas a un cuerpo lúteo con mayor funcionalidad respecto a vaquillonas con menor RFA (Jimenez-Krassel et al., 2009). Vaquillonas Bradford que tenían un menor crecimiento y desarrollo, presentaron menor RFA pos-destete, una mayor edad a la pubertad y menores concentraciones de progesterona pos-inseminación artificial con respecto a las vaquillonas con alto RFA (Santa Cruz et al., 2018). Estos trabajos sugieren que el RFA también está asociado con el crecimiento y pubertad de las vaquillonas, y potencialmente con la fertilidad.

Se ha descrito una alta correlación entre el RFA y las concentraciones circulantes de hormona antimülleriana (AMH)(Ireland et al., 2008; Ireland et al., 2011). La AMH se produce en las células de la granulosa de folículos en

crecimiento (Vigier et al., 1984; Takahashi et al., 1986; Bézard et al., 1987; La Marca y Volpe, 2006; Mossa et al., 2017). La AMH circulante puede ser medida en una muestra de sangre obtenida en cualquier momento del ciclo en ganado adulto, ya que varía mínimamente durante el ciclo estral y es repetible a lo largo de múltiples ciclos (Mossa et al., 2017). Vacas con bajas concentraciones de AMH tienen pérdidas reproductivas mayores entre los días 35 y 65 de iniciada la estación reproductiva con respecto a vacas con concentraciones de AMH altas o intermedias (Ribeiro et al., 2014).

Por lo tanto, el RFA y la AMH son marcadores fenotípicos de fertilidad y se ha sugerido que pueden ser utilizados para seleccionar animales más fértiles en su primer servicio, para aumentar la eficiencia reproductiva global del rodeo.

### Pérdidas reproductivas de la vaca de cría

En Uruguay la eficiencia reproductiva se ha mantenido en niveles bajos en las últimas décadas, como lo describen el porcentaje de preñez (74,4 %) y la tasa de procreo (63 %; (DIEA, 2013). Las pérdidas entre el diagnóstico de gestación y el destete fueron del 11% promedio en estos últimos 10 años. La etiología de éstas pérdidas es multifactorial, incluyendo al manejo y desordenes nutricionales, alteraciones fisiológicas, infecciones, disturbios hormonales y factores genéticos (Boyd, 1965; Hawk, 1979; Ayalon, 1978; Levine, 1999; Båge et al., 2002). Los diferentes parámetros que describen la eficiencia reproductiva varían entre regiones y países (Burns et al., 2010), pero se ha estimado que la baja tasa de destete se debe a la incapacidad para concebir (22,0%), a la muerte fetal (4,7%), muerte perinatal de terneros (6,2%) y la muerte entre el parto y el destete (6,0%). Aunque la tasa de fertilización en el bovino está generalmente entre el 90-100 %, solo el 70% de todas esas fertilizaciones resultan en el nacimiento de un ternero vivo. Por lo tanto, el 30% de las fertilizaciones se pierden debido a alguna forma de muerte embrionaria (Lamb, 1990). Las pérdidas reproductivas debidas al fracaso en la concepción y la muerte embrionaria temprana, que tienen una alta incidencia en los rodeos lecheros (Gustafsson, 1985; Lucy, 2001; Starbuck et al., 2004), pero son poco conocidas en ganado para carne.

La mayoría de las muertes embrionarias en vaquillonas para carne sincronizadas e inseminadas ocurren entre los días 8 y 16 pos-ovulación (Diskin y Sreenan, 1980). Estas pérdidas embrionarias tempranas se deben a asincronías en el diálogo embrión-útero, incremento temprano de la secreción de PGF2-alpha (PGF2- $\alpha$ ) y retraso o insuficiente producción de interferón-tau (IFN $\tau$ ) por parte del embrión (Diskin y Sreenan, 1980). Las muertes embrionarias tempranas tienen como resultado: preñeces retrasadas, menos

terneros nacidos, retraso en el progreso genético, y pérdida substancial en la industria lechera y cárnica (Mondal et al., 2015).

### Síndrome de subfertilidad

La fertilidad es una variable multifactorial y su deterioro puede estar causado por una red de factores genéticos, ambientales y de manejo y sus complejas interacciones haciendo difícil el diagnóstico de la causa exacta (Walsh et al., 2011). Se han utilizado diferentes variables para evaluar la eficiencia reproductiva pero la concepción a la inseminación artificial es la más adecuada, lo que ha permitido importantes avances en el conocimiento en ganado para leche, donde ésta tecnología se aplica de forma rutinaria (Maurer y Chenault, 1983, Butler y Smith, 1989). Se ha definido a la vaca subfétil o repetidora como una hembra que falla en concebir luego de tres o más servicios de inseminación artificial con manifestación de estro a intervalos regulares (18-24 días) y en ausencia de anomalías detectables en el útero (Båge, 2002; Gustafsson y Emanuelson, 2002; Dochi et al., 2008; Yusuf et al., 2010; El-Khadrawy et al., 2011; Ergene, 2012). En la industria lechera, la selección genética por mayor producción ha inducido a una situación de desbalance metabólico asociado con una reducción en la fertilidad, aún en animales correctamente alimentados (Chagas et al., 2007). Este fenómeno se visualiza en vacas en lactación, pero está ausente en vaquillonas vírgenes (Butler y Smith, 1989). La situación es diferente en ganado para carne en sistemas pastoriles extensivos, ya que los niveles de producción de leche son inferiores y su impacto se mide solamente en un momento del año e indirectamente a través del peso al destete de los terneros. A pesar de que el manejo reproductivo del rodeo de cría ha mejorado sustancialmente, todavía se reportan porcentaje de preñez a la inseminación artificial a tiempo fijo muy variables (33 a 78%), utilizando toros de fertilidad probada (De Nava, 2013). En la producción cárnica, la selección genética por mayores tasas de crecimiento para mejorar características de la canal, ha llevado al desarrollo de animales más grandes y al aumento en los requerimientos nutricionales de mantenimiento que son difíciles de cubrir en sistemas pastoriles extensivos (Jenkins, 2009). La variabilidad observada en los porcentajes de preñez de las vaquillonas para carne puede en parte ser explicada por el plano nutricional al que fueron sometidas las vaquillonas en etapas tempranas de su vida (Roberts et al., 2017).

### Desarrollo folicular y concentraciones de progesterona en vacas subfétiles

La mayoría de los estudios sobre subfertilidad se han enfocado en la fase folicular del ciclo estral, el desarrollo del folículo ovulatorio, su producción de estrógenos y la duración del estro (Hernández-Cerón et al., 1993; Båge, 2002; Sood et al., 2015). Las concentraciones suprabasales de progesterona

durante el período periovulatorio prolongan la vida media del folículo ovulatorio, disminuyen la calidad del ovocito y reducen la fertilidad (Adams et al., 1992; Båge, 2002). Niveles suprabasales de progesterona durante el desarrollo folicular preovulatorio conducen al desarrollo de un folículo persistente, la reanudación prematura de la meiosis y una alta incidencia de muerte embrionaria en la etapa de 2 a 16 células (Inskeep, 2004). La inducción de concentraciones suprabasales de progesterona después de la luteólisis tiene un impacto negativo en la fertilidad de vaquillonas (Duchens et al., 1995). Se ha descrito una reducción en el porcentaje de concepción (46 vs 90 %), y un aumento en el número de inseminaciones ( $3,4 \pm 0,6$  vs  $1,1 \pm 0,1$ ) para el grupo de vaquillonas con niveles suprabasales de progesterona comparado con el grupo control (Duchens et al., 1995).

A pesar de que las concentraciones de progesterona regulan el recambio folicular (Adams et al., 1992), con importantes repercusiones en la producción de estrógenos y en el desarrollo embrionario temprano, existen pocos trabajos que estudien su evolución durante la fase luteal y los hallazgos son contradictorios. Båge (2002) no observó diferencias en la concentración de progesterona y el número de ondas foliculares entre vacas subfértiles y vaquillonas vírgenes durante la fase luteal del ciclo. Mientras que Cummins et al., (2012) reportaron que las vacas fértiles tienen un mayor volumen luteal, asociado a mayores concentraciones circulantes de progesterona y menor número de ondas foliculares durante el ciclo respecto a vacas subfértiles.

Con respecto al RFA, estudios que evalúan la población de folículos  $> 5$  mm, no encuentran diferencias en el recuento entre vacas fértiles y sub-fértiles (Cummins et al., 2012). Sin embargo, como describiéramos anteriormente, la población de folículos de 2 y 3 mm representan el 90% de la población de folículos visibles en la superficie ovárica, por lo que sería muy relevante evaluar ésta variable en modelos que estudien el síndrome de subfertilidad.

#### Debilidades de los modelos de estudio de la vaca subfértil

El síndrome de subfertilidad ha sido estudiado utilizando diferentes modelos experimentales. El grupo sueco ha comparado los parámetros endócrinos y de desarrollo folicular en vacas subfértiles y vaquillonas vírgenes para eliminar la potencial presencia de enfermedades reproductivas (Båge et al., 2002). La selección de las vacas subfértiles se ha basado en el análisis de información muy detallada de datos reproductivos obtenidos en diferentes tambos comerciales. Este modelo, ha permitido describir importantes cambios en la fase folicular del ciclo estral, asociado a niveles suprabasales de progesterona. Dada la dificultad en identificar vacas subfértiles, estas son en general más

viejas (2,4-4 vs 2-2,5 años), y con mayor peso vivo (580 vs 478 kg) que las vaquillonas control (Båge et al., 2002). La comparación de animales que no son contemporáneos, puede asociarse a la exposición a diferentes planos nutricionales durante la recría, y sus consecuentes efectos diferenciales en el largo plazo. Además, dado que las vaquillonas control nunca han sido servidas, se podrían estar utilizando como normales a vaquillonas potencialmente subfértiles.

Por otra parte, Warnick y Hansen (2010) encontraron que las vacas subfértiles no experimentaron tasas de ovulación o fertilización reducidas, pero tuvieron una mayor mortalidad embrionaria. Además, el aumento de la pérdida embrionaria después del día 34 contribuyó a la subfertilidad.

Moore et al.(2014), caracterizaron la fertilidad de las vacas lecheras Holstein de acuerdo a su mérito genético para producción de leche en baja y alta fertilidad. Se consideró una población de animales limitada a una diferencia esperada de progenie (DEP) para producción de leche entre +200 y +900 kg y con más de un 75% de genética Holstein. De acuerdo a sus DEPs para producción de leche, las vaquillonas fueron definidas en baja fertilidad (Fert -) y alta fertilidad (Fert +) basado en el intervalo entre partos. Los resultados demuestran la existencia de mayores niveles circulantes de progesterona en vaquillonas de alta fertilidad con respecto a las de baja fertilidad. Sin embargo, y a pesar de que el modelo lleva implícito cambios en el balance energético de las vacas, no se describen las diferencias en las concentraciones de hormonas metabólicas entre grupos.

Considerando la relevancia de la nutrición en etapas tempranas de la vida del animal como factor determinante de la fertilidad futura, consideramos que los estudios de subfertilidad requieren de una estrategia de largo plazo donde se defina un animal subfértil en base a su propia performance reproductiva en la fase juvenil y adulta

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El problema al que buscar aportar conocimiento esta tesis es la baja eficiencia reproductiva de la vaca de cría en sistemas pastoriles extensivos, que limita la productividad de la cadena cárnica nacional y comienza con la selección de los reemplazos. Vaquillonas con pobre crecimiento y desarrollo alcanzan la pubertad y se preñan tarde y repiten ésta característica a lo largo de su vida, reduciendo la producción de carne del rodeo (Cushman et al., 2013). La curva de crecimiento y desarrollo de las vaquillonas depende de nutrición pre y pos-destete y se refleja en las concentraciones de hormonas metabólicas. La nutrición en etapas tempranas de la vida, tiene repercusiones de largo plazo, ejerciendo un efecto de programación de la funcionalidad del eje somatotrófico (Guggeri et al., 2018). La GH y el IGF-I, tienen acciones en diferentes tejidos y órganos del cuerpo, actuando a nivel central (hipotálamo e hipófisis), de músculo y huesos y del tracto reproductivo (ovario y útero, Figura 2)(Dupont et al., 2014). El balance energético de los animales determina la deposición de grasa, que produce adipoquinas, con impacto directo en la edad a la pubertad (Cardoso et al., 2018), el desarrollo folicular y ambiente uterino, estimulando el desarrollo del embrión (Figura 2). El IGF-I, leptina y adiponectina, actúan a nivel ovárico estimulando el desarrollo folicular y regulando su capacidad esteroidogénica (Dupont et al., 2014). Existe una relación muy estrecha entre el desarrollo y capacidad esteroidogénica del folículo, y el tamaño y capacidad esteroidogénica del cuerpo lúteo que se forma luego de la ovulación. La progesterona, es la hormona que regula la función uterina promoviendo el desarrollo embrionario temprano y su capacidad de inducir el reconocimiento materno de la preñez (Spencer et al., 2004). Recientemente se ha determinado que el número de folículos antrales y las concentraciones de hormona antimüleriana tienen una relación positiva con la fertilidad y pueden utilizarse como herramientas de selección de reemplazos (Ireland et al., 2008; Santa Cruz et al., 2018). Por lo tanto, se requiere de estudios de largo plazo que evalúen en vacas contemporáneas con diferentes respuestas reproductivas y sometidas a fluctuaciones estacionales y anuales en la oferta de forraje, parámetros de crecimiento y desarrollo, estructuras ováricas y variables endócrinas, que ayuden a testar parte de las interacciones propuestas en la Figura 2.

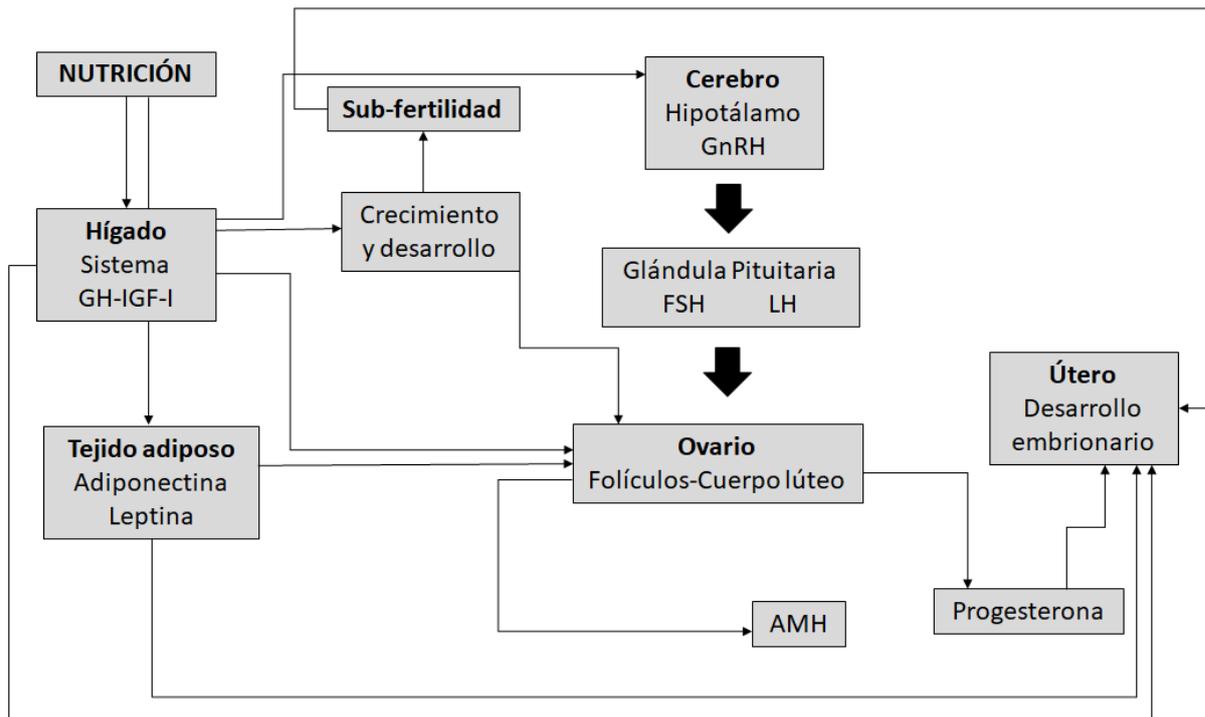


Figura 2. Esquema que describe las interacciones entre la nutrición y las hormonas metabólicas producidas a nivel del hígado (GH-IGF-I) y tejido adiposo (Leptina-adiponectina), que afectan el crecimiento y desarrollo de las terneras, con impactos a nivel central (cerebro-pituitaria) y en el tracto reproductivo (ovarios-útero) y la producción de hormonas (antimülleriana (AMH) y progesterona) que determinan el desarrollo embrionario y el éxito reproductivo.

## HIPÓTESIS

Las vacas subfértils tienen un patrón de crecimiento y desarrollo corporal más lento que las fértiles contemporáneas en su fase de desarrollo juvenil. Estas diferencias se asocian a menores concentraciones de hormonas metabólicas que afectan el desarrollo de las estructuras ováricas y su funcionalidad en la edad adulta.

## OBJETIVOS

1. Definir dos grupos de vacas contemporáneas: 1- fértiles y 2- subfértils, según su desempeño reproductivo en las etapas juvenil y adulta
2. Evaluar retrospectivamente el desarrollo corporal de ambos grupos de animales, en su fase de desarrollo juvenil.
3. Evaluar la altura de anca y composición corporal en la edad adulta

4. Evaluar las concentraciones de IGF-I y leptina durante el ciclo estral en la etapa adulta
5. Evaluar el pool de folículos antrales, el desarrollo del folículo dominante, el área del cuerpo y las concentraciones de progesterona y AMH durante el ciclo estral en la etapa adulta.

## **ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN**

Nos planteamos un estudio longitudinal donde se evaluó la fertilidad de animales contemporáneos en su fase juvenil de crecimiento y cuando alcanzaron la madurez fisiológica, comenzando el primer periodo de servicios a los 25 y el segundo a los 60 meses de edad. La evolución del peso vivo de los animales se evaluó retrospectivamente, una vez que estuvieron definidos los grupos de vacas a los 76 meses de edad. Durante la mayor parte del experimento (excepto el período de 30 a 46 meses de edad), las vacas estuvieron sometidas a la misma oferta de forraje de campo natural, con sus fluctuaciones estacionales y anuales (Alvez, 2014).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### Ubicación y animales

Los procedimientos utilizados en este estudio fueron aprobados por el Comité de Ética en el Uso de Animales Experimentales del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) (CEUA 0009/11). El experimento se realizó en las estaciones de investigación "Glencoe" (S31 °, W42 °) y "Sede" (S 31 °, W 55°) del INIA (Tacuarembó), Uruguay.

### Diseño experimental

El estudio comenzó con un grupo contemporáneo de 92 vaquillonas Hereford nacidas en el año 2005, a las cuales se les realizó ecografía ovárica una semana antes de aplicar el tratamiento de sincronización en Noviembre 2007. Ochenta y cuatro vaquillonas que estaban ciclando (presencia de cuerpo lúteo en la superficie ovárica) recibieron dos inyecciones de prostaglandina (PG) (20 µg de éster metílico de 16- (3-clorofenoxi) -w-tetranor-trans-D2-PGF<sub>2</sub>, DELPROSTENATO, Glandinex®, Universal Lab) administradas con 11 días de intervalo. A partir de las 48 horas de inyectada la segunda dosis de PG se comenzó a detectar estro. Las vaquillonas fueron inseminadas por un inseminador experimentado que utilizó semen congelado de buena calidad (eyaculado con > 70% de espermatozoides normales y < 20% de espermatozoides con anomalías primarias, tasas de movilidad pos-descongelación entre 50 a 70%) proveniente de dos toros de 24 meses de edad. El período de inseminación tuvo una duración de dos meses y luego se

realizó el repaso con un toro apto desde el punto de vista reproductivo durante 30 días. El diagnóstico de gestación se realizó cada 30 días desde el comienzo del período de servicios con ecógrafo modo B equipado con una sonda lineal de 5 MHz (Aloka SSD 500, Aloka Co., Ltd, Tokio, Japón). De las 84 vaquillonas sincronizadas, 38 se preñaron a la primera inseminación (45%), 11 en la segunda y tercera inseminaciones, y 19 en el repaso con toro, finalizando el período de servicios con 68 vaquillonas preñadas (81%) y 16 no preñadas. Se seleccionó al azar un sub-grupo de vaquillonas que cumplieran con los siguientes criterios de clasificación: 1) fértiles, si se preñaron a la primera inseminación (n = 9); 2) repetidoras, si habiendo mostrando estro a intervalos regulares de 18 a 24 días, no concibieron luego de 3 servicios con inseminación artificial pero se preñaron con el servicio de monta natural (n = 8); y 3) infértiles, si habiendo mostrado estro a intervalos regulares de 18 a 24 días durante todo el período de inseminación, no concibieron en el repaso con monta natural (n = 8). Luego del diagnóstico de gestación final (30 días de retirados los toros), las vaquillonas infértiles fueron separadas del resto del rodeo. A las vaquillonas preñadas de los grupos fértiles y repetidoras se les aplicó destete precoz a los 120 días pos-parto (40 meses de edad) y se les realizó un manejo nutricional para aumentar el peso vivo (fértiles:  $429 \pm 11$  kg; repetidoras:  $435 \pm 7$  kg) y la condición corporal (fértiles:  $4,9 \pm 0,2$  unidades; repetidoras:  $4,8 \pm 0,2$  unidades), a niveles similares a los de las vacas del grupo infértiles ( $459 \pm 15$  kg; infértiles y  $4,9 \pm 0,1$  unidades) por un período de 6 meses (46 meses de edad) momento a partir del cual todas las vacas fueron manejadas en forma conjunta. A los 60 meses de edad comenzó el segundo período de servicios con las 25 vacas seleccionadas según el criterio descrito anteriormente. Luego de comprobar que las vacas estuvieran ciclando por ecografía, se sincronizaron con dos inyecciones de prostaglandina a intervalo de 14 días y fueron inseminadas con semen congelado de buena calidad (3 oportunidades) o se realizó monta dirigida con un toro apto desde el punto de vista reproductivo (2 oportunidades). A los 30 días de efectuado cada servicio se realizó el diagnóstico de gestación mediante ecografía transrectal para visualizar la presencia o ausencia del embrión y actividad ovárica. Al momento del diagnóstico se les inyectó prostaglandina a todas las vacas para inducir el aborto y / o la manifestación estral. A las 2 semanas de inducir el aborto y / o el estro, el tracto reproductivo de las vacas se evaluó mediante ecografía, para confirmar la presencia de un cuerpo lúteo (CL) y la ausencia de contenido uterino. Se permitió un intervalo de 6 a 8 semanas entre el aborto inducido y/o el estro y el siguiente servicio, hasta alcanzar los 5 servicios planificados (60 a 76 meses de edad). Una vez finalizado el segundo período de servicios en la edad adulta, las vacas fueron reclasificadas en: 1) fértiles, vacas clasificadas como fértiles en el primer período de servicios que quedaron preñadas en  $\geq$  tres de cinco oportunidades en el segundo período de servicios (n = 5); 2) subfértiles, vacas clasificadas como repetidoras o infértiles en el primer período de servicios que quedaron preñadas en  $\leq$  dos de las cinco oportunidades en el

segundo período de servicios ( $n = 6$ ). De las 25 vacas que comenzaron el segundo período de servicios finalizamos con 11 porque algunas no se preñaron ( $n=6$ ), y otras tuvieron problemas sanitarios ( $n=3$ ) o no cumplieron con las definiciones para ingresar en los grupos definitivos ( $n=5$ ). El estudio de las características endócrinas y de las estructuras ováricas de las vacas fértiles y subfértiles durante el ciclo estral se realizó a partir de los 90 meses de edad. Para simplificar la comprensión del diseño experimental longitudinal (Figura 3), se definieron dos etapas: juvenil: desde el nacimiento hasta el diagnóstico de gestación realizado 30 días después de finalizado el primer período de servicios (0 a 29 meses, destete a los  $5,8 \pm 0,26$  meses de edad) y de madurez: desde el final del primer período de servicios hasta que se realizó el experimento (30 a 90 meses de edad).

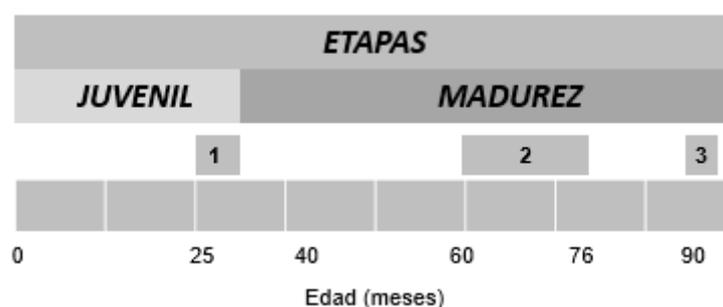


Figura 3: Descripción del diseño experimental longitudinal realizado para seleccionar a los 76 meses de edad a los grupos de vacas fértiles ( $n=5$ ) y subfértiles ( $n=6$ ). Se describe una Etapa Juvenil (0 a 29 meses de edad) y una de madurez (30 a 90 meses de edad). A los 90 meses de edad se realizó la caracterización endócrina y de las estructuras ováricas en ambos grupos de animales. 1= primer período de servicios de los 25 a los 27 meses de edad, 2= segundo período de servicios de los 60 a los 76 meses de edad; 3= caracterización endócrina y de estructuras ováricas durante el ciclo estral a los 90 meses de edad.

#### Caracterización endócrina y de las estructuras ováricas

A los 90 meses de edad, todas las vacas ( $n=11$ ) se sincronizaron con dos inyecciones de prostaglandina (150  $\mu\text{g}$  de D-cloprostenol, Dalmaprost®, Fatro, Montevideo, Uruguay) con 14 días de diferencia y se observaron cada 12 horas para detectar signos de comportamiento estral. La detección del estro se realizó dos veces al día a las 7 a.m. y a las 7 p.m. durante 30 minutos. Una vaca con inmovilidad a la montada fue considerada en estro.

Se realizaron exámenes ecográficos de los ovarios usando equipo modo B en tiempo real con una sonda lineal de 7,5 MHz (Aloka SSD 500, Aloka Co., Ltd, Tokio, Japón). Las ecografías ováricas fueron realizadas por el mismo operador

cada ocho horas después de la segunda inyección de prostaglandina para establecer el día de la ovulación (día 0, determinado por la desaparición del folículo más grande) y para evaluar el desarrollo folicular durante un ciclo ovulatorio completo y los siete primeros días del ciclo siguiente. Las estructuras ováricas (folículos y cuerpo lúteo (CL) se dibujaron en mapas individuales manteniendo su relación espacial, y se registraron en fotos y videos con la identificación de cada animal. Los ovarios se exploraron en los planos medial y latero dorsoventral para determinar el número total de folículos, la posición y el diámetro de cada folículo y el área del CL. El tamaño folicular se midió en su eje transversal, mientras que para evaluar el área de CL, se consideraron las dimensiones horizontal y vertical (Kastelic et al., 1990). Si el CL tenía una cavidad, se midió en dos dimensiones y se restó al área total del CL. Los folículos se clasificaron como pequeños (2 a 5 mm), medianos (6 a 9 mm) y grandes ( $\geq 10$  mm).

El día de emergencia de una onda se definió como el último día, en el que el folículo destinado a convertirse en el folículo más grande para esa onda se identificó retrospectivamente con un diámetro de 4 o 5 mm (Evans et al., 1994). La información de la primera onda y última onda del ciclo se usó en todas las vacas para analizar el perfil de crecimiento de los folículos dominantes, porque no todas las vacas desarrollaron tres ondas foliculares durante el ciclo estral. Para cada onda del ciclo, se determinó el día del recuento máximo de folículos antrales (RMFA, folículos de 2-5 mm). Se colectaron muestras de sangre para determinaciones hormonales mediante venopunción yugular diaria desde el día de la segunda inyección de prostaglandina hasta el final del experimento utilizando tubos vacutainer con heparina (Vacutest®, VacutestKima, Arzergrande, Italia) y agujas estériles. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 1500 g y el plasma se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta que se analizó el contenido de hormonas.

#### Determinaciones hormonales

Las concentraciones de progesterona se estimaron utilizando un RIA de fase sólida directa (COAT-A-COUNT Progesterona, SIEMENS, Los Angeles, EE. UU.). El límite de detección analítica del ensayo fue de 0,02 ng / mL. Los coeficientes de variación intraensayo para dos muestras control (bajo: 0,52 ng / ml y alto: 18,2 ng / ml) fueron 17,1% y 12%, respectivamente, y los coeficientes de variación interensayo fueron 16,6% y 13,4%, respectivamente. Las concentraciones de adiponectina se midieron con un kit de RIA comercial (HADP-61 HK, Millipore, EE. UU.) utilizando muestras de plasma sin diluir (Astessiano et al., 2015). El límite de detección analítica del ensayo de adiponectina fue de 1,54 ng / mL. Los coeficientes de variación intraensayo para las dos muestras control (bajo: 11,3 ng / mL y alto: 87,4 ng / mL) fueron 28,0% y 26,6, respectivamente. Las concentraciones de IGF-I se midieron

usando ensayos inmunoradiométricos (IRMA) con el kit comercial IGF-I-RIACT (CisBio International, GIF-SUR YVETTE CEDEX, Francia) utilizados previamente en bovinos (Astessiano et al., 2015). Para IGF-I, el límite de detección del ensayo fue 0,3 ng / mL y los coeficientes de variación intraensayo para las dos muestras de control (bajo: 48,8 ng / mL y alto: 656,6 ng / mL) fueron 9,6% y 15,9%, respectivamente. La concentración de hormona antimülleriana se determinó solo el día del RMFA para cada onda folicular utilizando el kit ELISA AL-114 (AnshLabs, Texas, EEUU), que fue validado previamente para el ganado bovino (Ireland et al. 2008). La sensibilidad del ensayo fue de 0,011 ng / ml. El CV intraensayo para el control bajo 1 (0,28 ng / mL) y alto (0,97 ng / mL) fueron 15,7% y 8,6%, respectivamente.

#### *Fecha de nacimiento, peso vivo, composición, condición corporal y altura de anca*

Una vez definidos los grupos experimentales a los 76 meses de edad (fértiles n=5 y subfértiles n=6), se estudiaron retrospectivamente la fecha de nacimiento y la evolución de peso de las vacas de ambos grupos. Las vacas fértiles nacieron en promedio 32 días antes (28/8 al 9/10/2005) que las vacas subfértiles (13/9 al 1/12/2005). Para realizar ésta evaluación contábamos con registros de peso vivo cada tres o cuatro semanas, desde el nacimiento. Las evaluaciones de peso vivo continuaron realizándose cada 4 semanas de los 76 a los 90 meses de edad, utilizando una balanza electrónica (TRU-TEST XR 3000). Los pesos siempre fueron tomados sin ayuno previo y en las primeras horas de la mañana. A los 90 meses de edad, la composición corporal se estimó por ecografía evaluando el espesor de la grasa subcutánea (sobre el músculo dorsal largo entre la 12<sup>a</sup> y la 13<sup>a</sup> costilla, mm), el marmoreado (porcentaje de grasa intramuscular dentro del músculo dorsal largo) y el área del ojo de bife (área del músculo dorsal largo; cm<sup>2</sup>) y espesor de la grasa en el anca (profundidad del tejido graso en la intersección de los músculos Gluteus medius y Biceps femoris en la región de la cadera expresada en mm). Las mediciones se realizaron usando un ecógrafo modo B en tiempo real con un transductor lineal de 3.5 MHz (AlokaSSD 500, Aloka Co., Ltd, Tokio, Japón) y almacenado en una computadora portátil (Houghton & Turlington, 1992). Estas imágenes se analizaron utilizando el software Biosofts (Bio-tronics Inc., Ames, Iowa, EEUU) (Guggeri et al., 2014). La altura de anca se midió a los 44, 60 y 90 meses de edad, con una regla en el punto directamente sobre los huesos de la cadera, con el animal de pie en un piso nivelado.

#### **Análisis estadísticos**

Se realizaron análisis univariados en todas las variables para identificar valores atípicos e inconsistencias y para verificar la normalidad de los residuos. Datos

continuos con medidas repetidas (peso vivo, aumento de peso diario y condición corporal, concentraciones de progesterona, adiponectina, IGF-I y AMH, tamaño de folículos dominantes y subordinados, número de folículos de 2 a 5 mm y folículos totales, área del CL y altura de cadera) se compararon mediante análisis de varianza, utilizando el procedimiento mixto disponible en SAS (SAS 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU., 2002). El número de folículos de 2 a 5 mm se estudió el día del RMFA, y su correlación con las concentraciones de AMH fue analizada utilizando PROC CORR disponible en SAS. Para el estudio de las concentraciones de progesterona, el ciclo ovulatorio se dividió en 3 fases: 1) la fase folicular, desde el día -3 a 0 (día 0 = ovulación); 2) la fase lútea temprana, del día 1 al 7, y 3) la fase lútea media a tardía, de 8 a 18 días del ciclo. Los dos efectos principales estudiados en el modelo fueron el grupo y la observación (día o mes) y la interacción grupo\*observación, utilizando al animal como efecto aleatorio. Para las variables como el peso vivo y el aumento diario de peso, la edad al destete se utilizó como covariable. El peso vivo fue estudiado considerando la fase juvenil y de madurez en el modelo. El tipo de estructura de covarianza utilizada se eligió según el criterio de información de Akaike (AIC). Se eligió el modelo con el AIC más bajo. El procedimiento GLM de SAS se utilizó para analizar las variables continuas sin mediciones repetidas a lo largo del tiempo (variables de composición corporal, número de ondas foliculares, área de CL, duración del ciclo, intervalo estro-ovulación). Los datos se presentan como medias  $\pm$  EE agrupadas y las diferencias se consideraron significativas cuando  $P < 0,05$  y las tendencias se identificaron cuando  $P > 0,05$  y  $P \leq 0,10$ .

## RESULTADOS

### Peso vivo y ganancia diaria de peso en las etapas juvenil y de madurez

El peso vivo desde el nacimiento hasta los 29 meses de edad (Etapa juvenil) se vió afectado por el grupo ( $P < 0,05$ ). Las vacas fértiles ( $140 \pm 8,6$  kg) fueron más pesadas al destete que las subfértiles ( $106 \pm 7,8$  kg). La interacción grupo\*observación fue significativa ( $P < 0,05$ ; Figura 4A). La ganancia de peso en este período estuvo afectada por el grupo ( $P < 0,05$ ), teniendo las vacas fértiles mayores ganancias de peso ( $0,537 \pm 0,03$  kg / día) que las vacas subfértiles ( $0,456 \pm 0,02$  kg / día). Desde el diagnóstico de gestación hasta el segundo período de servicio (Etapa de madurez), el efecto grupo no fue significativo, pero hubo un efecto significativo para la interacción grupo\*observación ( $P < 0,05$ ), ya que el peso vivo de las vacas subfértiles fue mayor de los 39 a 42 meses de edad que el de las vacas fértiles (Figura 4B).

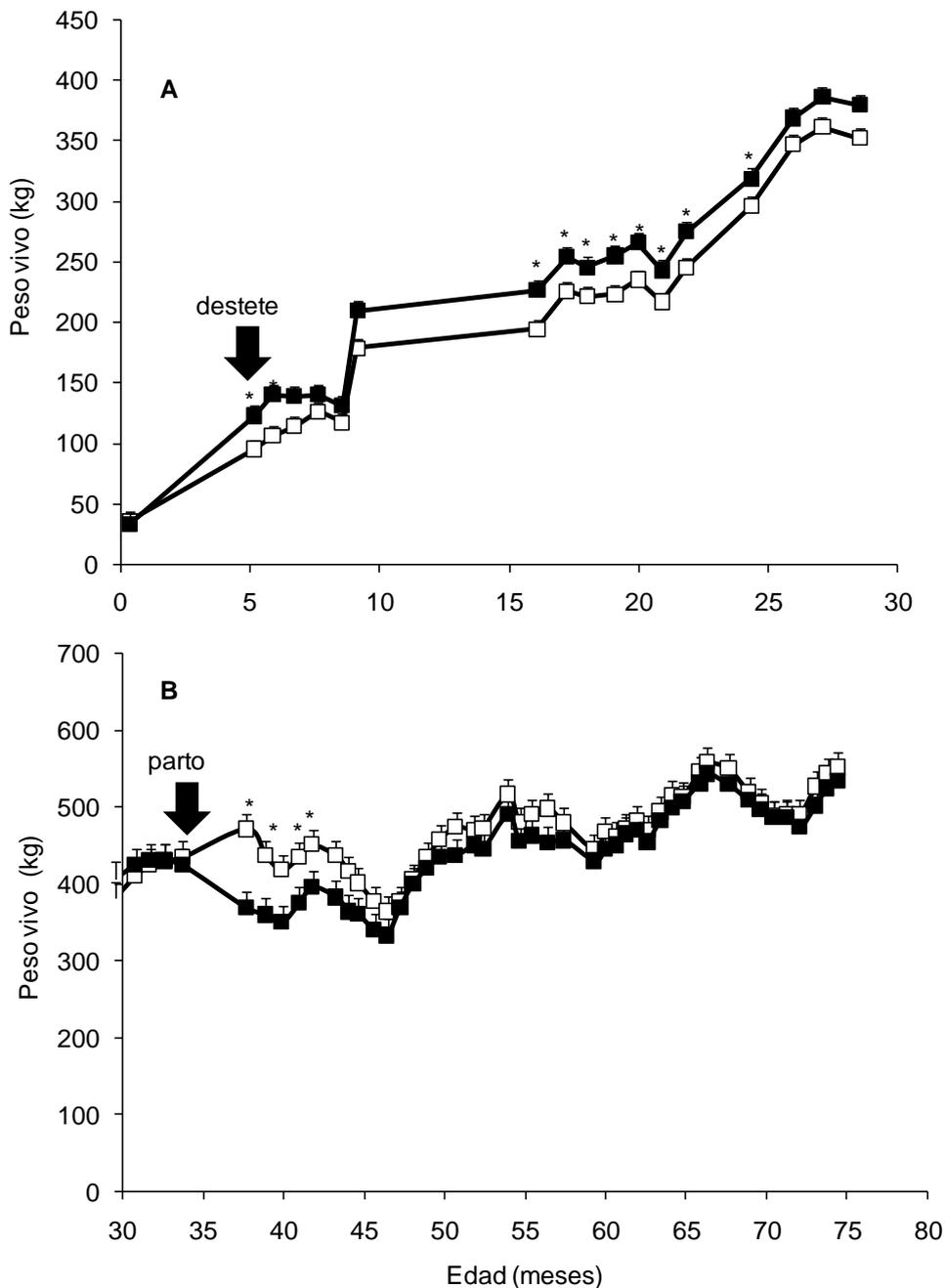


Figura 4. Evolución del peso vivo (Media  $\pm$  EE) desde el nacimiento hasta los 76 meses de edad de las vacas fértiles (■) y subfértiles (□). A) Fase Juvenil: desde el nacimiento hasta el diagnóstico definitivo del primer período de servicios (0 a 29 meses de edad). B) Fase de madurez: desde el diagnóstico definitivo hasta finalizado el segundo período de servicios (30 los 76 meses de edad) \* = diferencias significativas entre los grupos (P <0,05).

#### Altura de anca, músculo y grasa en la fase de madurez

La altura de anca no fue diferente para las vacas fértiles y subfértiles en el período de estudio, pero aumentó de los 44 ( $125 \pm 1,6$  cm) a los 60 meses ( $129 \pm 1,6$  cm, P <0,05) y permaneció sin cambios hasta los 90 meses de edad

(128± 1,6 cm). El marmoreado (6,1 ± 0,4%) y el espesor de la grasa del anca (16,8 ± 4,5 mm) no fueron diferentes en las vacas fértiles y subfértiles. Sin embargo, el área del ojo de bife fue mayor en las vacas fértiles (76,7 ± 3,1 cm<sup>2</sup>) que en las subfértiles (66,9 ± 2,9 cm<sup>2</sup>; P <0,05) y las vacas fértiles (11,1 ± 2,5 mm) tendieron a tener más grasa subcutánea que las vacas subfértiles (8,7 ± 2,3 mm; P <0,1).

Concentraciones de progesterona, área del cuerpo lúteo y dinámica folicular en la etapa de madurez

Las concentraciones plasmáticas de progesterona no fueron diferentes durante la fase folicular y la fase luteal temprana entre las vacas fértiles y subfértiles, pero fueron mayores en la fase luteal media-tardía del ciclo en las subfértiles que en las fértiles (P <0,05) (Figura 5A). No se encontraron diferencias en el área del CL (Tabla 1). El diámetro del folículo ovulatorio no fue diferente entre vacas subfértiles (13,4 ± 1,15 mm, Figura 5B) y vacas fértiles (14,3 ± 1,68 mm, Figura 5C) en la segunda ovulación. El efecto del grupo y la observación y su interacción no fueron significativos. No se observaron diferencias en el número de ondas foliculares, la duración del ciclo estral y el intervalo estro-ovulación entre las vacas fértiles y subfértiles (Tabla 1).

Tabla 1. Número de ondas foliculares, área del cuerpo lúteo, duración del ciclo estral e intervalo estro-ovulación en el grupo de vacas fértiles y subfértiles

Grupo	Fértiles (n=5)	Subfértiles (n=6)
Ondas foliculares (n)	3,0 ± 0,1	2,8 ± 0,1
Área del cuerpo lúteo (mm <sup>2</sup> )	323 ± 21	311 ± 19
Duración del ciclo estral (días)	20,4 ± 0,9	21,2 ± 0,8
Intervalo estro- ovulación (días)	2,6 ± 0,5	2,5 ± 0,5

(Media ± EEM).

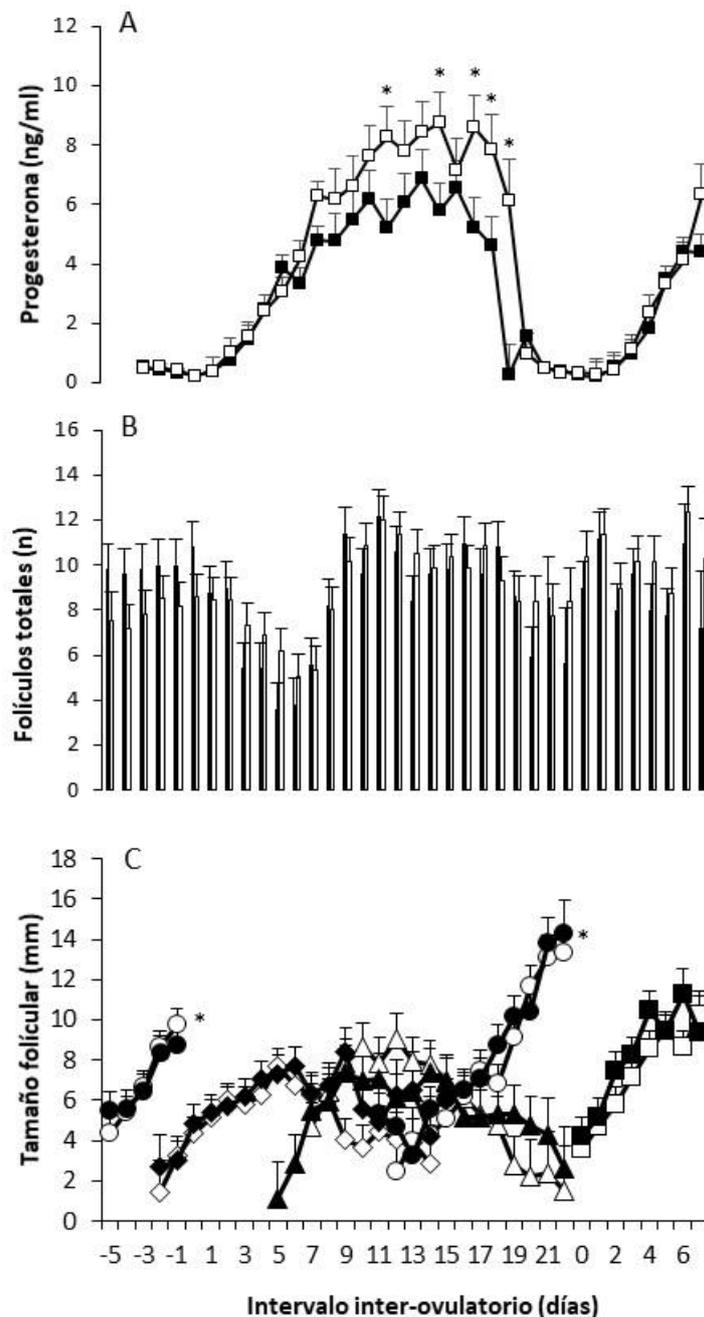


Figura 5. (A) Concentración de progesterona en plasma (Media  $\pm$  EE) desde el día de la segunda prostaglandina (día -5) hasta el día 7 del siguiente ciclo inter-ovulatorio en vacas subfértils (□, n = 6) y fértils (■, n = 5). Los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos. (B) Número de folículos totales ( $\geq 2$  mm) durante el ciclo inter-ovulatorio en vacas subfértils (barras blancas) y fértils (barras negras). (C) Patrón de crecimiento de los folículos ovulatorios (○ y ●), folículo dominante de la primera (◇ y ◆) y segunda onda del ciclo (△ y ▲), y folículo dominante de la primera onda del siguiente ciclo (■ y □). La primera ovulación (\*) fue inducida por la inyección de dos dosis de prostaglandina y la segunda (\*) ocurrió en forma espontánea.

Recuento máximo de folículos antrales y concentraciones de AMH en la etapa de madurez

Los resultados sobre el RMFA (2 a 5 mm) y las concentraciones de AMH para cada onda durante el ciclo estral se presentan en la Tabla 2. Los folículos de 2 a 5 mm de diámetro representaron el  $90,0 \pm 1,2\%$  de la población folicular total. No se encontraron diferencias entre los grupos en ninguna de estas dos variables. La correlación entre RMFA y AMH no fue significativa ( $r^2 = 0,2$ ;  $P = 0,2$ ).

Tabla 2. Recuento máximo de folículos antrales (RMFA, folículos 2-5 mm) y concentraciones de hormona antimüleriana (AMH, ng / mL) para cada onda folicular (1 a 3) en vacas fértiles y subfértiles durante un ciclo estral a los 83 meses de edad (Media  $\pm$  EE).

Grupo	Onda	RFMA	AMH (ng/mL)
Fértiles	1	10,6 $\pm$ 1,1	0,44 $\pm$ 0,1
	2	10,0 $\pm$ 1,1	0,44 $\pm$ 0,1
	3	9,0 $\pm$ 1,1	0,36 $\pm$ 0,1
Subfértiles	1	8,0 $\pm$ 0,9	0,46 $\pm$ 0,1
	2	8,9 $\pm$ 1,2	0,40 $\pm$ 0,1
	3	10,7 $\pm$ 1,0	0,41 $\pm$ 0,1

IGF-I y adiponectina en la etapa de madurez

Las concentraciones de IGF-I fueron mayores en vacas fértiles ( $160 \pm 4.3$  ng / mL) que en las subfértiles ( $148 \pm 4.0$  ng / mL) ( $P > 0.05$ ) y la interacción grupo\* observación tendió a ser significativa ( $P > 0.07$ ) (Figura 6A).

Las concentraciones de adiponectina fueron mayores en las vacas fértiles ( $7,5 \pm 0,5$  ng / mL) que en las subfértiles ( $5.9 \pm 0,5$  ng / mL,  $P < 0.05$ ), pero no se observó efecto de la observación, ni de la interacción grupo\*observación (Figura 6B).

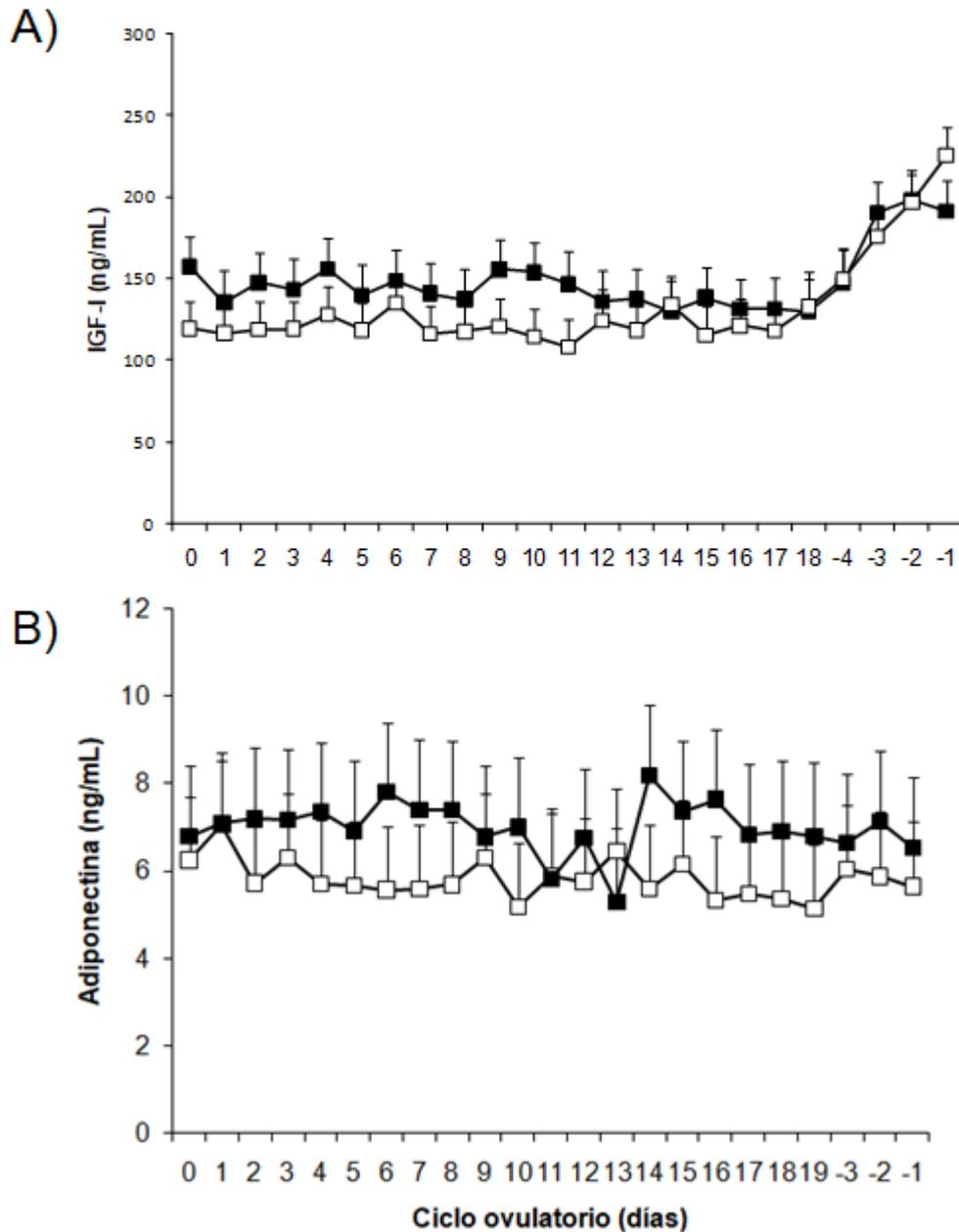


Figura 6. Concentraciones plasmáticas de IGF-I (A) y adiponectina (B) en las vacas fértiles (■, n = 5) y subfértiles (□, n = 6) durante un ciclo ovulatorio (Media ± EE).

## DISCUSIÓN

La hipótesis de que la fertilidad en la etapa de madurez estaría relacionada con variables que describen el crecimiento y el desarrollo en la etapa juvenil fue aceptada. Las vacas fértiles tuvieron una mayor ganancia de peso y peso vivo durante la etapa prepuberal, así como una mayor área del ojo de bife y grasa

en la etapa de madurez en comparación con las vacas subfértiles. En la etapa de madurez las vacas fértiles tuvieron concentraciones de progesterona más bajas que las subfértiles, pero esta diferencia no se asoció con el tamaño del folículo ovulatorio ni del CL, y no promovió cambios en la dinámica folicular, el número de folículos antrales y las concentraciones de AMH. Las diferencias en composición corporal estuvieron asociadas con mayores concentraciones de IGF-I y adiponectina en las vacas fértiles respecto a las subfértiles.

Las vacas fértiles nacieron más temprano, crecieron más rápido desde el nacimiento hasta el destete, fueron más pesadas al destete y las diferencias en el peso vivo se mantuvieron durante casi toda la etapa juvenil. Estas diferencias en el crecimiento fueron aún significativas cuando la edad al destete se utilizó como covariable en el modelo, para tener en cuenta su efecto en la trayectoria de crecimiento de las terneras (Viñoles et al., 2013). Trabajos recientes describen que vacas que nacen más tarde, crecen más lento desde el nacimiento al destete, son menos eficientes y tienen una menor AOB (Roberts et al., 2017). Nuestros resultados refuerzan la importancia de la fecha de nacimiento de las terneras de reemplazo por dos motivos: 1) la ventaja en la edad al destete y 2) el mejor ajuste de la curva de producción de forraje con la curva de lactación de las madres (Soca y Orcasberro, 1992). Ambos motivos ayudan a explicar la ventaja en el peso al destete de las vacas fértiles respecto a las subfértiles. El impacto del plano nutricional a edades tempranas en el peso vivo hasta los 18 meses de edad ha sido previamente reportado (Berge, 1991). En éste trabajo, el mayor desarrollo corporal de las vacas fértiles en la etapa juvenil se asoció con una mayor área del ojo de bife en la etapa de madurez, en comparación con las vacas subfértiles. La razón de esta diferencia podría ser la mayor deposición de músculo en el período prepuberal, cuando las vacas fértiles crecieron a un ritmo más rápido en comparación con las vacas subfértiles (Owens et al., 1993). La tasa de ganancia de peso en etapas tempranas en la vida (dos a cinco meses) se ha asociado con una mayor área del ojo de bife en el momento del destete, probablemente explicada por una mayor expresión de ARNm para GH en el hígado y mayores concentraciones circulantes de IGF-I (Guggeri et al., 2014, 2018). Por otra parte, en el primer período de servicios, las vaquillonas que recibieron un mayor plano nutricional tenían mayores concentraciones de progesterona y una mayor expresión de ARNm de IGF-I en el útero, compatible con un mejor ambiente para el desarrollo embrionario temprano (Guggeri et al., 2018). Este hallazgo es relevante y sugiere la ocurrencia de una programación metabólica en vaquillonas para carne. En la etapa de madurez, la disminución en el peso vivo de las vacas fértiles en comparación con las subfértiles se restringió al período de 39 a 42 meses de edad, ya que sólo la mitad de las vacas subfértiles parieron durante este período. La caída más pronunciada en el peso vivo en vacas fértiles versus subfértiles fue debido al estado de lipomovilización inducido por los mayores requerimientos del último tercio de gestación y el

inicio de la lactancia (Quintans et al., 2010; Astessiano et al., 2012; Soca, 2014). Es importante enfatizar que ambos grupos de animales fueron alimentados diferencialmente después del destete de su primer ternero, para que pudieran alcanzar un desarrollo corporal similar, y también que mantuvieron el peso durante al menos 6 meses, para eliminar el efecto de corto plazo del balance energético negativo en el eje reproductivo (Britt, 1992). Los resultados de éste experimento resaltan la relevancia de la programación del desarrollo en la eficiencia reproductiva de las vacas, a través del impacto de largo plazo que tiene la mayor tasa de ganancia pre-destete y el mayor peso al destete en la clasificación de las vacas en fértiles o subfértiles en la etapa de madurez. Por lo tanto, terneras nacidas más temprano y más pesadas al destete deberían de seleccionarse como reemplazos para ingresar al rodeo de cría en nuestros sistemas pastoriles, ya que redundarán en su mayor productividad y longevidad (Cushman et al., 2013; Roberts et al., 2017).

En este experimento, las vacas fértiles y subfértiles tuvieron concentraciones de progesterona similares en la fase folicular del ciclo estral pos-sincronización, lo que no concuerda con reportes previos (Båge et al., 2002), que describen concentraciones suprabasales de progesterona en vaquillonas subfértiles durante este período. Las diferencias podrían deberse al tipo de vaca (lechera vs. vaca para carne) y a la estrategia experimental utilizada, que incluye la edad de los animales en ambos experimentos (vaquillonas vírgenes vs. vaquillonas repetidoras en su caso y animales contemporáneos cuya fertilidad fue evaluada durante el desarrollo y cuando alcanzaron la edad adulta en nuestro caso). Por otra parte, la metodología utilizada para medir las concentraciones de progesterona en ambos experimentos fue diferente (luminiscencia inmunoensayo vs un kit de radioinmunoensayo fase sólida), y en las vaquillonas repetidoras hubo una gran variabilidad en las concentraciones de progesterona durante la fase folicular del ciclo (Båge et al., 2002). Por lo tanto, sugerimos que las diferencias en las concentraciones de progesterona durante la fase folicular del ciclo probablemente no sean la principal alteración endocrina en las vacas subfértiles. En concordancia con éstos hallazgos, no observamos ningún impacto en la vida media o en el diámetro del folículo ovulatorio en nuestro estudio, por tanto, no serían esperables cambios en la calidad de los ovocitos que pudieran explicar las diferencias en fertilidad entre los grupos de vacas (Mihm et al., 1994; Revah y Butler, 1996).

En la fase lútea temprana no hubo diferencias en las concentraciones de progesterona entre los grupos, pero en la fase lútea media a tardía (días 8 a 18) las concentraciones de progesterona fueron más bajas en las vacas fértiles que en las subfértiles. Estos hallazgos contrastan con el trabajo previo de Båge et al. (2002), quienes encontraron que las concentraciones de progesterona no difirieron entre vaquillonas subfértiles y vaquillonas vírgenes en la fase lútea. Otros autores, utilizando un modelo en que seleccionan animales de similar

mérito genético para producción de leche pero diferente para fertilidad, observan que las concentraciones de progesterona son 34% superiores en la fase luteal media (día 5 a 13) en vacas fértiles respecto a las sub-fértiles (Cummins et al., 2012). En nuestro estudio, las diferencias en las concentraciones circulantes de progesterona no se relacionaron con diferencias en el área del CL (Adams et al., 1992), medición que se ha utilizado como indicador de las concentraciones periféricas de progesterona en vaquillonas Holstein nulíparas (Kastelic et al., 1990). Nuestros resultados contrastan con los de Cummins et al. (2012), quienes reportan un volumen 16% superior del CL en vacas fértiles respecto a las subfértiles. Por lo tanto, el tamaño del CL no explica 100% lo cambios en las concentraciones circulantes de la hormona. Una explicación alternativa podría ser que las vacas fértiles retuvieron progesterona en el tejido adiposo, lo que habría disminuido las concentraciones plasmáticas de la hormona, teniendo en cuenta su naturaleza liposoluble (Rodrigues et al., 2011). Sin embargo, la diferencia en espesor de grasa observada entre las vacas fértiles y subfértiles solo tendió a ser significativa, y la variación en la medición de ésta variable cuestiona la solidez de éste argumento. Otra explicación sería la mayor velocidad de metabolización hepática de la hormona, como se ha descrito en vacas lecheras lactantes, asociada a una mayor tasa de ingestión de alimento (Sangsritavong et al., 2002). Sin embargo, esto parece poco probable en este estudio, considerando que las vacas fértiles y subfértiles no estaban en lactación, tenían un peso vivo similar y su dieta base era forraje del campo natural. Finalmente, las menores concentraciones de progesterona circulantes en vacas fértiles respecto a las subfértiles pueden no reflejar las concentraciones hormonales a nivel endometrial. Los receptores en las células diana concentran las hormonas en los tejidos. En ovejas subnutridas se ha demostrado que concentraciones más altas de progesterona en sangre se asociaron con un menor contenido de receptor de progesterona endometrial, menor concentración de la hormona y mayor mortalidad embrionaria respecto a las ovejas del grupo control (Lozano et al., 1998; Sosa et al., 2004; Abecia et al., 2015). Por lo tanto, se necesitan más estudios para explicar el significado de las menores concentraciones de progesterona en vacas seleccionadas por mayor fertilidad.

A pesar de las mayores concentraciones de progesterona durante la fase luteal media a tardía en vacas subfértiles, no se observaron diferencias en el número de ondas foliculares entre los grupos. Adams et al. (1992) demostraron que una dosis alta de progesterona suprimía el folículo dominante más que la dosis fisiológica cuando se administraba durante su fase de crecimiento, induciendo así un recambio folicular más rápido. En éste sentido, las diferencias en concentraciones de progesterona reportadas por Cummins et al., (2012) se asociaron con un menor número de ondas y un ciclo de menor duración en vacas fértiles respecto a las subfértiles. En éste trabajo, las características del folículo preovulatorio y el intervalo estro-ovulación fueron similares entre vacas

fértiles y subfértiles en contraste con hallazgos previos (Båge, 2002; Gustafsson y Emanuelson 2002a; Maurer y Echtenkamp, 1985; Moss et al., 2002). Además, el RMFA por onda fue similar entre los grupos. Los resultados similares en esta variable pueden estar relacionados con la edad de los animales en el momento de realizar del RMFA (90 meses), ya que la mayoría de la información que asocia RMFA y fertilidad utilizó vaquillonas antes de su primer servicio con 14 meses de edad. El efecto de la edad en la disminución de la población de folículos antrales se ha descrito anteriormente (Cushman et al., 2009), y podría además estar asociada con el reducido número de animales utilizado en este experimento, que se explica en parte por la duración del experimento. Sin embargo, Cummins et al. (2012), reportan que el número de folículos  $\geq 5$  mm fue similar entre vacas fértiles y subfértiles, aunque el punto de corte utilizado por éstos autores reduce sustancialmente el pool de folículos evaluados. Las concentraciones de AMH fueron similares entre los grupos, y la correlación con el RMFA no fue significativa, lo que sugiere que estas variables pueden no ser buenos marcadores de fertilidad en animales adultos.

En nuestro estudio, utilizando vacas de 90 meses de edad de similar peso vivo, aún observamos diferencias en las concentraciones de IGF-I entre grupos. Las diferencias más marcadas se observaron en los días 9 a 11 del ciclo estral, momento crítico del crecimiento embrionario y producción de la señal de reconocimiento materno de la preñez (Sequeira et al., 2015). Este resultado es muy relevante, y refuerza el concepto de que el funcionamiento del eje somatotrófico puede programarse en etapas tempranas de la vida asociado a diferentes planos nutricionales (Guggeri et al., 2018). Estudios sobre la expresión diferencial de ARNm de IGF-I y II en el endometrio, podrían agregar información muy relevante sobre el medio ambiente uterino en que se desarrollan los embriones de vacas fértiles y subfértiles, y ayudar a explicar las diferencias entre grupos de vacas.

En nuestro estudio, las concentraciones de adiponectina fueron mayores en las vacas fértiles respecto a las subfértiles, de acuerdo con lo que se ha sugerido anteriormente en humanos (Toulis et al., 2009; Maillard et al., 2010). Esto ocurrió asociado a una tendencia a que las vacas fértiles tuvieran más espesor de grasa subcutánea, respecto a las subfértiles. Sin embargo, se ha reportado que el tejido adiposo que produce la mayor proporción de adiponectina circulante en vacas lecheras es el visceral, que no fue evaluado en éste estudio (Sauerwein & Häußler, 2016). Por lo tanto, se necesitan más estudios con un mayor número de vacas y evaluaciones que permitan predecir la grasa corporal total, para evaluar las interacciones hormonales mencionadas.

## CONCLUSIONES

- Las vacas subfértiles nacieron más tarde y tuvieron una menor tasa de ganancia de peso y peso vivo al destete y durante la etapa juvenil respecto a las fértiles.
- Este retraso en el crecimiento y desarrollo en la etapa juvenil se asoció con una menor deposición de músculo y grasa en etapa de madurez.
- En la etapa de madurez la vacas subfértiles en comparación con las fértiles tuvieron:
  - Una mayor concentración de progesterona circulante durante la fase luteal del ciclo estral, que no afectó el número de folículos antrales, las concentraciones de AMH, la dinámica folicular y las características del folículo ovulatorio.
  - Menores concentraciones de IGF-I y adiponectina durante la fase luteal media

## PERSPECTIVAS A FUTURO

La eficiencia reproductiva es una característica de muy alta relevancia económica para los productores criadores y comienza a definirse con la selección de los reemplazos (Wiltbank, 1994). Los resultados de éste trabajo claramente demuestran que la etapa juvenil, particularmente en el período pre-destete, marca cambios en el funcionamiento de tejidos y órganos que determinan la fertilidad en la etapa de madurez. Los cambios que ocurren en etapas tempranas de la vida no pueden ser compensados posteriormente, aunque las vacas alcancen pesos vivos similares en la etapa de madurez. Estudios longitudinales de éste tipo son muy valiosos y potentes, pero tiene el inconveniente de requerir un elevado número de animales desde el inicio. Por lo tanto requieren de una planificación muy detallada y entender los cuellos de botella de los mismos, experiencia que se adquirió en ésta oportunidad. Algunos cambios endócrinos observados en las vacas subfértiles, como los mayores niveles de progesterona, son contradictorios con una menor fertilidad de éste grupo de vacas. Por lo tanto, se requieren estudios más detallados de histología del cuerpo lúteo y/o expresión génica de receptores endometriales para explicar éstas aparentes contradicciones. Otro aspecto relevante en sistemas pastoriles son los estudios de consumo de forraje y el impacto de las interacciones sociales que pueden generar diferencias nutricionales y metabólicas asociadas a la respuesta reproductiva. Más estudios longitudinales con el agregado de variables que ayuden a explicar diferencias en eficiencia reproductiva entre grupos de vacas permitirán generar conocimiento relevante para el manejo reproductivo del rodeo de cría en condiciones pastoriles.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abecia, J. A., Casao, A., Pascual-Alonso, M., Lobón, S., Aguayo-Ulloa, L. A., Forcada, F., Maria, G. A. (2015). Periconceptional undernutrition increases quantity and quality of oocyte population, but not cognitive or emotional response of 60-day-old lambs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99(3), 501–510.
- Adams, G., Matteri, R. L., & Ginther, O. (1992). Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *Journal of Reproduction*, 95, 627–640.
- Adams, G. P., Matteri, R. L., & Ginther, O. J. (1992). Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, 96(2), 627–640.
- Alvez, A. (2014). *Subfertilidad en vacas para carne: caracterización de la funcionalidad ovárica*. Universidad de la República.
- Amundson, O. L., Fountain, T. . H., Larimore, E. L., Richardson, B. N., McNeel, A. K., Wright, E. C., Freetly, H. C. (2015). Postweaning nutritional programming of ovarian development in beef heifers. *Journal of Animal Science*, 93, 5232–5239.
- Archanco, M., Gómez-Ambrosi, J., Tena-Sempere, M., Frühbeck, G., & Burrell, M. A. (2007). Expression of leptin and adiponectin in the rat oviduct. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 55(10), 1027–1037.
- Arije, G. ., & Wiltbank, J. N. (1971). Age and weight at puberty in Herford heifers. *Journal of Animal Science*, 33(2), 401–406.
- Astessiano, A. L., Carriquiry, M., Mattiauda, D. A., Adrien, M. L., Chilbroste, P., & Meikle, A. (2017). Endometrial gene expression in primiparous dairy cows at the end of the voluntary waiting period is affected by nutrition: Total mixed ration vs increasing levels of herbage allowance. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(5), 798–805.
- Astessiano, A. L., Meikle, A., Fajardo, M., Gil, J., Mattiauda, D. A., Chilbroste, P., & Carriquiry, M. (2015). Metabolic and endocrine profiles and hepatic gene expression of Holstein cows fed total mixed ration or pasture with different grazing strategies during early lactation. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 57(57), 1–12.
- Astessiano, A. L., Pérez-Clariget, R., Quintans, G., Soca, P., & Carriquiry, M. (2012). Effects of a short-term increase in the nutritional plane before the mating period on metabolic and endocrine parameters, hepatic gene expression and reproduction in primiparous beef cows on grazing conditions. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96(3), 535–544.
- Ayalon, N. (1978). A review of embryonic mortality in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, 54, 483–493.
- Båge, R. (2002). *On repeat breeding in dairy heifers. With especial focus on follicular dynamics, ovulation, and oocyte quality*. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Båge, R., Gustafsson, H., Larsson, B., Forsberg, M., & Rodríguez-Martínez, H.

- (2002). Repeat breeding in dairy heifers: follicular dynamics and estrous cycle characteristics in relation to sexual hormone patterns. *Theriogenology*, *57*(9), 2257–2269.
- Bazer, F. W. (1975). Uterine protein secretions: Relationship to development of the conceptus. *Journal of Animal Science*.
- Bazer, F. W., Burghardt, R. C., Johnson, G. A., Spencer, T. E., & Wu, G. (2008). Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy, *8*(3), 179–211.
- Bazer, F. W., Wu, G., & Johnson, G. A. (2017). Pregnancy recognition signals in mammals: the roles of interferons and estrogens. *Animal Reproduction*, *14*(1), 7–29.
- Berge, P. (1991). Long-term effects of feeding during calthood on subsequent performance in beef cattle (a review). *Livestock Production Science*, *28*, 362–364.
- Bézar, J., Vigier, B., Tran, D., & N, M. P. & J. (1987). Immunocytochemical study of anti-Müllerian hormone in sheep ovarian follicles during fetal and post-natal development. (doi:10.1530/jrf.0.0800509. *Journal of Reproduction and Fertility*, *80*, 509–516.
- Boldt, R. J., Speidel, S. E., Thomas, M. G., & Enns, R. M. (2018). Genetic parameters for fertility and production traits in Red Angus cattle. *Journal of Animal Science*, *96*, 4100–4111.
- Boyd, H. (1965). Embryonic death in cattle, sheep and pigs. *Vet. Bull*, *35*, 251–266.
- Breier, B. H., Gluckman, P. D., & Bass, J. J. (1988). Influence of nutritional status and oestradiol-17 beta on plasma growth hormone, insulin-like growth factors-I and -II and the response to exogenous growth hormone in young steers. *Journal of Endocrinology*, *118*(2), 243–250.
- Bridges, G. a., Day, M. L., Geary, T. W., & Cruppe, L. H. (2013). Triennial Reproduction Symposium: Deficiencies in the uterine environment and failure to support embryonic development. *Journal of Animal Science*, *91*(7), 3002–3013.
- Brito, L. F. C., Barth, A. D., Rawlings, N. C., Wilde, R. E., Crews, D. H., Mir, P. S., & Kastelic, J. P. (2007). Effect of nutrition during calthood and peripubertal period on serum metabolic hormones, gonadotropins and testosterone concentrations, and on sexual development in bulls. *Domestic Animal Endocrinology*, *33*(1), 1–18.
- Britt, J. (1992). Influence of nutrition and weight loss on reproduction and early embryonic death in cattle. *25th Annual Meeting American Association Bovine Practice, St. Paul, USA*, 143–8.
- Burns, B. M., Fordyce, G., & Holroyd, R. G. (2010). A review of factors that impact on the capacity of beef cattle females to conceive, maintain a pregnancy and wean a calf-Implications for reproductive efficiency in northern Australia. *Animal Reproduction Science*, *122*(1–2), 1–22.
- Buskirk, D. D., Faulkner, D. B., & Ireland, F. A. (1995). Increased Postweaning Gain of Beef Heifers Enhances Fertility and Milk Production. *Journal of Animal Science*, *73*, 937–946.
- Butler, W. R., & Smith, R. D. (1989). Interrelationships Between Energy Balance and Postpartum Reproductive Function in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, *72*(3), 767–783.
- Cardoso, R. C., Alves, B. R. C., Prezotto, L. D., Thorson, J. F., Tedeschi, L. O.,

- Keisler, D. H., ... Williams, G. L. (2014). Use of a stair-step compensatory gain nutritional regimen to program the onset of puberty in beef heifers. In *Journal of Animal Science* (Vol. 92, pp. 2942–2949).
- Cardoso, R. C., Alves, B. R. C., Williams, G. L., Texas, A., & Station, C. (2018). Neuroendocrine signaling pathways and the nutritional control of puberty in heifers. *Animal Reproduction*, *15*(1), 868–878.
- Chagas, L. M., Bass, J. J., Blache, D., Burke, C. R., Kay, J. K., Lindsay, D. R., ... Webb, R. (2007). Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *90*(9), 4022–4032.
- Clark, J. H., Schrader, W. T., & O'Malley, B. W. (1992). Mechanisms of steroid hormones action. In J. D. Wilson & D. W. Foster (Eds.), *Endocrinology* (pp. 35–90). Saunders; Philadelphia.
- Cummins, S. B., Lonergan, P., Evans, A. C. O., & Butler, S. T. (2012). Genetic merit for fertility traits in Holstein cows: II. Ovarian follicular and corpus luteum dynamics, reproductive hormones, and estrus behavior. *Journal of Dairy Science*, *95*(7), 3698–3710.
- Cundiff, L. V., Núñez-Dominguez, R., Dickerson, G. E., Gregory, K. E., & Koch, R. M. (1992). Heterosis for lifetime production in Hereford, Angus, shorthorn, and crossbred cows. *Journal of Animal Science*, *70*(8), 2397–2410.
- Cushman, R. A., Allan, M. F., Kuehn, L. A., Snelling, W. M., Cupp, A. S., & Freetly, H. C. (2009). Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. *Journal of Animal Science*, *87*(6), 1971–1980.
- Cushman, R. A., Kill, L. K., Funston, R. N., Mousel, E. M., & Perry, G. A. (2013). Heifer calving date positively influences calf weaning weights through six parturitions. *Journal of Animal Science*, *91*(9), 4486–4491.
- Daftary, S. S., & Gore, A. C. (2005). IGF-I in the brain as a regulator of reproductive neuroendocrine function. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.), *230*(5), 292–306.
- Davis, M. E., Bishop, M. D., Park, N. H., & Simmen, R. C. . M. (1995). Divergent selection for blood serum insulin-like growth factor I concentration in beef cattle: I. Nongenetic effects. *Journal of Animal Science*, *73*, 1927–1932.
- Day, M. L., & Nogueira, G. (2013). Management of age at puberty in beef heifers to optimize efficiency of beef production. *Animal Frontiers*, *3*(4), 6–11.
- De Nava, G. (2013). *Reproducción bovina aplicada: desarrollo y validación de programas de inseminación a tiempo fijo en Uruguay* (Editorial). Buenos Aires, Argentina.
- Degrelle, S. A., Champion, E., Cabau, C., Piumi, F., Reinaud, P., Richard, C., ... Hue, I. (2005). Molecular evidence for a critical period in mural trophoblast development in bovine blastocysts. *Developmental Biology*, *288*, 448–460.
- DIEA, & MGAP. (2013). *ANUARIO ESTADÍSTICO AGROPECUARIO*.
- Diskin, M. . G., & Kenny, D. A. (2014). Optimising reproductive performance of beef cows and replacement heifers. *Animal*, *8*(1), 27–39.
- Diskin, M. G., & Sreenan, J. M. (1980). Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *Journal of Reproduction and Fertility*, *59*(2), 463–468.

- Do Carmo, M., Claramunt, M., Carriquiry, M., & Soca, P. (2016). Animal energetics in extensive grazing systems: Rationality and results of research models to improve energy efficiency of beef cow-calf grazing campos systems. *Journal of Animal Science*, *94*(6), 84–92.
- Do Carmo, M., Sollenberger, L. E., Carriquiry, M., & Soca, P. (2018). Controlling herbage allowance and selection of cow genotype improve cow-calf productivity in Campos grasslands. *The Professional Animal Scientist*, *34*(1), 32–41.
- Dochi, O., Takahashi, K., Hirai, T., Hayakawa, H., Tanisawa, M., Yamamoto, Y., & Koyama, H. (2008). The use of embryo transfer to produce pregnancies in repeat-breeding dairy cattle. *Theriogenology*, *69*(1), 124–128.
- Duchens, M., Maciel, M., Gustafsson, H., Forsberg, M., Rodríguez-Martínez, H., & Edqvist, L.-E. (1995). Influence of perioestrous suprabasal progesterone levels on cycle length, oestrous behaviour and ovulation in heifers. *Animal Reproduction Science*, *37*(2), 95–108.
- Dupont, J., Reverchon, M., Bertoldo, M. J., & Froment, P. (2014). Nutritional signals and reproduction. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *382*(1), 527–537.
- Echternkamp, S. E., Roberts, A. J., Lunstra, D. D., Wise, T., & Spicer, L. J. (2004). Ovarian follicular development in cattle selected for twin ovulations and births. *Journal of Animal Science*, *82*, 459–471.
- El-Khadrawy, H. ., Ahmed, W. M., Emtenan, & Hanafi, M. (2011). Observations on Repeat Breeding in Farm Animals with Emphasis on its Control. *Journal of Reproduction and Infertility*, *2*(1), 01–07.
- Ergene, O. (2012). Progesterone concentrations and pregnancy rates of repeat breeder cows following postinsemination PRID and GnRH treatments \*. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, *36*(3), 283–288.
- Erickson, B. H. (1966). Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of Animal Science*, *25*(3), 800–805.
- Evans, A. C. O., Adams, G. P., & Rawlings, N. C. (1994). Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. *Journal of Reproduction and Fertility*, *102*(2), 463–470.
- Evans, A. C. O., Mossa, F., Fair, T., Lonergan, P., Butler, S. T., Zielak-Steciwo, A. E., ... Ireland, J. J. (2010). Causes and consequences of the variation in the number of ovarian follicles in cattle. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, *67*, 421–429.
- Fenwick, M. A., Fitzpatrick, R., Kenny, D. A., Diskin, M. G., Patton, J., Murphy, J. J., & Wathes, D. C. (2008). Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology*, *34*(1), 31–44.
- Forde, N., & Lonergan, P. (2017). Interferon-tau and fertility in ruminants. *Reproduction*, *154*(5), F33–F43. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0432>
- Garcia-Garcia, R. M. (2012). Integrative Control of Energy Balance and Reproduction in Females. *ISRN Veterinary Science*, *2012*, 1–13.
- Garrett, J. E., Geisert, R. D., Zavy, M. T., & Morgan, G. L. (1988). Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *Reproduction*, *84*(2), 437–446.
- Gasser, C. L., Behlke, E. . J., Grum, D. E., & Day, M. L. (2006). Effect of timing of feeding a high-concentrate diet on growth and attainment of puberty in early-weaned heifers. *Journal of Animal Science*, *84*, 3118–3122.

- Guggeri, D., Meikle, a., Carriquiry, M., Montossi, F., De Barbieri, I., & Viñoles, C. (2014). Effect of different management systems on growth, endocrine parameters and puberty in Hereford female calves grazing Campos grassland. *Livestock Science*, 1–8.
- Guggeri, D., Meikle, A., Carriquiry, M., De Barbieri, I., Montossi, F., & Viñoles, C. (2018). Long-term effect of early nutrition on endocrine parameters and liver and endometrial gene expression of the members of the somatotrophic axis in Hereford heifers. *Reproduction in Domestic Animals*, 1–7.
- Gustafsson, H. (1985). Characteristics of embryos from repeat breeder and virgin heifers. *Theriogenology*, 23(3), 487–498.
- Gustafsson, H., & Emanuelson, U. (2002a). Characterisation of the repeat breeding syndrome in Swedish dairy cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 43(2), 115–125.
- Gustafsson, H., & Emanuelson, U. (2002b). Characterisation of the Repeat Breeding Syndrome in Swedish Dairy Cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 43(2), 115–125.
- Gutiérrez, V., Espasandin, A. C., Astessiano, A. L., Casal, A., López-Mazz, C., & Carriquiry, M. (2013). Calf foetal and early life nutrition on grazing conditions: metabolic and endocrine profiles and body composition during the growing phase. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97(4), 720–731.
- Hawk, H. (1979). Infertility in dairy cattle. 1. Hawk H. *Infertility in Dairy Cattle. Beltsv. Symp. Agric. Res. 1979;3:19–29. Beltsville Symposia in Agricultural Research*, 3, 19–29.
- Hehenkamp, W. J. K., Looman, C. W. N., Themmen, A. P. N., De Jong, F. H., Te Velde, E. R., & Broekmans, F. J. M. (2006). Anti-Mullerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91, 4057–4063.
- Hernandez-Cerdón, J., Zarco, L., & Lima-Tamayo, V. (1993). Incidence of delayed ovulation in Holstein heifers and its effect on fertility and early luteal function. *Theriogenology*, 40, 1073–1081.
- Houghton, P. L., & Turlington, L. M. (1992). Application of ultrasound for feeding and finishing animals: a review. *Journal of Animal Science*, 70(3), 930–941.
- Houseknecht, K. L., Boggs, D. L., Champion, D. R., Sartin, J. L., Rampacek, G. B., & Amos, H. E. (1988a). Effect of Dietary Energy Source and Level on Serum Growth Hormone , Insulin-Like Growth Factor 1 , Growth and Body Composition in Beef Heifers. *Animal Science*, 2916–2923.
- Houseknecht, K. L., Boggs, D. L., Champion, D. R., Sartin, J. L., Rampacek, G. B., & Amos, H. E. (1988b). Effect of Dietary Energy Source and Level on Serum Growth Hormone , Insulin-Like Growth Factor 1 , Growth and Body Composition in Beef Heifers. *Journal of Animal Science*, 66, 2916–2923.
- Imakawa, K., Bai, R., Nakamura, K., & Kusama, K. (2017). Thirty years of interferon-tau research; Past, present and future perspective. *Animal Science Journal*, 88(7), 927–936.
- Inskeep, E. K. (2004). Preovulatory , postovulatory , and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *Journal of Animal Science*, 82, 24–39.
- Ireland, J. . L. H., Scheetz, D., Themmen, A. P. N., Ward, F., Lonergan, P.,

- Smith, G. W., ... Ireland, J. J. (2008). Antral Follicle Count Reliably Predicts Number of Morphologically Healthy Oocytes and Follicles in Ovaries of Young Adult Cattle. *Biology of Reproduction*, 79, 1219–1225.
- Ireland, J. J., Folger, J., Bettgowda, A., Scheetz, D., Walsh, S., Mossa, F., ... Evans, A. C. O. (2009). Variation in the Ovarian Reserve Is Linked to Alterations in Intrafollicular Estradiol Production and Ovarian Biomarkers of Follicular Differentiation and Oocyte Quality in Cattle. *Biology of Reproduction*, 80, 954–964.
- Ireland, J., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Themmen, A., Ward, F., Lonergan, P., ... Ireland, J. (2008). Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biology of Reproduction*, 79(6), 1219–1225.
- Ireland, J., Smith, G. W., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Folger, J. K., Ireland, J. L. H., ... Evans. (2011). Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Mullerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in. *Reproduction, Fertility and Development*, 23, 1–14.
- Jenkins, T. G. (2009). Interbreed evaluation of beef productivity under low and moderate dry matter availabilities. *Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics*, 18, 113–116.
- Jimenez-Krassel, F., Folger, J. K., Ireland, J. L. H., Smith, G. W., Hou, X., Davis, J. S., Ireland, J. J. (2009). Evidence That High Variation in Ovarian Reserves of Healthy Young Adults Has a Negative Impact on the Corpus Luteum and Endometrium During Estrous Cycles in Cattle. *Biology of Reproduction*, 80, 1272–1281.
- Kastelic, J., Bergfelt, D., & Ginther, O. (1990). Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology*, 33, 1269–1278.
- Kerbler, T. L., Buhr, M. M., Jordan, L. J., Leslie, K. E., & Walton, J. S. (1997). Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology*, 47(3), 703–714.
- Kiess, W., Blum, W. F., & Aubert, M. L. (1998). Leptin, puberty and reproductive function: lessons from animal studies and observations in humans. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 138(1), 26–29.
- La Marca, A., & Volpe, A. (2006). Anti-Müllerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool? *Clinical Endocrinology*, 64, 603–610.
- Lamb, C. (1990). Embryonic Mortality in Cattle. *Beef Cattle Handbook, BCH-2220*, 1–3.
- Laron, Z. (2001). Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C) (IGF1). *Molecular Pathology*, 54, 311–316.
- Larson, R. L. (2007). Heifer Development: Reproduction and Nutrition. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 23, 53–68.
- Larson, R. L., White, B. J., & Laflin, S. (2016). Beef Heifer Development. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 32(2), 285–302.
- Lesmeister, J.L., Burfening, P.J. & Blackwell, R.L. (1973). Date of first calving in beef cows and subsequent calf production. *Journal of Animal Science* 36,

- Levine, H. . (1999). The repeat breeder cow. *The Bovine Practitioner*, 33, 97–105.
- Lohakare, J. D., Südekum, K. H., & Pattanaik, a. K. (2012). Nutrition-induced changes of growth from birth to first calving and its impact on mammary development and first-lactation milk yield in dairy heifers: A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25(9), 1338–1350.
- Lonergan, P., Fair, T., Forde, N., & Rizos, D. (2016). Embryo development in dairy cattle. *Theriogenology*, 86(1), 270–277.
- Lozano, J. M., Abecia, J. A., Forcada, F., Zarazaga, L., & Alfaro, B. (1998). Effect of undernutrition on the distribution of progesterone in the uterus of ewes during the luteal phase of the estrous cycle. *Theriogenology*, 49(3), 539–546.
- Lucy, M. C. (2001). Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where Will It End? *Journal of Dairy Science*, 84(6), 1277–1293.
- Maillard, V., Uzbekova, S., Guignot, F., Perreau, C., Ramé, C., & Coyral-castel, S. (2010). Effect of adiponectin on bovine granulosa cell steroidogenesis , oocyte maturation and embryo development. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(23), 1–15.
- Mani, A. M., Fenwick, M. A., Cheng, Z., Sharma, M. K., Singh, D., & Wathes, D. C. (2010). IGF1 induces up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidylinositol-dependent kinase/AKT in bovine granulosa cells. *Reproduction*, 139(1), 139–151.
- Martinez, M. F., Sanderson, N., Quirke, L. D., Lawrence, S. B., & Juengel, J. L. (2015). Association between antral follicle count and reproductive measures in New Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system. *Theriogenology*, 85(3), 466–475.
- Maurer, R., & Echternkamp, S. E. (1985). Repeat- breeder females in beef cattle: influences and causes. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 61(3), 624–636.
- Meikle, A., Brun, V. de, Carriquiry, M., Soca, P., Sosa, C., Adrien, M. de L., ... Abecia, J.-A. (2018). Influences of nutrition and metabolism on reproduction of the female ruminant. *Animal Reproduction*, 15(Suppl. 1), 899–911.
- Meikle, A., Kulcsar, M., Chilliard, Y., Febel, H., Delavaud, C., Cavestany, D., & Chilbroste, P. (2004). Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction*, 127(6), 727–737.
- Meiyu, Q. I., Roth, Z., & LIU, D. (2011). Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) in Reproduction System of Female Bovine. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)*, 18(4), 84–87.
- Mihm, M., Baguisi, A., Boland, M. P., & Roche, J. F. (1994). Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, 102(1), 123–130.
- Miller, H. M., Foxcroft, G. R., Squires, J., & Aherne, F. X. (1999). The Effects of Feed Intake and Body Fatness on Progesterone Metabolism in Ovariectomized Gilts. *Journal of Animal Science*, 77, 3253–3261.
- Mondal, S., Reddy, I. J., & Mor, A. (2015). Impact of nutritional stress on early embryonic survival. *Functional Foods in Health and Disease*, 5(9), 304–

- Moore, S. G., Scully, S., Browne, J. A., Fair, T., & Butler, S. T. (2014). Genetic merit for fertility traits in Holstein cows: V. Factors affecting circulating progesterone concentrations. *Journal of Dairy Science*, *97*(9), 5543–5557.
- Moss, N., Lean, I. J., Reid, S. W. J., & Hodgson, D. R. (2002). Risk factors for repeat-breeder syndrome in New South Wales dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, *54*(2), 91–103.
- Mossa, F., Jimenez-Krassel, F., Scheetz, D. M., Weber-Nielsen, M., Evans, A. C. O., & Ireland, J. (2017). Anti-Müllerian Hormone (AMH) and fertility management in agricultural species. *Reproduction*, (1), REP-17-0104.
- Ohtani, Y., Yonezama, T., Song, S., Takahashi, T., Ardiyanti, A., Sato, K., ... Kato, K. (2011). Gene expression and hormonal regulation of adiponectin and its receptors in bovine mammary gland and mammary epithelial cells. *Animal Science Journal*, *82*, 99–106.
- Owens, F. N., Dubeski, P., & Hanson, C. F. (1993). Factors that alter the growth and development of ruminants. *Journal of Animal Science*, *71*(11), 3138–3150.
- Palin, M.-F., Bordignon, V. V., & Murphy, B. D. (2012). Adiponectin and the control of female reproductive functions. *Vitamins and Hormones*, *90*, 239–287.
- Parr, R. A., Davis, I. F., Miles, M. A., & Squires, T. J. (1993). Liver blood flow and metabolic clearance rate of progesterone in sheep. *Research in Veterinary Science*, *55*(3), 311–316.
- Patterson, D. J., Perry, R. C., Kiracofe, G. H., Bellows, R. a, Staigmiller, R. B., & Corah, L. R. (1992). Management considerations in heifer development and puberty. *Journal of Animal Science*, *70*(12), 4018–4035.
- Patton, J., Kenny, D. A., Mcnamara, S., Mee, J. F., Mara, F. P. O., Diskin, M. G., & Murphy, J. J. (2007). Relationships Among Milk Production , Energy Balance , Plasma Analytes , and Reproduction in Holstein-Friesian Cows. *Journal of Dairy Science*, *90*(2), 649–658.
- Perry, G. A. (2016). Factors affecting puberty in replacement beef heifers. In *Special Issue : Proceedings of ICAR 2016 The 18th International Congress on Animal Reproduction* (Vol. 86, pp. 373–378).
- Perry, G. A., & Cushman, R. (2013, November 1). Effect of age at puberty/conception date on cow longevity. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. Elsevier.
- Perry, G. A., Smith, M. F., Roberts, A. J., MacNeil, M. D., & Geary, T. W. (2007). Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *Journal of Animal Science*, *85*(3), 684–689.
- Plasse, D., Warnick, A. C., & Koger, M. (1968). Reproductive behavior of Bos indicw females in a subtropical environment. I. Puberty and ovulation frequency in Brahman and Brahman x British heifers. . *Journal of Animal Science*, (27), 94.
- Psilopanagioti, A., Papadaki, H., Kranioti, E. F., Alexandrides, T. K., & Varakis, J. N. (2009). Expression of adiponectin and adiponectin receptors in human pituitary gland and brain. *Neuroendocrinology*, *89*, 38–47.
- Quintans, G., Banchemo, G., Carriquiry, M., López-Mazz, C., & Baldi, F. (2010). Effect of body condition and suckling restriction with and without presence of the calf on cow and calf performance. *Animal Production Science*, *50*(10), 931.

- Quintans, G., Vaz Martins, D., & Carriquiry, E. (1994). Alimentación invernal de la recria. In *Bovinos para carne. Avances en la Suplementación en la Recría e Invernada Intensiva. Resultados Experimentales . Serie Técnica INIA* (INIA, pp. 2–8). Treinta y Tres, Uruguay: INIA Treinta y Tres.
- Revah, I., & Butler, W. R. (1996). Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, *106*(1), 39–47.
- Revelli, A., Piane, L. D., Casano, S., Molinari, E., Massobrio, M., & Rinaudo, P. (2009). Follicular fluid content and oocyte quality : from single biochemical markers to metabolomics. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *7*(40), 1–13.
- Ribeiro, E. S., Bisinotto, R. S., Lima, F. S., Greco, L. F., Morrison, A., Kumar, A., Santos, J. E. P. (2014). Plasma anti-Müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. *Journal of Dairy Science*, *97*(11), 6888–6900.
- Roberts, A. J., Silva, A. G., Summers, A. F., Geary, T. W., & Funston, R. N. (2017). Developmental and reproductive characteristics of beef heifers classified by pubertal status at time of first breeding 1. *Journal of Animal Science*, *95*, 5629–5636.
- Rodrigues, R. O., Trevisanuto, C., Cooke, R. F., & Vasconcelos, J. L. M. (2011). Effects of body weight loss on serum progesterone concentrations of non-lactating dairy cows. *Theriogenology*, *75*(1), 131–137.
- Sangsrivavong, S., Combs, D. K., Sartori, R., Armentano, L. E., & Wiltbank, M. C. (2002). High Feed Intake Increases Liver Blood Flow and Metabolism of Progesterone and Estradiol-17  $\beta$  in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, *85*, 2831–2842.
- Santa Cruz, R., Cushman, R. A., & Viñoles, C. (2018). Antral follicular count is a tool that may allow the selection of more precocious Bradford heifers at weaning. *Theriogenology*, *119*, 35–42.
- Santa Cruz, R., Cushman, R., & Vinales, C. (2017). Antral follicular count is a tool that allows the selection of more precocious animals at weaning. *Under Revision by Theriogenology*.
- Sauerwein, H., & Häußler, S. (2016). Endogenous and exogenous factors influencing the concentrations of adiponectin in body fluids and tissues in the bovine. *Domestic Animal Endocrinology*, *56*, 33–43.
- Schillo, K. K., Hall, J. . B., & Hileman, S. M. (1992). Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer. *Journal of Animal Science*, *70*(12), 3994–4005.
- Senger, P. L. (2003). *Pathways to Pregnancy and Parturition* (Second). Pullman, Washington: Current Conceptions, Inc.
- Sequeira, M., Pain, S. J., de Brun, V., Meikle, A., Kenyon, P. R., & Blair, H. T. (2015). *Gestation related gene expression and protein localization in endometrial tissue of Suffolk and Cheviot ewes at gestation day 19, following transfer of Suffolk or Cheviot embryos*. Massey University.
- Short, R. E., Bellows, R. A., Staigmiller, R. B., Berardinelli, J. G., & Custer, E. E. (1990). Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. *Journal of Animal Science*, *68*, 799–816.
- Soca, P. M. (2014). *La condición corporal al parto afecta las respuestas reproductiva y metabólica al destete temporario y flushing en vaca primipara*. Universidad de la República, Uruguay.

- Soca, P., & Orcasberro, R. (1992). Propuesta de Manejo del Rodeo de Cría en base a estado corporal, altura del pasto y aplicación del destete temporario. In *Evaluación Física y Económica de Alternativas Tecnológicas en Predios Ganaderos*. Montevideo, Uruguay: Facultad de Agronomía.
- Sood, P., Zachut, M., Dube, H., & Moallem, U. (2015). Behavioral and hormonal pattern of repeat breeder cows around estrus. *Reproduction*, *149*(6), 545–554.
- Sosa, C., Lozano, J., & Viñoles, C. (2004). Effect of plane of nutrition on endometrial sex steroid receptor expression in ewes. *Animal Reproduction*, *84*(3), 337–348.
- Spencer, T. E., Johnson, G. A., Bazer, F. W., & Burghardt, R. C. (2004). Implantation mechanisms : insights from the sheep. *Reproduction*, *128*, 657–668.
- Spencer, T. E., Johnson, G. A., Bazer, F. W., Burghardt, R. C., & Palmarini, M. (2007). Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: Roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reproduction, Fertility and Development*, *19*(1), 65–78.
- Spicer, L. ., & Echterkamp, S. E. (1995). The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis n domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology*, *12*, 223–245.
- Spicer, L. J., Tucker, W. B., & Adams, G. D. (1990). Insulin-like growth factor-I in dairy cows: relationships among energy balance, body condition, ovarian activity, and estrous behavior. *Journal of Dairy Science*, *73*(4), 929–937.
- Starbuck, M. J., Dailey, R. A., & Inskeep, E. K. (2004). Factors affecting retention of early pregnancy in dairy cattle. *Animal Reproduction Science*, *84*(1–2), 27–39.
- Stevens, D., Alexander, G., & Bell, A. W. (1990). Effect of prolonged glucose infusion into fetal sheep on body growth, fat deposition and gestation length. *Journal of Developmental Physiology*, *13*, 277–281.
- Straus, D. S. (1984). Growth-stimulatory actions of insulin in vitro and in vivo. *Endocrine Reviews*, *5*(2), 356–369.
- Takahashi, M., Hayashi, M., Manganaro, T., & Donahoe, P. (1986). The Ontogeny of Mullerian Inhibiting Substance of the Bovine Ovarian Follicle in Granulosa. *Biology of Reproduction*, *35*, 447–453.
- Tersigni, C., DiNicuolo, F., Ippolito, S. D., Veglia, M., Castel- lucci, M., & Di Simone, N. (2011). “Adipokines: new emerging roles in fertility and reproduction.” *Obstetrical and Gynecological Survey*, *66*(1), 47–63.
- Toulis, K. A., Goulis, D. G., Farmakiotis, D., Georgopoulos, N. A., Katsikis, I., Tarlatzis, B. C., ... Panidis, D. (2009). Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome: A systematic review and a meta-analysis. *Human Reproduction Update*, *15*(3), 297–307.
- Velazquez, M. A., Newman, M., Christie, M. F., Cripps, P. J., Crowe, M. A., Smith, R. F., & Dobson, H. (2005). The usefulness of a single measurement of insulin-like growth factor-1 as a predictor of embryo yield and pregnancy rates in a bovine MOET program. *Theriogenology*, *64*, 1977–1994.
- Velazquez, M. a, Spicer, L. J., & Wathes, D. C. (2008). The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. *Domestic Animal Endocrinology*, *35*(4), 325–342.
- Vigier, B., Picard, J., Tran, D., & Legeai, L. (1984). Production of Anti-Miillerian

- Hormone : Another Homology between Sertoli and Granulosa Cells. *Endocrinology*, 114(4), 1315–1320.
- Viñoles, C., Banchemo, G., Quintans, G., Pérez-Clariget, R., Soca, P., Ungerfeld, R., ... Meikle, A. (2009). Estado actual de la investigación vinculada a la Producción Animal Limpia , Verde y Ética en Uruguay. *Agrociencia*, XIII(3), 59–79.
- Viñoles, C., Jaurena, M., De Barbieri, I., Do Carmo, M., & Montossi, F. (2013). Effect of creep feeding and stocking rate on the productivity of beef cattle grazing grasslands. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 56(4), 279–287.
- Walsh, S. W., Mossa, F., Butler, S. T., Berry, D. P., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., ... Ireland, J. J. (2014). Heritability and impact of environmental effects during pregnancy on antral follicle count in cattle. *Journal of Dairy Science*, 97(7), 4503–4511.
- Walsh, S. W., Williams, E. J., & Evans, A. C. O. (2011). A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 123(3–4), 127–138.
- Warnick, A. ., & Hansen, P. J. (2010). Comparison of ovulation, fertilization and embryonic survival in low-fertility beef cows compared to fertile females. *Theriogenology*, 73(9), 1306–1310.
- Wathes, D. C., Taylor, V. J., Cheng, Z., & Mann, G. E. (2003). Follicle growth, corpus luteum function and their effects on embryo development in postpartum dairy cows. *Reproduction (Cambridge, England) Supplement*, 61, 219–237.
- Williams, A. H., & Cumming, I. A. (1982). Inverse relationship between concentration of progesterone and nutrition in ewes. *The Journal of Agricultural Science*, 98(3), 517–522.
- Wiltbank, J. (1994). Challenges for improving calf crop. *39th Annual Beef Cattle Short Course, University of Florida*, 1–22.
- Wiltbank, J. N., Kasson, C. W., & Ingalls, J. E. (1969). Puberty in crossbred and straightbred beef heifers on two levels of feed. *Journal of Animal Science*, 26, 602–605.
- Wiltbank, J. N., Roberts, S., Nix, J., & Rowden, L. (1985). Reproductive performance and profitability of heifers fed to weigh 272 or 318 kg at the start of the first breeding season. *Journal of Animal Science*, 60(1), 25–34.
- Wiltbank, M. C., Souza, a H., Carvalho, P. D., Cunha, a P., Giordano, J. O., Fricke, P. M., ... Diskin, M. G. (2014). Physiological and practical effects of progesterone on reproduction in dairy cattle. *Animal : An International Journal of Animal Bioscience*, 8 Suppl 1, 70–81.
- Wood, B. J., Archer, J. A., & Van Der Werf, J. H. J. (2004). Response to selection in beef cattle using IGF-I as a selection criterion for residual feed intake under different Australian breeding objectives. *Livestock Production Science*, 91(1–2), 69–81.
- Yakar, S., Liu, J.-L., Stannard, B., Butler, A., Accili, D., Sauer, B., & LeRoith, D. (1999). Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 7324–7329.
- Yilmaz, A., Davis, M. E., & Simmen, R. C. . M. (2006). Analysis of female reproductive traits in Angus beef cattle divergently selected for blood serum insulin-like growth factor I concentration. *Theriogenology*, 65(6), 1180–

1190.

Yusuf, M., Nakao, T., Ranasinghe, R. B. K., Gautam, G., Long, S. T., Yoshida, C., Hayashi, A. (2010). Reproductive performance of repeat breeders in dairy herds. *Theriogenology*, 73(9), 1220–1229.