UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

# NIVELES DE PROGESTERONA EN SANGRE Y VOLUMEN DE CUERPO LÚTEO EN UN PROTOCOLO DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO EN VACAS EN ANESTRO MODIFICANDO EL DÍA DE APLICACIÓN DE LA eCG

Por

María Ximena GOYETCHE BERAZATEGUI

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias Orientación Medicina Veterinaria

FV-33425

MODALIDAD Ensayo Experimental

MONTEVIDEO
URUGUAY
2018

**PAGINA DE APROBACIÓN**

TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de Mesa:

Dr. Danilo Fila

Segundo Miembro (Tutor):

Dr. Rafael Aragunde

Tercer Miembro:

Dra. María José Estradé

Fecha de aprobación: 27/09/2018

Autor:

María Ximena GOYETCHE BERAZATEGUI



FACULTAD DE VETERINARIA
Aprobado con ... (8) ocho

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Rafael Aragunde por su constante apoyo y dedicación a este trabajo.
- A la Dra. Carolina Viñoles y la Dra. Andrea Alvez por su apoyo durante el trabajo práctico.
- Al personal del INIA "La Magnolia", Tacuarembó.
- Al personal del Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria por su paciencia y colaboración en la medición de Progesterona.
- Al personal de Biblioteca, Hemeroteca y Referencia de la Facultad de Veterinaria, muchas gracias.
- A la Facultad de Veterinaria que contribuyó en mi proceso de constante formación.
- A mis amigos y compañeros por estar siempre.
- A mi madre, padre y hermano por estar siempre conmigo en este proceso.

TABLA DE CONTENIDO

PAGINA DE APROBACIÓN ..... 1
AGRADECIMIENTOS ..... 2
1. LISTADO DE CUADROS Y FIGURAS ..... 4
2. RESUMEN ..... 5
3. SUMMARY ..... 6
4. INTRODUCCIÓN ..... 7
5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA ..... 8
5.1 Ciclo Estral ..... 8
5.2 Regulación neuroendocrina del CE. ..... 8
5.3 Fases del Ciclo Estral ..... 10
5.4 Dinámica folicular: su desarrollo y regulación. ..... 11
5.5 Fase Luteal y formación del Cuerpo Luteo ..... 12
5.6 Anestro Posparto ..... 14
5.7 Inseminación Artificial ..... 16
5.8. Tratamientos de inducción de la ovulación. ..... 16
5.9. GonadotrofinaCorionica Equina (eCG) ..... 17
6. HIPÓTESIS ..... 19
7. OBJETIVO ..... 19
7. MATERIALES Y MÉTODOS ..... 19
8 RESULTADOS ..... 22
9. DISCUSIÓN ..... 24
10. BIBLIOGRAFÍA ..... 28

# 1. LISTADO DE CUADROS Y FIGURAS

## CUADROS

CUADRO N° 1 Grupo experimental T5 ..... 20
CUADRO N° 2 Grupo control T7 ..... 20

## FIGURAS

Figura 1: Volumen de CL desde la ovulación representada como día 1, al día 14 en vacas de carne en anestro superficial con ternero al pie para los grupos T7 y T5. ..... 22
Figura 2: Niveles de $P_4$ en sangre desde la ovulación representado desde el día 1 al día 9 de la fase luteal en vacas de carne en anestro superficial con ternero al pie para los grupos T5 y T7 ..... 23

# 2. RESUMEN

El presente trabajo consistió en evaluar el efecto de la aplicación de la eCG 48 horas antes del retiro del progestágeno sobre la funcionalidad del cuerpo lúteo (CL) en un protocolo de inducción de la ovulación. Se midió la evolución del volumen del CL y la producción de progesterona ($P_4$) luego de la ovulación en vacas en anestro posparto con ternero al pie. Para ello se utilizaron 22 vacas Bradford en anestro superficial, determinado por la realización de 2 exámenes ecográficos con un intervalo de 10 días donde se evidenció la ausencia de CL y folículos de hasta 6 mm de diámetro en ambas instancias. Se formaron 2 grupos de 11 vacas cada uno, uniformizando por condición corporal y tiempo de paridas. A todas las vacas el Día 0 se les aplicó una dosis de 2 mg de benzoato de estradiol (BE) y en ese momento se les coloco un dispositivo intravaginal (DIV) de liberación lenta de $P_4$ (750 mg de P4). El Día 7 se les retira el DIV y se le administra 0,150 mg IM de un análogo de PGF2α y 400 UI IM de eCG; el Día 9, se le administró una dosis de 8 µg IM de GnRH. La diferencia fue en que al grupo experimetal (Grupo T5), el Día 5 se le administró 400 UI IM de eCG; después se realizaron los mismos tratamientos que al grupo control (Grupo T7). Desde el primer día postovulación hasta el día 9 postovulación, se les extrae sangre a ambos grupos de la vena yugular, para medir la concentración de $P_4$ en sangre y, se les realizó una ultrasonografía ovárica, para medir el diámetro de los CL en ambos grupos desde el día 1 postovulación hasta el día 14. El aumento del volumen del CL desde la ovulación hasta el día 14 del ciclo estral (CE), mostró que el volumen no presentó diferencias significativas durante ese tiempo. Aunque el día 7 después de la ovulación, hubo una tendencia a que los CL fueran mayores en el T5 (6344 ± 634 $mm^3$) que en el T7 (5258 ± 634 $mm^3$). La $P_4$ en sangre desde la ovulación hasta el día 8 de la fase luteal, se mantuvo igual para ambos grupos. El Día9 luego de la ovulación la $P_4$ del Grupo T5 (3,59 ±0,38 ng/mL) fue estadísticamente mayor que la del Grupo T7 (2,53 ± 0,35 ng/mL). La larga vida media en la sangre de la eCG, permitió que la misma actuara durante más tiempo tanto en los receptores de FSH como de LH, probablemente generando folículos preovulatorios mayores dando lugar a un CL más funcional.En conclusión, la eCG aplicada 48 horas antes de retirado el DIV, en un protocolo de inducción de la ovulación en vacas en anestro superficial genera un CL con una tendencia a tener mayor volumen 7 días postovulación y un aumento de la concentración de $P_4$ en sangre el día 9 postovulación. Por lo que es una herramienta a tener en cuenta para aumentar la tasa de concepción de la IATF, y mejorar la eficiencia reproductiva

# 3. SUMMARY

The aim of the present study was to determine the effect of eCG given 48 hours before withdrawal of an intravaginal progesterone device, on corpus luteal (CL) functionality in a fixed time ovulation protocol. Luteal volume evolution and progesterone ($P_4$) production were measured in anestrous sucked beef cows after the ovulation. 22 Bradford cows in anestrum were used determined by 2 ultrasonography (US) with 10 days interval to monitor the growth and ovulation or regression of individual follicles (≥ 6 mm and corpus luteum absence). All cows received estradiol benzoate (BE) (2 mg IM) and a progesterone releasing intravaginal device (IVD) containing 750 mg of progesterone on Day 0. Two groups of eleven cows were assigned, with a similar body condition score (BCS) (scale 1 to 8) and delivery time. Group T5 (experimental group) received on Day 5 eCG (400 UI IM). On Day 7 IVD was removed and they were given PGF2α (0.150 mg IM); on Day 9, they were given GnRH (8 μg IM).Group T7 (control group), on Day 7 IVD was removed, and PGF2α (0.150 mg IM) and eCG (400 UI IM) was administered. On Day 9 8 μg of GnRH were administered. From the first day after ovulation until Day 9 post ovulation blood samples were collected from jugular vein in both groups to determine serum $P_4$ concentrations and the luteal volume was measured from the first day after ovulation until Day 14 by ultrasonography in both groups. The increase of luteal volume from ovulation until the estrous cycle day 14, showed that volume did not present any difference. However, on Day 7 after ovulation luteal volume tended to be larger in the T5 (6344 ± 634 $mm^3$) than T7 (5258 ± 634 $mm^3$). From ovulation until Day 8 of luteal phase, serum $P_4$ concentration was the same for both groups. Since Day 9 after ovulation serum $P_4$concentration of T5 (3.59 ± 0.38 ng/mL) was statistically higher than in the T7 (2.53 ± 0.35 ng/mL). The prolonged half – life of eCG, allowed it to act more time over both FSH and LH receptors, stimulating larger preovulatory follicles resulted in a larger CL. In conclusion, the effect of eCG given 48 hours before removal of an intravaginal progesterone device, in an ovulation protocol in anestrous cows resulted in CL tending to increase luteal volume and increase serum $P_4$concentration on Day 9 after ovulation.

# 4. INTRODUCCIÓN

El manejo reproductivo es clave en la producción ganadera. Su control requiere el conocimiento de la fisiología reproductiva, sus capacidades y limitaciones genéticas y la adecuación al ambiente para utilizar su potencial de producción (Bó y Tegli, 2005).

La eficiencia de los sistemas de producción de carne bovina está determinado por el número de terneros nacidos o destetados/vaca servida por año. El amamantamiento del ternero y la baja condición corporal al parto y entore, son las principales razones que condicionan el reinicio de la actividad ovárica, de ésta forma la tasa de preñez estará afectada, y por ende se obtendrá una baja eficiencia reproductiva (Cutaia y col., 2003).

Para medir la eficiencia reproductiva se han desarrollado diferentes índices: el intervalo parto a primer servicio (IPS), el intervalo parto - concepción (IPC), intervalo entre partos (IEP), número de servicios por concepción (SC), porcentaje de detección de celos (%DC), porcentaje de concepción (%C) y porcentaje de preñez (%P). El anestro posparto afecta dichos índices reproductivos, y así la eficiencia reproductiva (Morales y Cavestany, 2012).

La actual situación de la ganadería exige a los productores a obtener la máxima eficiencia para garantizar un retorno económico aceptable. En este contexto, la optimización de la eficiencia reproductiva es uno de los principales factores que contribuyen para mejorar las ganancias. A pesar de haber consenso entre los productores y técnicos de que la Inseminación Artificial (IA) es una de las técnicas más apropiada para acelerar el avance genético y el retorno económico en una explotación ganadera, el porcentaje del rodeo bovino, incluido en estos esquemas en el mundo continúa siendo bajo (Roche y col., 1992). Al uso de la IA se le debe sumar un buen manejo nutricional y sanitario del rodeo. (Baruselli y Vieira, 2017).

Uno de los principales factores que reducen la eficiencia reproductiva en programas de IA es la falla en la detección de celo ya sea por la condición de anestro o por errores del técnico a la hora de la detección. Esto se agrava cuando influyen las condiciones climáticas como el estrés calórico que bloquea la ciclicidad y las manifestaciones de celos o por los sistemas de producción pastoriles (donde la dependencia del tiempo influye directamente disminuyendo la detección de celos). Estos factores se han logrado superar gracias al uso de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF). (Baruselli y Vieira, 2017).
En la actualidad la IATF se aplica en diferentes condiciones tanto en rodeos de carne como de leche y en biotipos cebuinos como taurinos (Menchaca y col., 2013b).Los animales con sangre índica, como el Bradford, tienen una alta tasa de celos de duración menor a 12 horas, y hasta un 30% de ellos tienen celos que comienzan y terminan durante la noche, por lo que pasa desapercibido para el personal (Bó y col., 2002).

# 5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## 5.1 Ciclo Estral

El ciclo estral (CE) es un conjunto de eventos que se repiten sucesivamente: en la vaca tiene una duración promedio de 21 días. La vaca es una especie poliéstrica anual (por lo que los ciclos se repiten durante todo el año) (Ungerfeld, 2002c). La edad de la pubertad, primer estro, está influenciada por la nutrición y la estación del año en que se ha producido el nacimiento (Arthur, 1989), y está comprendida entre los 6 y 12 meses de edad, con un peso de 200 – 250 kg (Forde y col., 2010).Una vez alcanzada la pubertad, el ciclo estral será interrumpido únicamente por la gestación, lactancia o diversos estados patológicos (Arthur, 1989).

Algunas vaquillonas no ovula en el primer estro pero la gran mayoría presenta una primera ovulación sin manifestación de celo, el llamado celo "silente". La duración media del celo es de 18 horas. Entre los factores que pueden influenciar su duración se incluyen: raza del animal, estación del año, presencia del toro, nutrición, producción láctea, número de partos y, la cantidad de vacas en celo al mismo tiempo. La ovulación es espontánea (Arthur, 1989), y ocurre de 10 a 12 horas después del celo (Forde y col., 2010). Algunas vacas y vaquillonas no manifiestan signos externos de estro a pesar de tener una actividad cíclica normal. Los síntomas de celo, suelen ser más intensos en las vaquillonas que en las vacas. Una vaquillona o vaca se encuentra en celo cuando acepta la monta de un macho o es montada por otra vaca, se muestra intranquila (más activa), tienden a agruparse; disminuye su apetito, presenta descarga genital de moco filante, transparente y claro, cuya elasticidad permite que cuelgue desde la vulva al suelo, adhiriéndose a la cola y los flancos, la vulva se encuentra ligeramente edematosa y congestionada y hay una pequeña elevación de la temperatura corporal, el pelo de la base de la cola suele estar erizado y la piel puede presentar escoriaciones producidas por la monta de otras vacas (Arthur, 1989).

## 5.2 Regulación neuroendocrina del CE.

La regulación de la ciclicidad sexual se lleva a cabo bajo el control del eje hipotálamo – hipofisario-gonadal. Este sistema es regulado por una hormona de naturaleza peptídica, la Hormona Liberadora de Gonadotrofinas (GnRH) que es sintetizada por neuronas hipotalámicas y liberada a los vasos porta-hipofisarios por donde llega a la hipófisisen vía directa para estimular la secreción de 2 hormonas hipofisarias: la Hormona Luteinizante (LH) y la Hormona Folículo Estimulante (FSH). Ambas hormonas, son de naturaleza peptidica, denominadas gonadotrofinas ya que su órgano blanco son las gónadas en las que estimulan la gametogénesis y la liberación de esteroides. Estos esteroides a su vez regulan tanto la función hipotalámica como la hipofisaria cerrando el circuito de este eje (Samoza, 2002).

### GnRH. Hormona Liberadora de Gonadotrofinas.

Es un decapéptido, sintetizado y almacenado en el hipotálamo. La GnRH proporciona un enlace humoral entre los sistemas neural y endocrino. En respuesta a las señales neurales, se libran pulsos de GnRH hacia el sistema portal hipofisario para la liberación de LH y FSH de la hipófisis anterior (Hafez y Hafez, 2000).

**FSH. Hormona Foliculoestimulante.**

Esta hormona glicoproteica promueve el crecimiento y la maduración del folículo ovárico. La FSH no causa la secreción de estrógeno del ovario por sí sola, sino que necesita de la presencia de LH para estimular la producción de estrógeno (Hafez y Hafez, 2000).

**LH. Hormona Luteinizante.**

Es una hormona glicoproteica cuyos niveles basales actúan conjuntamente con la FSH para inducir la secreción de estrógenos del folículo ovárico. La oleada preovulatoria de LH causa la ovulación, así como la luteinización de los folículos ováricos (cuerpo lúteo) (Hafez y Hafez, 2000).

**Estrógenos.**

El 17βestradiol es el principal estrógeno producido por el ovario a nivel de los folículos antrales (Ungerfeld, 2002b). Los estrógenos tienen gran cantidad de funciones, algunas de ellas son: el estímulo sobre el Sistema Nervioso Central para inducir el comportamiento estral en las hembras; en la vaca, son necesarias pequeñas cantidades de progesterona($P_4$)con estrógeno para inducir el estro; a nivel del útero aumentan la amplitud y la frecuencia de las contracciones, potenciando los efectos de la oxitocina y la $PGF2_{\alpha}$; desarrolla los caracteres sexuales secundarios; ejerce el control de retroalimentación tanto positiva como negativa sobre la liberación de LH y FSH a través del hipotálamo; y estimula el crecimiento de los ductos de la glándula mamaria (Hafez y Hafez, 2000).

**Progesterona.**

La Progesterona (como su nombre lo indica, la hormona de la preñez) es la principal secreción del cuerpo lúteo (Ungerfeld, 2002b), y también puede ser secretada por la placenta (Wiltbank y col., 2014). Es transportada en la sangre por una globulina de enlace. La secreción de $P_4$es estimulada principalmente por la LH.
La $P_4$realizà las siguientes funciones: prepara el endometrio para la implantación y mantenimiento de la preñez, lo cual aumenta la actividad de las glándulas secretorias en el endometrio e inhibe la movilidad del miometrio; actúa sinérgicamente con los estrógenos para inducir el comportamiento estral; desarrolla el tejido secretor (alveolos) de las glándulas mamarias; en altas concentraciones, inhibe el estro y el pico de LH que induce la ovulación (Hafez y Hafez, 2000).

**Inhibina**

Es una hormona proteica de origen gonadal que juega un importante rol en la regulación de la secreción de FSH. La principal fuente de Inhibina es la granulosa de los folículos dominantes en crecimiento. Actúa regulando la secreción de FSH, provoca en ésta un feed-back negativo sobre su síntesis y liberación (Ungerfeld, 2002b).
La Inhibina desempeña una importante función en la regulación hormonal de la foliculogénesis ovárica durante el ciclo estral. Actúa como señal química a la hipófisis respecto al número de folículos que crecen en el ovario, disminuyendo la secreción de FSH de forma de mantener el número de ovulaciones. Al inhibir la liberación de FSH sin alterar la

liberación de LH, la inhibina es parte responsable de la liberación diferencial de LH y FSH desde la hipófisis (Hafez y Hafez, 2000).

**Relaxina**

La Relaxina es una hormona polipeptidica (Hafez y Hafez, 2000), sintetizada por el CL (Ungerfeld, 2002b). La principal acción biológica de la Relaxina es la dilatación del cuello uterino y la vagina antes del parto (Hafez y Hafez, 2000). También tiene papel en la disrupción del tejido conectivo de la pared del folículo, lo que facilita la ovulación (Ungerfeld, 2002b).

**Prostaglandinas**

Casi todos los tejidos corporales la secretan (Hafez y Hafez, 2000). Las prostaglandinas constituyen un grupo de ácidos grasos esenciales polinsaturados, derivados del ácido araquidónico. Su corta vida media solo les permite tener acciones locales.
Las prostaglandinas más estrechamente relacionadas con la reproducción, son la $PGF_{2\alpha}$ y la prostaglandina $E_2$ ($PGE_2$), secretadas ambas por el útero (Ungerfeld, 2002b).
La $PGF_{2\alpha}$ es el agente luteolítico natural que finaliza la fase luteal y permite el inicio de un nuevo ciclo estral en ausencia de un embrión viable (Hafez y Hafez., 2000); es secretada por el endometrio en forma pulsátil (Ungerfeld, 2002b).

## 5.3 Fases del Ciclo Estral

Durante el CE podemos encontrarnos con 2 fases: una Fase Luteal (14 – 18 días) y una Fase Folicular (4 – 6 días) (Forde y col., 2010).
El CE se puede dividir en 4 etapas sucesivas:

i. *Proestro.* Cuando empieza la luteólisis y el folículo dominante comienza a diferenciarse del resto de los folículos en diámetro(Adams y Singh, 2015).Se manifiestan los primeros signos de cambio de actividad sexual y su duración es de 1 a 2 días (Cavestany y Méndez, 1993).
ii. *Estro.* Celo propiamente dicho. Este periodo es muy corto, de aproximadamente 18 horas de duración con un rango de 6 a 30 horas (Cavestany y Méndez, 1993). En esta fase hay ausencia de un CL funcional y se produce la receptividad sexual por parte de la hembra ocurriendo la maduración del folículo que ovulará en la siguiente fase (Adams y Singh, 2015).
iii. *Metaestro.*Etapa que va desde el final del celo hasta la formación del cuerpo lúteo. Es en esta etapa que se produce la ovulación, la formación del cuerpo hemorrágico y su duración es de 2 a 3 días.
iv. *Diestro.* Es la etapa en que el cuerpo lúteo se desarrolla por completo produciendo la máxima concentración de $P_4$ en sangre. Es la etapa más larga del ciclo y dura unos 15 días, durante este periodo del ciclo estral, el cuerpo lúteo es funcional, lo denominamos *fase luteal.*

La fase luteal es el periodo que sigue a la ovulación cuando se forma el CL (incluye el metaestro y el diestro), mientras que la fase folicular es el periodo en el que el CL regresa (luteólisis) hasta la ovulación (incluye el proestro y el estro) (Forde y col., 2010).

En caso de no haber fecundación, el útero produce prostaglandina F2α, que provoca la lisis del cuerpo lúteo con la caída de $P_4$dando lugar al comienzo de un nuevo ciclo. De haber fecundación, la liberación de prostaglandinas no se produce debido a la señal embrionaria (Interferon Tau), la vaca entra en estado de gestación, y la secreción de $P_4$se mantiene durante toda la preñez (Cavestany y Méndez, 1993).

## 5.4 Dinámica folicular: su desarrollo y regulación.

El proceso continuo de crecimiento y regresión de los folículos antrales que conducen al desarrollo del folículo preovulatorio es conocido como "dinámica folicular". De una a ondas de desarrollo folicular ocurren en un ciclo estral bovino, y el folículo preovularorio deriva de la última onda folicular (Lucy y col., 1992). El desarrollo folicular es continuo e independiente de la etapa del ciclo estral en que esté el animal (Sirois y Fortune, 1988).
Cada onda de crecimiento folicular incluye reclutamiento, selección y dominancia del folículo, seguido por la atresia o la ovulación del folículo dominante (FD) (Forde y col., 2010).

El reclutamiento folicular es el proceso por el cual un conjunto de folículos comienzan a madurar en un ambiente con suficiente cantidad de FSH que permitan el desarrollo del folículo hasta su ovulación (Lucy y col., 1992).
Inmediatamente después del reclutamiento, comienza la "selección folicular" en donde un único folículo emerge del pool de folículos reclutados y continúa su crecimiento, mientras que otros folículos se atresian (Lucy y col., 1992). De ésta manera un único folículo se vuelve funcional y morfológicamente dominante sobre el resto de los folículos de la onda (Adams y Singh, 2015).
El folículo dominante (FD) es aquel folículo que crece hasta por lo menos los 11mm y supera el diámetro de los demás folículos de la onda folicular (Ginther y col., 1989a; Ginther y col., 1989b).De modo, que un FD es capaz de inhibir el crecimiento de otros folículos (Lucy y col., 1992).
Los folículos subordinados son aquellos que se originan del mismo pool de folículos que el FD (Ginther y col., 1989a; Ginther y col., 1989b). Estos folículos en cada onda aumentan de tamaño por dos o tres días después cesan su crecimiento y regresan (Ginther y col., 1989a).
Tanto los folículos dominantes como los subordinados atraviesan por 3 fases: de crecimiento, estática y de regresión (Ginther y col., 1989b). La fase de crecimiento va desde el primer día de la onda hasta el día en que el folículo cesa su crecimiento. La fase estática se extiende por dos o tres días en que el folículo cesa su crecimiento hasta el día en que éste comienza a disminuir progresivamente su diámetro. Y la fase de regresión, se extiende desde el último día de la fase estática hasta que surge una nueva onda folicular y estos folículos no se logran identificar. Se considera que el folículo ovulatorio está en fase de crecimiento desde el día que es identificado hasta que ovula (Ginther y col., 1989a, Ginther y col., 1989b).

Para cada onda folicular, el folículo que se torna dominante no difiere en diámetro del folículo subordinado el primer día de emergencia de la onda, pero el FD se vuelve significativamente mayor que el subordinado en los días siguientes en que los mismos sufren un desvío en su crecimiento (Ginther y col., 1989a).

La codominancia se produce cuando más de un FD aparece en una onda folicular dando como resultado ovulaciones dobles en una misma onda folicular. En las vacas que ovulan

múltiples folículos, todos los folículos ovulatorios emergen de la misma onda folicular. En aquellas vacas que desarrollan múltiples folículos dominantes, la desviación folicular se asocia con baja concentración de inhibina y $P_4$ circulante en comparación con las vacas que desarrollan sólo un folículo dominante. Esto coincide con altas concentraciones de FSH y LH circulantes al momento de la desviación folicular, continuando el crecimiento del segundo y tercer folículo de la onda, y desarrollándose múltiples folículos dominantes (Adams y Singh, 2015).

La FSH induce la emergencia de una onda folicular; esta va a ser inhibida por el estradiol y la inhibina producidos en el folículo seleccionado. Como resultado la FSH comienza a disminuir y el folículo seleccionado comienza a ejercer dominancia sobre los folículos subordinados; esto ocurre, aproximadamente al tercer día de emergencia de la onda (Colazo y Mapletoft, 2014). Luego comienza la desviación folicular que se define como el cambio de diámetro entre los folículos más grandes (es decir, folículo dominante y los que le siguen en tamaño (Wiltbank y col., 2003).

En cada onda folicular, el FD se diferencia de los otros por adquirir receptores para la LH mientras que los folículos subordinados todavía requieren de la FSH para mantener su crecimiento antes de sufrir atresia. El FD crece por 6 días aproximadamente y después ingresa en una fase estática de su crecimiento (Colazo y Mapletoft, 2014).

Se demostró que hay incrementos de la concentración de FSH antes de la emergencia de cada onda folicular; observándose 2 picos de FSH en los ciclos de 2 ondas y 3 picos de FSH en los picos de 3 ondas (Bó y Caccia, 2002).
El patrón de concentraciones de FSH circulante está relacionado con el patrón de crecimiento folicular. Tanto la primera como la segunda onda folicular son precedidas por un aumento de las concentraciones de FSH (Wiltbank y col., 2003).

En los ciclos de 2 y 3 ondas foliculares, la emergencia de la primera onda folicular ocurre el día 0, que corresponde con la ovulación. La emergencia de la segunda onda ocurre el día 9 – 10 para los ciclos de 2 ondas, y el día 8 – 9 para los ciclos de 3 ondas. En los ciclos de 3 ondas, la tercera onda emerge el día 15 – 16 (Adams y Singh, 2015). El CL comienza su regresión más temprano en los ciclos de 2 ondas (días 16) que en los ciclos de 3 ondas (días 19), afectando el intervalo interovulatorio. La duración del CL de la vaca depende principalmente de su patrón de desarrollo folicular que puede ser de 18 a 20 días para ciclos de 2 ondas, y de 21 a 23 días para ciclos de 3 ondas. En ambos casos, el folículo dominante se torna folículo preovulatorio cuando ocurre la luteólisis.
No hay diferencias en la fertilidad entre vacas de 2 y 3 ondas; sin embargo, factores como el nivel nutricional, stress calórico y estacionalidad pueden modificar el patrón de desarrollo folicular (Bó y Caccia, 2002).

## 5.5 Fase Luteal y formación del Cuerpo Lúteo.

El pico preovulatorio de LH conduce a la ovulación del FD y a la luteinización de las células de la granulosa y la teca (con la formación del CL) (Ungerfeld, 2002c). En la ovulación, el contenido antral es eliminado y la pared del folículo ovulatorio colapsa. Las células de la granulosa y de la teca se expanden más allá del antro folicular por un proceso de vascularización y luteinización originando un CL funcional (Adams y Singh, 2015);éste es

una glándula endócrina transitoria(Diaz y col, 2002), que presenta formación de vasos sanguíneos en la etapa adulta (Kaessmeyer y col, 2016).A las 48 horas de la ovulación tiene un diámetro de 1,4 cm; alcanzando su máximo tamaño entre el séptimo y octavo día del diestro, que puede variar entre 2,0 a 2,5 cm de diámetro (Arthur, 1989).

La función del CL es producir la cantidad de $P_4$ suficiente durante la fase luteal del CE como para preparar el endometrio para reconocer un embrión y mantener la preñez. En caso que haya un concepto, las altas concentraciones de $P_4$ en sangre durante la preñez afectan en forma positiva el desarrollo y la sobrevida del embrión (Kumer y col., 2014).

Mientras el CL se desarrolla, las cantidades de $P_4$ secretadas por éste aumentan (Ungerfeld, 2002c). El número y la funcionalidad de las células luteales son un factor primario en la producción de $P_4$ (Wiltbank y col., 2014).El CL contiene al menos 2 tipos celulares: las células luteales grandes que derivan de las células de la granulosa y las pequeñas células luteales que derivan de las células de la teca, del folículo preovulatorio. Las células luteales grandes, son las que producen mayor cantidad de $P_4$ durante los 10 primeros días de la fase luteal; son responsables del 80 % de la producción de $P_4$ luteal (Diaz y col., 2002).

La concentración de $P_4$ plasmática tiene alta correlación con el peso y el volumen del CL (Kastelic y col., 1990; Adams y Singh, 2015).

A medida que el CL va creciendo, se produce un aumento progresivo de la $P_4$ circulante. Las concentraciones de $P_4$ son elevadas durante toda la vida del CL, lo que es fundamental para el desarrollo embrionario y la preñez. Esta $P_4$ circulante impide futuros picos de LH y ovulaciones (Wiltbank y col., 2003).

Al final del diestro y comienzo del proestro, el CL regresa disminuyendo su peso, su volumen de células luteales y la producción de $P_4$. Estos cambios morfológicos se asocian a cambios en la concentración plasmática de $P_4$ a lo largo del CE que va de 2 ng/ml al tercer día después de la ovulación a 6 ng/ml entre los días 10 y 14intervalo en que alcanza los valores máximos (Martin y col, 2013) después de la ovulación, volviendo a niveles basales después del día 16coincidiendo con la luteólisis (Adams y Singh, 2015).Cuando la $P_4$ cae por debajo 1 ng/mL, la luteólisis llega a su fin (Martin y col., 2013).

Según Kastelic y col., 1990 el volumen del CL y la concentración de$P_4$ aumentan de forma similar durante la fase luteal, pero durante la luteólisis el volumen del CL disminuye más lento que la concentración de $P_4$.

El crecimiento del CL puede ser controlado ecográficamente desde el día 2 del ciclo (tomando como día 0 el día de la ovulación) en el 95 % de los CE. Los CL (entre un 40 – 70%) tienen una cavidad central conteniendo el remanente del licor folicular. Esta cavidad se vuelve pequeña y puede desaparecer a medida que el CL madura (Adams y Singh, 2015). El tamaño de dicha cavidad es variable, con una media de 0,4 cm de diámetro, pero ocasionalmente puede ser grande, alcanzando un diámetro de 1,0 cm o más (Arthur, 1989). La concentración plasmática de $P_4$ no es diferente entre los CL que tengan o no tengan dicha cavidad (Kastelic y col., 1990). La cantidad de tejido luteal detectado por ultrasonografía se correlaciona positivamente con la concentración plasmática de$P_4$, excepto durante la luteólisis que la $P_4$ comienza a decaer 1 a 2 días antes que se detecte la regresión del CL por ultrasonografía (Adams y Singh, 2015).

Si para el día 16 del CE, no se detectan suficientes cantidades de interferon tau (INF – τ; encargado del reconocimiento materno de la preñez, secretado por el concepto (Silva y col., 2002)), se produce la luetólisis (Forde y col., 2010). En este momento el embrión debe enviar

INF – τ, como señal para indicar su presencia. Este es necesario para el mantenimiento del CL y la producción de$P_4$, y la continuación del desarrollo endometrial y su actividad secretora (Silva y col., 2002). Si ésta señal no ocurre, el útero secreta PGF2α, principal hormona luteolítica de los rumiantes, induciendo la regresión del CL. Esto disminuye la concentración de $P_4$ circulante, dando lugar al comienzo de una nueva fase estrogénica (Forde y col., 2010).
El CL mantiene su máximo tamaño hasta 24 horas antes de comenzado el celo. En este momento se produce una rápida disminución de su tamaño: a la mitad del celo, su diámetro ha disminuido a 1,5 cm, con la consecuente caída de la $P_4$ en sangre (Arthur, 1989).

## 5.6 Anestro Posparto

El anestro (a = sin; estro = deseo sexual) es la ausencia de comportamiento estral en una hembra, en un periodo de tiempo esperado (Gatica, 1993; de Castro, 2002; Morales y Cavestany, 2012); es un evento fisiológico que tiene un promedio de 45 a 60 días de tiempo, siendo más bajo en condiciones pastoriles (Morales y Cavestany, 2012). Implica un retraso en el reinicio de la actividad ovárica posparto o fallas en la detección de celos en vacas ciclando (Cavestany, 2002).
Este es el período de transición en el cual el eje hipotálamo hipofiso –ovárico –uterino se recupera de la preñez previa, siendo un evento fisiológico luego de un parto normal. La duración del anestro posparto está influenciada por el amamantamiento, la presencia del ternero, el estatus nutricional, la estación de parición y la edad, entre otros; siendo la categoría más afectada la vaca de primera cría(de Castro, 2002). Las vacas de carne con cría al pie en condiciones de pastoreo, presentan un alto porcentaje de anestro (Bó y col., 2002). Nuestro país tiene una producción típicamente pastoril, donde más del 80 % del rodeo con cría se encuentra en anestro al inicio de los servicios (Menchaca y col., 2013b).

Al final de la gestación el eje hipotálamo – hipofisario está bajo la acción de un feedback negativo producido por una alta concentración de esteroides placentarios y ováricos (estrógeno y $P_4$), durante un tiempo prolongado. Esto resulta en un agotamiento de las reservas de gonadotrofinas hipofisarias, que lleva a un bloqueo de la actividad folicular.
La emergencia de la primera onda folicular después del parto, ocurre entre los día 2 a 7 en las vacas de carne con cría al pie. El diámetro de estos folículos aumenta conforme se extiende el posparto. La dominancia folicular se observa de 10 a 21 días posparto, no obstante, ese folículo es anovulatorio (Baruselli y col., 2003).
En la vaca de carne aunque se reinicie el desarrollo folicular en ondas, estos folículos no ovulan por la falta de pulsos de LH necesarios para la maduración previa de dicho folículo (de Castro, 2002). La ausencia de ovulación es consecuencia de un bloqueo de pulsos de LH, por una disminución de sus reservas en la adenohipofisis (Baruselli y col., 2003), y por el feedback negativo ejercido por el estradiol ovárico sobre la GnRH hipotalámica (de Castro, 2002). Luego que se restablecen los niveles de LH (15 a 30 días posparto), el amamantamiento pasa a ser uno de los factores que bloquean la ovulación en vacas de carne; prolongando el anestro posparto. La interacción de la vaca con el ternero promueve la liberación de opioides endógenos por la vaca, produciendo un feedback negativo a nivel del hipotálamo, que impide la liberación de la LH necesaria para promover el crecimiento folicular y la ovulación (Baruselli y col., 2003).
La exposición a la $P_4$ es un requisito indispensable para el reinicio de la actividad ovárica posparto (celo y fase luteal normal), su inclusión es imprescindible para el éxito de cualquier tratamiento hormonal de vacas en anestro (Cavestany, 2002). La primera ovulación posparto

refleja el reinicio de la actividad folicular, siendo el retraso en el inicio de la ovulación y manifestación externa de celo un factor asociado a la reducción en el porcentaje de concepción (Morales y Cavestany, 2012).

Según Ambrose (2015), el anestro en vacas se basa en el diámetro de los folículos según la emergencia folicular (~ 4 mm), desviación del folículo (~ 9 mm) y folículo ovulatorio (~10 – 20 mm).De acuerdo a esta dinámica folicular y luteal, el anestro se clasifica en:

**Tipo I:** hay crecimiento folicular dependiente de la emergencia folicular pero no ocurre desviación folicular lo que determina que no se selecciona un FD. Este tipo de anestro se debe a una extrema mala nutrición, que ejerce un efecto negativo sobre la producción de FSH lo que suprime el crecimiento folicular. Los ovarios están "inactivos", por ende, no se palpa ninguna estructura en su superficie en el examen rectal.

**Tipo II:** se da la desviación y crecimiento de los folículos con o sin FD, seguido de atresia o regresión folicular. La regresión del FD generalmente es seguida por la emergencia de una nueva onda folicular, 2 – 3 días después.

**Tipo III:** hay desviación, crecimiento y emergencia de un FD, pero dicho folículo no ovula, transformándose en un folículo persistente o continúa creciendo hasta que se desarrolla un quiste folicular.

**Tipo IV:** el FD ovula y se forma un CL, pero la fase luteal es prolongada debido a que no ocurre la luteólisis y por ende, no hay regresión del CL; habiendo un CL persistente.

Para confirmar el anestro se debe realizar ecografía ovárica, asumiendo que aquellas vacas con CL o con signos de estro (flujo vaginal o tono uterino aumentado) están ciclando, y las que tienen folículos de hasta 6 - 8 mm sin CL ni signos de estro en un período de 10 días se encuentran en anestro superficial o anestro profundo cuando tienen folículos < a 8 mm (Menchaca y col., 2013b).

Por palpación rectal en el anestro, se van a encontrar ovarios blandos, pequeños e inactivos con ausencia de CL en caso de un verdadero anestro. Sin embargo, los folículos pueden empezar a madurar y volverse atresicos. En caso de celo silencioso, se puede palpar un CL funcional así como en el anestro un CL persistente.

El anestro se caracteriza por una pobre producción de $P_4$ ovárica (Kumer y col., 2014). La $P_4$ va a aumentar después de la primera ovulación posparto pero decae unos días después en la primera fase luteal que es corta. Siendo la segunda fase luteal de duración normal (Ambrose, 2015). El diagnostico también puede ser confirmado por una concentración de $P_4$ basal en sangre de 0,5 – 1 ng/ml. Si la concentración de $P_4$ supera el 1ng/ml, es por la presencia de un CL y por el anestro, produciéndose un celo silencioso y habiendo un CL persistente (Kumer y col., 2014).

Se pueden realizar tratamientos para acortar el anestro posparto con la finalidad de: 1) controlar el desarrollo de las ondas foliculares, 2) promover la ovulación y 3) sincronizar el estro y/u ovulación al final del tratamiento. Estos tratamientos están dirigidos a aumentar la frecuencia de pulsos de LH y así permitir que el FD madure y ovule.

Generalmente los tipos de anestros que se tratan con hormonas son los de tipo II y III ("anestro superficial"), dado que animales en anestro tipo I ("anestro profundo"), están generalmente en un balance energético negativo (BEN) por lo que tienen pocas chances de responder a los tratamientos (Morales y Cavestany, 2012).

FACULTAD DE

## 5.7 Inseminación Artificial

La inseminación artificial se basa en que el eyaculado del macho posee muchos más espermatozoides que los necesarios para producir una gestación. La IA en bovinos es la técnica que permite introducir en el tracto genital de la vaca una dosis mínima seminal del toro elegido, sin que exista contacto físico o en el tiempo entre ambos animales, con el objetivo de lograr la concepción de un ternero (Elhordoy y Farias, 1998).

Las principales limitaciones para el empleo de la IA en el ganado de cría en condiciones pastoriles son fallas en la detección de celos, anestro posparto y pubertad tardía. Para ello se han desarrollado protocolos de sincronización de la ovulación que permiten inseminar todo el rodeo en un periodo de tiempo establecido. Estos tratamientos se conocen con el nombre de protocolos de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF) (Roche y col., 1992).
La IATF es una tecnología que mediante el control de la dinámica folicular y del CL logra sincronizar e inducir la ovulación en un momento conocido, permitiendo inseminar gran número de animales cada día sin necesidad de detectar celo (Menchaca y col., 2013). Para obtener una buena fertilidad en los esquemas de IATF es necesario controlar el desarrollo folicular, la ovulación y la formación de un buen CL (Bó y Tegli, 2005).
Lo que se busca en los programas de IATF es inducir la ovulación de un folículo de buena calidad que más tarde resulte en un CL capaz de producir altas concentraciones de $P_4$ en la siguiente fase luteal (Núñez Olivera y col., 2014).

Entre las ventajas de la IATF se encuentran: el incremento de la tasa de preñez final; la inseminación de vaquillonas y vacas con cría ciclando o en anestro; se evita la detección de celo; y aumenta el número de cabeceras de parto y disminuye la cola de parición (Menchaca y col., 2013a).
Entre las desventajas de la IATF se encuentran: los menores índices de preñez que si se realiza inseminación a celo visto(Stevenson y col., 1987); para Cutaía, 2005la condición corporal determinaría los resultados de la IATF (los animales deberían de tener una CC mínima de 4 para obtener buenos resultados de preñez); además de que los tratamientos de IATF son estrictos en cuanto a los tiempos de realización de cada actividad(Cutaia, 2005).

La principal limitante reproductiva en los sistemas de producción de carne en base pastoril es el anestro posparto. Ante esta situación los tratamientos de IATF más eficaces para dichas condiciones son aquellos diseñados para inducir la ovulación, combinando el uso de$P_4$, benzoato de estradiol y gonadotrofina coriónica equina, como hormona promotora de el desarrollo folicular y luteal (Menchaca y col., 2013a).

## 5.8. Tratamientos de inducción de la ovulación.

Basicamete hay 2 tipos de protocolos usados en ganado de carne: protocolos basados en el estradiol y los basados en la GnRH, ambos se pueden combinar con dispositivos de liberación de $P_4$. Los protocolos basados en el uso de Estradiol se usan en América del Sur y en Australia; mientras que los basados en la GnRH tienden a ser más usados en EEUU, Europa y Nueva Zelanda, donde los protocolos a base de Estradiol están prohibidos (Bó y col., 2016).

El primer protocolo desarrollado para sincronizar la ovulación, es el Ovsynch, que se basó en la combinación de GnRH y PGF2α para controlar la dinámica folicular y luteal de manera tal

que el tiempo de ovulación pudiera ser sincronizado con precisión; para así poder realizar la IATF, sin tener que detectar celo. Consiste en la aplicación de GnRH y PGF2α en 3 momentos distintos: la GnRH (en cualquier momento del CE)para que induzca la emergencia de una nueva onda folicular, la PGF2α administrada 7 días después, para inducir la luteólisis y GnRH nuevamente, de 36 a 48 horas después de la PGF2α, para sincronizar la ovulación. La IA se va a realizar de 16 a 24 horas después de la segunda GnRH administrada (Pursley y col.; 1995). Si la primera GnRH no sincroniza la emergencia de una onda folicular, la ovulación que le sigue a la segunda GnRH no se sincroniza bien, dando como resultado bajos porcentajes de preñez a la IA. Por eso, muchas de las vacas y vaquillonas que son sincronizadas con GnRH también se les aplica un dispositivo de liberación de P4 entre la administración de la primera GnRH y la PGF2α (Bó y Baruselli, 2014).

En general, no ha sido un protocolo muy efectivo para la sincronización de la ovulación en vaquillonas; lo que podría deberse a una menor duración de las ondas foliculares (un recambio folicular más rápido) en vaquillonas que en vacas. La reducción de la duración de las ondas foliculares aumenta la posibilidad de administrar la primera GnRH sin la presencia de un FD y/o el comienzo de una onda folicular antes que la ovulación pueda ser inducida por la segunda inyección de GnRH (Wiltbank y Haughian, 2003).

El anestro, interfiere negativamente en la respuesta al protocolo Ovsynch (Baruselli y col., 2003), debido a los bajos porcentajes de concepción que se obtienen (Bó, 2002; Bó y col., 2014).

Por lo tanto, la elección de éste protocolo en rodeos de cría depende de la categoría de los animales a utilizar (se puede usar en vacas con cría ciclando pero no en vaquillonas o vacas en anestro) (Bó y Tegli, 2005; Cutaia y col., 2007), y del estado de ciclicidad del rodeo (Cutaia y col., 2007; Colazo y Mapletoft, 2014). Es necesario que las vacas tengan FD capaces de ovular para obtener una respuesta satisfactoria al tratamiento (Cutaia y col., 2007).

Esto sugiere que el momento indicado para aplicar un protocolo de IATF es al inicio de la fase luteal (por ejemplo, entre los días 5 y 12 del CE). Para lograr esto, se propuso el Presynch; donde previo a la primera inyección de GnRH, se aplican 2 inyecciones de PGF2α separadas por 14 días cada una, lo cual tiene poco costo para sincronizar la ovulación aumentando la tasa de preñez siguiente (Moreira y col., 2001).

Los tratamientos para inducir la ciclicidad en vacas en anestro requieren la administración de $P_4$ por 7 u 8 días, seutilizan progestágenos para producir un efecto de "priming". Los progestágenos actúan inhibiendo la secreción de LH en la hipófisis. La hormona puede ser aplicada por medio de dispositivos intravaginales (momento que se define como día 0 en el protocolo) (Cutaia y col., 2003).

## 5.9. Gonadotrofina Corionica Equina (eCG)

Esta es una glicoproteína compleja, producida por las copas endometriales del útero de yeguas preñadas. Tiene un alto contenido en carbohidratos (45 %) siendo su peso molecular de 68.000 daltons. Comparándola con otras gonadotrofinas es la que tiene mayor cantidad de ácido siálico; este y su alto peso molecular son los responsables de su larga vida media en sangre en rumiantes, siendo detectable hasta 10 días luego de su aplicación (Menzer y Schams, 1979; Murphy y Marinuk, 1991). Por su gran tamaño, no atraviesa fácilmente el filtro renal, lo que alarga su permanencia en la circulación (Ungerfeld, 2002a).

Esta gonadotrofina tiene una alta afinidad con los receptores tanto de FSH como de LH (Murphy y Marinuk, 1991). En la vaca, es capaz de estimular tanto el crecimiento folicular en

el ovario, como la ovulación (Pessoa y col., 2016).Administrada algunas horas previo a la ovulación estimula el crecimiento folicular a través de su acción de FSH y LH, aumenta el tamaño del folículo preovulatorio, incrementa las concentraciones plasmáticas de $P_4$ luego de la ovulación, mejorando así el desarrollo embrionario y el mantenimiento de la preñez (Núñez Olivera, 2011). De modo, que se podría utilizar la eCG como herramienta para incrementar la concentración plasmática de $P_4$, habiendo una correlación positiva entre ésta y la tasa de preñez; ya que la eCG estimula el crecimiento folicular y por ende, el volumen del CL (Binelli y col., 2001).

En vacas de carne en anestro, hay una pulsatilidad de LH insuficiente como para alcanzar un desarrollo folicular adecuado y la ovulación, siendo esto una limitante para los programas de IATF. Por eso, se ha incluido la eCG en los protocolos de IATF (Pessoa y col., 2016).
Se administra la eCG cuando se retira el dispositivo intravaginal con $P_4$, en hembras en anestro. Dicha adminstración aumenta la tasa de preñez en vacas en anestro y vaquillonas (Menchaca y col., 2013b); siendo su efecto más evidente cuanto mayor sea el anestro (Baruselli y col., 2004).En los animales cíclico (con presencia de un CL) no se observa un efecto positivo cuando se realiza tratamiento con eCG ni aumento de la tasa de preñez de las IATF (Baruselli y col., 2004).

La adición de la eCG es favorable en aquellas vacas con una condición corporal comprometida; ya que la condición corporal es un factor excluyente en la tasa de preñez cuando se usa IATF (los animales deben de tener una condición corporal de 4,en una escala de 1 a 8, para una tasa de preñez aceptable)(Bó y col., 2002; Cutaía y col., 2007).

Nuñez et al. (2014),determinaron que la administración de la eCG aumenta la cantidad de vacas que ovulan estimulando el crecimiento final del folículo ovulatorio. Asimismo, estas vacas desarrollaron un CL más grande que genera mayores concentraciones de $P_4$ después de la ovulación.
Los tratamientos con eCG producen niveles superiores de $P_4$ sérica en la fase luteal siguiente, lo que sugiere que la eCG estimula el desarrollo de un CL más competente (Bó y col., 2014) y la mayor producción de $P_4$ por el mismo (Bó y Baruselli, 2014).
Por lo tanto, los tratamientos con eCG pueden ser una herramienta importante para aumentar la tasa de concepción a la IATF (porque incrementa las concentraciones plasmáticas de P4), disminuir el periodo posparto y mejorar la eficiencia reproductiva (Cutaía y col., 2007).

La iniciativa de éste trabajo fue determinar si la administración de eCG 48 hs antes del retiro del DIV en un protocolo de IATF produce diferencias en el volumen de los CL desarrollados y los niveles de $P_4$ en sangre luego de la ovulación en vacas en anestro con ternero al pie.
Dado que la eCG actúa directamente sobre el folículo preovulatorio (por su acción FSH y LH), creando condiciones óptimas de crecimiento y ovulación, con la posterior formación de un CL por su larga vida media en sangre del rumiante. Dado que su uso es favorable en rodeos con CC comprometida y tiene un efecto positivo cuando el rodeo se encuentra en anestro superficial.

## 6. HIPÓTESIS

La aplicación la eCG 48 hs antes del retiro del progestágeno en un protocolo de inducción de la ovulación en vacas en anestro superficial, debido a su larga vida media en sangre aumenta el volumen del CL y la producción de $P_4$ luego de la ovulación.

## 7. OBJETIVO

Determinar si la aplicación de la eCG 2 días antes del retiro del progestágeno tiene algún efecto sobre el volumen de CL y la producción de P4.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo fue realizado en el INIA "La Magnolia" Depto. de Tacuarembó, durante el mes de Enero coincidiendo con la edad de los terneros y la fecha en la que se realiza la IATF en el establecimiento. Los animales estaban a campo natural mejorado desde el mes anterior en que se inicio el experimento, con una CC uniforme en todo el lote de vacas (CC 3 – 4,5; escala de 1 – 8). Se les efectuó un plan sanitario que consiste en una vacunación anual contra Carbunco, Mancha y Gangrena, además de Campylobacteriosis y Leptospirosis. Se utilizaron 22 vacas Bradford con ternero al pie de 60 a 90 días de nacidos, que se dividieron en 2 grupos uniformizados por el día de parición y CC a las que se le aplicó un tratamiento de IATF utilizando eCG para el grupo control T7 (n = 11) el día 7 y para el grupo tratamiento T5 (n = 11) el día 5, tomando en cuenta como día 0 el día de la aplicación de los progestágenos.

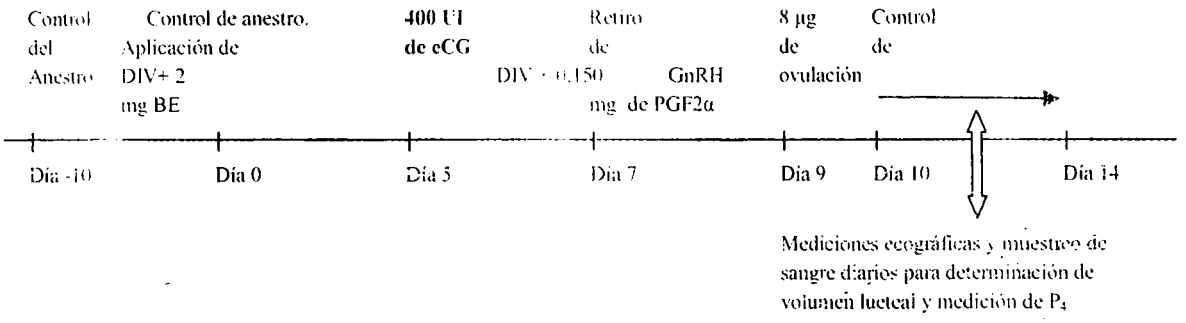
Las vacas se seleccionaron mediante ultrasonografía; se les realizaron 2 ultrasonografías en un lapso de 10 días, para el diagnostico de anestro superficial.

A ambos grupos se les aplico el Día 0 una dosis de 2 mg IM de Benzoato de estradiol (BE – Benzoato de estradiol zoovet, Zoovet, Santa Fe, Argentina), y se les colocó un dispositivo intravaginal (DIV) impregnado en 750 mg de Progesterona (Pro - ciclar p4 Zoovet, Santa Fe, Argentina). El Día 7 se les retira el DIV y se le administra 0,150 mg IM de un análogo de PGF2α D – Cloprostol (PG, Ciclar Zoovet, Santa Fe, Argentina) y 400 UI IM de eCG (Biogón Plus, Biogénesis Bagó, Buenos Aires, Argentina); el Día 9, se le aplicó una dosis de 8 µg IM de un análogo sintético de GnRH, Acetato de Buserelina (GnRH, Progerelin, Nonoken, Montevideo, Uruguay).

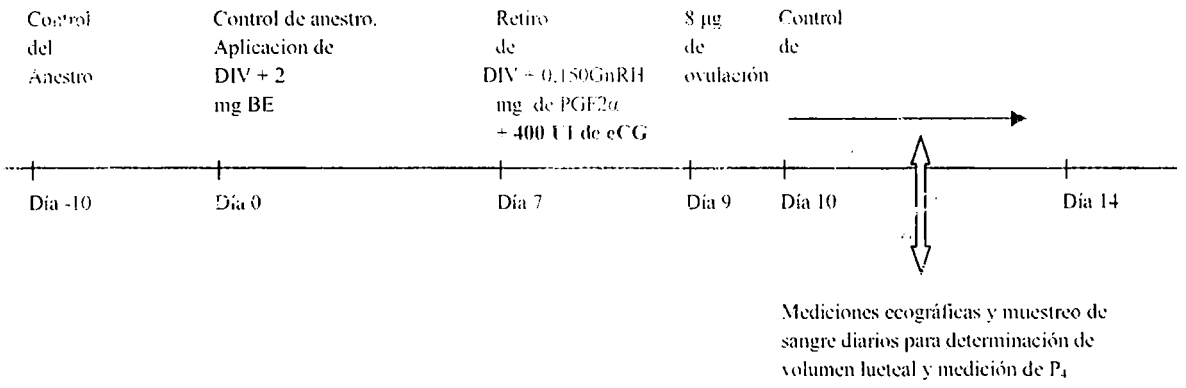
La diferencia radica en que al grupo experimental (Grupo T5), el Día 5 se le administró 400 UI IM de eCG (Biogón Plus, Biogénesis Bagó, Buenos Aires, Argentina); después se realizó el mismo protocolo que al grupo control (Grupo T7).

Se realizó control ecográfico de ovulación. El primer día postovulación, se les comienza a extraer sangre de la vena yugular para medir posteriormente la concentración de P4 plasmática y de forma simultánea, por ultrasonografía se midió el diámetro de los CL durante 14 días, en ambos grupos.

*CUADRO N° 1Grupo experimental T6*




*CUADRO N° 2Grupo control T7*




*Ultrasonografía*

Diariamente se realizó ecografía ovárica en cada vaca hasta el día 14 posovulación, utilizando un equipo de última generación (Esaoate Mylab, Dietrich Holanda) con una sonda transrectal lineal de 10 MHz.

En cada ovario, se midieron aquellos folículos mayores de 3 mm y sus CL. Se tomo como el momento de la ovulación, cuando el FD que se observó durante los tratamientos en la misma posición y superficie ovárica, se deja de observar y en su lugar se observa tejido luteal; confirmando si hubieron ovulaciones únicas o múltiples.

En forma simultánea se midieron los dos diámetros mayores de los CLs. Luego, se calculó el promedio de los 2 diámetros mayores y se aplicó la formula geométrica de volumen de esferas ($V= 4 \pi r^3/ 3$), para obtener el volumen en $mm^3$. Los CLs cavitarios fueron medidos de la misma forma restando el volumen de la cavidad para obtener el volumen de tejido luteal.

*Extracción de sangre*

Desde la ovulación hasta el día 9, se les extrajo sangre a ambos grupos diariamente de la vena yugular. Esta se colocó en frío (5°C) hasta ser centrifugada para obtener el suero que se congeló – 20 °C. La medición de hormonas fue realizada por Radioinmunoanálisis (RIA) en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la

República. La $P_4$ fue analizada con un kit comercial (MP Biomedicals, LLC Diagnostics División, OH, Estados Unidos). La mínima concentración detectada del ensayo fue de 0,14 ng/mL. Todas las muestras fueron analizadas en un único ensayo. Los coeficientes de variación (CVs) intraensayo para los controles bajos (0,91 ng/mL) y altos (4,81 ng/mL) fueron de 6,3 % y 4,2 % respectivamente.

*Análisis estadístico*

El análisis estadístico se realizó con el SAS (Statical Analysis System Institute Inc., Cary, NC, USA, 2008) por el método Proc Mixed para las variables continuas como el volumen de los CLs. y para los niveles de P4 en sangre.

# 8 RESULTADOS

El primer resultado encontrado, es que todas las vacas presentaron un solo CL, de modo, que tuvieron una única ovulación: descartando la presencia de ovulaciones múltiples.

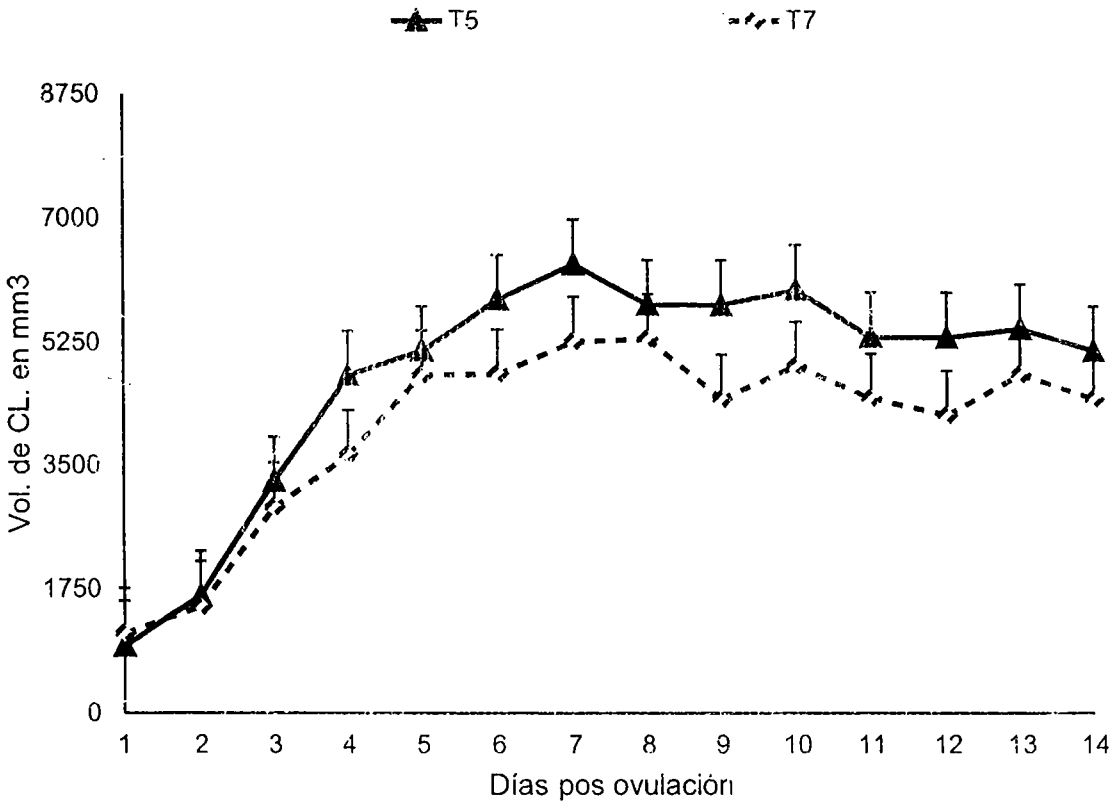



***Figura 1: Volumen de CL desde la ovulación representada como día 1, al día 14 en vacas de carne en anestro superficial con ternero al pie para los grupos T7 y T5.***

La evolución del volumen del CL desde el día de la ovulación hasta el día 14 se muestra en la Figura 1. El volumen del CL no presentó diferencias significativas desde la ovulación hasta el día 14, el día 7 luego de la ovulación mostró una tendencia a ser mayor para el grupo T5 (6344 ± 634 $mm^3$) comparando con el grupo T7 (5258 ± 634 $mm^3$) (P = 0,07).

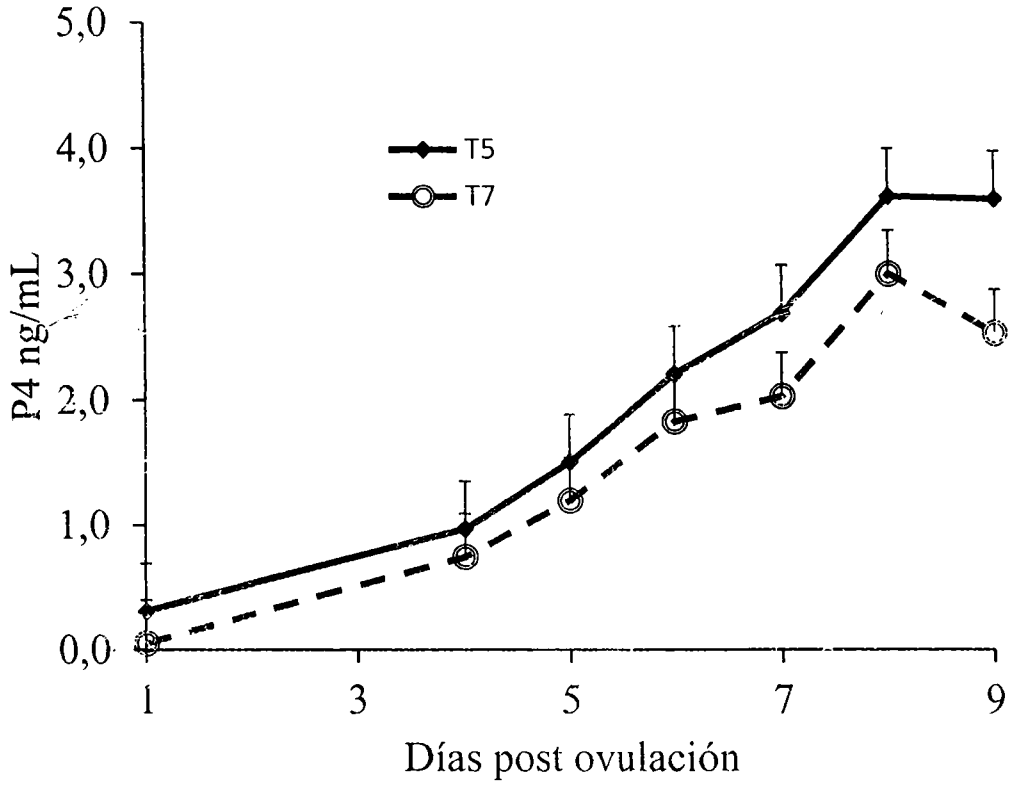



*Figura 2: Niveles de $P_4$ en sangre desde la ovulación representado desde el día 1 al día 9 de la fase luteal en vacas de carne en anestro superficial con ternero al pie para los grupos T5 y T7.*

En la Figura 2 se muestra la concentración de $P_4$ para ambos grupos. Los niveles de $P_4$ en sangre se mantuvieron iguales hasta el día 9 luego de la ovulación en el que la $P_4$ del grupo T5 (3,59 ± 0,38 ng/mL) fue estadísticamente mayor que la del grupo T7 (2,53 ± 0,35 ng/mL) (P = 0,04).

FACULTAD DE VETERIN
Dpto. Cs. y Sa

# 9. DISCUSIÓN

Todas las vacas del ensayo presentaron sólo un CL, de modo, que ovularon sólo una vez. Esto se da porque el día 5 ya hay desvío folicular; hay un FD que inhibe al resto de los folículos a través de su producción de Inhibina.

Para Aragunde y col., 2016 la administración de eCG 2 días antes (o sea, en el día 5 en vez de en el día 7), tiene efecto sobre el folículo preovulatorio, provocando un FD más grande y por ende, un alto porcentaje de preñez.

Según Martínez y col., 2014 el momento de aplicación de la eCG puede inducir ovulaciones dobles. Esto ocurre cuando la eCG se aplica 1 día después de la emergencia de la onda folicular después de la aplicación de la GnRH, pero antes del desvío folicular. La eCG a través de su efecto de FSH y LH, asociado a una baja concentración de $P_4$, permite la rápida maduración del FD o folículos codominantes.

Las altas dosis de eCG también proporcionan soporte gonadotropico para estimular el crecimiento de los 2 folículos más grandes de la onda folicular, dándose la codominancia y resultando en ovulaciones dobles. Para que se produzcan ovulaciones dobles, se debe de administrar una dosis de eCG de al menos 800 UI por vía IM en la tabla del cuello; pero si esta misma dosis es administrada de forma SC, resulta en ovulaciones simples. Esto podría deberse a una menor concentración de la eCG circulante, insuficiente para ovulaciones dobles, pero si podría proporcionar más tiempo de soporte gonadotropico como para que se produzca un folículo de calidad y su consiguiente CL (Martínez y col., 2014).

Otro factor que evitó la presencia de ovulaciones dobles en el trabajo, es que este fue realizado con vacas en anestro superficial. Como en las vacas en anestro la pulsatilidad de LH no es la adecuada para el crecimiento de un FD capaz de ovular, el tratamiento con eCG aumenta por su efecto FSH las gonadotrofinas para que se desarrolle un folículo, comenzando la onda folicular rápidamente desde el principio. Como no hay un FD, la vaca "arranca" desde cero, lo que asegura que a los 5 días halla un FD. Este FD aumenta el tamaño y ovula, incrementándose la fertilidad de las vacas en anestro en condiciones pastoriles.

Uno de los objetivos del ensayo fue evaluar si la aplicación de eCG 2 días antes de retirado el progestágeno en un protocolo de inducción de la ovulación en vacas en anestro tiene algún efecto sobre el volumen del CL formado después de la ovulación por la aplicación de la eCG. En dicho ensayo, el volumen de los CL no presentó diferencias significativas desde la ovulación hasta el día 14; el día 7 después de la ovulación el grupo T5(6344 ± 634 $mm^3$) tendió a tener CL más grandes que el grupo T7(5258 ± 634 $mm^3$) ($P = 0.07$), medido ecográficamente.

La administración de eCG 2 días antes permitiría que ésta actúe más tiempo sobre el folículo preovulatorio formándose un CL que produce más cantidad de $P_4$. Aragunde y col., 2017 concluyeron que dejar actuar más tiempo la eCG aumenta el volumen del CL y el mismo produce más $P_4$ en vacas en anestro.

Otro de los objetivos era evaluar la producción de $P_4$ por parte del CL.

En este ensayo, los niveles de $P_4$ sanguínea se mantienen iguales para ambos grupos hasta el día 9 luego de la ovulación en el que la $P_4$ del grupo T5 (3,59 ± 0,38 ng/mL) aumentó respecto a la del grupo T7 (2,53 ± 0,35 ng/mL) ($P = 0.04$). Esto podría demostrar que hubo un efecto del tratamiento realizado; aunque no se sabe qué pasó con la P4 después del día 9, si esta siguió aumentando o disminuyó.

Esto se puede deber a la larga vida media que tiene la eCG, que proporciona un alto soporte de gonadotrofinas previo a la ovulación. Lo que produciría un CL de mayor tamaño, que por

ende forma más $P_4$. Probablemente por la larga vida media de la eCG, ésta sea más exitosa en estimular el crecimiento folicular que la FSH (Sales y col., 2011).
Otro factor sobre el que ejercería efecto la larga vida media de la eCG, es la fertilidad. Junto a su capacidad de unirse a receptores de LH y de FSH, estimula las células de la teca y de la granulosa del FD y la secreción de $P_4$ por el CL, su inclusión en protocolo mejora el desarrollo folicular y proporciona en mejor ambiente hormonal durante el proestro (mayor cantidad de estradiol circulante) y el diestro (mayor cantidad de $P_4$ circulante), lo que es favorable para la fertilidad como lo describió SáFilho y col., 2009.

Baruselli y col., 2004 obtuvieron mayores concentraciones de P4 plasmática después del tratamiento IATF (8,6 ± 0,9 ng/mL) ($P < 0,05$) a los 12 días de realizado. Estos realizaron un protocolo de inicio similar, en el que el Día 8, se retira el dispositivo y todas las vacas reciben PGF2α y 400 UI de eCG en uno de los grupo, y al otro no se le administra (n = 25). Todas las vacas recibieron otra dosis de BE de 1 mg IM el día 9 y se les realiza la IATF de 52 ± 56 horas de retirado el dispositivo de P4. Se evaluó la actividad ovárica mediante ultrasonografía en el día 0, y las vacas fueron clasificadas en: vacas con CL, vacas con folículos preovulatorios medianos (≥ a 8 mm de diámetro), y vacas que no presentan estructuras ováricas (folículos < 8 mm de diámetro). El protocolo consistió en evaluar la tasa de ovulación, el tamaño del folículo preovulatorio y del CL, así como la producción de $P_4$ plasmática después de retirado el dispositivo de P4. No solo la producción de P4 fue mayor, sino también la tasa de preñez en aquellas vacas tratadas con eCG. Habría que evaluar que si nuestro ensayo hubiese durado más de 9 días se hubiera obtenido mayor producción de P4 por parte del CL, así como la tasa de preñez (que no fue medida en nuestro estudio y tampoco realizamos IATF).

Vasconcelos y col., 2001 vieron que un menor tamaño de folículo preovulatorio en vacas, resulta en menor el tamaño del CL, menor cantidad de $P_4$ circulante y menor fertilidad (de Tarso y col., 2017).
Por lo general, se asume que a mayor tamaño del CL éste produce más $P_4$, generando alta concentración plasmática de $P_4$. Para Mann (2000), hay una relación positiva entre el CL recién formado y la producción de$P_4$. Según éste, después del día 8 de la formación del CL, ésta relación cambia, el tamaño del CL no determinaría la cantidad de $P_4$ producida. Esto es porque el CL ya maduró, siendo máxima su maduración para el día 16 del ciclo.
Que sea un CL de gran tamaño, no quiere decir que produzca mucha $P_4$, sino hay que una correlación positiva, pero no es la única característica que indica su calidad en lo que refiere a su funcionalidad. El día 0 de nuestro ensayo, el GT5 presenta una diferencia numérica en la cantidad de $P_4$producida (0,3088 ± 0,38 ng/mL) respecto al GT7 (0,05273 ± 0,38 ng/mL). Esto probablemente se debe a que las células luteales grandes de la granulosa puedan haber empezado a formar antes $P_4$, es decir, que se hallan luteinizado antes.
Rigoglio y col., 2013; usaron dosis de 2000 UI de eCG para superovular vacas, esto produjo un incremento de la producción de $P_4$ por el aumento del número de células luteales grandes y pequeñas, a pesar de que las células luteales pequeñas producen menos $P_4$ que las grandes. El volumen del CL de las vacas superovuladas fue mayor, probablemente éste aumento del volumen se deba a un incremento en el número de células luteales grandes.
Es probable que si el "n" de vacas usadas hubiese sido mayor, el resultado hubiese dado una diferencia significativa entre ambos grupos en cuanto a la producción de$P_4$. Algo que si sucedió en el estudio de Baruselli y col., 2004 donde si se uso un "n" mayor como se describió más arriba.

El CL es la glándula endócrina más vascularizada del cuerpo; la vascularización es necesaria para su crecimiento. Dicha vascularización aumenta con la aproximación de la ovulación y es indispensable para su rápido desarrollo (Kaessmeyer y col., 2016). La evaluación de la vascularización del CL evidencia distintos patrones de circulación sanguínea en el mismo, efectivos para predecir la regresión del CL y la preñez. Hay una relación positiva entre el grado de vascularización sanguínea del folículo preovulatorio y el establecimiento de la preñez (Varughese y col., 2017).

Al administrarse antes la eCG, se estimula antes la ovulación (Aragunde y col., 2016), y por ende, la maduración de un FD, que al ser más grande, probablemente tenga mayor irrigación. Al ser un folículo más irrigado, el CL será más irrigado y por ende, producirá más $P_4$ (Aragunde y col., 2017). En nuestro ensayo, no se midió la irrigación que presentaban los FD ni los CL, siendo esto una buena opción de estudio a futuro, para comparar la producción de $P_4$ con Ecodoppler y las distintas aplicaciones de eCG.

En caso de haberse podido realizar Ecodoppler, otra cosa que nos hubiese permitido detectar son las ovulaciones múltiples (que nos pueden dar preñeces gemelares) por la diferencia en la vascularización que hay entre las ovulaciones múltiples y la ovulación de un único FD (Varughese y col., 2017).

El uso de la Ecodoppler ha sido exitoso para evaluar la funcionalidad folicular y la capacidad del CL de mantener la preñez basado en las características de su flujo sanguíneo (Varughese y col., 2017).

Para Carter y col., 2008, la alta concentración de $P_4$ circulante que se evidencia enseguida que se forma el concepto se asocia a un aumento del crecimiento del embrión, de la producción de INF-τ (cuya máxima secreción se da entre los días 16 – 19 de gestación (Varughese y col., 2017)), y de la tasa de preñez en vacas. Hay una correlación positiva entre la cantidad de $P_4$ producida y el INF-τ: aquellas vacas que producen más $P_4$ después de la ovulación, sus embriones producirían más INF-τ, que estimula el reconocimiento materno de la preñez.

La administración de eCG genera un mejor soporte para el reconocimiento materno de la preñez en vacas de carne en anestro, debido a que favorece la función del CL en la gestación temprana (Menchaca y col., 2013a). Esto probablemente también sea otro de los beneficios que tiene el uso de ésta hormona por su larga vida media.

Este ensayo utilizó una dosis tradicional de la eCG de 400 UI para vacas de carne, pudiéndose reducir a 300 UI en vaquillonas sin comprometer ningún resultado. Pessoa y col., 2016 no encontraron diferencias en la dinámica folicular si se disminuye la dosis de eCG de 400 UI a 300 UI. Cuando se han intentado utilizar dosis de 200 UI de eCG para incrementar los índices de preñez, se han producido fallas; por eso, se necesitan dosis de 300 o 400 UI al menos. Se pueden usar dosis exógenas de eCG de unas 2000 UI para producir superovulaciones en vacas o mejorar la calidad del FD en los protocolos de IATF (Rigoglio y col., 2013). Debido al alto costo de los tratamientos con eCG en relación con los protocolos de IATF, es necesario encontrar cual sería la mínima dosis de eCG para producir efecto y así ayudar en el costo de los protocolos de IATF, pero esto tendría que ser investigado.

Los efectos de la eCG van a ser mayores en vacas primíparas, que en vacas multíparas sobre la dinámica folicular y fertilidad de las mismas. En las primíparas, hay un balance energético negativo que lleva a un menor crecimiento folicular sobre todo cuando la CC es baja y el animal está en anestro (situaciones comunes en vacas primíparas) (Sales y col., 2016).

La eCG solo tendría resultados positivos en aquellas vacas con una condición corporal comprometida (Cutaia y col., 2003); dado que la CC está fuertemente relacionada con la

ciclicidad. La mayoría de las vacas con buena CC tienen un CE normal, por ende, la eCG no tendría efecto aumentando la inducción de la ovulación y el porcentaje de concepción (Baruselli y col., 2013). De modo, que los efectos de la eCG son más evidentes en vacas con pobre CC o en anestro.

En conclusión, la aplicación de la eCG 2 días antes del retiro del progestágeno no resultó en un aumento del volumen del CL, pero sí aumentó la producción de $P_4$ en vacas en anestro, por lo que se logra un CL de mayor calidad y más activo.

# 10. BIBLIOGRAFÍA


1. Adams, GP.; Singh, J. (2015).Ovarian follicular and luteal dynamics in cattle. En: Hopper RM. Bovine reproduction. Ames. Wiley Blackwell, p. 219-44.
2. Ambrose, DJ. (2015). Postpartum Anestrus and its Management in Dairy Cattle. En: Hopper RM. Bovine reproduction. Ames, Wiley Blackwell, p. 456-470.
3. Aragunde, R.; Cavestany, D.; de Nava, G.; Fila, D.; Viñoles, C. (2016). Comparison between eCG administered at Day 5 or Day 7 of a protocol for inducing ovulation in anestrus suckling beef cows: follicular growth and fertility. Proceedings of the 18th ICAR; 26 – 30 Jun; Touls, France. Poster.
4. Aragunde, R.; Fila D.; Viñoles, C.; Goyetche, MX.; Cavestany, D. (2017). Efecto de la administrar la eCG el día 5 o el día 7 en un protocolo de inducción de la ovulación sobre el tamaño del cuerpo lúteo y niveles de progesterona en vacas de carne con ternero al pie. X Jornadas Técnicas Veterinarias. Montevideo, p. 118-119.
5. Arthur, GH. (1989). Reproducción y Obstetricia en Veterinaria. Madrid, Interamericana – McGraw – Hill. p. 3 -49.
6. Baruselli, PS.; Marques, MO.; Reis, EL.; Bó, GA. (2003). Tratamientos hormonales para mejorar la performance reproductiva de vacas de cría en anestro en condiciones tropicales. V Simposio Internacional de Reproducción Animal. IRAC, Córdoba, Argentina. p. 103–116.
7. Baruselli, PS.; Reis, EL.; Marques, MO.; Nasser, LF.; Bó, G.A. (2004). The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. Anim Reprod Sci 82-83:479-486.
8. Baruselli, PS.; Vieira, LM. (2017) Programas de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo seriadas sin el uso de Toros. XLV Jornadas Uruguayas de Buiatria, Paysandú, Uruguay, p. 99 – 104.
9. Binelli, M.; Thatcher, WW.; Mattos, R.; Baruselli, PS. (2001). Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. Theriogenology 56: 1451 – 1463.
10. Bó, GA.; Caccia, M. (2002). Dinámica folicular ovárica en el ganado bovino. En: Ungerfeld R. Reproducción en los animales domésticos. Facultad de Veterinaria, Montevideo, Malibea, V.1, p. 55 – 68.
11. Bó, GA.; Cutaia, L.; Tríbulo, R. (2002). Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos para carne: algunas experiencias realizadas en Argentina. Primera Parte. Taurus; 14: 10 – 21. Disponible en: www.producción-animal.com.ar.Fecha de consulta: 4/4/18.
12. Bó, GA.; Baruselli, PS.; Martinez, MF. (2003). Pattern and manipulation of folicular development in Bos indicus cattle. Anim. Reprod. Sci. 78: 307 – 326.
13. Bó, GA.; Tegli, JC. (2005). Sincronización de Celos e Inseminación Artificial a Tiempo Fijo en Ganado de Carne. Asociación Bradford Argentina. Disponible en: www.producción-animal.com.ar.Fecha de consulta: 15/8/18.
14. Bó, GA.; Cutaia, L.; Souza, AH.; Baruselli, PS. (2008). Actualización sobre protocolos de IATF en bovinos de leche. Disponible en: www.producción-animal.com.ar.Fecha de Consulta: 18/6/18.
15. Bó, GA.; Baruselli, PS. (2014). Synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in beef cattle. Animal 8: (S1): 144 – 150.
16. Bó, GA; Huguenine, E.; Menchaca, A. (2014). Control farmacológico del ciclo estral para IATF en vacas de cría: estado del arte. Séptimas Jornadas Taurus de Reproducción Bovina. Buenos Aires, Argentina. p. 76 – 94

17. Bó, GA.; de la Mata, JJ.; Baruselli, PS.; Menchaca, A. (2016).Alternative programs for synchronizing and resychronizing ovulation in beef cattle. Theriogenology 86: 388 – 396.
18. Carter, F.; Forde, N.; Duffy, P.; Wade, M.; Fair, T.; Crowe, MA.; Evans, ACO.; Kenny, DA.; Roche, JF.; Lonergan, P. (2008). Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. Reproduction, Fertility and Development. 20: 368 – 375.
19. Cavestany, D.; Méndez, J.E. (1993). INIA: Manual de Inseminación Artificial en Bovinos. Boletín N° 39.86 p
20. Cavestany, D. (2002). Sincronización y/o inducción de celos con o sin inseminación artificial a tiempo fijo en rodeos de Uruguay. Costos y variaciones en las respuestas. Primera parte: fundamentos teóricos. XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay, pp. 143 - 163.
21. Colazo, MG.; Mapletoft, RJ. (2014). A review of current timed – AI (TAI) programs for beef and dairy cattle. Can Vet J 55: 772 – 780.
22. Cutaia, L.; Veneranda, G.; Tríbulo, R.; Baruselli, PS.; Bó, GA. (2003). Programas de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo en Rodeos de Cría: factores que lo afectan y resultados productivos. Quinto Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina. p. 119 – 132.
23. Cutaia, LE. (2005).Programas de inseminación artificial a tiempo fijo: análisis de costos e implementación. Disponible en: www.produccionbovina.com.ar.Fecha de Consulta: 18/06/18.
24. Cutaia, L.; Chesta, P.; Picinato, D.; Peres, L.; Maraña, D.; Bó, GA. (2007). Inseminación Artificial a Tiempo Fijo en vacas con cría y vaquillonas: fundamentos fisiológicos y aspectos prácticos. XXXV Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay. p. 16 – 37.
25. de Castro, T. (2002). Anestro posparto en la Vaca de cría. En: Ungerfeld R. Reproducción en los animales domésticos. Facultad de Veterinaria, Montevideo, Melibea, V.1, p. 207 – 217.
26. de Tarso, SGS.; Gastal, GDA.; Bashir, ST.; Gastal, MO.; Apgar, GA.; Gastal, EL. (2017). Follicle vascularity coordinates corpus luteum blood flow and progesterone production. Reproduction, Fertility and Dvelopment. 29: 448 – 457.
27. Diaz, FJ.; Anderson, LE.; Wu, YL.; Rabot, A.; Tsai, SJ.; Wiltbank, MC. (2002). Regulation of progesterone and prostaglandin $F_{2\alpha}$ production in the CL. Molecular and Cellular Endocrinology 191: 65 – 80.
28. Elhordoy, D; Farias, D. (1998). Manual de Inseminación Artificial en Bovinos. Montevideo, Facultad de Veterinaria, 95 p.
29. Forde, N.; Beltman, ME.; Lonergan, P.; Diskin, M.; Roche, JF.; Crowe, MA. (2010). Oestrus cycles in Bos Taurus cattle. Animal Reproduction Science 124: 163 – 169
30. Gatica, R. (1993). Causas, incidencias, control y tratamientos de anestro. XXI Jornadas Uruguayas de Buiatria, Paysandú, Uruguay, pp. 1 – 19.
31. Ginther, OJ.; Kastelic, JP.; Knopf, L. (1989a). Composition and Characteristics of Follicular Waves during the Bovine Estrous Cycle. Anim. Reprod. Sci. 20: 187 – 199.
32. Ginther, OJ.; Knopf, L.; Kastelic, JP. (1989b) Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and three folicular waves. Journal of Reproduction & Fertility. 87: 223 – 230.
33. Hafez, ESE.; Hafez, B. (2000). Reproducción e Inseminación Artificial en animales. 7ª ed. México. McGraw Hill. 519 p.

34. Kaessmeyer, S.; Huenigen, H.; Al Masri, S.; Dieckhoefer, P.; Richardson, K.; Plendel,J. (2016). Corpus luteal angiogenesis in a high milk production dairy breed differs from that of cattle with lower milk production levels. Veterinarian Medicina, 61(9): 497 – 503.
35. Kastelic, JP.; Bergfelt, DR.; Ginther, OJ. (1990). Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. Theriogenology 33: 1269 – 1278.
36. Kumer, PR.; Singh, SK.; Kharche, SD.; Govindaraju, CS.; Behera, BK.; Shulka, SN.; Kumar, B.; Agarwal, SK. (2014). Anestrus in Cattle and Buffalo: Indian Perspective. Advances in Animal and Veterinary Sciences. 2 (3): 124 – 138.
37. Lucy, MC.; Savio, JD.; Badinga, L.; De La Sota, R.; Thatcher, WW. (1992). Factors that affect Ovarian Follicular Dynamics in Cattle. J. Anim. Sci. 70: 3615 – 3626.
38. Mann, GE. (2009). Corpus luteum size and plasma progesterone concentration in cows. Anim. Reprod. Sci. 115: 296 – 299.
39. Martin, I.; Pinto Rodríguez, MM.; Junko Fujihara, C.; Camargo Marques Filho, W.; Oba, E.; Laufer – Amorim, R.; Pinheiro Ferreira, JC. (2013). Localization patterns of steroid and luteinizing hormone receptors in the corpus luteum of Nelore (Bos Taurus indicus) cows throughout the estrous cycle. Livestock Science155: 442 – 453.
40. Martinez, MF.; Tutt, D.; Quirke, LD.; Tattersfield, G.; Juengel, JL. (2014). Development of a GnRH-PGF$_{2\alpha}$-progesterone-based synchronization protocol with eCG for inducing single and double ovulations in beef cattle. J. Anim. Sci. 92: 4935 – 4948.
41. Menchaca, A.; Núñez, R.; Wijma, R.; García Pintos, C.; Fabini, F.; de Castro, T. (2013a). Como Mejorar la Fertilidad de los Tratamientos de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo en Vacas Bos Taurus. X Simposio Internacional de Reproducción Animal – IRAC, Córdoba, Argentina. p. 103 – 133.
42. Menchaca, A.; Núñez, R.; García Pintos, C.; Cuadro, F. (2013b). Implementación de programas de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo en rodeos de cría.INIA: Seminario de Actualización Técnica: Cría Vacuna. Serie Actividades de Difusión N° 108, p. 229 – 246.
43. Menzer, C.; Schams, D. (1979). Radioimmunoassay for PMSG and its application to in – vivo studies. J. Reprod. Fert. 55: 339 – 345.
44. Morales, JT.; Cavestany, D. (2012). Anestro posparto en vacas lecheras: tratamientos hormonales. Revisión. Veterinaria (Montevideo) 188: 19 – 27. Disponible en: www.revistasmvu.com.uy. Fecha de consulta: 31/3/18.
45. Moreira, F.; Orlandi, C.; Risco, CA.; Mattos, R.; Lopes, F.; Thatcher, WW. (2001). Effects of Presynchronization and Bovine Somatotropin on Pregnancy Rate to a Timed Artificial Insemination Protocol in Lactating Dairy Cows. J. Dairy Sci. 84: 1646 – 1659.
46. Murphy, BD.; Martinuk, SD. (1991). Equine Chorionic Gonadotropin. Endocr. Rev.12: 27 –44.
47. Núñez Olivera, R. (2011). Utilización de la Gonadotrofina Corionica Equina (eCG) en vacas de carne, sobre la tasa de preñez y pérdidas embrionarias en un programa de Inseminación a Tiempo Fijo. Instituto de Reproducción Animal (IRAC). Córdoba, Argentina. Disponible en: www.iracbiogen.com.ar. Fecha de consulta: 2/4/2016.
48. Núñez Olivera, R.; de Castro, T.; García Pintos, C.; Bó, G.; Piaggio, J.; Menchaca, A. (2014). Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol based treatment in postpartum anestrous beef cattle. Animal Reproduction Science 146: 111 – 116.
49. Pessoa, GA.; Martini, AP.; Carloto, GW.; Rodrigues, MCC.; Claro Júnior, I.; Baruselli, PS.; Brauner, CC.; Rubin, MIB.; Correa, MN.; Leivas, FG.; Sá Filho, MF. (2016). Different doses of equine chorionic gonadotropin on ovarian follicular growth and

pregnancy rate of suckled *Bos Taurus* beef cows subjected to timed artificial insemination protocol. Theriogenology 85: 792 – 799.

50. Pursley. JR.; Mee, MO.; Wiltbank, MC. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2α and GnRH. Theriogenology 44: 915 – 923.
51. Rigoglio, NN.; Fátima, LA.; Hanassaka, JY.; Pinto, GL.; Machado, ASD.; Gimenes, LU.; Baruselli, PS.; Rennó; FP.; Moura, CEB.; Watanabe, IS.; Papa, PC. (2013). Equine chorionic gonadotropin alters luteal cell morphologic features related to progesterone synthesis. Theriogenology 79: 673 – 679.
52. Roche, JF.; Crowe, MA.; Boland, MP. (1992). Postpartum anestrus in dairy and beef cows. Anim Reprod Sci; 28:371 – 378.
53. Sá Filho, OG.; Meneghetti, M.; Peres, RFG.; Lamb, GC.; Vasconcelos, JLM. (2009). Fixed – time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cow II: Strategies and factors affecting fertility. Theriogenology 72: 210 – 218.
54. Sales, JNS.; Crepaldi, GA.; Girotto, RW.; Souza, AH.; Baruselli, PS. (2011). Fixed –time IA protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. Anim Reprod Sci; 124: 12 – 18.
55. Sales, JNS.; Bottino, MP.; Silva, LACL.; Girotto, RW.; Massoneto, JPM.; Souza, JC.; Baruselli, PS. (2016). Effects of eCG are more pronounced in primiparous than multiparous Bos indicus cows submitted to a timed artificial insemination protocol.Theriogenology 86: 2290 – 2295.
56. Sartori, R.; Rosa, GJM.; Wiltbank, MC. (2002). Ovarian Structures and Circulating Steroids in Heifers and Lactating Cows in Summer and Lactating and Dry Cows in Winter. J. Dairy Sci. 85: 2813 – 2822.
57. Silva, L.; Laca, M.; Ungerfeld, R. (2002). Reconocimiento materno de la preñez. En: Ungerfeld R. Reproducción en los animales domésticos. Facultad de Veterinaria, Montevideo, Malibea. V1, p. 201 – 206.
58. Sirois, J.; Fortune, E. (1988). Ovarian Follicular Dynamics during the Estrous Cyclein Heifers Monitored by Real - Time Ultrasonography. Biology of Reproduction. 39: 308 – 317.
59. Somoza, GM. (2002). Eje hipotalamo-hipofisiario. Hormona Liberado de Gonadotrofinas (GnRH).En: Ungerfeld R. Reproducción en los animales domésticos. Facultad de Veterinaria. Montevideo, Melibea. V1, p. 15 – 21.
60. Ungerfeld, R. (2002a). Hipófisis y Gonadotrofinas. En: Ungerfeld R. Reproducción en los animales domésticos. Facultad de Veterinaria, Montevideo, Melibea V1, p. 23 – 28.
61. Ungerfeld, R. (2002b). Hormonas gonadales. Otras hormonas vinculadas a la reproducción. En: Ungerfeld R. Reproducción en los animales domésticos. Facultad de Veterinaria, Montevideo, Melibea V1, p. 29 – 35.
62. Ungerfeld, R. (2002c). Control endócrino del ciclo estral. En: Ungerfeld R. Reproducción en los animales domésticos. Facultad de Veterinaria, Montevideo, Melibea V1, p. 39 – 53.
63. Varughese, EE.; Barar PS.; Ghuman, SS. (2017). Vascularization to preovulatory follicle and corpus luteum – a valuable predictor of fertility in dairy cows. Theriogenlogy 103; 59 – 68.
64. Vasconcelos, JLM.; Sartori, R.; Oliveira, HN.; Gunther; JG.; Wiltbank, M. (2001) Reduction in size of the ovulatory follicle reduce subsequent luteal size and pregnancy rate. Theriogenolgy. 56: 307 – 314.

65. Wiltbank, MC.; Gümen, A.; Sartori, R. (2003). Clasificación Fisiológica de Condiciones Anovulatorias en Bovinos. En: V Simposio Internacional de Reproducción Animal. IRAC, Córdoba, Argentina. p. 19 – 52.
66. Wiltbank, MC.; Haughian, JM. (2003). GnRH: de la Fisiología a la "Sincología". V Simposio Internacional de Reproducción Animal. IRAC, Córdoba, Argentina. p. 71 – 84.
67. Wiltbank, MC.; Souza, AH.; Carvalho, PD.; Cunha, AP.; Giordano, JO.; Fricke, PM.; Baez, GM.; Diskin, MG. (2014). Physiological and practical effects of progesterone on reproduction in dairy cattle. Animal 8 (S1):1 -12.