



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

CAMBIOS ENDÓCRINOS, OVÁRICOS Y UTERINOS EN VACAS PARA CARNE  
SUBFÉRTILES

por

MARIA XIMENA GONZÁLEZ

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2020





UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

CAMBIOS ENDÓCRINOS, OVÁRICOS Y UTERINOS EN VACAS PARA CARNE  
SUBFÉRTILES

por

MARIA XIMENA GONZÁLEZ

---

Carolina Viñoles

2020

## INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Jorge Gil; MS, PhD

Laboratorio de Reproducción Animal PPRRLN - EEMAC – Paysandú. Facultad de Veterinaria

Universidad de la República – Uruguay

Victoria De Brun; MS, PhD

Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal. Facultad de Veterinaria

Universidad de la República – Uruguay

Francisco Báez; MS, PhD

Centro Universitario de Tacuarembó. Polo de Desarrollo Universitario

Instituto Superior de la Carne - Uruguay



**FACULTAD DE VETERINARIA  
Programa de Posgrados**

**ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS  
DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL**

**CAMBIOS ENDÓCRINOS, OVÁRICOS Y UTERINOS EN VACAS  
PARA CARNE SUBFÉRTILES**

**Por: Dra. María Ximena GONZÁLEZ FERNÁNDEZ**

**Directora de Tesis: Dra. Carolina Viñoles**

**Tribunal**

**Presidente: Dr. Jorge Gil**


**Segundo Miembro: Dr. Francisco Báez**

**Tercer Miembro: Dra. Victoria de Brun**



**Fallo del Tribunal: aprobado con mención.**

**JUEVES 27 DE AGOSTO DE 2020, 9 HORAS.**

**SALA VIRTUAL DE PLATAFORMA ZOOM**

**El Fallo de aprobación de la Tesis puede ser: Aprobada (corresponde a la nota BBB- en el Acta), o Aprobada con Mención (corresponde a la nota SSS- 12 en el Acta)**



## FUNDAMENTACIÓN

TESIS: Cambios endócrinos, ováricos y uterinos en vacas para carne subfértiles.

POR: María Ximena González, defendida el 27 de Agosto de 2020.

El tribunal consideró que la Dra. María Ximena González reporta en su tesis de Maestría, un experimento que implicó el trabajo por períodos de tiempo que exigen una dedicación y vocación especiales. Desarrolló su presentación con total solvencia, resolviendo satisfactoriamente las preguntas del tribunal, instancia en la que se generó una interesante discusión sobre el impacto de éstos hallazgos. Los estudios publicados en la temática son escasos y casi todos tienen a vacas lecheras como modelo, por lo que el modelo animal de esta tesis tiene características de novedosas que implica otro mérito particular. Los resultados obtenidos son relevantes para la comunidad científica, por lo que se espera que culmine el proceso de la publicación en medios arbitrados por pares. La tesis fue un trabajo de investigación muy significativo que implicó tareas de campo y de laboratorio de alta especialización donde la para la maestranda asumió con iniciativa y autonomía en el trabajo.

El tribunal ha señalado los detalles en el manuscrito, que ya han sido considerados por la tesista y su tutora y están incorporadas en ésta versión de la tesis.

En suma, el Tribunal considera que la Dra. María Ximena González realizó muy buen trabajo, y que da mérito para adjudicar la calificación de APROBADO CON MENCIÓN.

Sin otro particular, saluda atentamente,

Jorge Gil Laurerio

Presidente del Tribunal

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer en primera instancia a mi tutora Dra. Carolina Viñoles, por su invaluable dedicación, motivación y esfuerzo brindado, así como por compartir su conocimiento y experiencia.

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 con sede en la Estación Experimental Bernardo Rosengurtt (Facultad de Agronomía) y perteneciente a la Casa de la Universidad de Cerro Largo.

A Paula Nicolini por su profesional guía en técnicas de biología molecular en el laboratorio y la redacción de aspectos metodológicos en la tesis.

A Ana Meikle por brindar su tiempo para corregir las versiones previas de este documento, orientarme y por su rigor científico.

Al Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal y a su personal por su ayuda para realizar los análisis de hormonas y de expresión génica.

A Andrea Alvez, por su colaboración en el trabajo de campo.

A Pablo González por su ayuda en el análisis estadístico.

A todo el personal de INIA Tacuarembó por su excelente disposición y apoyo en el trabajo de campo.

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

A mis amigos por creer en mí y siempre tener una palabra de aliento.

A Alfonso mi compañero de vida por su apoyo incondicional.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	10
RESUMEN .....	10
SUMMARY .....	12
INTRODUCCIÓN .....	13
EFICIENCIA REPRODUCTIVA.....	13
Ciclos estrales y su regulación.....	13
Factores que afectan la eficiencia reproductiva .....	16
Hormonas metabólicas y reproducción .....	18
EFICIENCIA REPRODUCTIVA DE LA VACA DE CRÍA EN SISTEMAS PASTORILES .....	21
SUBFERTILIDAD.....	22
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS .....	25
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	25
HIPÓTESIS.....	26
OBJETIVOS.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
Clasificación de las vacas en fértiles y subfértiles .....	26
Animales y diseño experimental .....	28
Disección de ovarios y evaluación de folículos .....	30
Determinación de hormonas en suero y fluido folicular .....	31
Extracción de ARN y PCR cuantitativo en tiempo real. ....	32
Análisis estadístico .....	34
RESULTADOS.....	35
Seguimiento ultrasonográfico del crecimiento folicular .....	35
Caracterización de los folículos a la disección .....	36
Hormonas en suero .....	38
Progesterona (P4) .....	38
Factor de crecimiento insulino-símil 1 (IGF1).....	38
Insulina .....	39

Leptina .....	39
Adiponectina.....	39
Expresión génica en endometrio.....	42
DISCUSIÓN .....	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49

## ABREVIATURAS

CIDR dispositivo de liberación controlada de drogas internas

CL cuerpo lúteo

E2 estradiol

FF fluido folicular

FSH hormona folículo estimulanteGH hormona de crecimiento

GHr receptor de la hormona de crecimiento

GnRH hormona liberadora de gonadotrofinas

IA Inseminación artificial

IGF1 factor de crecimiento insulínico tipo 1

IGF2 factor de crecimiento insulínico tipo 2

IGF1 R receptor de IGF1

IGFBPs 1-6 proteínas de unión 1 a 6 de los factores de crecimiento insulino  
símiles 1 y 2

INSR receptor de insulina

LEPRb receptor tipo b de leptina

LH hormona luteinizante

NPY neuropéptido Y

PG prostaglandina

PR receptor de progesterona

RIA radioinmunoanálisis

## RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue evaluar el desarrollo y estado de salud de los folículos ováricos, las concentraciones circulantes de progesterona y hormonas metabólicas y la expresión génica endometrial en vacas Hereford fértiles y subfértiles. 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  $n = 5$  subfértiles) se definieron a los 76 meses de edad. A los 116 meses de edad se sincronizaron las vacas con un protocolo de inseminación a tiempo fijo. Se evaluaron las estructuras ováricas *in vivo* e *in vitro*, concentraciones hormonales y expresión génica endometrial. Los datos fueron analizados por ANOVA y test de Student considerándose significativos valores de  $P < 0,05$ . Las vacas fértiles tendieron a presentar folículos con mayor cantidad de células granulosas ( $3,58 \pm 0,45$  vs.  $2,56 \pm 0,32 \cdot 10^6$ ;  $P = 0,1$ ) y mayor concentración de IGF1 en el FF ( $101,48 \pm 13,65$  vs.  $60,11 \pm 13,65$  ng/ml,  $P = 0,06$ ) respecto a las vacas subfértiles. Las concentraciones de leptina y adiponectina en suero durante el ciclo estral fueron mayores en las vacas fértiles respecto a las subfértiles ( $21,90 \pm 1,60$  vs.  $13,90 \pm 1,50$  ng/mL;  $P = 0,006$  y  $40,80 \pm 1,00$  vs.  $36,90 \pm 1,00$  ng/mL;  $P = 0,02$  ng/mL, respectivamente). Las concentraciones de progesterona e insulina en suero fueron mayores en las vacas subfértiles respecto a los fértiles ( $2,00 \pm 0,10$  vs.  $1,70 \pm 0,10$  ng/mL;  $P = 0,056$  y  $23,50 \pm 1,10$  vs.  $19,10 \pm 1,10$   $\mu$ U/mL;  $P = 0,01$ , respectivamente). A nivel endometrial las vacas subfértiles tuvieron mayor expresión de IGF1 al día 7 ( $1,83 \pm 0,15$  vs.  $1,25 \pm 0,15$ ;  $P = 0,03$ ) y tendieron a presentar menor expresión de PR ( $1,17 \pm 0,39$  vs.  $2,30 \pm 0,39$ ;  $P = 0,06$ ) y ADIPOR2 ( $1,20 \pm 0,55$  vs.  $2,77 \pm 0,55$ ;  $P = 0,06$ ) que las vacas fértiles ese mismo día. Concluimos que en las vacas subfértiles los cambios que ocurren a nivel folicular, endócrino y de sensibilidad uterina a la progesterona y hormonas metabólicas el día 7 podrían asociarse a alteraciones en el desarrollo embrionario temprano y reconocimiento materno de la preñez.

## SUMMARY

The objective of this thesis was to evaluate the development and health of the ovarian follicles, the circulating concentrations of progesterone and metabolic hormones, and endometrial gene expression in fertile and subfertile Hereford cows. 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  $n = 5$  subfertile) were defined at 76 months of age. At 116 months of age the cows were synchronized with a fixed-time insemination protocol. Ovarian structures *in vivo* and *in vitro*, hormonal concentrations and endometrial gene expression were evaluated. The data were analyzed by ANOVA and Student test, considering significant values of  $P < 0.05$ . Fertile cows tended to present follicles with a greater quantity of granulosa cells ( $3.58 \pm 0.45$  vs.  $2.56 \pm 0.32$ ;  $P = 0.1$ ) and a higher concentration of IGF1 in the follicular fluid ( $101.48 \pm 13.65$  vs.  $60.11 \pm 13.65$  ng/mL,  $P = 0.06$ ) compared to subfertile cows. Serum leptin and adiponectin concentrations during the estrous cycle were higher in fertile cows compared to subfertile cows ( $21.90 \pm 1.60$  vs.  $13.90 \pm 1.50$  ng/mL;  $P = 0.006$  and  $40.80 \pm 1.00$  vs.  $36.9 \pm 1.00$  ng/mL;  $P = 0.02$  ng/mL, respectively). Serum progesterone and insulin concentrations were higher in subfertile than fertile cows ( $2.00 \pm 0.10$  vs.  $1.70 \pm 0.10$  ng/mL;  $P = 0.056$  and  $23.50 \pm 1.10$  vs.  $19.10 \pm 1.00$   $\mu$ IU/mL;  $P = 0.01$ , respectively). At the endometrial level, the subfertile cows had higher IGF1 expression on day 7 ( $1.83 \pm 0.15$  vs.  $1.25 \pm 0.15$ ;  $P = 0.03$ ) and tended to have lower PR expression ( $1.17 \pm 0.39$  vs.  $2.30 \pm 0.39$ ;  $P = 0.06$ ) and ADIPOR2 ( $1.20 \pm 0.55$  vs.  $2.77 \pm 0.55$ ;  $P = 0.06$ ) than fertile cows the same day. We conclude that in subfertile cows, changes that occur at the follicular, endocrine, and uterine levels on day 7 could be associated with alterations in early embryonic development and maternal recognition of pregnancy.

## INTRODUCCIÓN

### EFICIENCIA REPRODUCTIVA

La eficiencia reproductiva es un factor relevante en la rentabilidad de los sistemas de producción de carne (Wiltbank 1994). Los principales componentes de la misma son la edad al primer entore de las vaquillonas y la duración del anestro posparto en la vaca de cría (Lesmeister et al. 1973; Viñoles et al. 2009). Por lo tanto, el inicio (pubertad) y re-inicio (duración del anestro) de los ciclos estrales es el evento fisiológico que determina la eficiencia reproductiva.

#### Ciclos estrales y su regulación

La ocurrencia de los ciclos estrales depende de la armoniosa coordinación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario-útero. El ciclo estral consiste en una serie de eventos reproductivos que comienza con el estro y finaliza en el comienzo del estro siguiente (Figura 1). En los bovinos tiene una duración de 18 a 24 días. Estos eventos continúan a lo largo de la vida del animal y son interrumpidos por la preñez o el anestro. El ciclo estral está dividido en 2 fases. Una fase luteal que se extiende desde el día 2-3 luego del celo hasta el día 16-19 y una fase folicular que va desde la regresión del CL inducida por la prostaglandina  $F2\alpha$  hasta el día de la ovulación. Como fue descrito por Arthur (1991), estas dos grandes fases del ciclo se clasifican fisiológicamente en proestro, estro (que corresponden a la fase folicular), metaestro y diestro (que corresponden a la fase luteal; Figura 1). Cada uno de estos estadios está coordinado principalmente por 4 órganos (hipotálamo, hipófisis, ovarios y útero). Las principales hormonas involucradas en la regulación del ciclo estral son: la GnRH o factor liberador de gonadotropinas hipofisarias, secretada por el hipotálamo; la hormona folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) secretadas por la hipófisis; el estradiol (E2), la Inhibina y la progesterona (P4) producidas en el ovario y la prostaglandina  $F2\alpha$  secretada por el útero. La oxitocina secretada en la hipófisis y en el ovario y los andrógenos secretados por las células de la teca en el ovario, también juegan un papel importante en la regulación del ciclo estral (Arthur 1991).

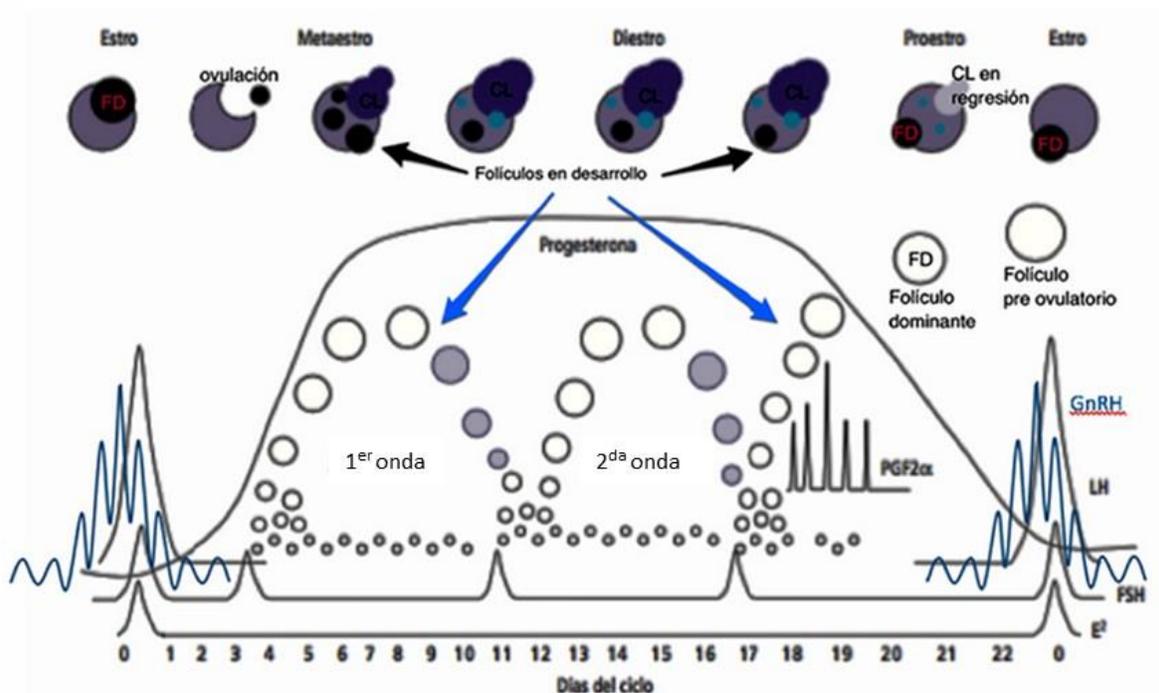


Figura 1. Ciclo estral bovino de 22 días de duración y sus diferentes fases (luteal, (metaestro y diestro); folicular (proestro y estro)) donde se describen aumentos del factor liberador de gonadotrofinas (GnRH), hormona luteinizante (LH) y estradiol (E2) al estro, inducción de la ovulación, formación del cuerpo lúteo (CL) y secreción de progesterona, su regresión inducida por la prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ), desarrollo del folículo dominante (FD) pre-ovulatorio del siguiente ciclo, estro y ovulación (Modificado de Hernández Cerón 2016).

El folículo ovárico es una parte integral del proceso reproductivo. Tiene un papel importante en el control del ciclo estral, determinando el comportamiento del estro, asegurando la competencia de los ovocitos y la tasa de supervivencia del embrión, y determinando la síntesis de P4 por el cuerpo lúteo (CL) (Diskin et al. 2003). El proceso que conduce a la formación de folículos se lleva a cabo durante la vida fetal y los animales nacen con un pool de folículos primordiales que se gastan a lo largo de su vida (Scaramuzzi et al. 2011). Los folículos primordiales se desarrollan a folículos primario, secundario, antral y preovulatorio o dominante, este proceso lleva unos 180 días (Scaramuzzi et al. 1993). Los folículos antrales y el preovulatorio son dependientes de las gonadotrofinas para su crecimiento, y son los únicos visibles mediante ultrasonografía. El desarrollo de los folículos antrales se produce de acuerdo a un patrón de ondas de crecimiento folicular (Figura 1). En los bovinos el ciclo estral está caracterizado por la presencia predominantemente de 2 ó 3 ondas de crecimiento folicular por ciclo estral (Figura 1) (Savio et al. 1988; Sirois and Fortune 1988; Ginther et al. 1989; Wolfenson et al.

2004). Cada onda folicular ocurre cada 11 días (9-14) de acuerdo a un patrón sincrónico (Wiltbank et al. 2002).

Las células tecales del folículo pre-ovulatorio producen andrógenos estimulados por la LH que en las células granulosas será aromatizado a E2 estimulado por la FSH. Luego de la ovulación las células granulosas se luteinizan y producen P4. El FF proporciona un microambiente muy importante para el desarrollo de los ovocitos. Es un producto tanto de la transferencia de constituyentes del plasma sanguíneo, que cruzan la barrera folicular, como de la actividad secretora de las células granulosas y tecales (Fortune 1994). Entre los diversos componentes del fluido folicular se encuentran: FSH y LH, prolactina, E2, P4, hormona antimülleriana, factores de crecimiento (Revelli et al. 2009). En bovinos existe una alta correlación entre el tamaño folicular y la producción de E2 por parte del folículo (Nishimoto et al. 2009). Elevadas concentraciones de E2 y alta relación E2/P4 en el líquido folicular se han asociado con un mejor crecimiento y dominancia folicular, calidad del ovocito y tasa de preñez (Revelli et al. 2009; Meikle et al. 2018).

El tamaño del folículo ovulatorio se ha asociado con un mayor tamaño del CL y una mayor producción de P4 por parte del mismo y por consiguiente una mayor tasa de preñez (Perry et al. 2007). La concentración de P4 está determinada por un balance entre su producción por el CL y el metabolismo hepático (Wiltbank et al., 2014) y por la retención por el tejido adiposo dado su naturaleza liposoluble (Rodrigues et al., 2011). Se ha descrito que la concentración de P4 circulante esta inversamente relacionada con el nivel de consumo de la dieta en ovinos (Williams y Cumming, 1982; Parr et al., 1993) y bovinos (Sangsrivong et al., 2002) y ello se debe al incremento en la tasa de metabolización hepática (Parr et al. 1993; Miller et al. 1999; Sangsrivong et al. 2002).

Para que ocurra la preñez se requiere de un buen funcionamiento del oviducto y el útero. Entre las funciones del oviducto se encuentra el transporte de espermatozoides y ovocito y la capacitación de espermatozoides, aparte de ser el lugar donde ocurre la fecundación. Además de estas funciones, se sabe que el embrión en el oviducto sufre cambios epigenéticos responsables de su desarrollo posterior, la implantación y el fenotipo posnatal (Wrenzycki et al. 2005).

Posteriormente el embrión es trasladado hacia el útero, siendo clave una buena preparación del endometrio para recibir al embrión. El endometrio sufre una serie de transformaciones en respuesta a la fluctuación de los niveles sanguíneos de las hormonas esteroideas (P4 y E2) (Hafez and Tsutsumi 1966). El E2 promueve la proliferación celular en el endometrio (Comer et al. 1998), provoca un rápido aumento en el número de células epiteliales sensibles a los esteroides y prepara el

epitelio uterino para la acción de la P4 (Maslar 1988). La P4 actúa en el útero asegurando su quiescencia, estimulando y manteniendo las funciones secretoras endometriales esenciales para el desarrollo temprano del embrión, implantación, placentación y un correcto desarrollo fetoplacentario hasta el término de la gestación (Graham and Clarke 1997).

La P4 producida por el CL pasa a la arteria ovárica mediante un mecanismo de contracorriente (Einer-Jensen and McCracken 1981), y una rama de esta arteria suministra sangre al oviducto y útero (Del Campo and Ginther 1973), lo que resulta en un gradiente de P4 a lo largo del tracto reproductivo: cuanto más cerca del CL mayor es la concentración de P4 (Weems et al. 1989). La P4 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). Las concentraciones de P4 en la fase luteal temprana (días 3-7) determinan el desarrollo embrionario y mantenimiento de la preñez (Walsh et al., 2011). El tratamiento con P4 en el ganado del día 2 al 5 (fase luteal temprana) incrementa 10 veces la elongación del embrión el día 14 (Kerbl et al., 1997; Wathes et al., 2003), mientras que un aumento más tardío en la P4 no tiene efecto marcado en el desarrollo embrionario (Garrett et al., 1988; Wathes et al., 2003).

Los niveles circulantes de P4 no necesariamente reflejan su acción a nivel del tejido donde se desarrolla su acción. La acción de la P4 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 P4 fueron mayores comparadas con las ovejas alimentadas a niveles de mantenimiento (Sosa et al., 2004). Esto se asoció con una menor expresión del receptor de P4, menor concentración de P4 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).

#### Factores que afectan la eficiencia reproductiva

Los factores exteroceptivos que afectan la reproducción en el ganado son el genotipo (Short et al. 1990), el fotoperíodo (Dahl et al. 2000), las altas temperaturas (Hansen, 2009), las señales socio-sexuales, la sanidad, el manejo y la nutrición que cumple un rol destacado. En vaquillonas y vacas la nutrición determina la homeostasis metabólica del sistema y regula la proporción de tejido adiposo y muscular. Las hormonas metabólicas secretadas por el tejido adiposo (leptina y adiponectina), el hígado (IGF1), el páncreas (insulina) y el intestino

(ghrelina) son las principales reguladoras de la función reproductiva (D'Occhio et al. 2019).

Una nutrición inadecuada lleva a un inicio tardío de la pubertad (Day et al. 1986), la inducción de anestro en vaquillonas (Rhodes et al. 1996) y un anestro posparto prolongado en vacas (Selk et al. 1988). El potencial reproductivo en las vaquillonas es programado por el ambiente metabólico durante el desarrollo fetal y posnatal temprano (programación del desarrollo) (Cardoso et al. 2018). Bajas ganancias de peso antes del destete y bajos pesos al destete están asociados con un retraso en la edad de la pubertad en el ganado de carne (Arije and Wiltbank 1971). Se ha reportado que animales que tienen altas ganancias de peso (mayor a 1 kg) tienen una mayor adiposidad y aumento de las concentraciones de hormonas metabólicas (leptina, adiponectina e IGF1) (Cardoso et al. 2014). Este perfil metabólico positivo promovería modificaciones a nivel del sistema neuroendocrino reproductivo resultando en una mayor pulsatilidad de GnRH y LH, necesarios para que ocurra la primera ovulación. En este sentido, el periodo de mayor relevancia ocurre entre los 4 y 6 meses de edad, en que un plano nutricional alto permite que las terneras alcancen la pubertad antes de los 300 días de edad (Gasser et al. 2006, 2014; Cardoso et al. 2014). Terneras que tuvieron altos planos nutricionales entre los 4 y 6,5 meses y que luego fueron sometidas a una restricción de la alimentación alcanzaron la pubertad a la misma edad que aquellas que tuvieron siempre altas ganancias de peso (Cardoso et al. 2014). Asimismo Gasser et al. (2006) reporta que terneras destetadas en forma precoz y alimentadas con una dieta alta en concentrados entre los 4 y 6,5 meses de edad alcanzaron antes la pubertad que las sometidas a la dieta control. Por otra parte, Guggeri et al. (2014) reporta que terneras que fueron sometidas a creep feeding entre los 2,5 y 5 meses de edad alcanzaron antes la pubertad que las destetadas en forma precoz o tradicional sin suplemento, reafirmando la importancia del plano nutricional en etapas tempranas de la vida.

Independientemente de la edad al primer servicio, las vaquillonas deberían llegar a un 60 a 65 % del peso vivo adulto para alcanzar la pubertad (Patterson et al. 1992). Las vaquillonas deben alcanzar 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, para un ternero vivo y queden preñadas a principios de la siguiente temporada de cría como vaca de primera cría (Larson et al., 2016).

## Hormonas metabólicas y reproducción

El crecimiento y la reproducción están regulados por el eje somatotrófico, el cual está integrado por la hormona del crecimiento (GH) y su receptor (GHR), la insulina, los factores de crecimiento insulino similares 1 y 2 y las proteínas de unión (IGFBPs 1-6) (Laron 2001)(Figura 2). El IGF1 es producido mayormente por el hígado y afecta la reproducción a nivel central (hipotálamo-hipófisis) y periférico (gónadas, tracto reproductivo y embrión). Los folículos ováricos tienen una dependencia absoluta del IGF1 para completar el crecimiento y la maduración antes de la ovulación, por lo tanto las concentraciones de IGF1 aumentan con el incremento del tamaño folicular (Spicer et al. 1988; Fortune et al. 2004). En estudios *in vitro* se ha demostrado que la suplementación con IGF1 al medio de cultivo estimula la mitosis de células granulosas y la producción de E2 y P4 (Schams et al. 1988; Glister et al. 2001). La acción luteotrófica del IGF1, que estimula la producción de P4 por parte del CL, es fundamental para el mantenimiento de la gestación (Einspanier et al. 1990; Spencer et al. 2007). Se ha descrito que la P4 regula la expresión de varios genes y proteínas en el oviducto y útero incluyendo el IGF1, insulina, leptina y adiponectina (Sosa et al. 2010; Dobrzyn et al. 2018)

El endometrio es sensible a los cambios nutricionales, en etapas tempranas de la vida del animal y en respuesta a un cambio nutricional en la vida adulta. El IGF1, secretado en forma endócrina por el hígado y parácrina por el útero, es uno de los principales factores que estimulan el desarrollo embrionario (Wathes et al. 1998; Watson et al. 1999; Figura 2). Se ha reportado que la adición de insulina e IGF1 al cultivo *in vitro* de embriones bovinos tuvo efectos positivos en el desarrollo de los mismos (Matsui et al. 1997). La concentración de IGF1 y la expresión de su receptor están afectadas por la nutrición. Terneras bien alimentadas entre los 2 y 5 meses de edad tienen mayores concentraciones circulantes de IGF1 (Guggeri et al. 2014) y a los 24 meses de edad presentan una mayor expresión endometrial de IGF1R que las alimentadas en planos nutricionales más bajos. La insulina también tiene un rol importante en la regulación del crecimiento embrionario durante la preimplantación, promoviendo la proliferación celular y la diferenciación morfológica de embriones, ya que se ha descrito la presencia de receptores de insulina tanto en el endometrio como en el embrión (Gardner and Kaye 1991; Harvey and Kaye 1991).

Por otra parte, el tejido adiposo es un órgano que responde a los nutrientes y a la demanda de energía secretando adipoquinas: adiponectina y leptina; las cuales tienen un rol fundamental en la reproducción (Tersigni et al. 2011)(Figura 2). 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). La leptina está asociada positivamente con la cantidad de tejido adiposo y el nivel de ingesta, mientras que la adiponectina tiene una asociación negativa (Dupont et al. 2014a). La leptina es una hormona proteica codificada por el gen de la obesidad (*ob*) y se ha propuesto como el factor que vincula el estado metabólico con la reproducción (Barash et al. 1996; Zieba et al. 2005). Esta hormona afecta el eje reproductivo central a través de sus propios receptores (Tartaglia et al. 1995) y un neurotransmisor, el neuropéptido Y (NPY) (Kalra and Crowley 1992). El NPY se ha propuesto como principal mediador de la acción de la leptina en el hipotálamo para regular la LH (Kalra and Crowley 1992). Por otra parte la leptina también puede modular la reproducción directamente a nivel gonadal (Spicer and Francisco 1997). Los receptores de leptina están presentes en el ovario, donde modula la esteroidogénesis (Spicer 2001) y mejora la capacidad del ovocito para sostener el desarrollo embrionario (Boelhauve et al. 2005). En estudios *in vitro* con células luteales la leptina (en presencia de IGF1) promueve la producción de P4 (Nicklin et al. 2007). Sin embargo, en las células granulosas inhiben la esteroidogénesis (Spicer and Francisco 1997). En el endometrio se ha reportado una mayor sensibilidad a esta hormona los días 12 y 19 del ciclo estral, lo que podría sugerir un papel clave de la leptina en la preparación del ambiente uterino para sostener la preñez (Sosa et al. 2010).

Respecto a la adiponectina, los niveles de la misma están inversamente correlacionados con el grado de adiposidad y positivamente con la sensibilidad a la insulina (Dupont et al. 2014a). La hormona ejerce su acción a través de sus receptores: ADIPO R1 y R2 (Figura 2). Se ha descrito que los mismos se encuentran en diversos órganos como el hipotálamo e hipófisis (Psilopanagioti et al. 2009), el ovario (Maillard et al. 2010), oviducto (Archanco et al. 2007; Graña et al., 2019), endometrio (Astessiano et al. 2017; Graña et al., 2019), embriones (Maillard et al. 2010), placenta (Palin et al. 2012) y tejido mamario (Ohtani et al. 2011). La expresión de los receptores de adiponectina puede variar de acuerdo al estado nutricional. Vacas lecheras que tienen un mejor balance energético (multíparas vs primíparas y sometidas a altos vs bajos planos nutricionales) tienen una mayor expresión de adipo R1 y R2 en el útero (Astessiano et al. 2017).

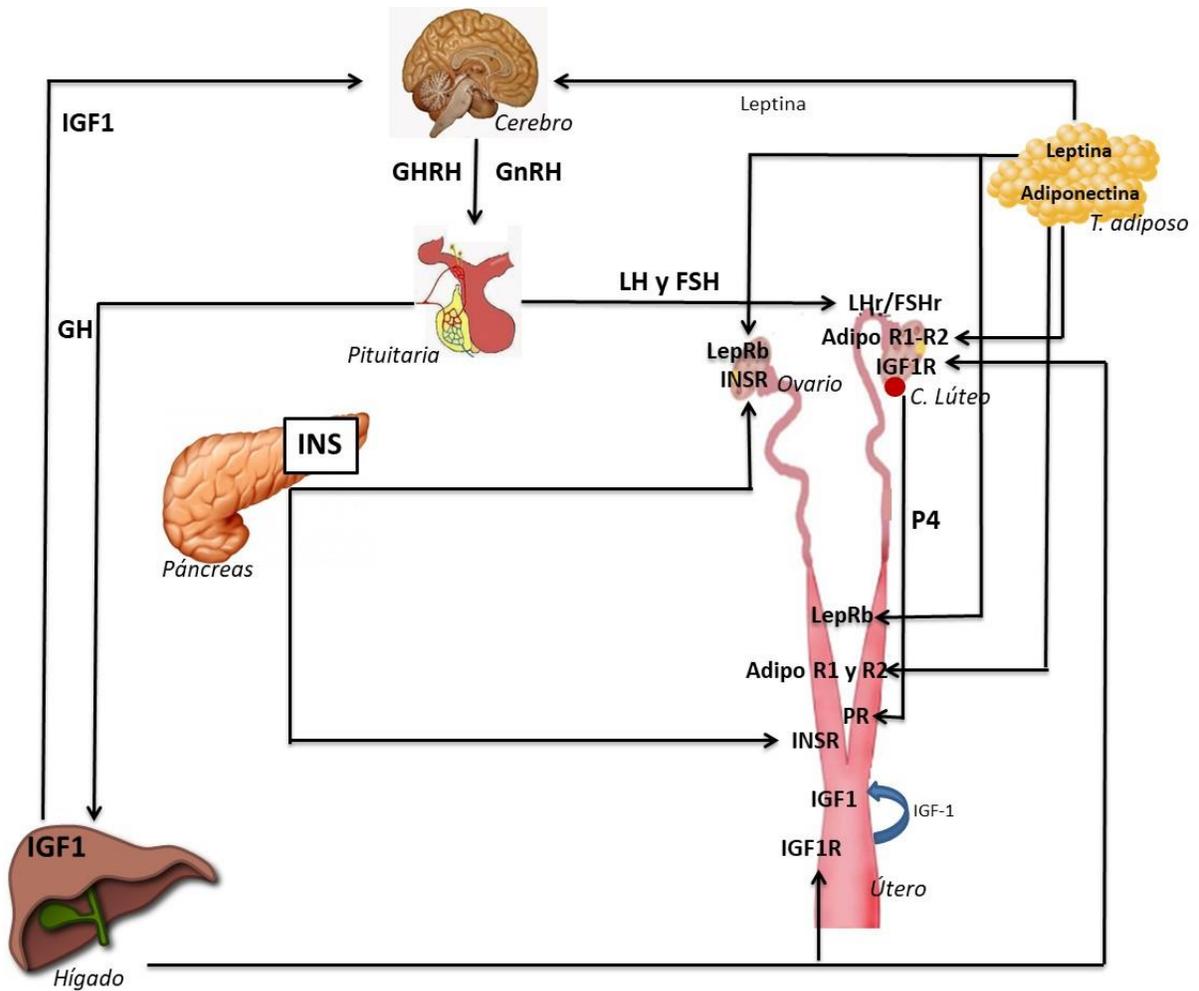


Figura 2. Esquema que describe la ruta clásica de regulación del eje reproductivo y su interacción con el metabolismo. A nivel central (cerebro), la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), estimula la liberación de las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) por la hipófisis que actúan a nivel ovárico y los esteroides ováricos (representada solamente la progesterona (P4) secretada por el cuerpo lúteo) actúan a nivel uterino. A nivel central el factor liberador de hormonas de crecimiento (GHRH) actúa a nivel hipofisario para estimular la liberación de hormona del crecimiento (GH) que a nivel hepático estimula la producción del factor de crecimiento insulino similar 1: IGF1), el tejido adiposo produce adipoquinas (leptina-adiponectina) y el páncreas produce insulina. Estas hormonas metabólicas actúan a nivel central y del tracto reproductivo (ovarios-útero) donde se expresan sus receptores específicos LHr= receptor de LH; FSHr= receptor de FSH; Lep Rb= forma larga del receptor de Leptina, Adipo R1 y R2= receptores de adiponectina, IGF1R= receptor de IGF1; INSR= receptor de insulina, PR= receptor de P4 (Modificado de Meikle et al., 2018).

## EFICIENCIA REPRODUCTIVA DE LA VACA DE CRÍA EN SISTEMAS PASTORILES

La variabilidad estacional en la producción de forraje del campo natural determina que los animales criados en sistemas pastoriles estén sometidos a sucesivos períodos de balance energético negativo (Alvez 2014; Do Carmo et al. 2016). Por este motivo, es importante hacer coincidir los momentos de mayores requerimientos de las vacas de cría con la producción de forraje del campo natural (Do Carmo et al. 2016, 2018). Por lo tanto, una de las definiciones más importantes de un sistema criador es la fecha y duración del entore, que en nuestras condiciones de producción coincide con finales de la primavera y verano (Figura 3). Esta definición permite que los partos ocurran en primavera, estación de mayor producción de forraje, lo que estimula la producción de leche y el crecimiento de las terneras (Berretta et al. 2000; Amundson et al. 2006). Sin embargo, la variable disponibilidad de nutrientes del verano, que coincide con un aumento en los requerimientos de las terneras y una caída en la producción de leche de las vacas, desacelera su crecimiento, lo que redundará en bajos pesos al destete (Viñoles et al. 2009). Bajos pesos al destete prolongan la duración de la recría de las vaquillonas, retrasan el inicio de la pubertad y afectan negativamente su performance reproductiva en el rodeo de cría (Schillo 1992; Roberts et al. 2017). Vaquillonas con menor crecimiento y desarrollo se preñan más tarde, y repiten ésta característica a lo largo de su vida, lo que determina su baja productividad y longevidad en el rodeo de cría (Cushman et al. 2013). Por lo tanto, la característica de preñarse temprano durante el período de servicios (primeros 21 días), que está asociada a planos nutricionales adecuados, debe ser priorizada ya que está altamente relacionada a su fertilidad futura (Cushman et al. 2013).

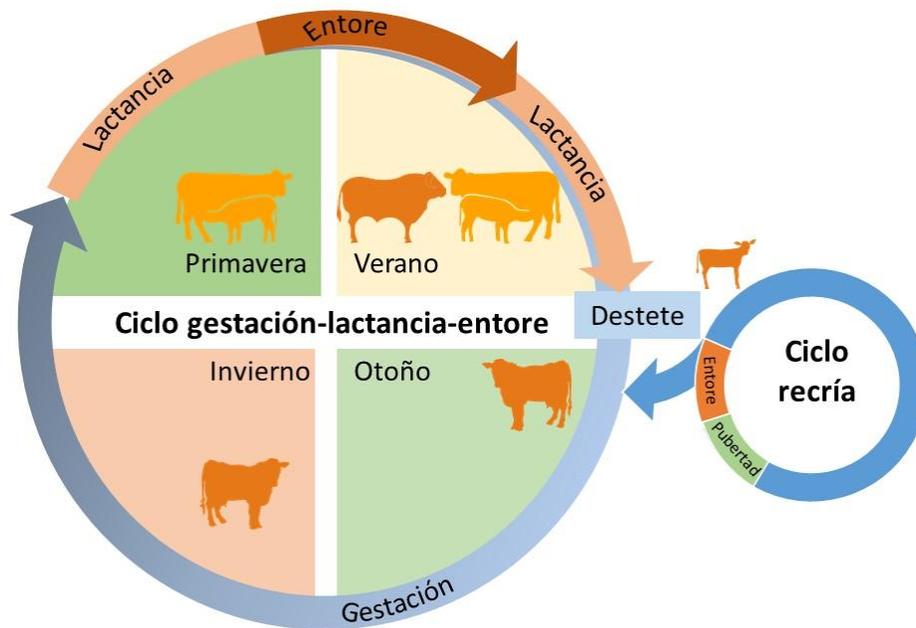


Figura 3. Ciclos de gestación-lactación-entore y recría en sistemas criadores pastoriles, en coincidencia con las estaciones del año. La definición de la fecha y duración del entore (fines de primavera-verano) y el destete al inicio de otoño son clave, para permitir la recuperación de las reservas corporales de la vaca, una pérdida controlada durante el invierno y retener reservas hasta la primavera (parto), para iniciar la lactancia y reiniciar los ciclos estrales al inicio del entore. El peso al destete de las terneras y su ganancia en el ciclo de cría, determinan la edad a la pubertad y número de ciclos estrales que están altamente asociados con la preñez en los primeros 21 días de entore y su permanencia en el rodeo de cría.

## SUBFERTILIDAD

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). La subfertilidad reduce la producción y la eficiencia económica en todos los sistemas de producción de carne y leche en rumiantes (Diskin and Morris 2008). En el ganado de carne se estima que las tasas de fecundación son del 90 %, mientras que las tasas de parición para un solo servicio están entre 40 y 55 %, lo que sugiere una tasa de mortalidad embrionaria/fetal (excluyendo la falla de la fecundación) de

aproximadamente 35% a 50 % (Diskin et al. 2006). La mayoría de las pérdidas embrionarias (70-80%) ocurre en los primeros 21 días de gestación, particularmente entre los días 7 y 16 (Berg et al. 2010). En la mayoría de los casos, las mismas pasan inadvertidas, ya que las vacas retornan al estro en un período equivalente a la longitud normal del ciclo estral (Hernández Cerón and Zarco Quintero 1998), y se caracterizan por la repetición de estros. En la industria lechera mundial, la vaca repetidora o subfétil ha sido intensamente estudiada, debido al impacto de las pérdidas en la producción de leche, los costos de semen y mano de obra involucrados en el manejo (Albihn, 1991). Sin embargo, en los rodeos de ganado para carne con largos períodos de entore (60-90 días), la repetición de estros no es notada por el productor (Maurer and Chenault 1983) por lo que ésta temática no ha sido abordada por la investigación.

La mayoría de los estudios sobre subfertilidad en ganado lechero 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). Se han reportado concentraciones suprabasales de P4 durante el período periovulatorio que 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 P4 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).

En el FF, las concentraciones de hormonas esteroideas (E2 y P4) y su relación son indicativas del estado de salud del ovocito. Un ambiente folicular con predominancia de E2 está asociado con un buen crecimiento folicular, tiene efectos anti-atresicos (Revelli et al. 2009) y promueve una mejor maduración citoplasmática de los ovocitos (Tesarik and Mendoza 1997). Por lo tanto, sería esperable encontrar mayores concentraciones de P4 y una menor relación E2/P4 en el FF de vacas repetidoras, que expliquen las alteraciones en el ovocito y desarrollo embrionario temprano. Sin embargo, los resultados de diferentes autores son contradictorios. Se ha descrito que las vacas repetidoras tuvieron mayores concentraciones de E2 y mayor relación E2/P4 en FF que el grupo control, pero similares concentraciones de P4 (Sood et al. 2017). Otros autores reportan similares concentraciones de E2 y P4 en el FF de vacas repetidoras y el grupo control, pero mayores concentraciones de IGF1 y glucosa en las vacas control respecto a las vacas repetidoras (Mogheiseh et al. 2019). Kafi et al. (2017) reportaron similares concentraciones de E2 y P4 en FF, pero menores tasas de maduración nuclear, fecundación y producción de blastocistos cuando se le adicionó al medio de cultivo FF de vacas repetidoras. Por lo tanto, las

concentraciones diferenciales de IGF1 y glucosa podrían explicar las diferencias observadas en desarrollo embrionario *in vitro*.

Existen pocos trabajos que estudien las concentraciones de P4 durante la fase luteal del ciclo estral y los hallazgos son también contradictorios. Algunos autores describen que no existieron diferencias en la concentración de P4 y el número de ondas foliculares entre vacas subfértiles y vaquillonas vírgenes durante la fase luteal del ciclo (Båge, 2002; Killen et al., 2014). Por otra parte Cummins et al. (2012) reportan en vacas fértiles un mayor volumen luteal asociado a mayores concentraciones de P4 y menor número de ondas foliculares durante el ciclo respecto a vacas subfértiles. Sin embargo, Cox et al. (1998) describen similares concentraciones de P4 a lo largo del ciclo estral en vacas de alta o baja fertilidad. Por lo tanto, se sugiere que las diferencias entre los grupos no se encuentran a nivel ovárico, sino que se atribuyen a una falla en el mecanismo involucrado en el desarrollo del concepto y el reconocimiento materno de la preñez en las vaquillonas de baja fertilidad.

Minten et al. (2013) reportan que vacas de alta fertilidad tendieron a tener una mayor tasa de preñez respecto a las subfértiles y observaron un patrón de expresión génica uterina diferencial entre los grupos. Las vacas de alta fertilidad tuvieron mayor expresión de genes asociados a: la señalización celular y el metabolismo uterino, la unión y traducción del ARN respecto a las subfértiles. Killen et al. (2014) comparando vacas de alta o baja fertilidad, observaron que 419 genes estaban diferencialmente expresados en muestras de endometrio extraídas al día 7. En los animales subfértiles se observó que genes relacionados a la inhibición de la proliferación celular, al metabolismo de la P4 y a la respuesta inflamatoria están regulados hacia arriba mientras los genes implicados en la angiogénesis, el metabolismo lipídico y la morfología y desarrollo celular están regulados hacia abajo. Sin embargo, no existen reportes de la expresión génica ni de receptores de hormonas metabólicas en el endometrio de vacas fértiles y subfértiles, a pesar de que la subfertilidad nutricional es la más frecuente en sistemas de producción pastoriles.

## ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La baja eficiencia reproductiva en los sistemas de cría extensivos, es altamente dependiente del balance energético de las terneras durante el período pre y pos-destete y de las vacas durante los ciclos de gestación y lactancia (Viñoles et al. 2009). La nutrición tiene efectos de corto, mediano y largo plazo sobre el metabolismo de los animales, particularmente en su fase exponencial de crecimiento, que pueden programar el funcionamiento del eje somatotrófico y tener implicancias en la eficiencia reproductiva futura, a pesar de que los animales tengan el mismo desarrollo corporal y peso vivo al momento del servicio (Guggeri et al. 2012, 2014). Alvez (2019) observó que la subfertilidad en vacas para carne está asociada con diferencia en los patrones de crecimiento en la etapa juvenil que redundaron en cambios en las concentraciones de hormonas esteroideas y metabólicas en la etapa de madurez. Esta subfertilidad nutricional estuvo asociada con mayores concentraciones de P4 circulante, pero menores concentraciones de IGF1 y adiponectina en las vacas subfértiles respecto a las fértiles cuando ya no existían diferencias en peso vivo.

Sin embargo, desconocemos el efecto de la subfertilidad sobre las concentraciones de hormonas esteroides y metabólicas en el fluido folicular y su expresión génica a nivel endometrial, donde cumplen un rol fundamental en la calidad del ovocito y el desarrollo embrionario temprano (Sosa et al. 2004b; Scaramuzzi et al. 2006; Viñoles et al. 2012a).

## HIPÓTESIS

La subfertilidad induce modificaciones en el microambiente folicular en el que se desarrolla el ovocito, en las concentraciones de hormonas metabólicas y esteroides circulantes y en la expresión génica de las mismas y de sus receptores a nivel uterino.

## OBJETIVOS

Evaluar en vacas Hereford fértiles y subfértiles:

1. El desarrollo y estado de salud de los folículos en la fase folicular del ciclo estral *in vivo* e *in vitro*.
2. Las concentraciones circulantes de progesterona y hormonas metabólicas (insulina, IGF1, leptina y adiponectina) durante el ciclo estral.
3. La concentración de hormonas (estradiol, progesterona e IGF1) en FF.
4. La expresión génica endometrial de los receptores de progesterona (*PR*), IGF1 (*IGF1R*), insulina (*INSR*), receptor tipo B de leptina (*LEPRb*) y receptor tipo 2 de adiponectina (*ADIPOR2*) los días 7 y 16 del ciclo estral.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento fue aprobado por el Comité de Ética en el Uso de Animales de Experimentación (CEUA) de Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) con el número de Registro 0009/11 y se realizó en las estaciones de investigación "Glencoe" (S31 °, W42 °) y "Sede" (S 31 °, W 55°) del INIA (Tacuarembó, Uruguay). El experimento involucró a hembras Hereford desde el nacimiento (2005, n=92) hasta los 114 meses de edad (2015, n=11).

### Clasificación de las vacas en fértiles y subfértiles

La estrategia experimental de largo plazo (Figura 4) y la descripción de la selección de los animales fue descrita anteriormente por Alvez (2019). Brevemente, la selección de los animales comenzó a partir de un grupo de 92 vaquillonas Hereford de 24 meses de edad con un peso promedio de  $309 \pm 9,4$  kg y una condición corporal de  $4,8 \pm 0,1$  unidades (escala 1 a 8 unidades) (Vizcarra et al. 1986). Ochenta y cuatro vaquillonas que estaban ciclando fueron sincronizadas

con prostaglandina, de las cuales 38 (45%) se preñaron a la primera inseminación artificial a celo visto (IA) y de allí se seleccionó al azar un subgrupo de vaquillonas denominadas fértiles (n=9). En las 46 vaquillonas restantes se continuó haciendo IA hasta completar tres servicios, durante los cuales se preñaron 11 vaquillonas más (29%). De las 35 vaquillonas restantes, las que mostraron celo a intervalos regulares de 17 a 24 días y no se preñaron luego de las tres IA (pero se preñaron en el repaso con toro, n=19) se seleccionaron al azar un subgrupo de vaquillonas denominadas repetidoras (n=8). De las vaquillonas que habiendo presentado celo a intervalos regulares durante el período de IA no se preñaron en el repaso con toros (n=16) se seleccionó al azar un subgrupo denominadas infértiles (n=8). Al final del primer período de servicios habían preñadas 68 vaquillonas (81%). Las vacas de los grupos fértiles y repetidoras que quedaron preñadas parieron, se les realizó destete precoz a sus terneros y fueron alimentadas en forma diferencial para alcanzar el mismo peso vivo que las vacas que no parieron (40 a 50 meses de edad). A partir del momento que se igualaron los pesos de las vacas paridas y las que no parieron (grupo infértiles) se comenzaron a manejar nuevamente como un único grupo experimental (50 a 60 meses). Las categorías de fertilidad fueron redefinidas a los 77 meses de edad, una vez finalizado el segundo período de servicios que se extendió de los 60 a los 76 meses de edad, el cual consistió en cinco servicios (tres por inseminación artificial y dos por monta natural). Durante éste período, se indujo el aborto con prostaglandina en las vacas que fueron diagnosticadas gestantes luego de cada servicio, dejando un intervalo de 2-3 semanas para su recuperación antes de iniciar el siguiente servicio. Las vacas fueron clasificadas en: 1) fértiles: aquellas preñadas a la primera IA a los 24 meses de edad, y en al menos tres ocasiones durante el segundo período de servicios; y 2) subfértiles: aquellas que a los 24 meses se preñaron al cuarto o quinto servicio o no se preñaron al final del período, pero se preñaron una o dos veces durante el segundo período de servicios. A los 90 meses de edad se realizó un primer experimento con 11 de estos animales (n=5 fértiles y n=6 subfértiles), donde se describió su trayectoria de crecimiento desde el nacimiento hasta la etapa de madurez y la dinámica folicular, los perfiles endócrinos y la composición corporal en la etapa de madurez (Figura 4; Alvez 2019).

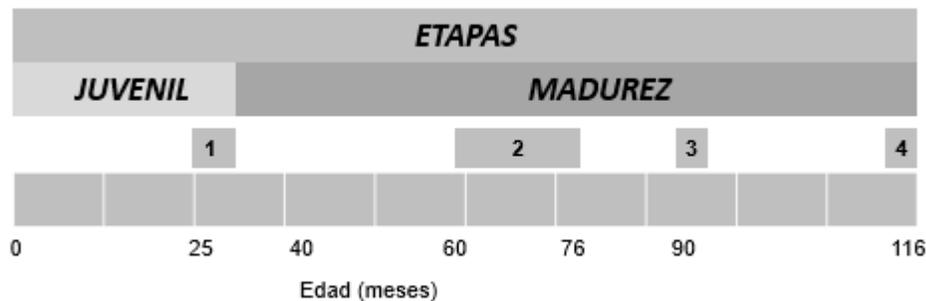


Figura 4. Descripción del diseño experimental longitudinal realizado para seleccionar a los 77 meses de edad a los grupos de vacas fértiles (n=5) y subfértiles (n=6). Se describe una Etapa Juvenil (0 a 29 meses de edad) y una de madurez (30 a 116 meses de edad). A los 116 meses de edad se realizó la caracterización endócrina y de las estructuras ováricas y la expresión génica endometrial 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, 4= Descripción del desarrollo folicular *in vivo* e *in situ*, caracterización endócrina y expresión génica endometrial a los 116 meses de edad. Entre los períodos 1 y 2 se permitió recuperar peso a las vacas de los grupos fértiles y repetidoras que parieron.

#### Animales y diseño experimental

A los 116 meses de edad se realizó un examen ginecológico y se seleccionaron 10 vacas (fértiles n=5; subfértiles n=5) que no presentaban anomalías (una vaca subfértil fue eliminada). En la Figura 5 se presenta el esquema temporal del diseño experimental. Para una mejor sincronización del momento de la ovulación se aplicó un protocolo de inseminación a tiempo fijo que comenzó (día -11, Figura 5) con la colocación de un dispositivo intravaginal con progesterona (CIDR, Prociclar®, Zoovet, Argentina). A los 7 días (día 4) se retiró el dispositivo y se aplicó 150 µg de cloprostenol dextrógiro (PG, Dalmaprost®, Fatro, Italia) vía intramuscular. A las 48 h (día -2) se inyectaron 8 µg de un análogo sintético de hormona liberadora de gonadotropina (Acetato de Buserelina, GnRH, Gonaxal®, Biogénesis Bago, Argentina) y se comenzó a observar los animales cada 12 h en búsqueda de signos de estro.

Para evaluar el crecimiento del folículo preovulatorio y determinar el momento de la ovulación (día 0) se realizó un monitoreo ovárico por ultrasonografía (Agroscan,

Echo Control Medical, Francia con transductor lineal de 7,5 MHz) cada 12 h a partir del retiro del CIDR y hasta la ovulación (desaparición del folículo dominante). Los ovarios fueron escaneados en los planos dorsoventral y lateromedial. Se estudiaron todos los folículos antrales  $\geq 2$  mm de diámetro. Estos fueron medidos y dibujados manteniendo su localización relativa en mapas individuales, para la posterior identificación del folículo dominante y su subordinado en base a la posición y el diámetro de los mismos.

Desde el día anterior (día -1) a la ovulación hasta el día 16 del ciclo estral se realizó la extracción de sangre diariamente para determinar concentraciones de progesterona, insulina, IGF1, leptina y adiponectina. La extracción de sangre se realizó utilizando tubos BD Vacutainer® de 6mL (Becton Dickinson, NJ, USA) con agujas estériles, mediante venopunción yugular. Las muestras se mantuvieron refrigeradas y luego fueron centrifugadas por 10 min a 1500 g. El suero se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior procesamiento.

En los días 7 y 16 del ciclo estral se realizaron biopsias endometriales del cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo (verificado previamente por ecografía ovárica) para el análisis de expresión génica acorde a la metodología descrita previamente por Meikle et al. (2001). Se seleccionó el día 7 porque es el día previo a la eclosión del blastocisto y el día 16 porque es el día previo al reconocimiento materno de la preñez. Las muestras endometriales fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para el posterior aislamiento de ARN total. Luego de la biopsia realizada el día 7 a todos los animales se les administró un concentrado energético-proteico, granos de destilería secos con solubles (DDGS= distillers dried grain with solubles) de maíz al 0,7% del peso vivo por animal.

Aproximadamente a los 15 días de la última biopsia las vacas fueron sincronizadas nuevamente para la realización de una ovariectomía durante la fase folicular del ciclo y evaluar el desarrollo y estado de salud de los folículos así como determinar la concentración de hormonas en FF. Las vacas fueron sincronizadas con dos dosis de 225  $\mu\text{g}$  de cloprostenol dextrógiro (PG, Dalmaprost®, Fatro, BO, Italia) con un intervalo de 13 días (Figura 5). Se utilizó esta hormona a altas dosis para promover la lisis del cuerpo lúteo en vacas subfértiles y el desarrollo del folículo pre-ovulatorio (Ahmed et al. 2016). La segunda dosis de PG se administró en forma escalonada, cada 2 horas, en grupos de dos vacas (una de cada grupo experimental). La ovariectomía se realizó a las 30 hs de administrada la segunda dosis de PG. Al momento de la ovariectomía se extrajo sangre para confirmar que todos los animales estuvieran en la fase folicular del ciclo, a través del análisis de las concentraciones de progesterona en suero. La ovariectomía se realizó transvaginalmente utilizando el castrador de cadena de Chassignac de acuerdo

con la técnica descrita previamente (Dutto 1981). El procedimiento se realizó con anestesia epidural craneal con lidocaína al 2% (Laboratorio Ripoll, Montevideo, Uruguay). Brevemente, para el procedimiento se higienizó y desinfectó con iodopovidona (dilución 1/100) la zona perineal, vulvar y vaginal, para después introducir el expansor de Dutto con el fin de tensar el techo de la vagina y hacer una incisión longitudinal. Posteriormente, se introdujo el castrador, se localizó un ovario y se lo introdujo en la vagina para fijarlo dentro de la abertura que forma la cadena del castrador y así producir la laceración del cordón ovárico. Se procedió de igual manera con el otro ovario. Los ovarios colectados fueron sumergidos en medio M199 (20 mM, pH 7.2, Sigma-Aldrich, US) y transportados al laboratorio para su disección. El intervalo promedio entre la castración y la disección fue de 30 min.

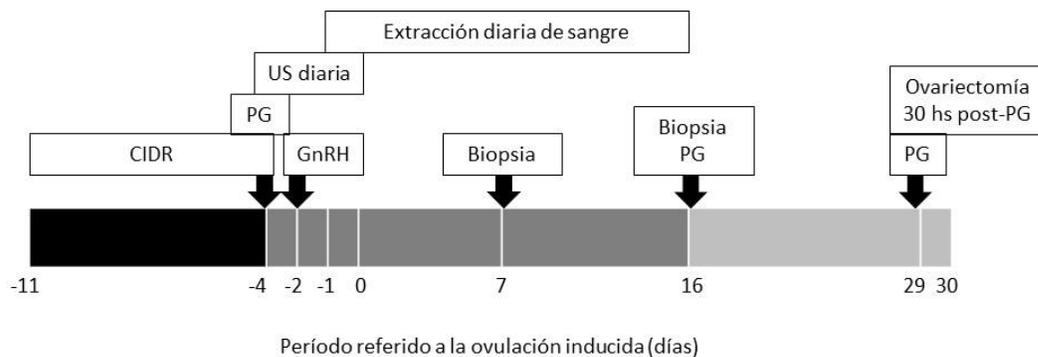


Figura 5. Diseño experimental realizado en vacas fértiles (n=5) y subfértiles (n=5) a los 116 meses de edad. El objetivo del primer protocolo aplicado del día -11 al -4 fue sincronizar la ovulación (Día =0) para realizar las biopsias uterinas los días 7 y 16 pos-ovulación. El objetivo del segundo protocolo aplicado los días 16 y 29, fue promover la lisis del cuerpo lúteo y realizar la ovariectomía (30 horas pos-segunda PG) durante la fase folicular inducida. CIDR: colocación de un dispositivo intravaginal de liberación de progesterona controlada por 7 días, PG= administración de prostaglandina el día de retiro del CIDR (150 µg) y los días 16 y 29 (225 µg). US: ultrasonografía ovárica desde el retiro del CIDR hasta que se determinó la ovulación GnRH: administración de hormona liberadora de gonadotropinas.

#### Disección de ovarios y evaluación de folículos

Los ovarios fueron pesados individualmente en una balanza (AS 60/220/C2. Calibración 60 g x 0,01, Radwag, Miami, USA). Los 5 folículos de mayor diámetro en cada ovario fueron disecados y evaluados individualmente utilizando lupa estereoscópica (Eclipse E200; Nikon Instruments, Melville, USA). Se registró el

tamaño de los folículos y se realizaron evaluaciones individuales en relación al estado de atresia y conteo de células de la granulosa (Cámara de Neubauer, USA). Asimismo, para cada folículo por separado se colectó FF, el mismo fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento para la determinación de hormonas. Los procedimientos de disección, colecta de FF, recuperación y conteo de las células de la granulosa y obtención de los ovocitos se realizaron de acuerdo con los protocolos descritos (McNatty et al. 1984). Brevemente, para evaluar el estadio de atresia fueron considerados los siguientes factores: presencia/ausencia de vascularización en la teca folicular, presencia/ausencia de restos celulares en el FF; presencia/ausencia y estado de salud del ovocito (saludable, degenerado), número de células de la granulosa y color de la teca interna (blanca=1, rosada=2 o roja=3). En uno de los animales del grupo subfértile no fue posible diseccionar folículos, dado que eran muy pequeños, por lo tanto en las características foliculares presentadas en los resultados este animal no fue tenido en cuenta.

#### Determinación de hormonas en suero y fluido folicular

La determinación de la concentración de hormonas se realizó en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal de la Facultad de Veterinaria (UDELAR).

Las concentraciones de P4 en suero se analizaron en duplicado en un solo ensayo de radioinmunoensayo (RIA) de fase sólida (COAT-A-COUNT Progesterone, SIEMENS, Los Angeles, USA). La sensibilidad del ensayo fue de 0,05 ng/mL con un CV intraensayo para el control bajo (0,86 ng/mL) de 26,6 % y para el control alto (18,2 ng/mL) de 9,9 %. Las concentraciones de P4 en suero el día de la ovariectomía se analizaron en forma simple en un solo ensayo, con el kit mencionado anteriormente. La sensibilidad del ensayo fue de 0,07 ng/mL con un CV intraensayo para el control bajo (0,93 ng/mL) de 16,7 % y para el control alto (4,5 ng/mL) de 20,4 %. Las concentraciones de insulina e IGF1 se midieron utilizando ensayos inmunoradiométricos (IRMA) con kits comerciales (INS-IRMA, DIA Source Immuno Assays S.A, Bélgica e IGF1-RIACT Cis Bio international, GFSUR-YVETTE CEDEX, Francia; respectivamente). Para insulina todas las muestras se determinaron en forma simple en un solo ensayo. El límite de detección fue 4,45  $\mu\text{IU/mL}$  y los CV intraensayo para el control 1 (19,8  $\mu\text{IU/mL}$ ) y 2 (67,7  $\mu\text{IU/mL}$ ) fue 10,8 y 7,2 %, respectivamente. Para determinar IGF1 en suero las muestras fueron analizadas en dos ensayos en forma simple. El límite de detección del ensayo fue de 0,5 ng/mL, y los CV intraensayo para el control bajo (53,3 ng/mL) y el control alto (407,0 ng/mL) fueron 7,9 y 9,5 %, respectivamente. Los CV interensayo fueron 11,8 y 11,4 % para el control bajo y alto, respectivamente. Las concentraciones de leptina se determinaron en forma simple en un solo ensayo mediante RIA en fase líquida, utilizando el kit comercial Multi-

Species RIA kit (RIA kit, Millipore, US). La sensibilidad del ensayo fue de 3,68 ng/mL. Los CV intraensayo para el control bajo (8,29 ng/mL) y el control alto (54,0 ng/mL) fueron 12,1 y 11,3 %, respectivamente. Las concentraciones de adiponectina fueron determinadas en forma simple en un solo ensayo de RIA usando el kit comercial (HADP-61 HK, Linco, Millipores, US). La sensibilidad del ensayo fue de 2,54 ng/mL. Los CV intraensayo para el control bajo (5,27 ng/mL) y el control alto (73,5 ng/mL) fueron 10,0 y 13,0 %, respectivamente.

Para determinar la concentración de hormonas (P4, E2, e IGF1) en el FF, se realizaron diluciones 1/10 (folículos dominantes) y 1/5 (resto folículos) y la concentración final se determinó realizando la corrección por el factor de dilución correspondiente. En el FF la concentración de P4 se determinó en forma simple en un solo ensayo con una sensibilidad de 0,07 ng/mL, siendo el CV intraensayo para el control bajo (0,83 ng/mL) de 20,1 % y para el control alto (4,96 ng/mL) de 15,1 %. Las concentraciones de E2 en FF se midieron en forma simple en un solo ensayo mediante RIA en fase líquida (E2 Double Antibody, MPBiomedicals, US). La sensibilidad del ensayo fue 9,7 pg/mL con un CV intraensayo para el control bajo (10,85 pg/ml) de 10,1 %, para el control medio (29,0 pg/ml) 22,4 % y para el control alto (107,5 pg/ml) 8,0 %. El análisis de IGF1 en FF se realizó en forma simple en un solo ensayo con un límite de detección de 0,9 ng/mL. Los CV intraensayo para el control bajo (47,4 ng/mL) y el alto (404,9 ng/mL) fueron 12,4 y 4,8 %, respectivamente.

#### Extracción de ARN y PCR cuantitativo en tiempo real.

Se extrajo ARN total de las muestras de endometrio utilizando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguido de una precipitación selectiva con cloruro de litio. La concentración de ARN se determinó por medición de la absorbancia a 260 nm y la pureza a partir de la relación de la absorbancia 260/280 nm y 260/230 nm (NanoDrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific Wilmington, DE U. S). El ARN extraído se conservó a -80°C hasta su procesamiento. Para cada muestra se sintetizó ADN copia (ADNc) mediante transcripción reversa usando el kit SuperScript III (Invitrogen, Carlsband, CA, US) con primers oligo-dT (Invitrogen, Carlsband, CA, US) y 1 µg de ARN total añadido como molde. El ADNc se diluyó a una concentración final de 10 ng/µL en agua DEPC y se almacenó a -20 °C hasta su posterior procesamiento. Se determinó la expresión génica mediante PCR cuantitativo en tiempo real, utilizando discos de 72 muestras del equipo Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Sciences, Sydney, Australia). Los genes de interés evaluados fueron: *IGF1*, *receptor de IGF1 (IGF1R)*, receptor de insulina (*INSR*),

receptor tipo B de leptina (*LEPRb*), receptor tipo 2 de adiponectina (*ADIPOR2*) y receptor de progesterona (*PR*). Como control endógeno se utilizaron los genes: proteína ribosomal S9 (*RPS9*) e hipoxantina fosforribosiltransferasa (*HPRT*). Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  que incluyó: 2  $\mu\text{L}$  de ADNc diluído, 300nM de cada primer (Macrogen Inc., Seoul, Korea) y 10  $\mu\text{L}$  de 2x QuantiNova<sup>TM</sup> SYBR Green® qPCR Master Mix (QIAGEN, Germany). Las condiciones estándar de amplificación para todos los genes fueron: 10 min a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 seg a 95°C, 45 seg a 60°C y 20 seg a 72°C (Astessiano et al. 2017). En cada disco y para cada gen se incluyó un pool en triplicado de ADNc de todas las muestras analizadas como control exógeno y controles sin ADNc como control negativo. Asimismo, se incluyó una curva de 5 puntos de dilución del pool de ADNc (100 a 6.25 ng/uL) para estimar, mediante regresión lineal, la eficiencia de amplificación (E) de cada gen (genes de interés y de control endógeno) y realizar la normalización de los resultados para la posterior cuantificación. Todas las muestras se corrieron por duplicado. La eficiencia de amplificación fue calculada por el software del equipo RotorGene, de acuerdo a la fórmula  $E = (10^{-1/\text{slope}-1})$  (Rutledge and Cote 2003). Las eficiencias de amplificación de los genes (de interés y de control endógeno) estuvieron en un rango de 1 a 1,09. Los coeficientes de variación (CV) intraensayo fueron  $\leq 2\%$ . A partir de los datos de cuantificación (valor Ct, *threshold cycle*) obtenidos para todos los genes y la muestra pool se midió la expresión de los genes de interés por cuantificación relativa al control exógeno y normalizada a la media geométrica de los genes de control endógeno, tomando en consideración las eficiencias de amplificación respectivas (método  $\Delta\Delta\text{Ct}$ ) (Pfaffl 2001). En la Tabla 1 se presenta la información de los primers utilizados que fueron previamente diseñados (Astessiano et al. 2017).

Tabla 1. Primers utilizados para la cuantificación de cDNA de los genes objetivo y control endógeno

Gen	Número de acceso	de	Secuencia (5'3')	Tamaño del amplicón (pb)	Eficiencia
<i>IGF1</i>	XM_612412		F: CCAGACAGGAATCGTGGATG R: ACTTGCGGGCTTGAGAG	89	1,03
<i>IGF1R</i>	NM_001244612		F: GACCATCAAAGCTGGGAAAA R: TTATGTCCCTTTGCTCTGG	116	1,06
<i>INSR</i>	XM_590552.4		F:CTGAAGCCAAGGCAGATGATATT R: GCCACATCAAGTGAACAACGTT	77	1,02
<i>LEPRb</i>	AB199589		F: ACCACACCTTCCGTTCTCAG R: GGGACAACACTCTTGACTC	164	1
<i>ADIPOR2</i>	NM_1040499		F: GGCAACATCTGGACACATC R: CTGGAGACCCCTTCTGAG	203	1,06
<i>PGR</i>	Z66555		F: GACAGCACTTTCTAGGCGATAT R: TGTGCTGGAAGAAACGATTGC	79	1,03
<i>HPRT</i>	XM_580802		F: TGGAGAAGGTGTTTATTCCTCATG R: CACAGAGGGCCACAATGTGA	105	1,09
<i>RPS9</i>	NM_1101152		F: CCTCGACCAAGAGCTGAAG R: CCTCCAGACCTCACGTTTGTTTC	63	1,08

*IGF1*, factor de crecimiento insulino-símil tipo 1; *IGF1R*, receptor de *IGF1*; *INSR*; receptor de insulina; *LEPRb*, receptor tipo b de leptina; *ADIPOR2*; receptor tipo 2 de adiponectina; *PR*, receptor de progesterona; *HPRT*, hipoxantina fosforribosiltransferasa; *RPS9*, proteína ribosomal S9. \*(Astessiano et al. 2017)

### Análisis estadístico

Para todas las variables se realizó un test de normalidad (PROC UNIVARIATE, SAS 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2002) para identificar valores atípicos y para verificar la normalidad de los residuales. Las variables peso de los ovarios, cantidad y tamaño de folículos disecados, cantidad de células granulosas,

concentración de P4 en suero el día de la ovariectomía y concentración de hormonas en FF fueron analizadas mediante ANOVA, utilizando el procedimiento mixto disponible en SAS (PROC MIXED, SAS 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU., 2002) incluyendo en el modelo al grupo (fértil/subfértil) como efecto fijo. El tamaño de folículos dominantes, subordinados, número de folículos totales y las concentraciones de hormonas en suero desde el día -1 a 16 del ciclo estral fueron analizadas de la misma forma, incluyendo en el modelo al grupo, día y su interacción. Las diferencias en la expresión génica endometrial al día 7 y 16 del ciclo estral entre las vacas fértiles y subfértiles se analizaron mediante una prueba T de Student con 95% de confianza, analizando los días por separado. Los datos se presentan como medias  $\pm$  error estándar (EE) agrupadas. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $P < 0,05$  y tendencias cuando  $0,05 \leq P \leq 0,10$ .

## RESULTADOS

### Desarrollo folicular

#### Seguimiento ultrasonográfico del crecimiento folicular

En el seguimiento ultrasonográfico realizado luego de aplicar el primer protocolo de sincronización, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la trayectoria de crecimiento de los folículos dominantes ni subordinados, en el diámetro máximo alcanzado por los mismos, ni en la cantidad de folículos totales ( $\geq 2\text{mm}$ ) durante la fase folicular entre vacas fértiles y subfértiles (Figura 6).

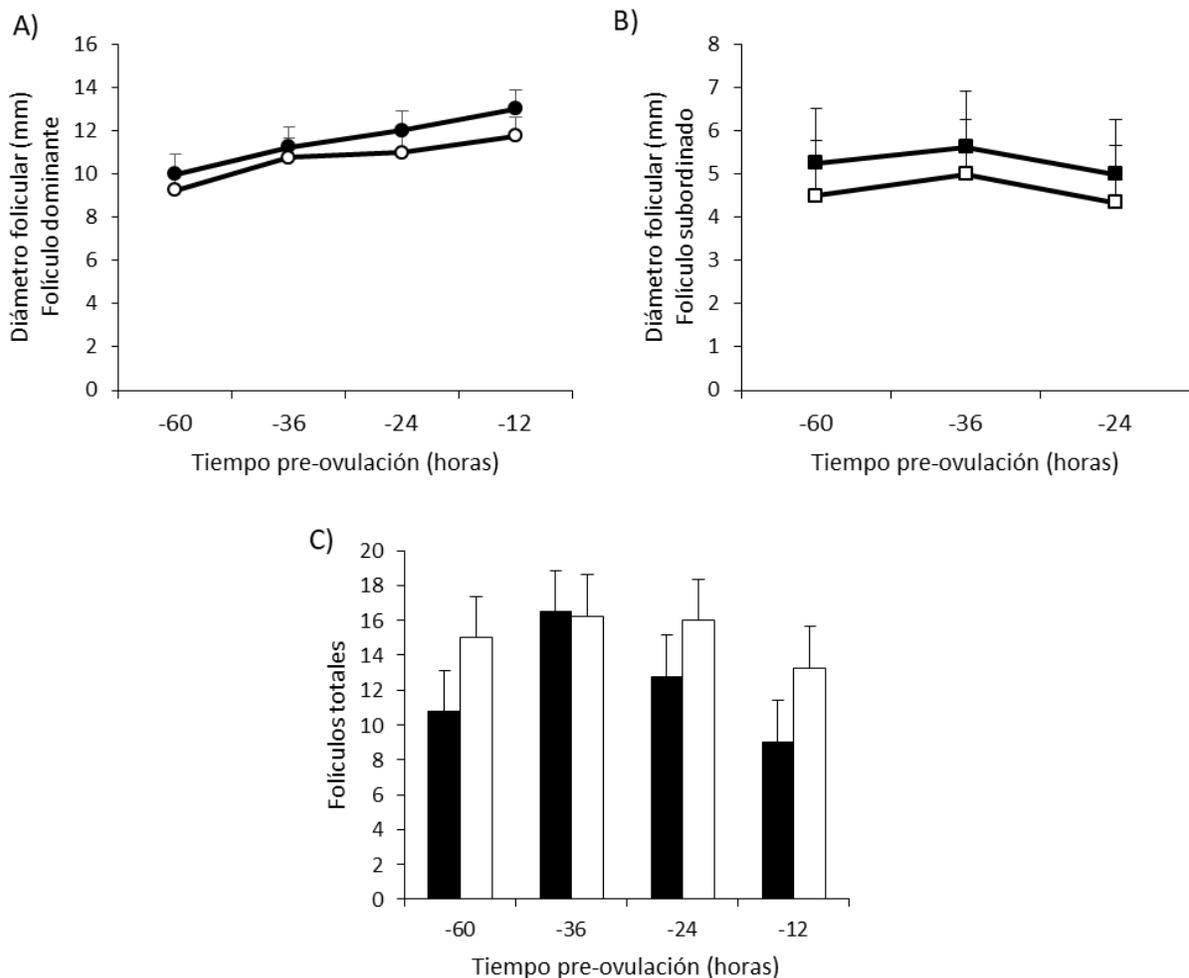


Figura 6. Diámetro (mm) de los folículos dominante (A) y subordinado (B) y cantidad de folículos totales ( $\geq 2$  mm) (C) a las 60, 36, 24 y 12 h previas a la ovulación (Hora 0) en vacas fértiles (negro) y subfértiles (blanco).

#### Caracterización de los folículos a la disección

La concentración de P4 en suero el día de la ovariectomía confirma que todas las vacas se encontraban en la fase folicular del ciclo inducida por el segundo tratamiento de sincronización (fértiles:  $0,084 \pm 0,08$  ng/mL y subfértiles:  $0,24 \pm 0,08$  ng/mL;  $P > 0,05$ ). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos de vacas en el peso de los ovarios (fértiles  $20,4 \pm 1,6$  g; subfértiles  $20,2 \pm 1,8$  g;  $P = 0,94$ ), la cantidad de folículos disecados (fértiles  $5,4 \pm 0,8$ ; subfértiles  $4,2 \pm 0,8$ ;  $P = 0,17$ ), el tamaño (fértiles  $6,4 \pm 0,7$ ; subfértiles  $7,3 \pm 0,7$ ;  $P = 0,34$ ) ni en el estado de salud de los mismos (saludables y atrésicos; Figura 7). El número de ovocitos

recuperados del total de folículos disecados fue similar entre las vacas del grupo fértil (22/27) y sub-fértil (19/21; P=0.4).

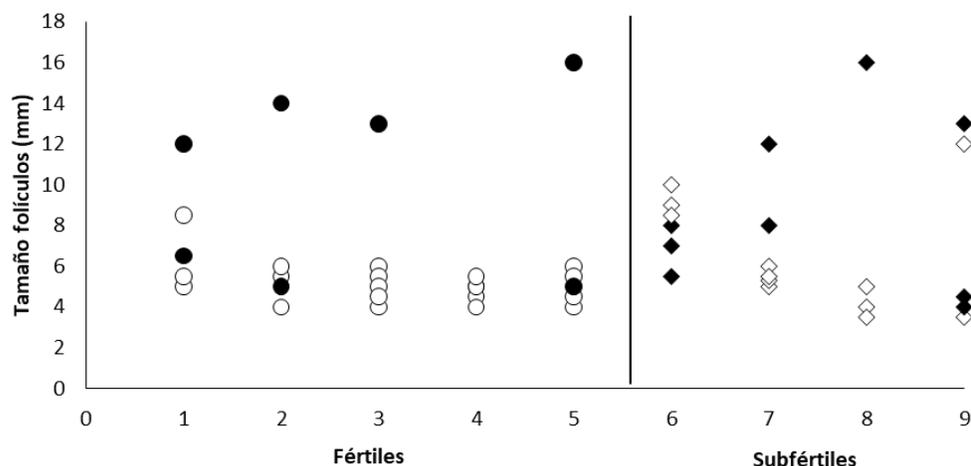


Figura 7. Información individual de la cantidad, tamaño y estado de salud de los folículos antrales  $\geq 5$  mm (negro: saludables; blanco: atrésicos) en vacas fértiles (circulo, n=5) y subfértiles (rombo, n=4). No se presentan los resultados de una vaca subfétil que no tenía folículos  $\geq 5$  mm en la superficie de los ovarios.

En los folículos saludables disecados en vacas fértiles y subfértiles no se observaron diferencias estadísticamente significativas en tamaño, concentración de E2 y P4 en el FF ni en la relación E2/P4. Los folículos saludables de las vacas fértiles tendieron (P=0,1) a presentar más células granulosas y su FF tendió a presentar una mayor concentración de IGF1 (P=0,06) que los folículos de las vacas subfértiles (Tabla 2).

Tabla 2. Características de los folículos saludables disecados en vacas fértiles y subfértiles: tamaño (mm), cantidad de células granulosas ( $\times 10^6$ ), ovocitos recuperados, concentraciones de estrógenos (E2) (pg/mL), progesterona (P4) (ng/mL) y factor de crecimiento insulino-símil tipo 1 (IGF1) (ng/mL) en el fluido folicular (media  $\pm$  EE) y relación E2/P4.

	Fértiles (n)	Subfértiles (n)	P
Tamaño (mm)	8,60 $\pm$ 1,67 (5)	7,07 $\pm$ 1,41(7)	0,5
Células granulosas ( $\times 10^6$ )	3,58 $\pm$ 0,45 (4) <sup>x</sup>	2,56 $\pm$ 0,32(8) <sup>y</sup>	0,10
E2 (ng/ml)	7,78 $\pm$ 6,40 (4)	16,09 $\pm$ 5,22 (6)	0,34
P4 (ng/ml)	23,2 $\pm$ 11,7 (5)	30,7 $\pm$ 13,1 (4)	0,68
Rel. E2/P4	0,32 $\pm$ 0,24(4)	0,52 $\pm$ 0,34(2)	0,27
IGF1 (ng/ml)	101,48 $\pm$ 13,65(5) <sup>x</sup>	60,11 $\pm$ 13,65 (5) <sup>y</sup>	0,06

x vs. y P>0,05

## Hormonas en suero

### Progesterona (P4)

La concentración de P4 durante la fase luteal tendió (P=0,056) a ser superior en el grupo de vacas subfértiles (2,0 $\pm$ 0,1 ng/mL) respecto a las fértiles (1,7 $\pm$ 0,1 ng/mL). La concentración de P4 estuvo afectada por el día del ciclo estral (P<0,0001) y se observó efecto de la interacción grupo\*día (P=0,07). En los días 8 y 12 del ciclo estral las vacas subfértiles presentaron mayores concentraciones de P4 respecto a las fértiles (Figura 8A).

### Factor de crecimiento insulino-símil 1 (IGF1)

La concentración de IGF1 no difirió estadísticamente entre los grupos (P=0,61) y estuvo afectada por el día del ciclo estral (P<0,0001). Se observó una tendencia a que la interacción grupo\*día fuera significativa (P=0,07). Los días -1 y 11 las vacas subfértiles presentaron mayores concentraciones de la hormona (Figura 8B). Sin embargo, el día 6 las vacas fértiles tendieron a presentar mayores concentraciones de IGF1 que las subfértiles (P=0,09) (Figura 8B).

## Insulina

La concentración de insulina fue mayor ( $P=0,01$ ) en los animales subfértiles ( $23,5\pm 1,1 \mu\text{IU/mL}$ ) respecto a los fértiles ( $19,1\pm 1,0 \mu\text{IU/mL}$ ) y estuvo afectada por el día del ciclo estral ( $P<0,0001$ ). En ambos grupos de animales hubo un aumento en las concentraciones de insulina desde el día 7 al 8 ( $P<0,0001$ ). Se observó que la interacción grupo\*día fue significativa ( $P=0,05$ ), explicada porque las vacas subfértiles presentaron mayores concentraciones de insulina los días 9, 11 y 12 (Figura 8C).

## Leptina

Las vacas fértiles ( $21,9\pm 1,6 \text{ ng/mL}$ ) presentaron mayores concentraciones de leptina respecto a las subfértiles ( $13,9\pm 1,5 \text{ ng/mL}$ ;  $P=0,006$ ). Las concentraciones de leptina estuvieron afectadas por el día del ciclo estral ( $P=0,003$ ), pero no se observó interacción grupo\*día ( $P=0,61$ ). En las vacas fértiles hubo una disminución de las concentraciones de leptina del día 7 al 8 ( $P=0,025$ ), no así en las vacas subfértiles ( $P=0,89$ ; Figura 9A).

## Adiponectina

La concentración de adiponectina fue mayor en las vacas fértiles ( $40,8\pm 1,0 \text{ ng/mL}$ ) respecto a las subfértiles ( $36,9\pm 1,0 \text{ ng/mL}$ ;  $P=0,02$ ). La concentración de esta hormona tendió a ser diferente entre días ( $P=0,07$ ) y la interacción grupo\*día fue significativa ( $P=0,0008$ ). En las vacas fértiles, hubo un aumento en las concentraciones de adiponectina del día 7 al 8 (Figura 9 B;  $P=0,028$ ). Este comportamiento no se observó en las vacas subfértiles ( $P=0,31$ ). Las vacas fértiles presentaron mayores concentraciones de adiponectina los días 4, 8 y 11 del ciclo estral respecto a las subfértiles. Asimismo el día 14 las vacas fértiles tendieron a presentar mayores concentraciones de adiponectina que las subfértiles ( $P=0,07$ ). El día previo a la ovulación las vacas subfértiles presentaron mayores concentraciones de adiponectina respecto a las fértiles ( $P=0,03$ ; Figura 9B).

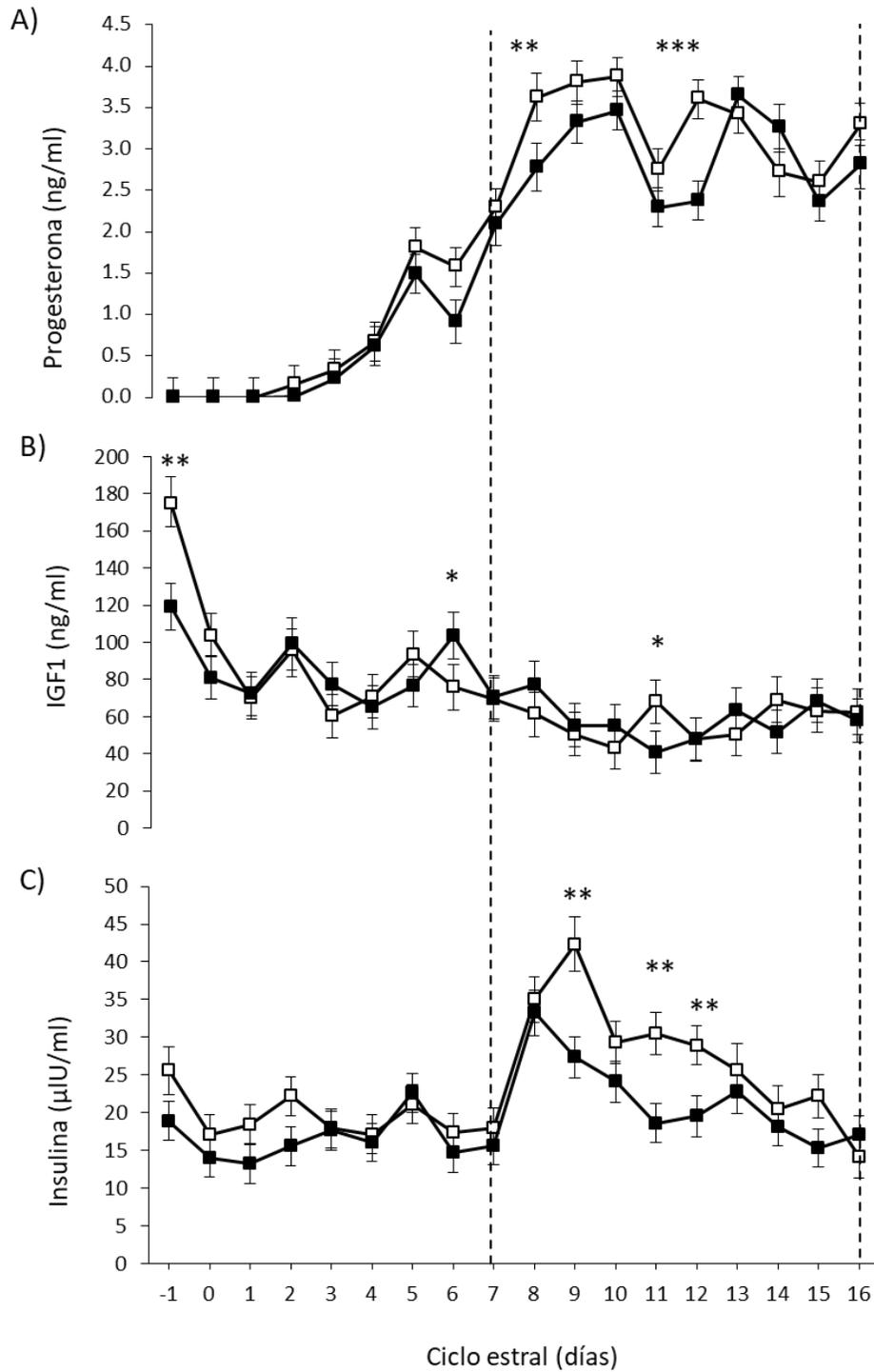


Figura 8. Concentraciones (media  $\pm$  EE) de progesterona (ng/mL) (A), insulina ( $\mu$ IU/mL) (B) e IGF1 (ng/mL) (C) desde el día -1 a 16 del ciclo estral (día 0= ovulación) en vacas fértiles (■) y subfértiles (□). \*  $P \leq 0,1$ ; \*\*  $P \leq 0,05$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ . Línea punteada representa los días de realización de las biopsias endometriales.

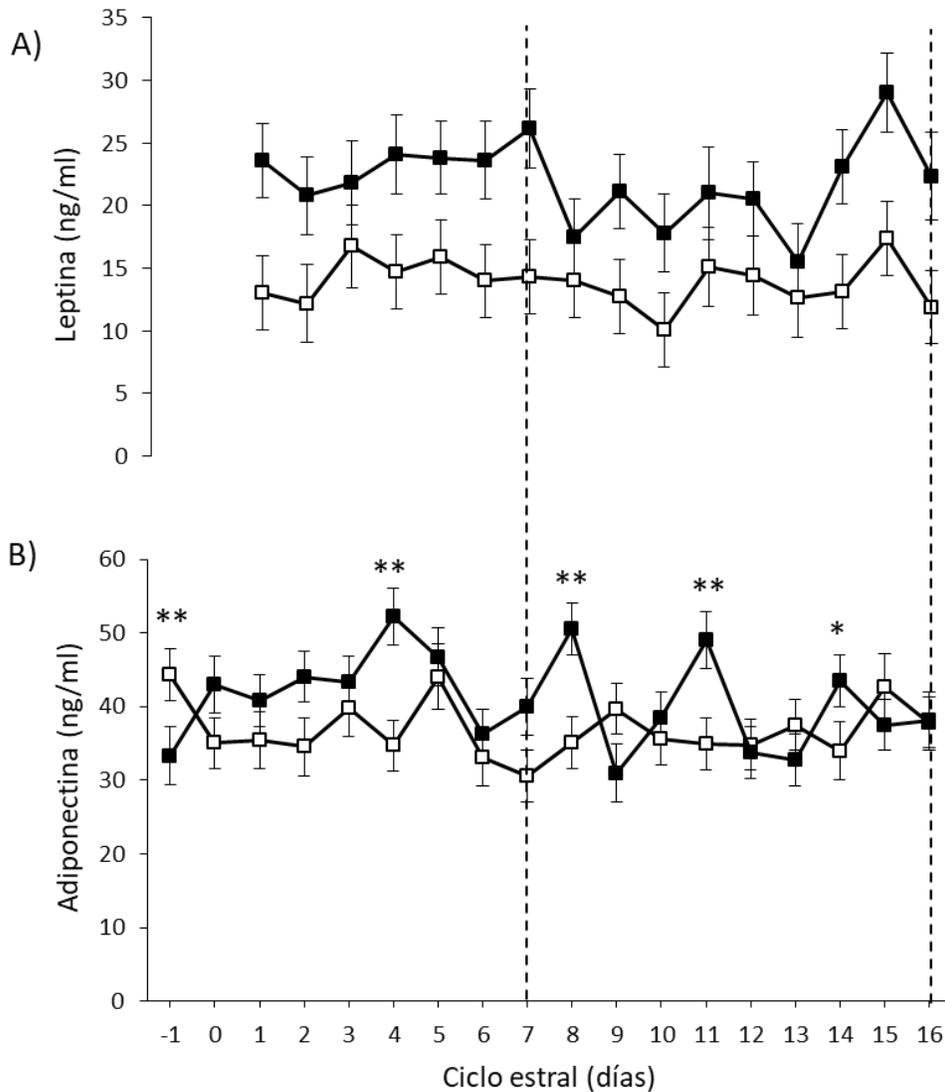


Figura 9. Concentraciones (media  $\pm$  EE) de leptina (ng/mL) (A) y adiponectina (ng/mL) (B) desde el día -1 a 16 del ciclo estral (día 0= ovulación) en vacas fértiles (■) y subfértiles (□). \*\*  $P < 0,05$ . Línea punteada representa los días de realización de las biopsias endometriales.

## Expresión génica en endometrio

El día 7 hubo una expresión diferencial de PR, ADIPOR2 e IGF1 entre grupos de animales. La expresión de PR y ADIPOR2 tendió ( $P=0,06$ ) a ser mayor en las vacas fértiles respecto a las subfértiles (Figura 10A y 10C). Sin embargo, la expresión de IGF1 fue mayor en los animales del grupo subfértil ( $P=0,03$ ) (Figura 10B). Al día 7 no hubo diferencias en la expresión relativa de IGF1R ( $2,04\pm 0,37$  y  $2,01\pm 0,86$ ), INSR ( $1,94\pm 0,2$  y  $3,02\pm 1,54$ ) y LEPRb ( $5,91\pm 2,81$  y  $3,59\pm 2,73$ ) entre vacas fértiles y subfértiles, respectivamente.

Al día 16 no hubo diferencias significativas entre los grupos en la expresión relativa de los distintos transcritos (PR:  $1,19\pm 1,27$  y  $1,78\pm 0,73$ ; IGF1:  $7,97\pm 5,01$  y  $9,06\pm 5,09$ ; IGF1R  $1,54\pm 0,30$  y  $1,41\pm 0,27$ ; INSR  $1,66\pm 0,56$  y  $1,90\pm 0,43$ ; ADIPOR2  $1,24\pm 0,29$  y  $1,66\pm 0,44$ ; LEPRb  $3,59\pm 2,41$  y  $5,17\pm 3,98$ ) entre vacas fértiles y subfértiles, respectivamente ( $P>0,05$ ).

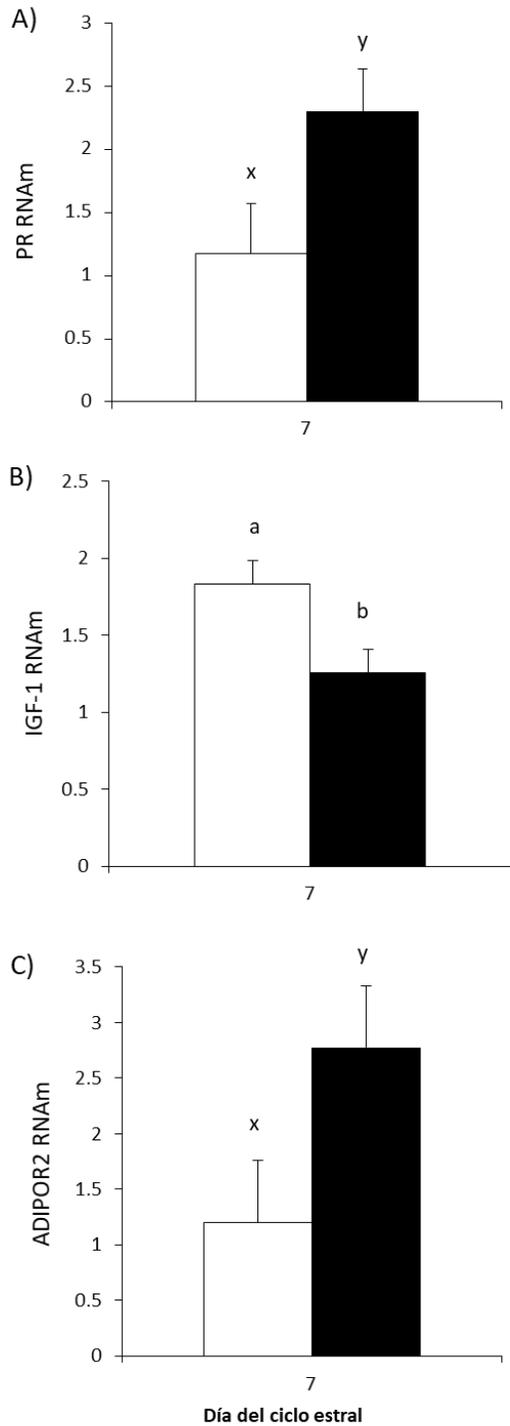


Figura 10. Expresión relativa de los genes *PR* (A), *IGF1* (B) y *ADIPOR2* (C) en endometrio de vacas fértiles (barra negra) y subfértiles (barra blanca). <sup>x</sup> vs <sup>y</sup>,  $0.05 \leq P \leq 0.10$ ; <sup>a</sup> vs. <sup>b</sup>;  $P \leq 0.05$

## DISCUSIÓN

La hipótesis de que la subfertilidad induce modificaciones en el desarrollo folicular y microambiente en que se desarrolla el ovocito, en las concentraciones de hormonas esteroideas y metabólicas y en la expresión génica de las mismas y de sus receptores a nivel uterino fue parcialmente aceptada. Las vacas subfértiles tendieron a presentar folículos con menor cantidad de células granulosas y menor concentración de IGF1 en el FF que las vacas fértiles. Las concentraciones de P4 tendieron a ser mayores y las de insulina fueron mayores en las vacas subfértiles, pero las concentraciones de adiponectina y leptina fueron menores que en las fértiles. A nivel endometrial, observamos que las vacas subfértiles tuvieron mayor expresión de IGF1 al día 7 y tendieron a presentar menor expresión de PR y ADIPOR2 que las vacas fértiles el mismo día. Estos resultados sugieren que el ambiente en el que se desarrolla el embrión es un factor relevante en la fertilidad de las vacas para carne y podría ser determinado por las ganancias de peso en la etapa juvenil (Alvez, 2019).

La trayectoria de crecimiento final y el diámetro máximo alcanzado por los folículos dominantes pre-ovulatorios evaluada por ultrasonografía no fue diferente entre vacas subfértiles y fértiles. Tampoco observamos diferencias en el diámetro del folículo subordinado, ni en la cantidad de folículos totales entre las vacas fértiles y subfértiles. Estos resultados son consistentes con los reportados por Alvez (2019), utilizando el mismo grupo de vacas 2,1 años más jóvenes. Sin embargo, son diferentes a los reportados por otros autores, que utilizan diferentes modelos para estudiar la subfertilidad en vacas para leche. Båge et al. (2002) reportan que las vacas repetidoras presentan folículos dominantes de mayor vida media, diámetro y producción de estradiol asociados a niveles suprabasales de P4 en la fase folicular. Los folículos de mayor vida media o “vida prolongada”, tienen un medio ambiente alterado, que permite el reinicio de la meiosis del ovocito en forma prematura, y se asocian con menor fertilidad (Mihm et al. 1994; Revah y Butler 1996). En éste experimento contamos con una única evaluación de las concentraciones de P4 durante la fase folicular al momento de la ovariectomía, y a pesar de ser casi 3 veces superior en las vacas subfértiles, la diferencia no fue estadísticamente significativa. En forma similar, Alvez (2019) no observó diferencias en las concentraciones de P4 en éste período, y las mismas fueron subluteales en ambos grupos de vacas. Por lo tanto, no serían esperables cambios en la frecuencia de pulsos de LH que tengan un impacto diferencial en el crecimiento folicular, como fue reportado previamente por otros autores (Mihm et al. 1994; Revah and Butler 1996). Nuestros resultados refuerzan el concepto pre existente de que los cambios más relevantes que determinan la subfertilidad no

ocurren a nivel ovárico, sino a nivel del desarrollo embrionario temprano y el reconocimiento materno de la preñez (Cox et al., 1998).

La disección de los ovarios y la evaluación de sus estructuras anatómicas coinciden con los resultados obtenidos a la ultrasonografía en la fase folicular inducida por el segundo tratamiento de sincronización. En este experimento no se observaron diferencias entre los grupos de vacas subfértiles y fértiles en el peso de los ovarios ni en la cantidad de folículos antrales disecados. Estos resultados son consistentes con reportes previos que asocian las dimensiones y el peso de los ovarios con la cantidad de folículos antrales (Cushman et al. 2009). El recuento de folículos antrales se asocia en forma positiva con la fertilidad, asociación que no se encontró en éste experimento ni en el de Alvez (2019). Tampoco hubo diferencias en el tamaño de los folículos, la proporción de folículos saludables vs atrésicos, ni en la concentración de E2 y P4 en el FF en vacas fértiles y subfértiles. Sin embargo los folículos saludables de las vacas fértiles tendieron a presentar una mayor cantidad de células granulosas y una mayor concentración de IGF1 en FF. Esto podría sugerir una mayor capacidad esteroidogénica de los folículos y/o una mayor capacidad de retención en el fluido folicular de las vacas fértiles, con sus ya conocidos efectos positivos en la calidad ovocitaria. Se ha reportado en estudios in vitro que altas concentraciones intrafoliculares de IGF1 se correlacionan con la fertilización de los ovocitos, las tasas de clivaje y el desarrollo embrionario (Spicer et al., 1993; Revelli et al. 2009). Sin embargo, las concentraciones de E2 en el líquido folicular fueron similares entre las vacas subfértiles y las fértiles. Es importante considerar que las concentraciones de E2 evaluadas en el líquido folicular fueron muy variables, y el reducido número de folículos evaluados limita la posibilidad de sacar conclusiones al respecto. Además, la esteroidogénesis es un mecanismo complejo, que está regulado en forma positiva (IGF1, insulina) y negativa (leptina y adiponectina) por diferentes hormonas metabólicas (Spicer et al. 1993; Scaramuzzi et al. 2006).

En este experimento las vacas subfértiles tendieron a presentar mayores concentraciones de P4 durante la fase luteal comparadas con las fértiles. Esto concuerda con lo reportado previamente por Alvez (2019) en este mismo grupo de animales, en que las vacas subfértiles tuvieron mayores concentraciones de progesterona del día 8 al 18 del ciclo estral. Estos resultados parecen contradecir el concepto de que las concentraciones de P4 se relacionan en forma positiva con la fertilidad (Mann and Lamming 1999, 2001; Meikle et al. 2018). Esta aparente contradicción podría explicarse por diferencias en la tasa de metabolización hepática de las hormonas esteroideas, como se ha descrito en vaca y ovejas que (Lozano et al. 1998; Sangsritavong et al., 2002; Sosa et al. 2004). Sin embargo, si existieran diferencias en la tasa metabólica hepática, las mismas debieron haberse marcado durante la etapa juvenil cuando las vacas fértiles crecieron a un ritmo

más acelerado que las subfértiles, ya que en la etapa de madurez todas las vacas fueron sometidas al mismo plano nutricional (Alvez, 2019). Otra posible explicación es que las concentraciones periféricas de la hormona podrían no reflejar su acción a nivel endometrial, donde determinan el desarrollo embrionario y el mantenimiento de la preñez. La relación inversa entre las concentraciones circulantes de P4 y la concentración endometrial de su receptor ha sido descrita previamente en ovejas, utilizando un modelo de sub-nutrición aguda (Sosa et al. 2004). En este sentido, las vacas fértiles tendieron a tener una mayor expresión de PR en el endometrio ipsilateral al cuerpo lúteo al día 7 pos ovulación, lo que podría indicar un mayor efecto de esta hormona en el endometrio de este grupo de animales. Considerando el rol clave que tiene la P4 en el mantenimiento de las funciones endometriales necesarias para el crecimiento del concepto, su implantación, placentación y desarrollo a término, este hallazgo podría explicar las diferencias en fertilidad entre ambos grupos de vacas (Spencer et al. 2007).

Los resultados más relevantes de éste experimento están asociados a las diferencias en las concentraciones circulantes de hormonas metabólicas en la etapa de madurez. Las vacas subfértiles presentaron mayores concentraciones de IGF1 en dos días puntuales del ciclo (-1 y 11) pero menores en otro (día 6) y mayores concentraciones circulantes de insulina respecto a las fértiles. El rol de estas hormonas como sensores del metabolismo energético y determinantes de la respuesta reproductiva en rumiantes en pastoreo ha sido destacado recientemente (Meikle et al. 2018). Ambas hormonas tienen acciones anabólicas similares y comparten receptores en diferentes tejidos, como por ejemplo el ovario donde estimulan la esteroidogénesis (Spicer and Echterkamp 1995). Además, se ha sugerido que el E2 estimula la producción de IGF1 a nivel hepático (Richards et al. 1991). Aunque las vacas subfértiles tuvieron una mayor concentración circulante de IGF1 en la fase folicular del ciclo y mayor expresión del transcrito de IGF1 en el endometrio al día 7 del ciclo estral, la sensibilidad del tejido endometrial basada en la expresión del receptor de IGF1 no difirió entre grupos. Se ha reportado que el principal regulador de la expresión de IGF1 en útero son los estrógenos (Murphy and Friesen 1988). En este sentido, podríamos especular que si el hígado de las vacas subfértiles es metabólicamente menos activo, esto podría asociarse con mayores concentraciones circulantes de ambas hormonas y explicar éste hallazgo.

El aumento en las concentraciones de insulina en ambos grupos del día 7 al 8, probablemente sea la respuesta metabólica a la suplementación con DDGS que recibieron todas las vacas el día de la primer biopsia endometrial (día 7), como ha sido reportado en ovinos (Viñoles et al. 2005; Scaramuzzi et al. 2011). Sin embargo, la evolución de las concentraciones de la hormona los días posteriores a la suplementación fue diferente entre grupos, manteniéndose más elevadas en las vacas subfértiles respecto a las fértiles. La mayor concentración circulante de

insulina en las vacas subfértiles puede estar indicando un estado de resistencia a esta hormona caracterizada por una disminución de la sensibilidad de los tejidos a concentraciones normales de insulina, lo que requiere mayores concentraciones de la misma para lograr respuestas metabólicas normales (Holtenius and Holtenius 2007). Se ha reportado que mujeres con hiperinsulinemia crónica podrían tener comprometida la absorción de glucosa por parte de las células, lo que conduce a la apoptosis celular (Pantaleon and Kaye 1998; Chi et al. 2000). Asimismo, se ha descrito que el exceso de insulina puede reducir la calidad de los ovocitos en vaquillonas (Adamiak et al. 2005) y la producción de embriones *in vitro* y expresión génica vinculada al metabolismo celular en vacas lecheras Bos Indicus (Sales et al. 2015). Por lo tanto, las mayores concentraciones de insulina observadas en las vacas subfértiles podrían haber afectado la calidad ovocitaria y su capacidad de desarrollarse en un embrión viable.

Las vacas subfértiles tuvieron menores concentraciones de leptina y adiponectina que las fértiles. Estas adipoquinas, secretadas por el tejido adiposo, son esenciales para el mantenimiento de la integridad del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, la regulación del proceso ovulatorio, la esteroidogénesis y para una implantación exitosa del embrión (Dupont et al. 2014b). En este sentido se ha reportado que vacas Holstein clasificadas como repetidoras tuvieron menores concentraciones de leptina respecto a las fértiles (Guzel and Tanriverdi 2014). Si bien en el presente experimento no se evaluó el tejido adiposo, nuestros resultados son consistentes con una tendencia a presentar mayor espesor de grasa subcutánea medida por ultrasonografía en vacas fértiles en la etapa de madurez en este mismo grupo de animales (Alvez, 2019). Sin embargo, se ha descrito que el tejido adiposo visceral produce mayor cantidad de adiponectina mientras que el subcutáneo produce más leptina (Fain et al. 2004). Por lo tanto, habría que evaluar ambos depósitos grasos para lograr una buena correlación entre estas hormonas y el tejido que las produce. Por otra parte se ha reportado que la leptina a nivel ovárico inhibe el efecto estimulador del IGF1 sobre la esteroidogénesis (Scaramuzzi et al. 2006). Este mecanismo podría ayudar a explicar en parte las menores concentraciones de progesterona circulantes, ya que se ha descrito un efecto similar para la adiponectina (Lagaly et al. 2008). Respecto a la expresión génica en endometrio de los receptores de leptina (LEPRb) y adiponectina (ADIPOR2), observamos que no hubo diferencias en LEPRb, pero ADIPOR2 tendió a ser menor en las vacas subfértiles respecto a las fértiles. Se ha reportado que vacas lecheras que tienen un mejor balance energético (múltiparas vs primíparas y sometidas a altos vs bajos planos nutricionales) tienen una mayor expresión de adipo R1 y R2 en útero (Astessiano

et al. 2017). La menor expresión génica de éste factor de crecimiento al día 7 post-ovulación en vacas subfértiles es muy relevante, ya que es el momento en que el embrión es liberado de la zona pelúcida, y debe desarrollarse y crecer para enviar la señal de reconocimiento materno de la preñez, que es fundamental para el éxito reproductivo (Spencer et al. 2007). El ambiente uterino en la primer semana post-ovulación es clave en el futuro desarrollo del embrión (Kalpokas 2019; Graña-Baumgartner et al. 2020). Si bien no hubo diferencias en la expresión de LEPRb en endometrio entre ambos grupos de animales, las vacas subfértiles presentaron menores concentraciones de leptina. En este sentido se ha descrito en mujeres que un aumento post-ovulatorio en las concentraciones séricas de leptina se asoció con el potencial de implantación (Cioffi et al. 1997). Asimismo, en vacas se ha reportado una mayor sensibilidad del endometrio a la leptina los días 12 y 19 del ciclo, lo que sugiere un papel importante de esta hormona en la implantación (Sosa et al. 2010). De hecho, en ratones los receptores de leptina se expresan preferentemente en los sitios de implantación (Yoon et al. 2005). Por lo tanto, las diferencias en las concentraciones de adipocinas y su dinámica en los tejidos blanco, podrían asociarse con alteraciones en la capacidad de desarrollo e implantación embrionaria y explicar las diferencias en fertilidad observadas entre grupos de vacas.

## Conclusiones

Las vacas subfértiles tendieron a presentar folículos saludables con menor número de células granulosas y menor concentración de IGF1 en el FF. La tendencia a mayores concentraciones circulantes de P4, se asociaron con una tendencia a menor expresión de su receptor en el endometrio al día 7. Además, las vacas subfértiles tuvieron mayores concentraciones circulantes de IGF1 previo a la ovulación y de insulina en momentos específicos de la fase luteal. Las vacas subfértiles tuvieron menores concentraciones circulantes de leptina y adiponectina, y una menor sensibilidad endometrial a ésta última al día 7. Las diferencias observadas en el microambiente folicular y uterino, podrían asociarse con alteraciones en la maduración ovocitaria, retrasos en el desarrollo embrionario temprano y alteraciones en el diálogo embrión-útero para establecer la preñez.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamiak SJ, Mackie K, Watt RG, et al (2005) Impact of Nutrition on Oocyte Quality : Cumulative Effects of Body Composition and Diet Leading to Hyperinsulinemia in Cattle 1. 926:918–926.  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.041483>
- Adams GP, Matteri RL, Ginther OJ (1992) Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *J Reprod Fertil* 96:627–640
- Ahmed N, Kathiresan D, Ahmed FA, et al (2016) Pattern of induced estrus and conception rate following ovsynch and ovsynch based gonadotropin-releasing hormone treatments initiated on day 6 of estrous cycle in repeat breeding crossbred cows. *Vet World* 9:342–345.  
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.342-345>
- Albihn A (1991) Standing oestrus, ovarian function and early pregnancy in virgin and repeat breeder heifers. *J Vet Med* 38:212–221
- Alvez A (2014) SUBFERTILIDAD EN VACAS PARA CARNE: CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD OVÁRICA. Universidad de la Republica
- Alvez A (2019) EFECTO DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO SOBRE LOS PERFILES ENDÓCRINOS, ESTRUCTURAS OVÁRICAS Y FERTILIDAD EN VACAS ADULTAS. Universidad de la República
- Amundson JL, Mader TL, Rasby RJ, Hu QS (2006) Environmental effects on pregnancy rate in beef cattle. *J Anim Sci* 84:3415–3420.  
<https://doi.org/10.2527/jas.2005-611>
- Archanco M, Go J, Tena-sempere M, Fru G (2007) Expression of Leptin and Adiponectin in the Rat Oviduct. 55:1027–1037.  
<https://doi.org/10.1369/jhc.6A7128.2007>
- Arije GF, Wiltbank JN (1971) U . S . Department of Agriculture , Nebraska Agriculture Experiment Station ; *J Anim Sci* 33:401–406
- Arthur G (1991) REPRODUCCION Y OBSTETRICIA EN VETERINARIA, 6°. Barcelona España, McGraw-Hill. 3-49
- Astessiano AL, Meikle A, Carriquiry M, et al (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. 1–8.  
<https://doi.org/10.1111/rda.12981>
- Båge R (2002) On repeat breeding in dairy heifers. With especial focus on follicular dynamics, ovulation, and oocyte quality. SWEDISH UNIVERSITY OF AGRICULTURAL SCIENCES

- Båge R, Gustafsson H, Larsson B, et al (2002) Repeat breeding in dairy heifers: Follicular dynamics and estrous cycle characteristics in relation to sexual hormone patterns. *Theriogenology* 57:2257–2269. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00840-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00840-3)
- Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, et al (1996) Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 137:3144–3147. <https://doi.org/10.1210/endo.137.7.8770941>
- Berg DK, Leeuwen J Van, Beaumont S, et al (2010) Embryo loss in cattle between Days 7 and 16 of pregnancy. *73:250–260*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.09.005>
- Berretta EJ, Risso D, Montossi F, et al (2000) Campos in Uruguay. In: Lemaire G, Hodgson J, de Moraes A, et al. (eds) *Grassland Ecophysiology and Grazing Ecology*, CAB International. New York, USA, pp 377–394
- Boelhaue M, Sinowatz F, Wolf E, Paula-Lopes FF (2005) Maturation of Bovine Oocytes in the Presence of Leptin Improves Development and Reduces Apoptosis of In Vitro-Produced Blastocysts<sup>1</sup>. *Biol Reprod* 73:737–744. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.041103>
- Cardoso RC, Alves BRC, Prezotto LD, Thorson JF (2014) Use of a stair-step compensatory gain nutritional regimen to program the onset of puberty in beef heifers 1. 2942–2949. <https://doi.org/10.2527/jas2014-7713>
- Cardoso RC, Alves BRC, Williams GL (2018) Neuroendocrine signaling pathways and the nutritional control of puberty in heifers. *Anim Reprod* 15:868–878. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0013>
- Chi M, Schlein A, Kelle H (2000) High Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) and Insulin Concentrations Trigger Apoptosis in the Mouse Blastocyst via Down-Regulation of the IGF-1 Receptor. *Endocrinology* 141:4784–4792
- Cioffi JA, Blerkom J Van, Antczak M, et al (1997) The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *3:467–472*
- Clark JH, Schrader WT, O'Malley BW (1992) Mechanisms of steroid hormones action. In: Wilson JD, Foster DW (eds) *Endocrinology*. Saunders; Philadelphia, pp 35–90
- Comer MT, Leese HJ, Southgate J (1998) Induction of a differentiated ciliated cell phenotype in primary cultures of Fallopian tube epithelium. *Hum Reprod* 13:3114–3120. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.11.3114>
- Cox S, McMillan W, Donnison M (1998) ESTABLISHMENT OF A HERD OF CATTLE WITH DIVERGENT POTENTIAL PREGNANCY RATE. *Theriogenology* 49:242
- Cummins SB, Lonergan P, Evans ACO, Butler ST (2012) Genetic merit for fertility traits in Holstein cows : II . Ovarian follicular and corpus luteum dynamics , reproductive hormones , and estrus behavior. 3698–3710

- Cushman RA, Allan MF, Kuehn LA, et al (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
- Cushman RA, Kill LK, Funston RN, et al (2013) Heifer calving date positively influences calf weaning weights through six parturitions.  
<https://doi.org/10.2527/jas2013-6465>
- D'Occhio MJD, Baruselli PS, Campanile G (2019) Theriogenology Influence of nutrition , body condition , and metabolic status on reproduction in female beef cattle : A review. *Theriogenology* 125:277–284.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.11.010>
- Dahl GE, Buchanan BA, Tucker HA (2000) Photoperiodic Effects on Dairy Cattle : A Review 1. 885–893. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74952-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74952-6)
- Day ML, Imakawa K, Garcia-Winder M, et al (1986) Influence of prepubertal ovariectomy and estradiol replacement therapy on secretion of luteinizing hormone before and after pubertal age in heifers. *Domest Anim Endocrinol* 3:17–25. [https://doi.org/10.1016/0739-7240\(86\)90036-6](https://doi.org/10.1016/0739-7240(86)90036-6)
- Del Campo C, Ginther OJ (1973) Vascular anatomy of the uterus and ovaries and the unilateral luteolytic effect of the uterus: horses, sheep, and swine. *Am Jorunal Veterinay Res* 34:723–728
- Diskin MG, Mackey DR, Roche JF, Sreenan JM (2003) Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci* 78:345–370. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00099-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00099-X)
- Diskin MG, Morris DG (2008) Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants Fertilization Rate in Cattle Fertilization Rates in Small Ruminants Extent and Timing of Early Embryo Loss in. 43:260–267.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01171.x>
- Diskin MG, Murphy JJ, Sreenan JM (2006) Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions &. 96:297–311.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.08.008>
- 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 1. 84–92.  
<https://doi.org/10.2527/jas2016-0596>
- Do Carmo M, Sollenberger LE, Carriquiry M, Soca P (2018) Controlling herbage allowance and selection of cow genotype improve cow-calf productivity in Campos grasslands. *Prof Anim Sci* 34:32–41.  
<https://doi.org/10.15232/pas.2016-01600>
- Dobrzyn K, Smolinska N, Szeszko K, et al (2018) Effect of progesterone on adiponectin system in the porcine uterus during early pregnancy 1. 338–352.

<https://doi.org/10.2527/jas2016.0732>

Dochi O, Takahashi K, Hirai T, et al (2008) The use of embryo transfer to produce pregnancies in repeat-breeding dairy cattle. *Theriogenology* 69:124–128. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.001>

Dragovic RA, Ritter LJ, Schulz SJ, et al (2005) Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. *Endocrinology* 146:2798–2806. <https://doi.org/en.2005-0098> [pii]10.1210/en.2005-0098

Dupont J, Reverchon M, Bertoldo MJ, Froment P (2014a) Nutritional signals and reproduction. *Mol Cell Endocrinol* 382:527–537. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.09.028>

Dupont J, Scaramuzzi RJ, Reverchon M (2014b) The effect of nutrition and metabolic status on the development of follicles , oocytes and embryos in ruminants. 1031–1044. <https://doi.org/10.1017/S1751731114000937>

Dutto L (1981) La castración de Vacas. Editorial Hemisferio Sur

Einer-Jensen N, McCracken JA (1981) The Transfer of Progesterone in the Ovarian Vascular Pedicle of the Sheep \*. *Endocrinology* 109:2–7

Einspanier R, Miyamoto A, Schams D, et al (1990) Tissue concentration , mRNA expression and stimulation of IGF-I in luteal tissue during the oestrous cycle and. *J Reprod Fertil* 90:439–445

El-Khadrawy H., Ahmed WM, Emtenan, Hanafi M (2011) Observations on Repeat Breeding in Farm Animals with Emphasis on its Control. *J. Reprod. Infertil.* 2:01–07

Ergene O (2012) Progesterone concentrations and pregnancy rates of repeat breeder cows following postinsemination PRID and GnRH treatments \*. *Turkish J Vet Anim Sci* 36:283–288

Fain JN, Madan AK, Hiler ML, et al (2004) Comparison of the Release of Adipokines by Adipose Tissue , Adipose Tissue Matrix , and Adipocytes from Visceral and Subcutaneous Abdominal Adipose Tissues. *Endocrinology* 145:2273–2282. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1336>

Fortune JE (1994) Ovarian Follicular Growth and Development in Mammals. 232:225–232

Fortune JE, Rivera GM, Yang MY (2004) Follicular development : the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. 83:109–126. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.031>

Gardner H, Kaye P (1991) Insulin Increases Cell Numbers and Morphological Development in Mouse Pre-implantation Embryos in vitro. *repro* 3:79–91

Garrett JE, Geisert RD, Zavy MT, Morgan GL (1988) Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle.

- Reproduction 84:437–446. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0840437>
- Gasser CL, Behlke EJ, Grum DE, Day ML (2006) Effect of timing of feeding a high-concentrate diet on growth and attainment of puberty in early-weaned heifers. *J Anim Sci* 84:3118–3122. <https://doi.org/10.2527/jas.2005-676>
- Gasser CL, Behlke EJ, Grum DE, Day ML (2014) Effect of timing of feeding a high-concentrate diet on growth and attainment of puberty in early-weaned heifers 1. 3118–3122. <https://doi.org/10.2527/jas.2005-676>
- Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP (1989) Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fertil* 87:223–230
- Glister C, Tannetta DS, Groome NP, Knight PG (2001) Interactions Between Follicle-Stimulating Hormone and Growth Factors in Modulating Secretion of Steroids and Inhibin-Related Peptides by Nonluteinized Bovine Granulosa Cells 1. 1028:1020–1028
- Graham J, Clarke C (1997) Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18:502–519. <https://doi.org/10.1210/er.18.4.502>
- Graña-Baumgartner A, Meikle A, Fernández-Foren A, et al (2020) Local influence of the corpus luteum on the ipsilateral oviduct and early embryo development in the ewe. *Theriogenology* 151:7–15. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.028>
- Guggeri D, Carriquiry M, Meikle A, Viñoles C (2012) Effect of age at weaning and plane of nutrition before weaning on progesterone secretion and uterine gene expression at first service in beef heifers. In: *International Congress of Animal Reproduction*. Vancouver, Canadá
- Guggeri D, Meikle a., Carriquiry M, et al (2014) Effect of different management systems on growth, endocrine parameters and puberty in Hereford female calves grazing Campos grassland. *Livest Sci*. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.06.026>
- Gustafsson H, Emanuelson U (2002) Characterisation of the Repeat Breeding Syndrome in Swedish Dairy Cattle. *Acta Vet Scand* 43:115–125
- Guzel S, Tanriverdi M (2014) Comparison of serum leptin, glucose, total cholesterol and total protein levels in fertile and repeat breeder cows. *Rev Bras Zootec* 43:643–647. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982014001200003>
- Hafez ESE, Tsutsumi Y (1966) Changes in endometrial vascularity during implantation and pregnancy in the rabbit. *Am J Anat* 118:249–281. <https://doi.org/10.1002/aja.1001180113>
- Harvey M, Kaye P (1991) Mouse Blastocysts Respond Metabolically to Short-Term Stimulation by Insulin and IGF-1 Through the Insulin Receptor. *Mol Reprod Dev* 29:253–258

- 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
- Hernández Cerón J (2016) *Fisiología Clínica de la Reproducción de Bovinos Lecheros*, 1st edn. Universidad Nacional Autónoma de México, México
- Hernández Cerón J, Zarco Quintero A (1998) Función de cuerpo lúteo y muerte embrionaria en rumiantes. *Cienc Vet* 8:1–28
- Holtenius P, Holtenius K (2007) A model to estimate insulin sensitivity in dairy cows. 3:3–5. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-49-29>
- Imakawa K, Bai R, Nakamura K, Kusama K (2017) Thirty years of interferon-tau research; Past, present and future perspective. *Anim Sci J* 88:927–936. <https://doi.org/10.1111/asj.12807>
- Inskeep EK (2004) Preovulatory , postovulatory , and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *J Anim Sci* 82:24–39
- Kafi M, Azari M, Chashnigir O, et al (2017) Inherent inferior quality of follicular fluid in repeat breeder heifers as evidenced by low rates of in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology* 102:29–34. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.07.011>
- Kalpokas I (2019) Caracterización endócrina y biología molecular del endometrio durante el diestro y la gestación temprana en la yegua. Universidad de la República
- Kalra SP, Crowley WR (1992) Neuropeptide Y: a novel neuroendocrine peptide in the control of pituitary hormone secretion, and its relation to luteinizing hormone. *Front Neuroendocr* 13:1–46
- Kerbler TL, Buhr MM, Jordan L., et al (1997) Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology* 47:703–714
- Killeen AP, Morris DG, Kenny DA, et al (2014) Global gene expression in endometrium of high and low fertility heifers during the mid-luteal phase of the estrous cycle. *BMC Genomics* 15:. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-234>
- Lagaly D V., Aad PY, Grado-Ahuir JA, et al (2008) Role of adiponectin in regulating ovarian theca and granulosa cell function. *Mol Cell Endocrinol* 284:38–45. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.01.007>
- Laron Z (2001) Insulin-like growth factor 1 ( IGF-1 ): a growth hormone. 1:311–316
- Larson RL, White BJ, Laflin S (2016) Beef Heifer Development. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 32:285–302
- Lesmeister L, Burfening P, Blackwell R (1973) DATE OF FIRST CALVING IN BEEF COWS AND SUBSEQUENT CALF PRODUCTION. *J Anim Sci* 36:

- Lozano J., Abecia JA, Forcada F, et al (1998) EFFECT OF UNDERNUTRITION ON THE DISTRIBUTION OF PROGESTERONE IN THE UTERUS OF EWES DURING THE LUTEAL PHASE OF THE ESTROUS CYCLE. *Theriogenology* 49:539–546
- Maillard V, Uzbekova S, Guignot F, et al (2010a) Effect of adiponectin on bovine granulosa cell steroidogenesis, oocyte maturation and embryo development. *Reprod Biol Endocrinol* 8:. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-23>
- Maillard V, Uzbekova S, Guignot F, et al (2010b) Effect of adiponectin on bovine granulosa cell steroidogenesis, oocyte maturation and embryo development. *Reprod Biol Endocrinol* 8:1–16. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-23>
- Mann GE, Lamming GE (1999) The Influence of Progesterone During Early Pregnancy in Cattle a n a n a n. *Reprod Domest Anim* 34:269–274
- Mann GE, Lamming GE (2001) Relationship between maternal endocrine environment , early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. 121:175–180
- Maslar IA (1988) The progestational endometrium. *Semin Reprod Endocrinol* 6:115–128. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1021348>
- Matsui M, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa H (1997) STIMULATION OF THE DEVELOPMENT OF BOVINE EMBRYOS BY INSULIN AND INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I (IGF-I) IS MEDIATED THROUGH THE IGF-I RECEPTOR. *Theriogenology* 48:605–616
- Maurer R, Chenault J (1983) Fertilization failure and embryonic mortality in parous and nonparous beef cattle. *J Anim Sci* 56:1186–1189
- McNatty KP, Hudson N, Henderson KM, et al (1984) Changes in gonadotrophin secretion and ovarian antral follicular activity in seasonally breeding sheep throughout the year. *J Reprod Fertil* 70:309–321
- Meikle A, Brun V de, Carriquiry M, et al (2018) Influences of nutrition and metabolism on reproduction of the female ruminant. *Anim Reprod* 15:899–911. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0017>
- Meikle A, Sahlin L, Ferraris A, et al (2001) Endometrial mRNA expression of oestrogen receptor  $\alpha$ , progesterone receptor and insulin-like growth factor-I (IGF-I) throughout the bovine oestrous cycle. *Anim Reprod Sci* 68:45–56. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00143-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00143-9)
- Mihm M, Baguisi A, Boland MP, Roche JF (1994) Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. *Reproduction* 102:123–130. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1020123>
- Miller HM, Foxcroft GR, Squires J, Aherne FX (1999) The Effects of Feed Intake and Body Fatness on Progesterone Metabolism in Ovariectomized Gilts 1 , 2. 3253–3261

- Minten MA, Bilby TR, Bruno RGS, et al (2013) Effects of Fertility on Gene Expression and Function of the Bovine Endometrium. *PLoS One* 8:1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069444>
- Mogheiseh A, Kafi M, Golestani N, et al (2019) Follicular fluid composition of ovulatory follicles in repeat breeder Holstein dairy cows. *Asian Pacific J Reprod* 8:124–131. <https://doi.org/10.4103/2305-0500.259170>
- Murphy LJ, Friesen HG (1988) Differential Effects of Estrogen and Growth Hormone on Uterine and Hepatic Insulin-Like Growth Factor I Gene Expression in the Ovariectomized Hypophysectomized Rat\*. 122:
- Nicklin LT, Robinson RS, Marsters P, et al (2007) Leptin in the Bovine Corpus Luteum : Receptor Expression and Effects on Progesterone Production. 729:724–729. <https://doi.org/10.1002/mrd>
- Nishimoto H, Hamano S, Hill GA, et al (2009) Classification of Bovine Follicles Based on the Concentrations of Steroids, Glucose and Lactate in Follicular Fluid and the Status of Accompanying Follicles. *J Reprod Dev* 55:219–224. <https://doi.org/10.1262/jrd.20114>
- Ohtani Y, Yonezama T, Song S, et al (2011) Gene expression and hormonal regulation of adiponectin and its receptors in bovine mammary gland and mammary epithelial cells. *Anim Sci J* 82:99–106. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2010.00805.x>
- Palin M, Bordignon VV, Murphy BD (2012) *Adiponectin and the Control of Female Reproductive Functions*, 1st edn. Elsevier Inc.
- Pantaleon M, Kaye PL (1998) Glucose transporters in preimplantation development. 77–81
- Parr RA, Davis IF, Miles MA, Squires TJ (1993) Liver blood flow and metabolic clearance rate of progesterone in sheep. *Res Vet Sci* 55:311–316
- Patterson DJ, Perry RC, Kiracofe GH, et al (1992) Management considerations in heifer development and puberty. *J Anim Sci* 70:4018–4035. <https://doi.org/10.2527/1992.70124018x>
- Pérez-Marín CC, España F (2007) Oestrus expression and ovarian function in repeat breeder cows, monitored by ultrasonography and progesterone assay. *Reprod Domest Anim* 42:449–456
- Perry G a., Smith MF, Roberts a. J, et al (2007) Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J Anim Sci* 85:684–689. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-519>
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR. *Nucleic Acids Res* 29:16–21
- Psilopanagioti A, Papadaki H, Kranioti EF, et al (2009) Expression of adiponectin and adiponectin receptors in human pituitary gland and brain.

Neuroendocrinology 89:38–47

Revah I, Butler W (1996) Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J Reprod Fertil* 106:39–47

Revelli A, Piane LD, Casano S, et al (2009) Follicular fluid content and oocyte quality : from single biochemical markers to metabolomics. 13:1–13.  
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-40>

Rhodes FM, Entwistle KW, Kinder JE (1996) Changes in Ovarian Function and Gonadotropin Secretion Preceding the Onset of Nutritionally Induced Anestrus in *Bos indicus* Heifers<sup>1</sup>. *Biol Reprod* 55:1437–1443.  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod55.6.1437>

Richards MW, Wettemann RP, Spicer LJ, Morgan GL (1991) Nutritional Anestrus in Beef Cows: Effects of Body Condition and Ovariectomy on Serum Luteinizing Hormone and Insulin-Like Growth Factor-I. *Biol Reprod* 44:961–966. <https://doi.org/10.1095/biolreprod44.6.961>

Roberts AJ, Gomes Da Silva A, Summers AF, et al (2017) Developmental and reproductive characteristics of beef heifers classified by pubertal status at time of first breeding. *J Anim Sci* 95:5629–5636.  
<https://doi.org/10.2527/jas2017.1873>

Rodrigues RO, Trevisanuto C, Cooke RF, Vasconcelos JLM (2011) Effects of body weight loss on serum progesterone concentrations of non-lactating dairy cows. *Theriogenology* 75:131–137

Rutledge RG, Cote C (2003) Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res* 31:93e – 93.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gng093>

Sales JNS, Iguma LT, Batista RITP, et al (2015) Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *J Dairy Sci* 1–14. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8858>

Sangsritavong S, Combs DK, Sartori R, et al (2002) High Feed Intake Increases Liver Blood Flow and Metabolism of Progesterone and Estradiol-17  $\beta$  in Dairy Cattle. *J Dairy Sci* 85:2831–2842

Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF (1988) Pattern of growth of dominant follicles cycle of heifers. *J Reprod Fertil* 83:

Scaramuzzi RJ, Baird DT, Campbell BK, et al (2011) Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reprod Fertil Dev* 23:444–467. <https://doi.org/RD09161> [pii] 10.1071/RD09161

Scaramuzzi RJ, Baird DT, Henderson KM, Graeme B M (1993) A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe.  
<https://doi.org/10.1071/RD9930459>

Scaramuzzi RJ, Campbell BK, Downing JA, et al (2006) A review of the effects of

- supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod Nutr Dev* 46:339–354
- Schams D, Koll R, Li C (1988) Insulin-like growth factor-I stimulates oxytocin and progesterone production by bovine granulosa cells in culture. *J Endocrinol* 116:97
- Schillo KK (1992) Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *J Anim Sci* 70:1271–1282. <https://doi.org/10.2527/1992.7041271x>
- Selk GE, Wettemann RP, Lusby KS, et al (1988) Relationship among weight change, body condition and reproductive performance of range beef cows. *J Anim Sci* 66:3153–3159. <https://doi.org/10.2527/jas1988.66123153x>
- Short RE, Bellows RA, Staigmiller RB, et al (1990) PHYSIOLOGICAL MECHANISMS CONTROLLING ANESTRUS
- Sirois J, Fortune E (1988) Ovarian Follicular Dynamics during the Estrous Cycle Ultrasonography ' in Heifers Monitored by. *Biol Reprod* 39:308–317
- Sood P, Zachut M, Dekel I, et al (2017) Preovulatory follicle characteristics and oocyte competence in repeat breeder dairy cows. *J Dairy Sci* 100:9372–9381. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12973>
- Sood P, Zachut M, Dube H, Moallem U (2015) Behavioral and hormonal pattern of repeat breeder cows around estrus. *Reproduction* 149:545–554. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0598>
- Sosa C, Carriquiry M, Chalar C, et al (2010) Endometrial expression of leptin receptor and members of the growth hormone-Insulin-like growth factor system throughout the estrous cycle in heifers. *Anim Reprod Sci* 122:208–214. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.011>
- Sosa C, Lozano J, Viñoles C (2004a) Effect of plane of nutrition on endometrial sex steroid receptor expression in ewes. *Anim Reprod* ... 84:337–348
- Sosa C, Lozano JM, Viñoles C, et al (2004b) Effect of plane of nutrition on endometrial sex steroid receptor in ewes. *Anim Reprod Sci* 84:337–348
- Spencer E, Johnson A, Bazer F, et al (2007) Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants : roles of progesterone , interferons and endogenous retroviruses. *Reprod Fertil Dev* 19:65–78. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20130199>
- Spicer L., Echternkamp SE (1995) THE OVARIAN INSULIN AND INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR SYSTEM WITH AN EMPHASIS ON DOMESTIC ANIMALS. *Domest Anim Endocrinol* 12:223–245
- Spicer L, Echternkamp S, Canning S, Hammond J (1988) Relationship between concentrations of immunoreactive insulin-like growth factor-I in follicular fluid

- and various biochemical markers of differentiation in bovine antral follicles. *Biol Reprod* 39:573–580
- Spicer LJ (2001) Leptin: A possible metabolic signal affecting reproduction. *Domest Anim Endocrinol* 21:251–270. [https://doi.org/10.1016/S0739-7240\(01\)00120-5](https://doi.org/10.1016/S0739-7240(01)00120-5)
- Spicer LJ, Alpizar E, Echternkamp SE (1993) Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in vitro. *J Anim Sci* 71:1232–1241
- Spicer LJ, Francisco CC (1997) The adipose obese gene product, leptin: Evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. *Endocrinology* 138:3374–3379. <https://doi.org/10.1210/endo.138.8.5311>
- Tartaglia L, M D, X W, et al (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83:1263–1271
- Tersigni C, Nicuolo F, Ippolito S, Simone N (2011) Adipokines : New Emerging Roles in Fertility and Reproduction. *Obstet Gynecol Surv* 66:47–63
- Tesarik J, Mendoza C (1997) Direct non-genomic effects of follicular steroids on maturing human oocytes: Oestrogen versus androgen antagonism. *Hum Reprod Update* 3:95–100. <https://doi.org/10.1093/humupd/3.2.95>
- Thibault C (1977) Hammond Memorial Lecture. Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes? *J Reprod Fertil* 51:1–15
- Viñoles C, Banchemo G, Quintans G, et al (2009a) Estado actual de la investigación vinculada a la Producción Animal Limpia , Verde y Ética en Uruguay. *Agrociencia XIII*:59–79
- Viñoles C, Banchemo G, Quintans G, et al (2009b) Estado actual de la investigación vinculada a la Producción Animal Limpia, Verde y Etica en Uruguay. *Agrociencia XIII*:59–79
- Viñoles C, Forsberg M, Martin GB, et al (2005) Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00536>
- Viñoles C, Glover KMM, Paganoni BL, Milton JTB (2012a) Embryo losses in sheep during short-term nutritional supplementation. *Reprod Fertil Dev* 24:1040–1047
- Viñoles C, Guggeri D, Carriquiry M, Meikle A (2012b) Effect of age at weaning and plane of nutrition before weaning on progesterone secretion and uterine gene expression at first service in beed heifers. In: *Reproduction in Domestic Animals*. p 565
- Vizcarra JA, Ibañez W, Orcasberro R (1986) Repetibilidad y reproducibilidad de

- dos Escalas para estimar la Condición Corporal de vacas Hereford. *Investig Agronómicas* 7:45–47
- Walsh SW, Williams EJ, Evans ACO (2011) Review article A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim Reprod Sci* 123:127–138. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.12.001>
- Wathes DC, Reynolds TS, Robinson RS, Stevenson KR (1998) Role of the Insulin-Like Growth Factor System in Uterine Function and Placental Development in Ruminants. *J Dairy Sci* 81:1778–1789. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75747-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75747-9)
- Wathes DC, Taylor VJ, Cheng Z, Mann GE (2003) Follicle growth, corpus luteum function and their effects on embryo development in postpartum dairy cows. *Reprod Suppl* 61:219–37
- Watson AJ, Westhusin ME, Winger QA (1999) IGFparacrineand autocrineinteractionsbetween conceptus and oviduct. *J Reprod Fertil* 54:303–315
- Weems C, Weems Y, Lee CN, Vincent D (1989) Progesterone in Uterine and Arterial Tissue and in Jugular and Uterine Venous Plasma of Sheep. *Biol Reprod* 6:1–6
- Williams AH, Cumming IA (1982) Inverse relationship between concentration of progesterone and nutrition in ewes. *J Agric Sci* 98:517–522. <https://doi.org/10.1017/S0021859600054277>
- Wiltbank J (1994) Challenges for improving calf crop, 39th edn. Annual Beef Cattle Short Course, University of Florida
- Wiltbank M, Gümen A, Sartori R (2002) PHYSIOLOGICAL CLASSIFICATION OF ANOVULATORY CONDITIONS IN CATTLE. *Theriogenology* 21–52
- Wiltbank MC, Souza AH, Carvalho PD, et al (2014) Physiological and practical effects of progesterone on reproduction in dairy cattle. 70–81. <https://doi.org/10.1017/S1751731114000585>
- Wolfenson D, Inbar G, Roth Z, et al (2004) Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. 62:1042–1055. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.12.020>
- Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-hahn A, et al (2005) Epigenetic Reprogramming throughout Preimplantation Development and Consequences for Assisted Reproductive Technologies. 9:1–9. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20035>
- Yoon S, Cha K, Lee K (2005) Leptin receptors are down-regulated in uterine implantation sites compared to interimplantation sites. 232:27–35. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.01.002>
- Yusuf M, Nakao T, Bimalka RMS, et al (2010) Reproductive performance of repeat breeders in dairy herds. *Theriogenology* 73:1220–1229.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.01.016>

Zieba DA, Amstalden M, Williams GL (2005) Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: A comparative review. *Domest Anim Endocrinol* 29:166–185. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2005.02.019>