



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

Programa de Posgrados

**EFFECTOS LUTEOLÍTICOS DE LOS ESTÍMULOS
SOCIO-SEXUALES EN VAQUILLONAS DE CARNE**

María Victoria Felipez

**TESIS DE MAESTRIA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL
URUGUAY
2019**



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

Programa de Posgrados

**EFFECTOS LUTEOLÍTICOS DE LOS ESTÍMULOS SOCIO-SEXUALES EN
VAQUILLONAS DE CARNE**

Por

María Victoria FELIPEZ

**Dr. Rodolfo Ungerfeld
Director de Tesis**

**Dr. Tomas Acosta
Co-director de Tesis**

TESIS DE MAESTRIA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

URUGUAY

2019



FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

DE MAestrÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

“EFECTOS LUTEOLÍTICOS DE LOS ESTÍMULOS SOCIO-
SEXUALES EN VAQUILLONAS DE CARNE”

Por: Dra. María Victoria Felipez

Director de Tesis: Dr. Rodolfo Ungerfeld
Codirector de Tesis: Dr. Tomás Acosta

Tribunal

Presidente: Dr. Rodolfo De La Sota

Segundo Miembro: Dr. Felipe Zandonadi Brandao

Tercer Miembro: Dra. Rebeca Chávez

Fallo del Tribunal: *aprobada con mención*


Salón de Posgrados
Viernes 3 de mayo de 2019

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 de la Calificación del Tribunal de Tesis de Maestría de la Dra. María Victoria Felipez

La justificación de la aprobación con mención se basa en la originalidad del trabajo de tesis, en que se haya realizado con trabajos de campo con rigurosidad científica, y que los resultados fueron publicados en una revista internacional especializada indexada. La presentación oral de la tesis fue clara, respondió con solvencia a las preguntas demostrando conocimiento en el tema.


Dr. Rodolfo De La Sota
Presidente del Tribunal

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer en primera instancia a mi tutor el Dr. Rodolfo Ungerfeld, por su dedicación, tiempo y esfuerzo brindado, así como por compartir su conocimiento y experiencia. También a mi co-tutor el Dr. Tomas Acosta por su gran ayuda con las técnicas de ecografía, medición hormonal y redacción de esta tesis. Quisiera agradecer a los médicos veterinarios: Augusto Taira, Víctor Mayorga, Rodrigo Bardier y a las Br. Soledad Rodríguez y Br. Belén Varela por su gran colaboración en la parte experimental de esta tesis.

También quisiera agradecer a la Dr. Ana Meikle, al Dr. Rodrigo Puentes y a la Lic. Patricia Silvera por su ayuda en la medición hormonal de este trabajo. Igualmente a la Dra. Ana Laura Camacho por su ayuda en la utilización del programa Image J para el análisis de las imágenes y al Dr. Javier Meilán (Laboratorio Zoetis) quien donó las hormonas utilizadas en ambos experimentos.

Por último, quisiera dedicarle este trabajo y agradecer a mi familia y amigos por el apoyo incondicional de siempre.

Este trabajo fue sustentado por CSIC, Universidad de la República, Uruguay y ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación).

PUBLICACIÓN

La información generada en los experimentos de este trabajo fue publicada en un artículo científico:

Felipez MV, Acosta TJ, Ungerfeld R 2019. Sexual stimulation as a luteolytic inductor in beef heifers. *Theriogenology* 132: 83-87. (ANEXO 1).

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	2
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN GENERAL	6
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	8
1 Fisiología del ciclo estral	8
1.1 <i>Fase folicular y ovulación</i>	8
1.2 <i>Fase luteal y luteólisis</i>	9
1.2.1 <i>Luteinización y fase luteal</i>	9
1.2.2 <i>Vascularización del cuerpo lúteo</i>	11
1.2.3 <i>Luteólisis</i>	12
2 Sincronización de celos en los bovinos.....	13
3 Bioestimulación	15
HIPÓTESIS	17
OBJETIVO	17
MATERIALES Y MÉTODOS	17
1. <i>Localización y metodología</i>	17
1.1. Experimento 1	18
1.2 Experimento 2	19
2. Análisis del perfil del cuerpo lúteo: volumen, área irrigada y porcentaje de irrigación.....	20
3. Muestras sanguíneas y medición hormonal	20
4. Análisis estadístico	21
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN	24
CONCLUSIONES.....	27
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
ANEXO 1.....	36

RESUMEN

Los tratamientos clásicos de sincronización de celos en vaquillonas se basan en la aplicación de dos dosis de prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PG), de forma de generar luteólisis en ambas o al menos en la segunda aplicación. La bioestimulación, tanto con machos como con hembras en celo puede ser una herramienta para promover la luteólisis, ya que genera un aumento de pulsatilidad de LH y consecuentemente de estrógenos, conduciendo a la misma. Por tanto, la hipótesis de esta propuesta fue que la introducción de machos estimuladores o de hembras en celo durante la fase luteal avanzada de vaquillonas adelanta la luteólisis. Los objetivos fueron comparar el patrón de secreción de progesterona (P_4) así como las características morfológicas y funcionales del cuerpo lúteo (CL) en vaquillonas estimuladas durante su fase luteal tardía por novillos androgenizados o por hembras en celo. Se realizaron 2 experimentos. En el experimento 1 se utilizaron 12 vaquillonas Angus y Angus X Hereford, cuyas ovulaciones fueron presincronizadas. A partir del día 12 (día 0= ovulación) por la tarde se conformaron los dos grupos experimentales con 6 animales cada uno. Al grupo bioestimulado (BTNA) se le introdujo 2 novillos que fueron previamente androgenizados con 2 dosis semanales de 500 mg i.m de cipionato de testosterona permaneciendo las otras vaquillonas como control (CON1) aisladas de todo contacto con machos (distancia mínima: 1000 m). En el experimento 2 se utilizaron 20 vaquillonas Angus y Angus X Hereford. Se sincronizaron las ovulaciones y el día 12 por la tarde se formaron dos grupos de 10 animales: se introdujeron 4 vaquillonas en celo a las del grupo bioestimulado (BTHC), permaneciendo las otras 10 como control (CON2), separados ambos grupos por una distancia mínima de 1000 m. El día 13 se introdujeron 4 hembras en celo más al grupo BTHC. En ambos trabajos se determinó el tamaño del cuerpo lúteo (CL), así como la superficie perfundida mediante eco-doppler, y se colectaron muestras de sangre para la medición de P_4 . En el Experimento 1 no hubo efecto del tratamiento sobre el volumen del cuerpo lúteo, pero la superficie perfundida del CL fue menor en el grupo BTNA que en el control, indicando una regresión más temprana del CL ($0,09 \pm 0,01 \text{ cm}^2$ vs $0,16 \pm 0,02 \text{ cm}^2$ respectivamente; $p=0,015$). También el porcentaje de perfusión del CL fue menor en los animales BTNA que en los CON1 ($2,4 \pm 0,4 \%$ vs $4,2 \pm 0,4 \%$; $p=0,011$), y la concentración de P_4 fue

menor los días 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5 y 19,5. En el experimento 2 no hubo efecto del tratamiento en ninguna de las variables estudiadas. Por lo tanto, la bioestimulación de vaquillonas de carne con novillos androgenizados durante la fase luteal tardía adelantó el proceso luteolítico. Por el contrario, la introducción de vaquillonas en celo no tuvo efectos sobre la luteólisis.

ABSTRACT

The classic synchronization treatments in heifers are based on the application of two doses of PGF_{2α}, in order to induce luteolysis in both or at least in the second application. Biostimulation with males and females in estrus can be a tool to promote luteolysis, since it generates an increase in pulsatility of LH, and therefore of estrogen that can lead to it. Therefore, the hypothesis of this proposal was that the introduction of androgenized steers or heifers in estrus during the advanced luteal phase advances luteolysis in heifers. The objectives were to compare the progesterone (P₄) secretion pattern as well as the morphological and functional characteristics of the corpus luteum (CL) in heifers stimulated during their late luteal phase by androgenized steers or by females in estrus. Two experiments were performed. In experiment 1, 12 Angus and Angus X Hereford heifers were used, whose ovulations were presynchronized. On day 12 (day 0= ovulation) in the afternoon, two experimental groups were formed with 6 animals each. In the treatment group (BTNA), 2 steers that were previously androgenized with 2 weekly doses of 500 mg i.m. of testosterone cypionate, were introduced. The other heifers remained as control (CON1) and isolated from contact with males (minimum distance: 1000 m). In experiment 2, 20 Angus and Angus X Hereford heifers were used. The ovulations were synchronized, and they were separated into two groups of 10 animals: on the 12th day in the afternoon 4 heifers in estrus were introduced to those of the biostimulated group (BTHC), and 4 more on 13th day. The other 10 heifers remained as controls (CON2) and both groups were separated by a minimum distance of 1000 m. In both studies, the size of the CL was measured, as well as the perfused surface by Doppler ultrasound, and blood samples were collected for the measurement of P₄. In experiment 1, there was no treatment effect on the volume of the CL, but the perfused area of the CL was lower in the BTNA group than in the control group, indicating an earlier CL regression (0.09 ± 0.01 cm² vs 0.16 ± 0.02 cm² respectively, $p = 0.015$). The percentage of perfused area of the CL was also lower in the BTNA animals than in the CON1 animals ($2.4 \pm 0.4\%$ vs $4.2 \pm 0.4\%$, $p = 0.011$), and the concentration of P₄ was lower in BTNA on days 15.5, 16, 16.5, 17, 17.5 and 19.5. In experiment 2, there was no treatment effect in any of the variables studied. Therefore, the biostimulation of beef heifers with androgenized steers during

the late luteal phase advanced the luteolytic process. On the contrary, the introduction of heifers in estrus had no effect on luteolysis.

INTRODUCCIÓN GENERAL

En bovinos, el ciclo estral dura de 18 a 24 días (Ginther, Knopf y Kastelic, 1989), siendo la vida del cuerpo lúteo (CL) la principal determinante de su duración. En la vaca, la regresión estructural y funcional del CL (luteólisis) comienza en el día 15 (Día 0 = ovulación) y es atribuida principalmente a la liberación de prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PG) por el endometrio uterino (Ginther et al., 2007). La luteólisis se produce luego de una serie de interacciones hormonales que finalizan con la regresión del CL y el cese de su función (Stouffer, 2006). Durante la fase luteal tardía (días 13-15), el aumento de estradiol que se produce como consecuencia del desarrollo folicular induce un aumento en el número de receptores uterinos a oxitocina (Salfen et al., 1999). A su vez, la oxitocina hipofisaria y la luteal secretada durante la propia fase luteal provocan un aumento en la producción de PG por parte del útero (Flint y Sheldrick, 1982) que, debido a su efecto luteolítico (McCracken et al., 1999), determina la consiguiente luteólisis (Wiltbank y Ottobre, 2003) y, consecuentemente, el comienzo de una nueva fase folicular. El desarrollo de la capacidad del CL de producir y liberar progesterona (P_4) es dependiente del proceso de angiogénesis que ocurre durante los primeros días post-ovulación (Reynolds et al., 2000). Como resultado de este proceso, el CL se convierte en uno de los órganos más vascularizados (Gaytán et al., 1999) y que recibe mayor flujo sanguíneo por unidad de tejido comparado con cualquier otro órgano del cuerpo (Wiltbank et al., 1988). El sistema vascular del CL provee sustancias biológicas, nutrientes y hormonas a las células luteales, que son indispensables para la secreción de P_4 . Sin embargo, uno de los cambios histológicos más tempranos que ocurren durante la luteólisis es observado en los componentes vasculares (Azmi y O'Shea, 1984). Una de las principales acciones de la $PGF_{2\alpha}$ es el rápido descenso del flujo sanguíneo que recibe el CL. Este descenso ocurre tanto en la luteólisis normal como en la inducida por la administración de análogos sintéticos de $PGF_{2\alpha}$ (Azmi et al., 1982; Knickerbocker et al., 1988). Los cambios del flujo sanguíneo intraluteal pueden ser evaluados en tiempo real mediante la utilización del eco-doppler transrectal, una técnica no invasiva (Miyazaki et al., 1998). El efecto estimulante de machos sobre la ciclicidad de las hembras a través de la estimulación genital, feromonas u otras señales externas es conocido como bioestimulación (Chenoweth, 1983). Se ha demostrado que la presencia de machos o de hembras en

celo puede estimular la actividad reproductiva de hembras en varias especies de rumiantes (Ungerfeld, 2007). En este sentido, Chemineau (1983) sugirió que el aumento de estrógenos subsecuente a la introducción de machos a un grupo de cabras previamente aisladas puede inducir una rápida luteólisis y por tanto adelantar el estro.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1 Fisiología del ciclo estral

El bovino es un animal con reproducción poliéstrica no estacional (Bó et al., 2008), con un ciclo estral que dura de 18 a 24 días (Ginther et al.1989). Normalmente se considera el día del celo como el día 0 del ciclo debido a su fácil detección y monitoreo. La duración del celo es breve (entre 6 y 24 h), definiéndose como el periodo durante el que la hembra acepta la monta por parte del macho. Se puede dividir el ciclo estral en dos fases: fase folicular que va desde el día 13-14 (celo=día 0) cuando comienza la regresión luteal hasta el día 2, y la fase luteal que se extiende desde el día 2-3 del ciclo hasta el comienzo de la siguiente fase folicular (Ungerfeld, 2002). Los cambios hormonales y estructurales del tracto reproductivo de la hembra durante el ciclo estral están regulados por la interacción entre hormonas secretadas principalmente en el hipotálamo, la hipófisis, los ovarios (gónadas) y el útero, constituyendo lo que se conoce como “eje hipotalámico-hipofisario-gonadal-uterino” (Bó et al., 2008). La comunicación entre estos órganos se realiza fundamentalmente a través de hormonas. Las principales hormonas involucradas son la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), que es secretada por el hipotálamo, la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) secretadas por la hipófisis, el estradiol, la inhibina y laprogesteronona (P_4), de origen ovárico, y la $PGF_{2\alpha}$ secretada por el endometrio (Ungerfeld, 2002).

1.1 Fase folicular y ovulación

La fase folicular se extiende desde la regresión del CL hasta la ovulación. Durante esta fase se produce el desarrollo folicular preovulatorio, la ovulación y comienza la organización del folículo que ovuló en un nuevo CL (luteogénesis) (Ungerfeld, 2002). La P_4 secretada por el CL impide que se desencadenen los mecanismos de retroalimentación positiva GnRH-LH-estrógenos, pero al comienzo de la fase folicular, las concentraciones de P_4 caen debido a la regresión del CL, determinando que esta retroalimentación sea positiva. Es decir, que luego de cada pulso de GnRH la hipófisis

responde liberando LH, y el folículo responde a la LH secretando estrógenos (Walters et al., 1984). A su vez, los estrógenos determinan que se produzca un nuevo pulso de LH el que inducirá un nuevo incremento de estrógenos. El estradiol aumenta la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH (Reeves et al., 1971) de manera que se produzca una descarga masiva de LH o pico preovulatorio de LH. El pico preovulatorio de LH dura aproximadamente 12 h y es acompañado por un pico de FSH (Hafez, 1993). El mismo induce a las células de la granulosa a producir sustancias que debilitan la unión intercelular en la pared folicular, especialmente entre las células de la granulosa (Ungerfeld, 2002). Como consecuencia se produce la ruptura del folículo preovulatorio y la liberación del ovocito, proceso conocido como ovulación. La luteinización del folículo empieza horas antes de la ovulación y es acompañada por la disminución de las concentraciones de estrógenos (Ungerfeld, 2002)

La ovulación ocurre alrededor de 24 h después del comienzo del pico preovulatorio de LH, aproximadamente 12 h después de terminado el celo. Luego de la ovulación existe un segundo pico de FSH, debido a la remoción de la retroalimentación negativa del ovario sobre el desarrollo folicular (Hafez, 1993). Por lo tanto, los niveles preovulatorios de FSH están regulados por los mismos mecanismos que determinan el pico de LH: un estímulo de la secreción de la GnRH provocado por una retroalimentación positiva con los estrógenos ováricos (Walters et al., 1984).

1.2 Fase luteal y luteólisis

1.2.1 Luteinización y fase luteal

El CL es un órgano transitorio que se forma a partir de las paredes del folículo que ovuló, y secreta P₄ (Acosta y Miyamoto, 2004). Alcanza la madurez funcional en la mitad de la fase luteal (días 8-12 del ciclo) y comienza a regresar entorno a los 15-17 días post-ovulación (Reynolds et al., 2000). Luego de la ovulación, la cavidad del folículo ovulatorio es invadida por células de la granulosa y la teca interna que proliferan y se luteinizan comenzando así la formación del CL. El crecimiento y desarrollo del CL es extremadamente rápido y organizado con una alta tasa de renovación celular, incluso

cuando el CL es funcionalmente maduro (Reynolds y Redmer, 1999). Está formado por un tejido complejo de células parenquimatosas (pequeñas y grandes esteroideogénicas) y no parenquimáticas (fibroblastos, músculo liso vascular, pericitos y células endoteliales) (Reynolds y Redmer, 1999). Tanto las células de la teca como las de la granulosa se diferencian en las células luteales que conforman el CL (Alila y Hansel, 1984). Las células de la teca interna se diferencian en células luteales pequeñas. Las células de la granulosa se diferencian en células luteales grandes de mayor tamaño (Priedkalns et al., 1968). A pesar de que el CL se encuentra totalmente desarrollado y vascularizado en el día 9 postovulación, su crecimiento continúa hasta el día 12 y permanece con su tamaño máximo hasta el día 15-17 (aproximadamente 25 mm de diámetro) (Priedkalns et al., 1968).

El CL es la principal fuente de P_4 circulante (Reynolds et al., 2000). Ambos tipos celulares (células luteales pequeñas y grandes) secretan P_4 , pero las células pequeñas poseen mayor cantidad de receptores de LH y una respuesta seis veces mayor cuando se las expone a LH *in vitro* que las células grandes en términos de secreción de P_4 (Fitz, 1982). Por el contrario, la producción de P_4 de las células grandes es 20 veces mayor que las pequeñas sin necesidad de ser estimuladas (Fitz, 1982), por lo que las células pequeñas contribuyen con tan solo con el 15 % de la producción de P_4 total, siendo el resto atribuido a las células luteales grandes.

La determinación de las concentraciones plasmáticas de P_4 es comúnmente utilizada como indicador de la función luteal (Battocchio et al., 1999). Frecuentemente se asume que si la concentración de P_4 en plasma es mayor a 1 ng/mL existe un CL activo secretante en uno de los ovarios (Battocchio et al., 1999). De acuerdo a Robertson y Sarda (1971), las concentraciones de P_4 son muy bajas (generalmente entre 0,1 – 0,2 ng/mL) el día de la ovulación, y no aumentan en forma apreciable hasta el día 4 del ciclo (Fig. 1). En las vacas vacías, los valores máximos de concentración se alcanzan en torno al día 13, con 5 ng/mL, comenzando a descender abruptamente en los días 17 a 18 hasta concentraciones menores a 0,5 ng/mL antes del inicio del siguiente celo (Figura 1).

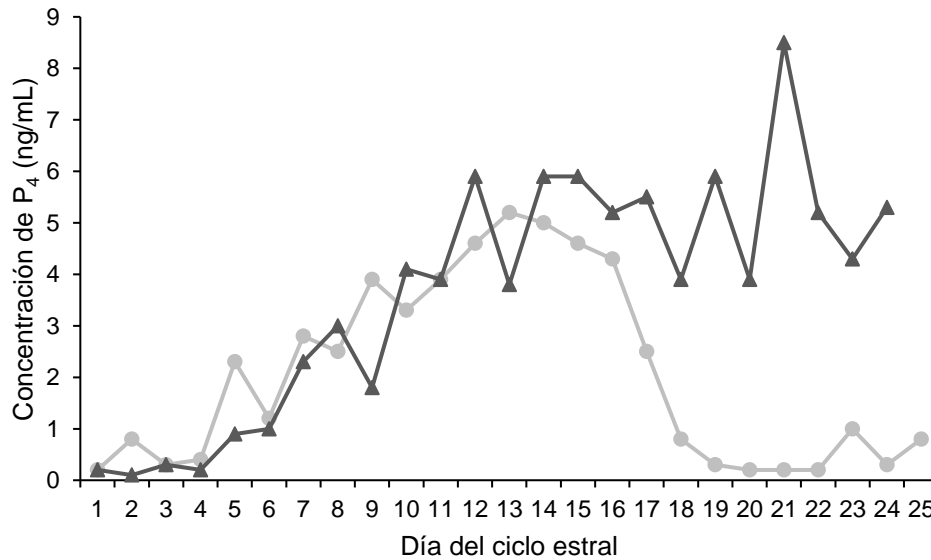


Figura 1: Concentración de P₄ en plasma de vacas durante el ciclo estral (•---) y durante la preñez (▲---▲). (Modificado de Robertson y Sarda, 1971).

1.2.2 . Vascularización del cuerpo lúteo

El desarrollo de la capacidad del CL de producir y liberar P₄ es dependiente del proceso de angiogénesis que ocurre durante los primeros días post- ovulación (Reynolds et al., 2000). La intensidad de este proceso en el CL es comparable con la velocidad en el desarrollo vascular de los tumores malignos (Reynolds et al., 2000). Como resultado de este intenso proceso angiogénico, el CL se convierte en uno de los órganos más vascularizados del animal (Gaytán et al., 1999), siendo el que recibe mayor flujo sanguíneo por masa de tejido (Wiltbank et al., 1988). Más del 50 % de la composición celular del CL maduro corresponde a células endoteliales (día 8-12 del ciclo) (Lei et al., 1991), que liberan sustancias vasoactivas que son capaces de regular el funcionamiento del CL (Milvae, 2000).

El sistema vascular del CL provee sustancias biológicas y nutrientes a las células luteales;, que son indispensables para la secreción de P₄. Sin embargo, uno de los cambios histológicos más tempranos que ocurren durante la luteólisis se observa en los

componentes vasculares (Azmi y O'Shea, 1984). El rápido descenso del flujo sanguíneo que recibe el CL es una de las principales acciones que genera $\text{PGF}_{2\alpha}$. Este descenso ocurre tanto durante la luteólisis normal como en la luteólisis inducida por la administración de análogos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Azmi et al., 1982; Knickerbocker et al., 1988). El flujo sanguíneo intraluteal se puede evaluar en tiempo real mediante la utilización del eco-doppler transrectal, una técnica no invasiva (Miyazaki et al., 1998).

1.2.3 Luteólisis

La vida del CL es el principal determinante de la duración del ciclo estral. En la vaca, la regresión estructural y funcional del CL (luteólisis) comienza en el día 15-17 y es atribuida principalmente a la liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ por el útero (Ginther et al., 2007). La luteólisis se produce luego de una serie de interacciones hormonales que finalizan con el cese funcional del CL y su regresión (Stouffer, 2006). Durante la fase luteal, la P_4 reduce la expresión uterina de los receptores a estrógenos (Wathes y Hamon, 1993) y oxitocina (Ivell et al., 2000), pero, además, la de sus propios receptores hormonales (Milgrom et al., 1973). Como consecuencia de esto último, la concentración de P_4 disminuye paulatinamente su capacidad de actuar sobre el útero a medida que avanza la fase luteal, reduciendo sus propios efectos e incrementando la expresión de los receptores a estrógenos y oxitocina (Spencer et al., 1995). Durante la fase luteal tardía (días 13-15), el aumento de estradiol que se produce como consecuencia del desarrollo folicular induce un aumento en el número de receptores uterinos a oxitocina (Salfen et al., 1999). A su vez, la oxitocina hipofisaria y la luteal secretada durante la propia fase luteal provocan un aumento en la producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ por parte del útero (Flint y Sheldrick 1982). La acción previa de concentraciones altas de P_4 favorece la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ de dos maneras: 1) incrementando la acumulación de lípidos en el endometrio, que por medio de la fosfolipasa 2, producen ácido araquidónico, el que es convertido a $\text{PGF}_{2\alpha}$ por acción de la ciclooxigenasa; e 2) incrementando la acción de la propia oxigenasa (McCracken et al., 1999). A su vez, la $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimula la síntesis y secreción de oxitocina por parte del CL (Flint y Sheldrick, 1982). Finalmente, estas dos hormonas –la $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina y la oxitocina luteal– desarrollan un ciclo de retroalimentación positiva, donde

pulsos de una son seguidos de pulsos de la otra (Vighio y Liptrap, 1986; Silvia et al., 1991). Estos pulsos son cada vez más importantes, llevando a un aumento de la concentración de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Flint y Sheldrick, 1982; Bazer et al., 1991). Además, a diferencia del CL de la fase lútea temprana-media (días 5-7), en esta fase el CL de la vaca es “maduro” y tiene la capacidad de sintetizar $\text{PGF}_{2\alpha}$ intralútea (Wiltbank y Ottobre, 2003). Dado el efecto luteolítico de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ (McCracken et al., 1999), su aumento determina la luteólisis (Wiltbank y Ottobre, 2003) y, consecuentemente, el comienzo de una nueva fase folicular.

2 Sincronización de celos en los bovinos

La sincronización de celos es una tecnología de amplia aplicación en rumiantes dado que simplifica el manejo reproductivo permitiendo que todos los animales se inseminen en un rango acotado de tiempo (Berardinelli et al., 2007). Por otra parte, la inseminación artificial (IA) es una biotecnología que ha sido extensamente utilizada para reproducir genética de alto valor, aunque factores como la nutrición, manejo y detección del celo pueden afectar la eficiencia de esta tecnología (Bó, 2013). Por ello, a pesar de que la IA es una biotecnología antigua, su implementación se ha difundido más recientemente asociada al uso de protocolos de sincronización que controlan el desarrollo folicular y la ovulación permitiendo la inseminación de un gran número de animales sin la necesidad de detectar celo, lo que se conoce como inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) (Bó, 2013). La adopción de esta tecnología en países de Sudamérica, Norteamérica y Oceanía creció significativamente a partir de los años 2000. En ese entonces, la IATF prácticamente no era utilizada en Uruguay excepto por pocos técnicos, muchas veces con resultados variables y controvertidos (Menchaca et al. 2013). Según datos reportados por Bó, en año 2013 fueron inseminadas por IATF aproximadamente 2.500.000 vacas en Argentina y 6.500.000 en Brasil. En Uruguay desde 1995 hasta el 2005 se inseminaban por IATF unas 10 mil vacas cada año. A partir de entonces su adopción se ha incrementado año tras año (Menchaca et al. 2013). De esta manera la IATF es probablemente la biotecnología de la reproducción que ha mostrado mayor crecimiento en los últimos años. Esta herramienta es utilizada en diferentes condiciones

a través de un importante número de profesionales que la aplican sin mayores inconvenientes y con resultados aceptables (Menchaca et al. 2013).

La identificación de la $PGF_{2\alpha}$ como “luteolisina” uterina de varias especies domésticas fue un gran avance en el desarrollo de las biotecnologías reproductivas, y en la década de los 70’s determinó un gran avance en el conocimiento de la fisiología y en la posibilidad de manipular y controlar el ciclo estral (Bó, 2014). Rowson (1972) y Cooper y Furr (1974) demostraron que una inyección de 500 mg de clorprostenol (análogo sintético de la $PGF_{2\alpha}$) a hembras bovinas cíclicas, desencadena la luteólisis en aquellos animales que poseen CL en la mitad de la fase luteal. Además, demostraron que aproximadamente a los 11 días después de esta primera dosis todos los animales se encontraban en la fase luteal, por lo que, administrando una segunda dosis, todos los animales eran sensibles a la $PGF_{2\alpha}$. Posteriormente, Cooper et al. (1976) demostraron que es posible sincronizar los celos de las hembras bovinas cíclicas y ser inseminadas a celo detectado, a las 72 y a las 96 h después de la segunda dosis de clorprostenol. Fue así como surgió el primer tratamiento de sincronización de celos con prostaglandina.

Por lo tanto, los tratamientos clásicos de sincronización de celos se basan en la aplicación de dos dosis de análogos de $PGF_{2\alpha}$ de forma de generar luteólisis en ambas o al menos en la segunda aplicación y consecuentemente, sincronizar la manifestación de celos. Estos tratamientos solo se pueden aplicar en hembras cíclicas, pero, además, con los mismos se logra menor cantidad de hembras que ovulan y porcentaje de preñez que con la IATF, además de generar menores costos y disminuir la aplicación de hormonas que puedan ser social y ambientalmente cuestionables. Es de interés poder mejorar la aplicación de estos tratamientos o disminuir aún más las dosis o la cantidad de $PGF_{2\alpha}$ necesaria. Para ello es necesario estudiar y/o desarrollar alternativas que pueden promover la luteólisis o actuar sinérgicamente con la aplicación de la $PGF_{2\alpha}$.

3 *Bioestimulación*

La reproducción es una consecuencia de mecanismos reguladores endógenos neuroendocrinos y factores externos que interactúan con ellos (Ungerfeld, 2007). Las condiciones del entorno interactúan con el sistema endocrino estimulando o inhibiendo mecanismos fisiológicos y muchos de estos mecanismos están relacionados con el sistema reproductivo (Ungerfeld, 2007). En rumiantes, el factor social actúa estimulando o inhibiendo la actividad reproductiva. El amamantamiento, y las jerarquías sociales son un ejemplo de factores inhibitorios que deben tenerse en cuenta a la hora del manejo de los animales (Ungerfeld, 2007).

El efecto estimulante de machos sobre la ciclicidad de las hembras a través de la estimulación genital, feromonas u otras señales externas es conocido como bioestimulación (Chenoweth, 1983). En vacas, la bioestimulación puede provocarse con toros, toros vasectomizados, vacas androgenizadas (Burns y Spitzer, 1992) o novillos androgenizados (Ungerfeld, 2009). La introducción de novillos androgenizados adelanta la ciclicidad de las hembras (Burns y Spitzer, 1992; Ungerfeld, 2009; Fiol y Ungerfeld, 2012) y además facilita el manejo de los animales y la implementación del trabajo en rodeos comerciales. Por otra parte, en varias especies también existe un estímulo de hembras sobre hembras: por ejemplo, el contacto estrecho con ovejas cíclicas induce la ovulación de ovejas en anestro (Zarco et al., 1995; Orihuela et al., 2016). Si bien en vacas existe menos información disponible, la exposición de mucus vaginal de vacas en celo reduce la duración del anestro posparto en vacas de carne (Wright et al. 1994).

Por lo tanto, se ha demostrado que la presencia de machos o de hembras en celo puede estimular la actividad reproductiva de hembras de varias especies de rumiantes (Ungerfeld, 2007). La estimulación puede lograrse a través de señales visuales, auditivas y/u olfativas (Ungerfeld, 2007). Si bien estos mecanismos han sido ampliamente estudiados en pequeños rumiantes, también se ha demostrado su efectividad en adelantar la pubertad en vaquillonas de carne (Fiol y Ungerfeld, 2011) o la ciclicidad en vacas posparto (Miller y Ungerfeld, 2008). En bovinos, a diferencia de lo que ocurre en pequeños rumiantes, los mecanismos fisiológicos desencadenados por la

bioestimulación no se encuentran del todo dilucidados hasta el momento, pero la mayoría de la información indica que los efectos positivos de la bioestimulación se deben a la activación del eje hipotálamo- hipófiso-ovárico (Fiol y Ungerfeld, 2016). Tanto en pequeños rumiantes como en bovinos, se ha demostrado que los estímulos socio-sexuales generan aumento en la secreción pulsátil de LH de las hembras estimuladas (Martin et al., 1983; Custer et al., 1990), y por tanto de estrógenos por parte del ovario. Considerando que el aumento de estradiol es el primer paso para que se desencadene la luteólisis (Hixon y Flint, 1987), sería esperable que la bioestimulación también induzca luteólisis.

En este sentido, Chemineau (1983) sugirió que el aumento de estrógenos subsecuente a la introducción de machos a un grupo de cabras cíclicas previamente aisladas, puede inducir una rápida luteólisis y el estro. Por lo tanto, la presencia de los machos puede haber inducido un adelanto de la luteólisis y la ovulación en las hembras que normalmente habrían ovulado varios días más tarde. A su vez, recientemente se demostró que la introducción repentina de machos cabríos modifica el patrón de secreción de progesterona en cabras cíclicas. La respuesta del grupo estimulado es bifásica, es decir que existe un aumento inicial, probablemente debido a la estimulación del CL por el aumento en los pulsos de LH, pero después de este aumento se observa una disminución más acentuada de la concentración de P_4 que en animales no estimulados (Ungerfeld y Orihuela, 2015). Esta segunda respuesta es probablemente debida a la secreción de estradiol inducida por los machos. En general, aunque este modelo no modificó la duración del ciclo estral, la introducción de machos cabríos podría potencialmente utilizarse para adelantar la luteólisis en cabras cíclicas (Ungerfeld y Orihuela, 2015).

Por otro lado, se comprobó que en un programa de sincronización de celos, la introducción de carneros junto con con la segunda dosis (Ungerfeld, 2011) o con media dosis de $PGF_{2\alpha}$ (Meilán y Ungerfeld, 2014) adelanta el celo e incrementa el número de ovejas que responden al tratamiento. Esto podría deberse a un adelanto del picopreovulatorio de LH y de la ovulación en ovejas sincronizadas con $PGF_{2\alpha}$ y

estimuladas con efecto macho, lo que puede ser explicado por una luteólisis temprana (Meilán y Ungerfeld, 2014). Queda claro que las ovejas que presentaron celo en ese período adelantaron el comienzo del mismo, demostrando que este tipo de manejo es potencialmente efectivo. Por lo tanto, ya existen estudios en pequeños rumiantes que soportan la hipótesis de que los estímulos sexuales pueden adelantar el proceso luteolítico.

HIPÓTESIS

La introducción de novillos androgenizados o de hembras en celo durante la fase luteal avanzada de vaquillonas adelanta la luteólisis.

OBJETIVO

Comparar el proceso luteolítico en vaquillonas estimuladas o no por novillos androgenizados o por hembras en celo durante la fase luteal avanzada.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Localización y metodología

Se realizaron 2 experimentos, ambos en un establecimiento particular ubicado en Cerro Colorado, Florida, Uruguay (33° 44´S, 55°26´O). El Experimento 1 se llevó a cabo en el mes de mayo (otoño) y el Experimento 2 en septiembre (primavera) del 2017. Ambos experimentos fueron aprobados por la Comisión de Ética en el Uso de Animales de Experimentación de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República.

1.1. Experimento 1

La bioestimulación de los animales se realizó en fase luteal avanzada (Día 12-13 del ciclo, considerando el día de la ovulación como Día 0). Para ello se sincronizaron las ovulaciones de 12 vaquillonas Angus y Angus X Hereford (311 ± 24 kg; media \pm DE) de 15 a 18 meses de edad. A cada animal se le administraron dos dosis de un agonista de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (500 μg im. de clorprostenol Ciclase DL, Syntex, Buenos Aires, Argentina) separadas por 11 días y una dosis de un análogo de GnRH (100 μg im. de acetato de gonadorelina, Gonasyn, Syntex, Buenos Aires, Argentina) dos días después de la segunda dosis de clorprostenol. Se realizó ecografía ovárica diariamente a todas las vaquillonas durante los dos días posteriores a la administración de la gonadorelina para determinar exactamente el día de la ovulación de cada animal.

El examen del CL se realizó mediante eco-Doppler transrectal (Esaote MyLab OneVET con un transductor lineal 7mHz, Milán, Italia) los Días 10, 11 y 12. Hasta este día los animales se mantuvieron en un potrero de 8 ha con buena oferta de forraje y pastoreando *ad libitum* y. El Día 12 por la tarde, las vaquillonas fueron separadas aleatoriamente en dos grupos de 6 animales cada uno. Al grupo bioestimulado (BTNA) se le introdujeron dos novillos Angus (343 ± 4 kg) de la misma edad que fueron previamente androgenizados con dos dosis semanales de 500 mg im. de cipionato de testosterona (Testosterona Ultralenta Dispert, Montevideo, Uruguay). Luego de la separación, tanto el grupo BTNA como el control (CON1) se mantuvieron en potreros de iguales dimensiones (8 ha) con una separación mínima de 1000 m. Ambos grupos de vaquillonas pastorearon *ad libitum* y con buena oferta de forraje durante todo el experimento. A partir del Día 13, se realizó eco-Doppler dos veces al día (separadas por 12 h) hasta que no se observó perfusión sanguínea en el CL del animal. Para analizar el tamaño y perfusión del CL, se grabaron videos cortos del órgano en cada animal. Los videos fueron copiados del ecógrafo a un pendrive y guardados en una computadora personal hasta su procesamiento. A todas las vacas se les realizó colecta de muestras de sangre de la región coccígea dos veces por día (separadas por 12 h) desde el Día 10 hasta el día en que no se visualizó perfusión en el CL. El manejo de los animales se realizó en el mismo

orden todos los días, primero el grupo CON1 y después el BTNA. El experimento terminó cuando no se observó perfusión luteal en ningún animal del grupo BTNA.

1.2. Experimento 2

Se utilizaron 20 vaquillonas Angus y Angus X Hereford de 15 a 18 meses de edad con un peso 270 ± 20 kg. Sus ciclos se sincronizaron administrando una dosis de benzoato de estradiol (2 mg im., Syntex, Buenos Aires, Argentina) y colocando un dispositivo intravaginal impregnado con P₄ (1 g, DIB, Syntex, Buenos Aires, Argentina). A los 7 días se retiró el dispositivo y se aplicó cipionato de estradiol (0,5 mg im., Von Franken, Fatro, Buenos Aires, Argentina), una dosis de un agonista de PGF_{2 α} (500 μ g im. de clorprostenol Ciclase DL, Syntex, Buenos Aires, Argentina) y 300 UI de gonadotrofina coriónica equina im. (Novormón, Syntex, Buenos Aires, Argentina). A los dos días de retirado el dispositivo, se realizó ecografía ovárica diariamente a todas las vaquillonas para determinar exactamente el día de la ovulación de cada animal (Día 0 del ciclo). El examen del CL se realizó mediante eco-Doppler transrectal los Días 10, 11 y 12 del ciclo. Hasta este día los animales se mantuvieron en un potrero de 8 ha, con buena oferta de forraje y pastoreando *ad libitum*. El Día 12 por la tarde las vaquillonas fueron separadas aleatoriamente en dos grupos de 10 animales cada uno. Al grupo bioestimulado (BTHC) se le introdujeron 4 vaquillonas en celo que fueron pre-sincronizadas de igual manera que las 20 vaquillonas. Se comprobó que estaban en celo mediante la visualización de peladuras sobre los huesos del anca y columna. Al día 13 se sumaron otras 4 vaquillonas en celo al grupo BTHC. Para prolongar la duración del celo de las 8 vaquillonas, se les administró 1 dosis de benzoato de estradiol (2 mg im de Benzoato de estradiol Syntex, Buenos Aires, Argentina) cada 12 h y hasta finalizar el experimento. Luego de la separación, tanto el grupo BTHC como el control (CON2) se mantuvieron en potreros con buena oferta de forraje, de iguales dimensiones (8 ha) con una separación mínima de 1000 m. Ambos grupos de vaquillonas pastorearon *ad libitum* durante todo el experimento. Se realizó eco-doppler dos veces al día (separadas por 12 h) en ambos grupos desde el día 13 hasta la desaparición de la perfusión del CL. Al igual que en el experimento 1, se grabaron videos cortos del CL y perfusión en cada animal, los cuales

fueron copiados a un pendrive y guardados en una computadora personal hasta su procesamiento. A su vez, se colectaron muestras de sangre a las 20 vaquillonas de la región coccígea dos veces por día (separadas por 12 h) desde el Día 10 hasta el día en que la perfusión del CL desapareció. En este caso también se respetó la secuencia de toma de muestras todos los días, primero el grupo CON2 y después el BTHC. El experimento terminó cuando todos los animales del grupo BTHC no presentaron perfusión luteal.

2. Análisis del perfil del cuerpo lúteo: volumen, área irrigada y porcentaje de irrigación

Para analizar el perfil de cada CL se grabaron videos cortos mostrando el tamaño y patrón de perfusión del órgano de cada animal mediante eco-doppler con la frecuencia anteriormente explicitada. Los videos fueron transferidos desde el equipo de ultrasonografía vía pendrive a una computadora personal (Sony Vaio Core i5, Tokio, Japón). Cada video fue analizado obteniendo una imagen con el diámetro y patrón de perfusión máximos apreciable. Una vez seleccionadas, las imágenes se analizaron utilizando el programa Image J (Image Processing and Analysis in Java, *Java2HTML versión 1.5*). Se seleccionó el contorno de cada CL obteniendo así el área y a partir de la misma se calculó el volumen. Para medir el área de perfusión sanguínea y así obtener el porcentaje de área de perfusión, se seleccionó el área coloreada (área perfundida) y posteriormente se transformó la imagen en una imagen en blanco y negro, siendo el área perfundida negra utilizando el programa, lo que permitió su medición.

3. Muestras sanguíneas y medición hormonal

Las muestras sanguíneas fueron centrifugadas y el suero almacenado y conservado a -20 °C hasta el momento de la medición en las muestras recolectadas en ambos experimentos. La concentración de P₄ fue medida con un kit de radioinmunoanálisis que utiliza tubos coteados con anticuerpos y progesterona marcada con un radioisótopo (¹²⁵I) (ImmuChem™ Coated Tube Progesterone, ICN Pharmaceuticals, Inc. Diagnostics Division Costa Mesa, CA, EEUU). El CV intraensayo y la sensibilidad de la medición de

las muestras del Experimento 1 fueron 8,52 % y 0,02 ng/mL respectivamente. El experimento 2 se midió en dos partes: sus CV intraensayo fueron 11,30 y 7,10% y el interensayo y la sensibilidad fueron 9,24 % y 0,03 ng/mL respectivamente.

4. Análisis estadístico

El perfil del cuerpo lúteo (volumen, superficie irrigada y porcentaje de la superficie irrigada), así como la concentración de P₄ se compararon por el procedimiento de análisis mixto de SAS (ANOVA para mediciones repetidas en tiempo). En el experimento 1 se incluyeron como covariables los valores del día 11 del ciclo en el área perfundida, el porcentaje de perfusión y volumen del CL. Se consideraron como efectos principales a los tratamientos, el tiempo y la interacción entre tratamiento y tiempo, y al animal como efecto aleatorio dentro de cada tratamiento. Se consideraron diferencias significativas cuando $P < 0,05$, y tendencias cuando $0,05 < P < 0,1$.

RESULTADOS

En el Experimento 1, no hubo diferencias significativas en el volumen del CL, entre grupos estudiados (Fig. 2a). Los animales del grupo BTNA tuvieron menor área perfundida ($0,09 \pm 0,02 \text{ cm}^2$ vs $0,16 \pm 0,02 \text{ cm}^2$ respectivamente; $p=0,015$) (Fig. 2b), menor porcentaje de perfusión ($2,4 \pm 0,4 \%$ vs $4,2 \pm 0,4 \%$; $p=0,011$) (Fig. 2c), y menor concentración de P₄ ($2,7 \pm 1,0 \text{ ng/mL}$ vs $5,8 \pm 0,9 \text{ ng/mL}$ respectivamente; $p=0,046$) que el grupo CON1 (Fig.2d). A su vez, hubo una interacción entre grupo y tiempo en la concentración de P₄ ($p=0,01$): la concentración de P₄ fue menor en el grupo BTNA que en el CON1 en los días 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5 y 19,5 ($p < 0,05$). En el día 14,5 del ciclo el grupo BTNA también tendió a tener menor concentración de P₄ que el grupo CON1 ($p= 0,06$) (Fig. 2d). En el Experimento 2, una vaquillona del grupo CON2 fue eliminada del experimento por presentar dos CLs, y una del grupo BTHC por presentar un quiste luteal. No hubo efectos del tratamiento en ninguna de las variables evaluadas (Fig.3).

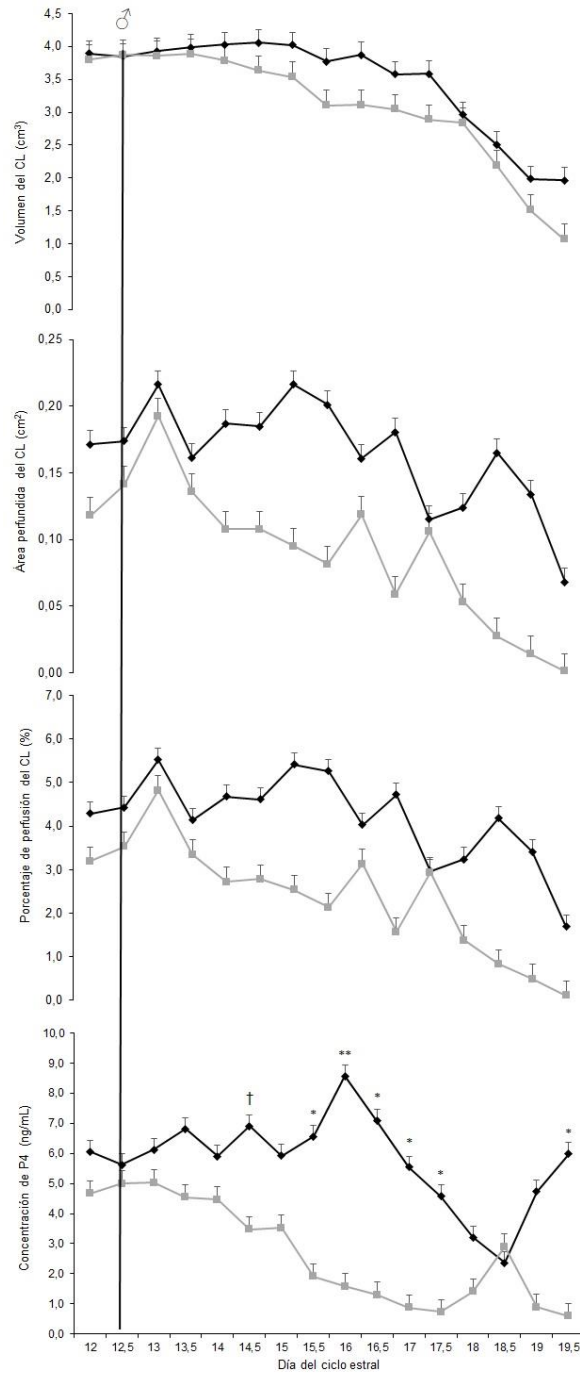


Figura 2: (a) volumen del CL (cm³), (b) área perfundida del CL (cm²) y (c) porcentaje de perfusión del CL (%) y (d) concentración de P₄ (ng/mL) del grupo BTNA (-■-) o del grupo CON1 (-◆-). ♂: entrada de los novillos androgenizados al grupo BTNA. *: P<0,05; **: P<0,01; †: 0,05<P<0,1.

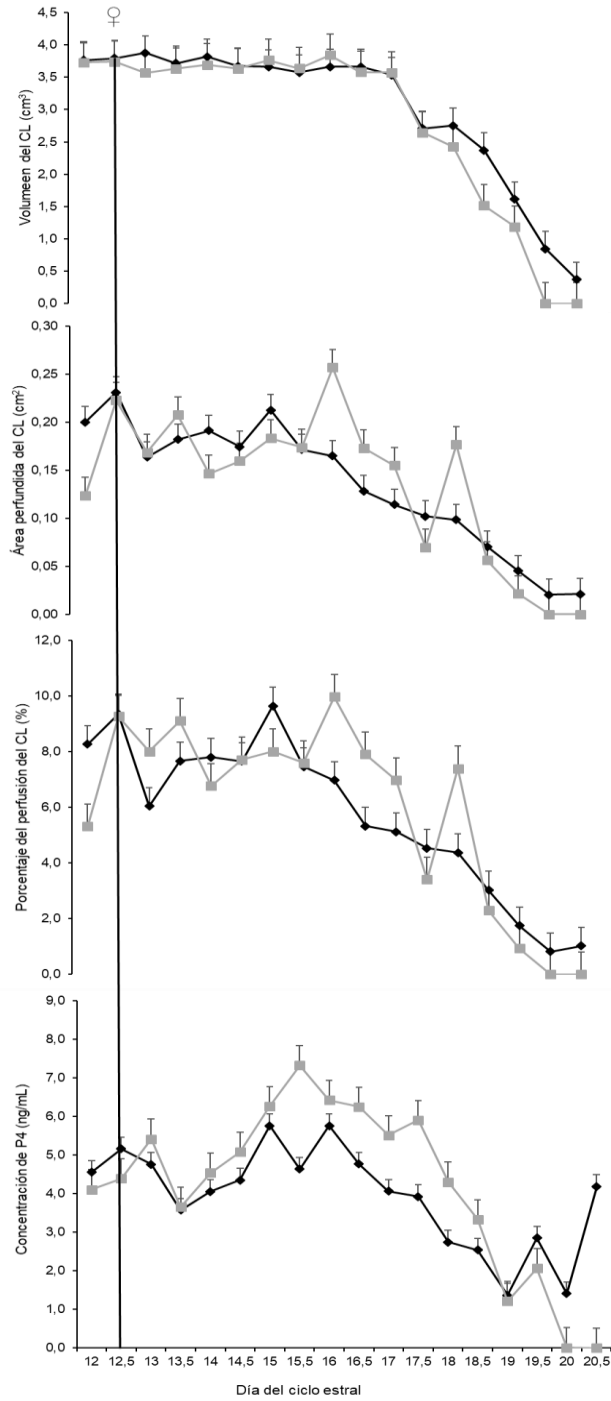


Figura 3: (a) volumen del CL (cm³), (b) área perfundida del CL (cm²) y (c) porcentaje de perfusión del CL (%) y concentración de P4 (ng/mL) (d) del grupo BTHC (-■-) o del grupo CON2 (-◆-). ♀: entrada de las hembras en celo al grupo BTHC.

DISCUSIÓN

La introducción de novillos androgenizados adelantó la luteólisis en vaquillonas bioestimuladas, pero esto no ocurrió con la introducción de hembras en celo. Esto expande estudios previos en los que se demostró que la estimulación con machos es efectiva para inducir o sincronizar los ciclos en vacas y vaquillonas (Burns y Spitzer, 1992, Ungerfeld, 2009; Fiol y Ungerfeld, 2012, Fiol y Ungerfeld, 2011, Miller y Ungerfeld, 2008). El efecto luteolítico de la introducción de machos fue sugerido por Chemineau (1983) y Ungerfeld y Orihuela (2015) en cabras, aunque no había estudios anteriores de la dinámica del cuerpo lúteo. Por el contrario, aunque incluso se utilizó una mayor cantidad de animales en la bioestimulación con hembras en celo, no se pudo demostrar un efecto similar que con novillos androgenizados. Por tanto, al igual que ocurre en ovinos, la intensidad de los efectos de la bioestimulación sería mayor con machos que con hembras en celo también en bovinos, al menos para generar una respuesta como la buscada en estos trabajos.

La perfusión sanguínea hacia el CL y la concentración de P_4 fueron menores en los animales bioestimulados con novillos androgenizados durante la fase lútea tardía, demostrando que la introducción de estos machos adelantó el proceso luteolítico. Más aún, mientras que en el día 19,5 la concentración de P_4 del grupo BTNA estuvo por debajo de las concentraciones luteales, los animales del CON1 todavía estaban en fase luteal, con valores por encima de 1 ng/mL (Battocchio et al., 1999). Este adelanto probablemente sea consecuencia del aumento del estradiol inducido por la bioestimulación, ya que se ha demostrado que los estímulos socio-sexuales generan un aumento en la secreción pulsátil de LH de hembras estimuladas tanto en bovinos (Custer et al., 1990; Fiol y Ungerfeld, 2016) como en pequeños rumiantes (Martin et al., 1983). A su vez, la pulsatilidad de LH induce un aumento de las concentraciones de estradiol (Hixon y Flint, 1987), que a su vez estimula un aumento en el número de receptores uterinos a oxitocina (Salfen et al., 1999). La oxitocina hipofisaria y la luteal secretadas durante la propia fase luteal provocan un aumento en la producción de $PGF_{2\alpha}$ por parte del endometrio, la que estimula la síntesis y secreción de oxitocina por parte del cuerpo lúteo (Flint y Sheldrick, 1982). Estas dos hormonas –la $PGF_{2\alpha}$ uterina y la oxitocina luteal–

desarrollan un ciclo de retroalimentación positiva, donde pulsos de una son seguidos de pulsos de la otra (Vighio y Liptrap, 1986; Silvia et al., 1991). Estos pulsos son cada vez más importantes, llevando a un aumento de la concentración de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Flint y Sheldrick, 1982; Bazer et al., 1991), la principal responsable de la regresión estructural y funcional del cuerpo lúteo (Ginther et al., 2007). Si bien en este experimento no fue posible determinar los estos mecanismos hormonales, es posible suponer que la bioestimulación desencadenó un aumento de la $\text{PGF}_{2\alpha}$, principal responsable del rápido descenso del flujo sanguíneo hacia el CL (Azmi et al., 1982; Knickerbocker et al., 1988) a través de estos mecanismos. Estos mecanismos se desencadenan fisiológicamente en la fase luteal avanzada, pero sería interesante a partir de estos resultados estudiar si es posible obtener efectos similares en etapas más tempranas del ciclo estral. En síntesis, la menor perfusión recibida y la menor concentración de progesterona, sumada a un adelanto de la caída de la misma por debajo de concentraciones luteales, demuestran el efecto luteolítico de la bioestimulación.

La bioestimulación con vaquillonas en celo no generó efectos en ninguna de las variables estudiadas. Si bien existen algunos trabajos anteriores en que se demuestra que la presencia de vacas en celo afecta la ciclicidad de otras, los resultados son controversiales. Wright et al. (1994) reportaron que la exposición de vacas en anestro posparto a mucus vaginal de vacas en celo acorta el anestro posparto de las mismas. Además, Izard y Vandenberg (1982) demostraron que los celos de vaquillonas sincronizados con prostaglandina exógena se sincronizaban más aún cuando fueron estimuladas con mucus vaginal de las vacas en celo. Es de suponer que en ambos casos, el efecto esté mediado por sustancias químicas contenidas en el fluido utilizado. En este experimento, las hembras se estimularon con hembras en celo, pero en un espacio abierto, y sin contacto directo intenso con las secreciones vaginales de las mismas. Por tanto, es posible que la ausencia de efectos se relacione con un estímulo menos intenso y directo que el utilizado en los trabajos citados. Sin embargo, Nordeus et al. (2012) no encontraron efecto de la exposición de vaquillonas a orina y mucus vaginal de vacas en celo sobre la duración del ciclo estral. Dado que ningún estudio proporcionó pruebas indiscutibles de la existencia de feromonas inter-femeninas que causen

sincronización de celos en ganado, es posible que las mismas no existan, tengan un efecto poco intenso, o que dado la complejidad del diseño de experimentos con grandes mamíferos sea difícil demostrar sus efectos (Nordeus et al., 2012). También es posible que en otros trabajos se hubiera detectado el comportamiento de celo, pero que esto no se asociara con los cambios ováricos esperados. En este sentido, Orihuela et al. (1983) demostraron que la expresión de celo de un grupo de vacas con celos sincronizados, indujo el comportamiento de celo en vacas no cíclicas, siendo exclusivamente una respuesta comportamental.

La perfusión sanguínea que recibió el CL fue un indicador confiable de la funcionalidad del mismo. Si bien la actividad luteal es frecuentemente evaluada mediante la concentración de P_4 plasmática (Battocchio et al., 1999), este procedimiento es más costoso y requiere de más tiempo para obtener resultados, por lo que el estudio de la perfusión del CL constituye una alternativa interesante. Battocchio et al. (1999) confirmaron que la correlación de la concentración de progesterona con los datos colectados mediante palpación rectal, ecogenicidad y diámetro del CL es muy baja. Por el contrario, Herzog et al. (2010) relacionaron adecuadamente la perfusión sanguínea del CL y su tamaño como indicadores de la función luteal en vacas, planteando que el flujo sanguíneo es un predictor altamente confiable del funcionamiento del CL. A su vez comprobaron que el flujo sanguíneo luteal se relaciona directamente con las concentraciones de P_4 cuando estas son mayores a 1,0 ng/mL. Más aún, la determinación del área del CL irrigada ha sido recientemente utilizada para diagnosticar la gestación el día 21 del ciclo en vacas (Siqueira et.al., 2013) y el 17 en ovejas (Arashiro et al., 2018) con una alta confiabilidad. Por lo tanto, los resultados muestran que el uso de ambos indicadores (concentración de P_4 y área irrigada del CL) son adecuados para comprobar que la bioestimulación con novillos androgenizados adelanta la luteólisis en las vacas, mientras que sólo el tamaño del CL obtenido por ultrasonografía no lo es.

El uso de la bioestimulación con machos como método para adelantar la luteólisis, es una alternativa interesante para incluir en posibles tratamientos de sincronización de celos, disminuyendo así el uso de hormonas sintéticas. Considerando que la

sincronización de celos es una tecnología de amplia aplicación que simplifica los manejos permitiendo que todos los animales se inseminen en un rango acotado de tiempo (Berardinelli et al., 2007), cualquier alternativa que simplifique el manejo o disminuya el uso de hormonas es de amplio interés. Los tratamientos clásicos se basan en la aplicación de dos dosis de $\text{PGF}_{2\alpha}$, como forma de generar luteólisis en ambas o al menos luego de la segunda aplicación, y por tanto sincronizar la manifestación de celos. Si bien con estos tratamientos se logran buenos resultados y se simplifica el manejo de campo, cada vez existe una mayor presión de los mercados consumidores para eliminar o disminuir el uso de hormonas (Martin et al., 2004). Más aún, varios países ya han prohibido la aplicación de esteroides sexuales en este tipo de tratamientos (Martin et al., 2004). En función de esto, sería interesante testar la efectividad de incluir la bioestimulación en tratamientos de sincronización de celos clásicos con $\text{PGF}_{2\alpha}$ para disminuir las dosis hormonales utilizadas.

CONCLUSIONES

La bioestimulación de vaquillonas de carne con novillos androgenizados durante la fase luteal tardía es capaz de adelantar el proceso luteolítico. Por el contrario, la introducción de vaquillonas en celo no tuvo efectos sobre la luteólisis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acosta TJ, Miyamoto A 2004. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Animal Reproduction Science* 82–83: 27–140.
2. Alila HW, Hansel W 1984. Origin of Different Cell Types in the Bovine Corpus Luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. *Biology of Reproduction* 31: 1015-1025.
3. Arashiro E, Nunes K, Ungerfeld R, Clariget R, Pinto P, Nicolau H, Balaro M, Alvarez F, Bragança GM, Ribeiro LS, Fonseca JF, Zandonadi F 2018. Early pregnancy diagnosis in ewes by subjective assessment of luteal vascularization using colour Doppler ultrasonography. *Theriogenology* 106: 247-252.
4. Azmi TI, O’Shea JD 1984. Mechanism of deletion of endothelial cells during regression of the corpus luteum. *Laboratory Investigation* 51: 206-217.
5. Azmi TI, O’Shea JD, Lee CS, Rodgers RJ 1982. Effects of a synthetic prostaglandin analogue, cloprostenol, on the corpus luteum of the guinea pig. *Prostaglandins* 24:519-526.
6. Battocchio M, Gabai G, Mollo A, Veronesi MC, Soldano F, Bono G, Cairoli F 1999. Agreement between ultrasonographic classification of the CL and plasma progesterone concentration in dairy cows. *Theriogenology* 51:1059–1069.
7. Bazer FW, Thatcher WW, Hansen PJ, Mirando MA, Ott TL, Plante C 1991. Physiological mechanisms of pregnancy recognition in ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility (Supplement)* 43:39-47.
8. Berardinelli JG, Joshi PS, Tauck SA 2007. Conception rates to artificial insemination in primiparous, suckled cows exposed to the biostimulatory effect of bulls before and during a gonadotropin-releasing hormone-based estrus synchronization protocol. *Journal of Animal Science* 85:848-852.

9. Bó GA, 2014. Sincronización de celos con prostaglandinas En: Sincronización de celos e inseminación artificial. (Ed), Primera Edición Córdoba, Argentina 32-58.
10. Bó GA, Alonso A, Caccia M, Carcedo J, Cutaia L, Moreno D, Martinez M, Baruselli P 2008. Endocrinología del ciclo estral foliculogénesis y desarrollo folicular del bovino adulto En: Fisiología de la reproducción de la vaca. (Ed), Primera Edición Córdoba, Argentina 40-52.
11. Bó GA, Baruselli PS, Mapletoft RJ 2013. Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. *Animal Reproduction* 3: 137-142.
12. Burns PD, Spitzer JC 1992. Influence of biostimulation on reproduction in postpartum beef cows. *Journal Animal Science* 70:358-36.
13. Chemineau P. 1983. Effect on estrous and ovulation of exposing creole goats to the male at three times of the year. *Journal of Reproduction and Fertility* 67:65-72.
14. Chenoweth, P.J. 1983. Reproductive management procedures in control of breeding. *Animal Production in Australia* 15: 28-31.
15. Cooper MJ, Furr BJA 1974. The role of prostaglandins in animal breeding. *Veterinary Record* 94: 161.
16. Cooper MJ, Hammond D, Harker DB, Jackson PS 1976. Control of the bovine oestrous cycle with ICI 80996 (cloprostenol). Field results in 3810 beef cattle. VIIIth International Congress on Animal reproduction and artificial insemination, Krakow, Poland. 449-451.
17. Custer EE, Berardinelli JG, Short RE, Wherman M, Adair R 1990. Postpartum interval to estrus and patterns of LH and progesterone in first calf-suckled beef cows exposed to mature bulls. *Journal of Animal Science* 68:1370-1377.

18. Fiol C, Ungerfeld R 2011. Estrous response and AI pregnancy rates of 2 year-old beef heifers exposed to androgenized steers before an estrous synchronization protocol with double PGF₂alpha. *Animal Reproduction* 8:9-13.
19. Fiol C, Ungerfeld R 2016. Positive effects of biostimulation on luteinizing hormone concentration and follicular development in anestrus beef heifers. *Journal of Animal Science* 94: 1-7.
20. Fiol C, Ungerfeld R, 2012. Biostimulation in cattle: stimulation pathways and mechanisms of response. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 1: S29 -S45
21. Fitz TA, Mayan MH, Sawyer HR, Niswender GD 1982. Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. *Biology reproduction* 27:703.
22. Flint AP, Sheldrick EL 1982. Ovarian secretion of oxytocin is stimulated by prostaglandin. *Nature* 297:587-588.
23. Gaytán F, Morales C, García-Pardo L, Reymundo C, Bellido C, Sánchez-Criado JE 1999. A quantitative study of changes in the human corpus luteum microvasculature during the menstrual cycle. *Biology of Reproduction* 60: 914-919.
24. Ginther OJ, Knopf, L, Kastelic, J P 1989. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *Journal of Reproduction and Fertility* 87: 223-230.
25. Ginther OJ, Silva LA, Araújo RR, Beg MA 2007. Temporal associations among pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂alpha, luteal blood flow, and luteolysis in cattle. *Biology of Reproduction* 76: 506-513.
25. Hafez ESE, 1993 Functional anatomy of female reproduction. In: *Reproduction in Farm animals* (Ed), Sixth Edition Lea & Febiger Press, Philadelphia 24.

26. Herzog K, Brockhan-Luëdemann M, Kaske M, Beindorff N, Paul V, Niemann H, Bollwein H 2010. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. *Theriogenology* 73: 691–697.
27. Hixon JE, Flint PF 1987. Effects of a luteolytic dose of oestradiol benzoate on uterine oxytocin receptor concentrations, phosphoinositide turnover and prostaglandin F-2alpha secretion in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility* 79:457-467.
28. Ivell R, Fuchs AR, Bathgate R, Tillmann G, Kimura T 2000. Regulation of oxytocin receptor in bovine reproductive tissues and the role of steroids. *Reproduction in Domestic Animals* 35: 134–141.
29. Izard MK, Vandenberg JG 1982. Priming pheromones from oestrous cows increase synchronization of oestrus in dairy heifers after PGF-2alpha. *Journal of Reproduction and Fertility* 66: 189-196.
30. Knickerbocker JJ, Wiltbank MC, Niswender GD 1988. Mechanisms of luteolysis in domestic livestock. *Domestic Animal Endocrinology* 5: 91-107.
31. Lei ZM, Chegini N, Rao ChV 1991. Quantitative cell composition of human and bovine corpora lutea from various reproductive states. *Biology of Reproduction* 44: 1148-1156.
32. Martin GB, Milton JTB, Davidson RH, Banchero GE, Lindsay DR, Blache D 2004. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Animal Reproduction Science* 82-83: 231-246.
33. Martin GB, Scaramuzzi RJ, Lindsay DR 1983. Effect of the introduction of rams during the anoestrous season on the pulsatile secretion of LH in ovariectomized ewes. *Journal of Reproduction and Fertility* 67: 47-55.
34. Mc Cracken JA, Custer EE, Lamsa JC 1999. Luteolysis: A Neuroendocrine-Mediated Event. En: *Physiological Reviews* Vol. 79, No. 2.

35. Meilán J, Ungerfeld R 2014. Does introduction of rams during the late luteal phase promote the estrus response in cyclic ewes? *Small Ruminant Research* 120:116-120.
36. Menchaca A, Núñez-Olivera R, de Castro T, García-Pintos C, Cuadro F. 2013 Implementación de programas de IATF en rodeos de cría. *Semin Actual Técnica Cría Vacuna INIA* 46: 208-229.
37. Milgrom E, Thi L, Atger M, Baulieu E 1973. Mechanisms regulating the concentration and the conformation of progesterone receptor(s) in the uterus. *Journal of Biological Chemistry* 248: 6366-6374.
38. Miller V, Ungerfeld R 2008. Weekly bull exchange shortens postpartum anestrus in suckled beef cows. *Theriogenology* 69:913-917.
39. Milvae RA 2000. Inter-relationships between endothelin and prostaglandin F₂ α in corpus luteum function Robert. *Reviews of Reproduction* 5: 1–5.
40. Miyazaki T, Tanaka M, Miyakoshi K, Minegishi K, Kasai K, Yoshimura Y 1998. Power and colour Doppler ultrasonography for the evaluation of the vasculature of the human corpus luteum. *Human Reproduction* 13: 2836-2841.
41. Nordéus K, Båge R, Gustafsson H, Humblot P, Söderquist L 2012. The influence of oestrous substances on cyclicity and oestrous behaviour in dairy heifers *Acta Veterinaria Scandinavica* 54-26.
42. Orihuela A, Clemente N, Ungerfeld R 2016. Close contact with spontaneously cycling Saint Croix ewes triggers cyclic activity in seasonally anestrous Suffolk ewes. *Animal Reproduction Science* 56: 1816-1819.
43. Orihuela A, Galina CS, Escobar J, Riquelme E 1983. Oestrous behaviour following prostaglandin F₂ α injection in Zebu cattle under continuous observation. *Theriogenology* 19: 795-809.

44. Priedkalns J, Weber AF, Zeinjanis R 1968. Qualitative and quantitative morphological studies of the cells of membranes, granulosa, theca interna and corpus luteum of the bovine ovary. *Zeitschrift für Zellforschung* 85: 501-520.
45. Reeves JJ, Arimura A, Schally AV 1971. Changes in pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in anestrus ewes pretreated with estradiol benzoate. *Biology of Reproduction* 4: 88-92.
46. Reynolds L, Grazul-Bilska A, Redmer D 2000. Angiogenesis in the corpus luteum. *Endocrine* 12:1-9.
47. Reynolds LP, Redmer DA 1999. Growth and development of the corpus luteum. *Journal of Reproduction and Fertility* 54: 181
48. Robertson HA, Sarda IR 1971. A very early pregnancy test for mammals: its application to the cow, ewe and sow. *Journal of Endocrinology* 49: 407-419.
49. Rowson LEA, Tervit R, Brand A 1972. Synchronisation of oestrus in cattle by means of prostaglandin F₂alpha. VIIth International Congress on Animal reproduction and artificial insemination, Munich. 2-865.
50. Salfen BE, Cresswell JR, Xu ZZ, Bao B, Garverick HA 1999. Effects of the presence of a dominant follicle and exogenous oestradiol on the duration of the luteal phase of the bovine oestrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility* 115:15-21.
51. Silvia WJ, Lewis GS, Thatcher WW, McCracken JA, Wilson L 1991. Hormonal Regulation during of Uterine Secretion of Prostaglandin Luteolysis in Ruminants of Animal of Animal for of Dairy. *Biology of Reproduction* 655-663.

52. Siqueira LGB, Areas VS, Ghetti AM, Fonseca JF, Palhao MP, Fernandes CA, Viana JH, 2013. Color Doppler flow imaging for the early detection of nonpregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. *Journal of Dairy Science* 96: 6461-6472.
53. Spencer TE, Becker WC, George P, Mirando MA, Ogle TF, Bazer FW 1995. Ovine interferon-tau inhibits estrogen receptor up-regulation and estrogen-induced luteolysis in cyclic ewes. *Endocrinology* 136: 4892-4944.
54. Stouffer RL 2006. Structure, function, and regulation of the corpus luteum. En Knobil and Neills physiology of Reproduction. 3rd ed. Neill, JD (Editor), Academic Press-Elseiver 475-526.
55. Ungerfeld R, 2002. Control endocrino del ciclo estral. En: Ungerfeld, R. Reproducción en los animales domésticos. Montevideo, Melibea 39- 53.
56. Ungerfeld R, 2007. Socio-sexual signaling and gonadal function: Opportunities for reproductive management in domestic ruminants. En *Reproduction in Domestic Ruminants VI*. Juengel JI, Murray JF, Smith MF (Eds.). Nottingham University Press, Nottingham, UK. 207-221.
57. Ungerfeld R, 2009. Short-term exposure of high body weight heifers to testosterone-treated steers increases pregnancy rate during a late autumn-early winter natural service. *Animal Reproduction* 6:446-449.
58. Ungerfeld R, 2011. Combination of the ram effect with PGF2alpha estrous synchronization treatments in ewes during the breeding season. *Animal Reproduction Science* 124: 65–68.
59. Ungerfeld R, Orihuela A, 2015. Sudden introduction of bucks during the late luteal phase of isolated female goats induces a biphasic change in progesterone concentrations. *Animal Reproduction* 12:927-930.

60. Vighio GH, Liptrap ELI 1986. Plasma concentrations of oxytocin, prostaglandin and ovarian steroids during spontaneous luteolysis in the cow. *Domestic Animal Endocrinology* 3:209-215.
61. Walters DL, Schams D, Schallenberger E 1984. Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the luteal phase of the oestrous cycle in the cow. *Journal of Animal Reproduction* 71:479-491.
62. Wathes DC, Hamon M 1993. Localization of oestradiol, progesterone and oxytocin receptors in the uterus during the oestrous cycle and early pregnancy of the ewe. *Journal of Endocrinology* 138:479-491.
63. Wiltbank MC, Dysko RC, Gallagher KP, Keyes PL 1988. Relationship between blood flow and steroidogenesis in the rabbit corpus luteum. *Journal of Reproduction and Fertility* 84:513-520.
64. Wiltbank MC, Ottobre J 2003. Regulation of intraluteal production of prostaglandins. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1:1-11.
65. Wright IA, Rhind SM, Smith AJ, Whyte TK 1994. Female-female influences on the duration of the postpartum anoestrous period in beef cows. *Animal Production* 59:49-53.
66. Zarco L, Rodriguez EF, Angulo MR, Valencia J 1995. Female to female stimulation of ovarian activity in the ewe. *Animal Reproduction Science* 39: 251-258.



ANEXO 1


Theriogenology 132 (2019) 83–87

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Theriogenology

journal homepage: www.theriojournal.com



Sexual stimulation as a luteolytic inductor in beef heifers

María Victoria Felipez ^a, Tomás Acosta ^b, Rodolfo Ungerfeld ^{a,*}

^a Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Lasplaces 1620, Montevideo, 11600, Uruguay
^b Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Field Center of Animal Science and Agriculture, Obihiro, Japan

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 6 February 2019
 Received in revised form 3 April 2019
 Accepted 4 April 2019
 Available online 11 April 2019

Keywords:
 Cattle
 Luteal activity
 Ovary
 Steroids

ABSTRACT

The objective was to determine if the introduction of androgenized steers or females in oestrus has luteolytic effects during the advanced luteal phase (Day 12–13 of the cycle, Day of ovulation = Day 0) in heifers by analysing the changes in corpus luteum (CL) size and perfused area together with progesterone (P4) secretion. Experiment 1 (EXP1) was carried out in May (autumn) with 12 Angus and Angus X Hereford heifers and experiment 2 (EXP2) in September (spring) with 20 heifers of the same breed. Procedures for both experiments were the same. Firstly, oestrus was synchronized in heifers, then, transrectal colour doppler ultrasonography was performed daily from Day 10 to Day 12 of the cycle in all animals. On Day 12 in the afternoon, animals were allocated to two experimental groups (control and biostimulated) and maintained separated (minimum distance: 1000 m) until the end of each experiment. In EXP1, two androgenized steers were introduced into the biostimulated group (BAS) and compared with unstimulated control group (CON1). In EXP2, 20 animals were separated into control group (CON2) and biostimulated group (BHE), in which 4 oestrous heifers were introduced on Day 12 in the afternoon, and 4 more on day 13. The oestrous heifers were injected with 2 mg i.m. of oestradiol benzoate every 12 h until the end of the experiment to maintain the receptiveness. In both experiments, from Day 13 until the day on which detectable luteal blood flow (irrigation) disappeared, colour doppler ultrasonography was performed every 12 h in both groups. Blood samples were collected from all heifers every 12 h from Day 10 to the day in which irrigation disappeared. In EXP1 there was no effect of treatment on CL volume. The BAS had less CL's perfused area than controls $0.09 \pm 0.02 \text{ cm}^2$ vs $0.16 \pm 0.02 \text{ cm}^2$, respectively ($p = 0.015$), less percentage of perfused area ($2.4 \pm 0.4\%$ vs $4.2 \pm 0.4\%$; $p = 0.011$), and lower progesterone (P4) concentration than CON1 ($2.7 \pm 1.0 \text{ ng/mL}$ vs $5.8 \pm 0.9 \text{ ng/mL}$ respectively; $p = 0.046$). On Day 14.5 of the cycle, the BAS tended to have a lower concentration of P4 than the CON1 ($p = 0.06$) and on Days 15.5, 16, 16.5, 17, 17.5, 19.5 the P4 concentration was lower in BAS than in CON1 ($p < 0.05$). In EXP2 there were no treatment effects in any of the studied variables. Overall, it was concluded that the introduction of androgenized steers during heifers' advanced luteal phase of heifers advanced the luteolytic process. However, the introduction of oestrous heifers had no effect on luteal activity.

© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction


In cattle, the structural and functional regression of the corpus luteum (CL) starts on day 15 (Day 0 = ovulation), as a consequence of the PGF2alpha released by the uterus [1]. Luteolysis occurs after hormonal interactions that end with the regression of the CL and the cessation of its function [2]. During the late luteal phase (days 13–15), oestradiol concentrations increase as follicular development provokes an increase in the number of uterine oxytocin

receptors [3]. In addition, pituitary and luteal oxytocin secreted during the luteal phase causes an increase in the synthesis of PGF2alpha by the uterus [4] which determinates the subsequent luteolysis [5] and, consequently, the beginning of a new follicular phase. The earlier changes during luteolysis occur in the vascular components of the CL [6] with a quickly decline in blood flow. In this sense, the eco-doppler has been used during the last years to study the CL perfusion, demonstrating that the angiogenic process in the CL reaches a peak 2–3 days after ovulation [7]. During luteolysis, there is sharp but transient increase in blood that triggers the luteolytic process [8].

It has been demonstrated that the presence of males or females in oestrus can stimulate the reproductive activity of females of

* Corresponding author.
 E-mail address: rungerfeld@gmail.com (R. Ungerfeld).

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.04.003>
 0093-691X/© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.



several ruminant species [9]. In particular, the bull effect is the stimulus of the cyclic activity of anoestrous heifers or cows provoked by the sudden introduction of males (bulls, steers) or heifers [10]. The effect may be produced by genital stimulation, pheromones, and other external signals [10] from bulls [11] or androgenized steers [12]. In both, small ruminants and bovines it has been shown that socio-sexual stimuli generate an increase in LH pulsatility in stimulated females [13,14], and therefore oestrogen secretion by the ovary [15] which in turn increases the number of uterine oxytocin receptors [3], ending in an advancement of the secretion of PGF2alpha by the endometrium [4]. These two hormones - the uterine PGF2alpha and the luteal oxytocin - develop a positive feedback loop, where pulses of the other [16,17] follow pulses of one. These pulses are increasingly important, leading to an increase in the concentration of PGF2alpha [18,19], the main responsible for the structural and functional regression of the CL [20]. Therefore, considering that the increase in oestradiol is the first step for triggering luteolysis [15], it would be expected that biostimulation will also induce luteolysis.

However, the introduction of males also triggers changes in the reproductive activity of cyclic females. For example, Chemineau [21] observed that goats come into oestrus with a bimodal pattern after the introduction of bucks, suggesting that the stimulus could induce luteolysis in a group of females. Moreover, it was proved that the introduction of rams simultaneously with the second dose [22] or with a half dose of PGF2alpha [23] in oestrus synchronization program advances the heat and increases the number of sheep who respond to the treatment. However, females in oestrus can also stimulate other females, as happens in anoestrous ewes that ovulate after being in close contact with cyclic ewes [24,25]. Although there is less information available in cows, the exposure of anoestrous cows to cervical mucus from oestrous cows advances postpartum rebreeding [26].

Considering all this background, the aims of these studies were to determine if the introduction of androgenized steers or females in oestrus during the advanced luteal phase triggers or induces an advancement of luteolysis in heifers.

2. Materials and methods

2.1. Location, animals and management

Both experiments were performed in a commercial farm in Cerro Colorado, Florida, Uruguay (33° S and 55° W). Experiment 1 (EXP1) was performed in May (autumn) and experiment 2 (EXP2) in September (spring). The studies were approved by the Comisión Ética en el Uso de Animales de Experimentación, from the Facultad de Veterinaria, Universidad de la República.

2.2. Experiment 1: biostimulation with androgenized steers

The ovulation of 12 Angus X Hereford (311 ± 24 kg; mean ± SEM) of 15 to 18-month-old was synchronized with 2 doses of a PGF2alpha agonist (500 µg im of cloprostenol Ciclase DL, Syntex, Buenos Aires, Argentina) separated by 11 days and one dose of a GnRH analogue (100 µg im of gonadorelin acetate, Gonasyn, Syntex, Buenos Aires, Argentina) two days after the second dose of cloprostenol. Two days after the administration of gonadorelin, the ovaries of each heifer were scanned with ultrasound (Esaote MyLab OneVET, Milan, Italy with a 7 mHz linear transducer) to confirm ovulation (Day 0 of the cycle). The CL was scanned daily on Days 10, 11 and 12. On day 12 in the afternoon, the animals were separated in two groups of 6 animals each.

Two androgenized Angus steers (343 ± 4 kg) were joined with 6 heifers (group BAS). For this, the steers received two doses of

500 mg im of testosterone cypionate (Testosterona Ultralenta Dispers, Montevideo, Uruguay) during the previous 2 weeks according to manufacturer' recommendations. The other 6 heifers remained isolated from males, as a control group (group CON1), with a minimum separation of 1000 m between both groups. From Day 13 until the last day in which luteal blood flow was observed, transrectal eco-doppler ultrasonography was performed to all heifers every 12 h. The real time images were recorded as short videos to measure later the size and the area perfused of the CL. Blood samples were collected immediately from the coccygeal region.

2.3. Experiment 2: biostimulation with estrous heifers

On this experiment, the ovulation of 20 Angus X Hereford heifers, 15 to 18-month-old (270 ± 20 kg) were synchronized. All animals received one dose of oestradiol benzoate (2 mg im, Syntex, Buenos Aires, Argentina) at the time at which an intravaginal device impregnated with P4 (1 g, DIB, Syntex, Buenos Aires, Argentina) was inserted. Seven days later the device was removed, and all animals received one dose of oestradiol cypionate (0.5 mg im, Von Franken, Fatro, Buenos Aires, Argentina), one dose of cloprostenol (500 µg im de cloprostenol Ciclase DL, Syntex, Buenos Aires, Argentina), and one dose of equine chorionic gonadotropin (300 IU im, Novormón, Syntex, Buenos Aires, Argentina). Two days after the intravaginal device removal, ovaries of each heifer were scanned to confirm ovulation (Day 0).

On the afternoon of day 12, heifers were separated in 2 groups of 10 animals, and four heifers in oestrus were introduced to one those groups (group BHE). The oestrous cycles of these four heifers were presynchronized in the same way as that of the other 20 heifers, but to extend the oestrus length, they received 1 dose of oestradiol benzoate (2 mg im of Estradiol Benzoate Syntex, Buenos Aires, Argentina) every 12 h until the end of the experiment. The other 10 heifers remained isolated from other animals as a control group (group CON2) (minimum distance = 1000 m). On Day 13, other four oestrous heifers stimulated in the same way were joined to BHE heifers. The oestrous behaviour of these heifers was also maintained with oestradiol benzoate injections until the end of the study.

The procedures to record the activity of the CL were the same as in EXP1, performed with the same frequency.

2.4. Analyses of the CL: volume, perfused area and percentage of perfused area

Each video was analysed, obtaining an image with the maximum diameter and the maximum perfused area according to Acosta et al. [27]. Fig. 1A and B shows examples of two CLs with different percentages of area perfused. The images were analysed using the Image J software (Image Processing and Analysis in Java, Java2HTML version 1.5, free version). The diameters of each CL were measured, calculating the area of the image and the volume of the CL. The area perfused of the CL was measured transforming it to a black and white image, and measuring the black area. Fig. 1C and D shows examples of the black and white images.

2.5. Blood samples and progesterone measurement

Blood samples were collected into tubes, allowed to clot, and centrifuged. Serum was separated and stored (-20 °C) until progesterone measurement. Plasma progesterone concentrations were measured using a solid-phase radioimmunoassay kit containing antibody-coated tubes and ¹²⁵I-labeled progesterone (ImmuChem TM Coated Tube Progesterone, ICN Pharmaceuticals, Inc. Diagnostics Division Costa Mesa, CA, EEUU). The intraassay CV and

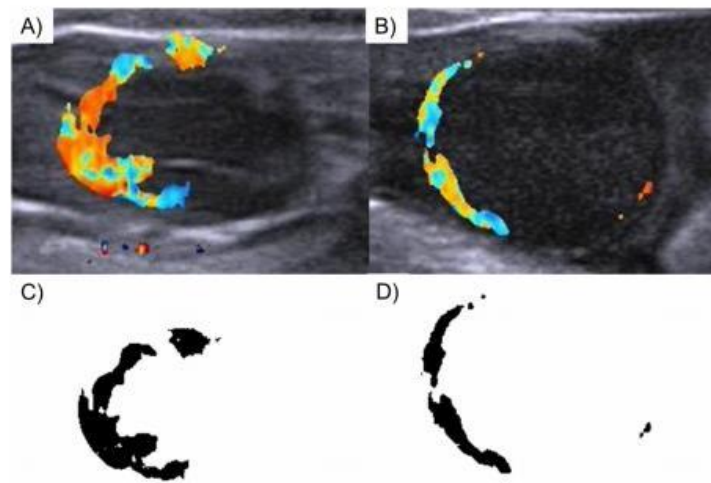


Fig. 1. Eco-doppler images of corpora lutea with different degrees of blood perfusion (A and B), and black and white images of the same corpora lutea used to measure the perfused area (C and D).

the sensitivity of the measurement of the samples from EXP1 were 8.5% and 0.02 ng/mL respectively. EXP2 was measured in two assays: their intraassays CVs were 11.3% and 7.1%, and the interassay CV and sensitivity were 9.2% and 0.03 ng/mL respectively.

2.6. Statistical analyses

The analyses of the CL (volume, perfused area and percentage of perfused area), as well as P4 concentrations were compared by the mixed procedure of SAS (SAS University Edition), including treatments, time and treatment-time interaction as main effects, and the animal as a random effect into the treatment. In EXP1, data from Day 11 was included as a covariate for perfused area, percentage of the CL perfused and CL volume. Differences were considered as significant when $P < 0.05$, and as tendencies when $0.05 < P < 0.1$.

3. Results

In EXP1, there were no significant differences between groups in the volume of the CL ($3.5 \pm 0.4 \text{ cm}^3$ in CON1 and $3.1 \pm 0.4 \text{ cm}^3$). The area and percentage of the CL perfused was lower in BAS than in CON1 heifers (area: $0.09 \pm 0.02 \text{ cm}^2$ vs $0.16 \pm 0.02 \text{ cm}^2$ respectively, $p = 0.015$; Fig. 2, percentage of the CL: $2.4 \pm 0.4\%$ vs $4.2 \pm 0.4\%$, $p = 0.011$; (Fig. 2). In the same way, the BAS heifers had lower P4 concentration than the CON1 heifers ($2.7 \pm 1.00 \text{ ng/mL}$ vs. $5.8 \pm 0.92 \text{ ng/mL}$ respectively; $p = 0.046$) (Fig. 2). Furthermore, there was an interaction between groups and time in P4 concentration ($p = 0.01$): on Day 14.5 BAS heifers tended to have a lower P4 concentration than CON1 ($p = 0.06$) and on Days 15.5, 16, 16.5, 17, 17.5, 19.5 the P4 concentration was lower in BAS than in CON1 heifers ($p < 0.05$) (Fig. 2).

In EXP2 there were no effects of the treatments nor interactions between treatments and time in any of the variables evaluated. The CL volume was 3.1 cm^3 and 2.9 cm^3 (pooled SEM = 0.2), the perfused area was 0.14 cm^2 and 0.14 cm^2 (pooled SEM = 0.02), the percentage of the CL perfused was 6.1% and 6.3 (pooled SEM = 0.7), and the progesterone concentration was 0.14 ng/mL and 0.15 ng/mL (pooled SEM = 0.01) for CON2 and BHE heifers respectively (ns for all).

4. Discussion

The introduction of androgenized steers advanced the luteolysis in heifers, but there was no effect with the introduction of oestrous females. In previous studies, it was demonstrated that stimulation with males is effective to induce or synchronize the cycles in cows and heifers [11,12,28–30]. In the same way, Chemineau [21] and Ungerfeld and Orihuela [31] suggested that the introduction of androgenized steers to cyclic heifers. On the other hand, although even more animals were used, it could not be demonstrated that the introduction of oestrous heifers provoked any effect. Therefore, it seems that in cattle happens similar than in sheep, in which the introduction of males provokes greater effects than the introduction of oestrous ewes, which has been reported to be effective only in certain conditions [24].

The differences in the CL dynamics and the P4 concentrations observed in the present study demonstrated that the introduction of the androgenized steers during the late luteal phase advanced the luteolytic process. Furthermore, on Day 19.5, serum concentrations of P4 in all heifers of BAS group was less than 1 ng/mL. This concentration of P4 was significantly lower than those heifers of control group (CON1) in which P4 concentrations were still over 1 ng/mL indicating that the CL was still functional [32] in control group but not in BAS group. Although it was not measured, probably an increase in LH pulsatility induced by the introduction of males induces an increase in oestradiol concentrations [15] the first step for triggering luteolysis. These mechanisms are triggered physiologically at the advanced luteal phase, but it would be interesting from these results to study if it is possible to obtain similar effects in earlier stages of the oestrous cycle. In summary, the lower perfusion (blood flow) received by the CL and the lower concentration of P4, added to an advance of the fall of it below the luteal concentrations, demonstrate the luteolytic effect. It would be interesting to determine if similar effects can be achieved at earlier stages of the luteal phase.

Biostimulation with heifers in oestrus did not affect luteal function. It has been reported that the presence of cows in oestrus

wondershare

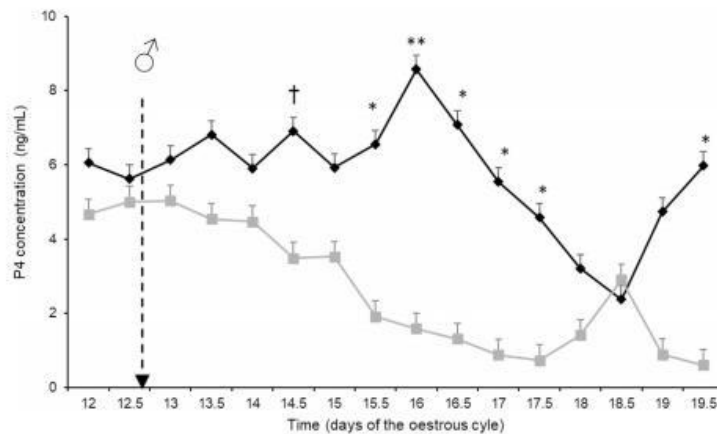


Fig. 2. Progesterone concentration in heifers biostimulated with androgenized steers (■) and control group (◆) from day 12 of the oestrous cycle. (♂) indicates the introduction of androgenized steers. *; $P < 0.05$; **; $P < 0.01$; †; $0.05 < P < 0.1$.

modifies the cyclic activity of other cows. For example, Izard and Vandenberg [33] showed that the result of an oestrous synchronization treatment with exogenous prostaglandin is even better in cows stimulated with vaginal mucus from oestrous cows. Wright et al. [26] reported that the exposure of cows in postpartum anoestrus to vaginal mucus of cows in oestrus shortens their postpartum anoestrus. Presumably, in both cases the effect was mediated by chemical substances contained in the fluids applied directly to treated animals. On the other hand, in the present experiment, the females were stimulated with females in oestrus in an open space, without direct contact with the vaginal secretions of the oestrous animals. Therefore, it is possible that the absence of effects observed in the present study was related to a less intense stimulus. However, in other study Nordeus et al. [34] did not observe any modification of the length of the oestrous cycle of heifers stimulated with urine and vaginal mucus of oestrous cows. Therefore, further studies are needed to clarify the pathways by which oestrus cows may stimulate the reproductive activity of other cows, the responding mechanisms, and the environmental conditions that limit it in certain situations. Moreover, oestrous behaviour displayed synchronously in groups of cows may be unrelated to the ovarian changes [35].

The blood perfusion received by the CL was an excellent indicator of its functionality. Although the luteal activity is frequently evaluated by the concentration of P4 in plasma [32], this is more expensive and requires more time to obtain the results, so the study of CL perfusion is an interesting alternative. Battocchio et al. [32] confirmed that the correlation of P4 concentration with the information collected by rectal palpation, echogenicity and CL diameter is very low. On the other hand, Herzog et al. [36] adequately related blood perfusion and luteal size as indicators of luteal function in cows, stating that blood flow is a highly reliable predictor of CL functionality. Moreover, the perfused area of the CL can be used to diagnose gestation as early as day 21 of the cycle in cows [37] and 17 in ewes [38] with high reliability. Therefore, the use of both indicators (concentration of P4 and CL irrigated area) reaffirms that biostimulation with androgenized steers advances luteolysis in cows, whereas only the size of CL obtained by ultrasonography was not a good indicator.

The use of biostimulation with males to advance luteolysis is an interesting alternative to include in treatments of oestrous

synchronization, thus decreasing the use of synthetic hormones. Whereas oestrous synchronization is a widely applied technology that simplifies management allowing all animals to be inseminated in a limited period of time [39], any alternative that simplifies management or decreases the use of hormones it is of interest. Classic treatments are based on the application of two doses of PGF2alpha to induce luteolysis in both or at least after the second application, and therefore synchronize the beginning of the follicular phase. Although these treatments achieve good results and simplify management, there is increasing pressure from consumer markets to eliminate or reduce the use of hormones [40]. Therefore, it would be interesting to test the effectiveness of biostimulation in classic oestrous synchronization treatments with PGF2alpha to reduce the hormonal doses used.

Overall, it was concluded that the introduction of androgenized steers during heifers' advanced luteal phase advanced the luteolytic process. However, the introduction of oestrous heifers had no effect on luteal activity.

Declarations of interest

None.

Authors' contributors

MVF organized and developed the field work, and drafted the manuscript. TA discussed the idea, the analysis of the data, and worked on the manuscript. RU proposed the initial idea and the experimental design, the analysis of the data, and worked on the manuscript.

Acknowledgments

We acknowledge Augusto Ryonosuke Taira, Víctor Mayorga, Soledad Rodríguez and Belén Varela for their help in animal management and Ana Laura Camacho for her collaboration with the use of the Image J program for images analysis. We also thank Ana Meikle, Rodrigo Puentes and Patricia Silvera for their help in hormonal measurement. We are also grateful to Javier Meilán (Laboratorio Zoetis) for the donation of the hormones used. This work was supported by CSIC (Universidad de la República, Uruguay) and

wondershare

ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación).

References

- [1] Ginther OJ, Silva LA, Araújo RR, Beg MA. Temporal associations among pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂α, luteal blood flow, and luteolysis in cattle. *Biol Reprod* 2007;76:506–13.
- [2] Stouffer RL. Structure, function, and regulation of the corpus luteum. In: Neill JD, editor. *Knobil and neills physiology of reproduction*. third ed. Academic Press-Elsevier; 2006. p. 475–526.
- [3] Salfen BE, Cresswell JR, Xu ZZ, Bao B, Garverick HA. Effects of the presence of a dominant follicle and exogenous oestradiol on the duration of the luteal phase of the bovine oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 1999;115:15–21.
- [4] Flint AP, Sheldrick EL. Ovarian secretion of oxytocin is stimulated by prostaglandin. *Nature* 1982;297:587–8.
- [5] Wiltbank MC, Ottobre J. Regulation of intraluteal production of prostaglandins. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:1–11.
- [6] Azmi TI, O'Shea JD. Mechanism of deletion of endothelial cells during regression of the corpus luteum. *Lab Invest* 1984;51:206–17.
- [7] Reynolds L, Grazul-Bilska A, Redmer D. Angiogenesis in the corpus luteum. *Endocrine* 2000;12:1–9.
- [8] Acosta TJ, Miyamoto A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim Reprod Sci* 2004;82–83:27–140.
- [9] Ungerfeld R. Socio-sexual signaling and gonadal function: opportunities for reproductive management in domestic ruminants. In: Juengel JI, Murray JF, Smith MF, editors. *Reproduction in domestic ruminants VI*. Nottingham, UK: Nottingham University Press; 2007. p. 207–21.
- [10] Chenoweth PJ. Reproductive management procedures in control of breeding. *Anim Prod Aust* 1983;15:28–31.
- [11] Burns PD, Spitzer JC. Influence of biostimulation on reproduction in postpartum beef cows. *J Anim Sci* 1992;70. 358–36.
- [12] Ungerfeld R. Short-term exposure of high body weight heifers to testosterone-treated steers increases pregnancy rate during a late autumn-early winter natural service. *Anim Reprod* 2009;6:446–9.
- [13] Martin GB, Scaramuzzi RJ, Lindsay DR. Effect of the introduction of rams during the anoestrous season on the pulsatile secretion of LH in ovariectomized ewes. *J Reprod Fertil* 1983;67:47–55.
- [14] Custer EE, Berardinelli JG, Short RE, Wherman M, Adair R. Postpartum interval to estrus and patterns of LH and progesterone in first calf-suckled beef cows exposed to mature bulls. *J Anim Sci* 1990;68:1370–7.
- [15] Hixon JE, Flint PF. Effects of a luteolytic dose of oestradiol benzoate on uterine oxytocin receptor concentrations, phosphoinositide turnover and prostaglandin F₂-α secretion in sheep. *J Reprod Fertil* 1987;79:457–67.
- [16] Vighio GH, Liptrap EL. Plasma concentrations of oxytocin, prostaglandin and ovarian steroids during spontaneous luteolysis in the cow. *Domest Anim Endocrinol* 1986;3:209–15.
- [17] Silvia WJ, Lewis GS, Thatcher WW, McCracken JA, Wilson L. Hormonal regulation during of uterine secretion of prostaglandin luteolysis in ruminants of animal of animal for of dairy. *Biol Reprod* 1991;655–63.
- [18] Flint AP, Sheldrick EL. Ovarian secretion of oxytocin is stimulated by prostaglandin. *Nature* 1982;297:587–8.
- [19] Bazer FW, Thatcher WW, Hansen PJ, Miranda MA, Ott TL, Plante C. Physiological mechanisms of pregnancy recognition in ruminants. *J Reprod Fertil (Suppl)* 1991;43:39–47.
- [20] Ginther OJ, Silva LA, Araújo RR, Beg MA. Temporal associations among pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂α, luteal blood flow, and luteolysis in cattle. *Biol Reprod* 2007;76:506–13.
- [21] Chemineau P. Effect on estrous and ovulation of exposing creole goats to the male at three times of the year. *J Reprod Fertil* 1983;67:65–72.
- [22] Ungerfeld R. Combination of the ram effect with PGF₂α estrous synchronization treatments in ewes during the breeding season. *Anim Reprod Sci* 2011;124:65–8.
- [23] Meilán J, Ungerfeld R. Does introduction of rams during the late luteal phase promote the estrus response in cyclic ewes? *Small Ruminant Research* 2014;120:116–20.
- [24] Zarco L, Rodriguez EF, Angulo MR, Valencia J. Female to female stimulation of ovarian activity in the Ewe. *Anim Reprod Sci* 1995;39:251–8.
- [25] Orihuela A, Clemente N, Ungerfeld R. Close contact with spontaneously cycling Saint Croix ewes triggers cyclic activity in seasonally anoestrous Suffolk ewes. *Anim Reprod Sci* 2016;56:1816–9.
- [26] Wright IA, Rhind SM, Smith AJ, Whyte TK. Female-female influences on the duration of the postpartum anoestrous period in beef cows. *Anim Prod* 1994;59:49–53.
- [27] Acosta TJ, Yoshizawa N, Ohtani M, Miyamoto A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F₂α injection in the cow. *Biol Reprod* 2002;66:651–8.
- [28] Fiol C, Ungerfeld R. Biostimulation in cattle: stimulation pathways and mechanisms of response. *Trop Subtrop Agroecosyst* 2012;1:529–45.
- [29] Fiol C, Ungerfeld R. Estrous response and AI pregnancy rates of 2 year-old beef heifers exposed to androgenized steers before an estrous synchronization protocol with double PGF₂α. *Anim Reprod* 2011;8:9–13.
- [30] Miller V, Ungerfeld R. Weekly bull exchange shortens postpartum anestus in suckled beef cows. *Theriogenology* 2008;69:913–7.
- [31] Ungerfeld R, Orihuela A. Sudden introduction of bucks during the late luteal phase of isolated female goats induces a biphasic change in progesterone concentrations. *Anim Reprod* 2015;12:927–30.
- [32] Battocchio M, Gabai G, Mollo A, Veronesi MC, Soldano F, Bono G, Cairoli F. Agreement between ultrasonographic classification of the CL and plasma progesterone concentration in dairy cows. *Theriogenology* 1999;51:1059–69.
- [33] Izard MK, Vandenbergh JG. Priming pheromones from oestrous cows increase synchronization of oestrus in dairy heifers after PGF₂-α. *J Reprod Fertil* 1982;66:189–96.
- [34] Nordéus K, Båge R, Gustafsson H, Humblot P, Söderquist L. The influence of oestrous substances on cyclicity and oestrous behaviour in dairy heifers. *Acta Vet Scand* 2012;54(1):26.
- [35] Orihuela A, Galina CS, Escobar J, Riquelme E. Oestrous behaviour following prostaglandin F₂α injection in Zebu cattle under continuous observation. *Theriogenology* 1983;19:795–809.
- [36] Herzog K, Brockhan-Lüdemann M, Kaske M, Beindorff N, Paul V, Niemann H, Bollwein H. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. *Theriogenology* 2010;73:691–7.
- [37] Siqueira LGB, Areas VS, Ghetti AM, Fonseca JF, Palhao MP, Fernandes CA, Viana JH. Color Doppler flow imaging for the early detection of nonpregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. *J Dairy Sci* 2013;96: 6461–72.
- [38] Arashiro E, Nunes K, Ungerfeld R, Clariget R, Pinto P, Nicolau H, Balara M, Alvarez F, Bragança GM, Ribeiro LS, Fonseca JF, Zandonadi F. Early pregnancy diagnosis in ewes by subjective assessment of luteal vascularization using colour Doppler ultrasonography. *Theriogenology* 2018;106:247–52.
- [39] Berardinelli JG, Joshi PS, Tauck SA. Conception rates to artificial insemination in primiparous, suckled cows exposed to the biostimulatory effect of bulls before and during a gonadotropin-releasing hormone-based estrus synchronization protocol. *J Anim Sci* 2007;85:848–52.
- [40] Martin GB, Milton JTB, Davidson RH, Bancho GE, Lindsay DR, Blache D. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Anim Reprod Sci* 2004;82–83:231–46.

