



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay



**UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY**

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**EFFECTO DEL USO DE LA GONADOTROFINA CORIÓNICA EQUINA EN
DIFERENTES MOMENTOS DE UN PROTOCOLO DE IATF EN VAQUILLONAS
HOLSTEIN SOBRE EL DIÁMETRO Y FLUJO SANGUÍNEO DEL FOLÍCULO
PREOVULATORIO**

Por

Nicolás CABRERA GIMENA

Ramiro FERRER CRUZ

TESIS DE GRADO presentada como
uno de los requisitos para obtener el
título de Doctor en Ciencias
Veterinarias
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2023**

PAGINA DE APROBACIÓN

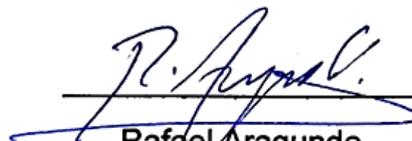
Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



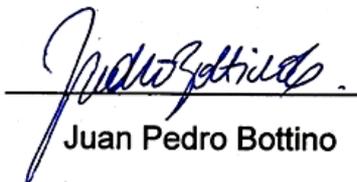
Daniela Crespi

Segundo miembro (Tutor):



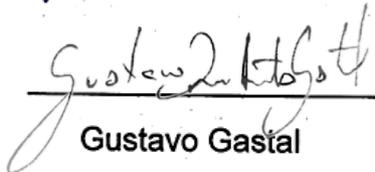
Rafael Aragunde

Tercer miembro:



Juan Pedro Bottino

Cuarto miembro:



Gustavo Gastal

Fecha de aprobación: 25/5/23

Autores:



Nicolás Cabrera



Ramiro Ferrer

AGRADECIMIENTOS

A nuestro tutor, Rafael, por la oportunidad, dedicación y constante motivación para mejorar este proyecto durante todo este tiempo.

A nuestro cotutor Gustavo Gastal por enriquecer y brindarnos herramientas en esta tesis como en nuestra formación.

A INIA “La Estanzuela” por abrirnos las puertas y utilizar sus instalaciones en el experimento.

A Federico Cuadro y Victoria Urioste por su ayuda en el trabajo de campo.

A Martín Díaz por su guía en el análisis estadístico y demostrar su brillante docencia en nuestro trabajo.

A la Facultad de Veterinaria por el lugar físico y emocional durante este período que fue tan importante para nosotros.

A nuestras familias y parejas por el apoyo constante y trabajo en todo este tiempo para que nosotros podamos conseguir nuestro objetivo y sueño.

A nuestros compañeros y amigos por la compañía durante toda la carrera.

A nosotros mismos, el uno al otro, por haber logrado formar un buen grupo de trabajo que hizo que esta tesis se hiciera más motivadora y emocionante.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PAGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	5
RESUMEN	6
SUMMARY	7
INTRODUCCION.....	8
REVISION BIBLIOGRAFICA.....	10
Ciclo estral y manejo reproductivo	10
Inseminación a tiempo fijo.....	12
Protocolos de IATF.....	15
Gonadotrofina coriónica equina (eCG)	17
Uso de la ultrasonografía en ganado	26
HIPÓTESIS	30
OBJETIVOS	30
Objetivo general.....	30
Objetivos específicos.....	30
MATERIALES Y METODOS.....	31
Diseño experimental	31
Análisis estadístico	34
RESULTADOS	35
DISCUSIÓN.....	37
Crecimiento folicular y flujo sanguíneo.....	37
CONCLUSIÓN	38
BIBLIOGRAFÍA	39

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Página

- Figura 1:** Diseño experimental de los tratamientos: A) tratamiento con eCG al día 5 del protocolo de sincronización (T5); B) tratamiento con eCG al día 7 del protocolo de sincronización (T7); C) sin tratamiento con eCG en el protocolo de sincronización, Control (TC).....**33**
- Figura 2:** Promedio (\pm SEM) del diámetro del folículo preovulatorio desde -108 h hasta el momento de la ovulación (0 h) en cada tratamiento de sincronización de celo, siendo el T5 (eCG día 5), T7 (eCG día 7) o Control (sin eCG)**35**
- Figura 3:** Promedio (\pm SEM) del flujo sanguíneo del folículo preovulatorio desde - 108 h hasta el momento de la ovulación (0 h) en cada tratamiento de sincronización de celo, siendo T5 (eCG día 5), T7 (eCG día 7) o Control (sin eCG).....**36**
- Figura 4:** Correlación entre los valores del flujo sanguíneo con el diámetro del folículo preovulatorio de cada folículo evaluado entre -108 h hasta la ovulación (0 h) de las 30 vacas.....**36**

RESUMEN

La gonadotropina coriónica equina (eCG) es una hormona que promueve el desarrollo folicular en bovinos y es recomendada para vacas en anestro en protocolos de sincronización de la ovulación. Además, su uso también puede ser implementado en programas de sincronización de celo de vaquillonas para promover el desarrollo folicular y una mejor sincronía en la ovulación. Sin embargo, el uso y momento adecuado de aplicación de la eCG en programas de sincronización en vaquillonas es controversial. El presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto del uso de la eCG en distintos momentos sobre el diámetro y flujo sanguíneo de folículos preovulatorios, y la correlación entre ambos parámetros en vaquillonas Holstein. Se utilizaron 30 vaquillonas Holstein púberes (18-30 meses de edad), con una condición corporal de 2,75 a 3,75 (escala del 1 al 5), en campo natural mejorado. Los animales fueron asignados al azar en 3 grupos de acuerdo al siguiente diseño experimental: control (TC; n=9), tratamiento con eCG el día 5 (T5; n=10) y un tratamiento con eCG día 7 (T7; n=11), donde fue administrado en el día 0 (inicio del tratamiento), 2mg de benzoato de estradiol intramuscular (BE) y se colocó un dispositivo intravaginal (DIV) impregnado con 750mg de progesterona. El día 7 se retiró el DIV y se les administró 0,150 mg de D-Cloprostenol. En T5, se le administró 400 UI de eCG intramuscular el día 5 y a T7 se le administró 400 UI de eCG el día 7 intramuscular. TC no recibió eCG. A los 3 grupos se les realizó ecografía de ovarios modo color Doppler vía transrectal cada 12 horas, desde el día 5 hasta el día 9 del protocolo, para evaluar el diámetro y flujo sanguíneo del folículo dominante. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software Statistix v 10.0. La normalidad y homocedasticidad de los datos fueron evaluadas mediante las pruebas de Kolmogórov-Smirnov y Levene, respectivamente. Los datos de diámetro folicular y flujo sanguíneo fueron analizados mediante el modelo mixto ANOVA para medidas repetidas y las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante el método de LSD. La asociación entre el diámetro del folículo dominante y su flujo sanguíneo fue analizada mediante la prueba de regresión lineal, considerando la variable hora para la regresión ponderada. Independiente del tiempo, el diámetro folicular fue mayor ($P < 0,05$) en los grupos que reciben eCG que el grupo control. Sin embargo, el diámetro folicular y el flujo sanguíneo no presentaron diferencias significativas entre los grupos ($P > 0,05$) a lo largo del tiempo. Además, el diámetro del folículo preovulatorio presentó una correlación positiva $R=0,25$ ($P=0,0001$) con su flujo sanguíneo. Por lo tanto, el protocolo utilizado provee un desarrollo folicular que es soportado por la irrigación sanguínea, promoviendo una posible ovulación de mejor calidad. Por lo que el flujo sanguíneo y el diámetro de folículo preovulatorio son dos variables que se correlacionan, donde, por ejemplo, un efecto positivo en el flujo sanguíneo puede determinar un aumento en el diámetro folicular cuando una nueva onda folicular es sincronizada. En conclusión, el uso de la eCG en distintos momentos de un protocolo de inseminación a tiempo fijo (IATF) no generó un aumento en el diámetro y flujo sanguíneo del folículo preovulatorio que pudiera explicar una relación con la sincronía de la ovulación en vaquillonas Holstein.

Palabras clave: eCG, flujo sanguíneo, vaquillonas, folículo preovulatorio, ecografía Doppler.

SUMMARY

Equine chorionic gonadotropin (eCG) is a hormone that promotes follicular development in bovines and is recommended for anestrous cows in ovulation synchronization protocols. In addition, its use can also be implemented in heifer heat synchronization programs to promote follicular development and better ovulation synchrony. However, the proper use and timing of eCG application in heifer synchronization programs is controversial. The present study aims to evaluate the effect of using eCG at different times on the diameter and blood flow of preovulatory follicles, and the correlation between both parameters in Holstein heifers. Thirty pubescent Holstein heifers (18-30 months of age) with a body condition of 2.75 to 3.75 (scale from 1 to 5) were used in an improved natural field. Animals were randomly assigned into three groups according to the following experimental design: control (TC; n=9), eCG treatment on day 5 (T5; n=10) and eCG treatment on day 7 (T7; n= 11), where 2mg of intramuscular estradiol benzoate (BE) was administered on day 0 (beginning of treatment) and an intravaginal device (IVD) impregnated with 750mg of progesterone was placed. On day 7 the IVD was removed and 0.150 mg of D-Cloprostenol was administered. In T5, 400 IU of eCG was given intramuscularly on day 5 and T7 was given 400 IU of eCG on day 7 intramuscularly. TC did not receive eCG. The three groups underwent transrectal color Doppler ultrasound of the ovaries every 12 hours, from day 5 to day 9 of the protocol, to assess the diameter and blood flow of the dominant follicle. Statistical analyzes were performed using the Statistix v 10.0 software. The normality and homoscedasticity of the data were evaluated using the Kolmogórov-Smirnov and Levene tests, respectively. Follicular diameter and blood flow data were analyzed using the ANOVA mixed model for repeated measures and the differences between groups were evaluated using the LSD method. The association between the diameter of the dominant follicle and its blood flow was analyzed using the linear regression test, considering the time variable for the weighted regression. Independent of time, the follicular diameter was greater ($P < 0.05$) in the groups receiving eCG. However, follicular diameter and blood flow did not appear to be significantly different between groups ($P > 0.05$) over time. In addition, the diameter of the preovulatory follicle presented a positive correlation $R=0.25$ ($P=0.0001$) with its blood flow. Therefore, the protocol used provides a follicular development that is supported by the blood supply, promoting a possible ovulation of better quality. Therefore, blood flow and preovulatory follicle diameter are two variables that correlate, where, for example, a positive effect on blood flow can determine an increase in follicular diameter when a new follicular wave is synchronized. In conclusion, the use of eCG at different times of a fixed-time insemination protocol (FTAI) did not generate an increase in the diameter and blood flow of the preovulatory follicle that could explain a relationship with ovulation synchrony in Holstein heifers.

Keywords: eCG, blood flow, heifers, preovulatory follicle, Doppler ultrasound.

INTRODUCCIÓN

Uruguay es un país que está centrado en la producción ganadera, y dentro de esta, uno de los pilares fundamentales es la reproducción animal. Por esta razón, año a año se busca mejorar y perfeccionar los índices reproductivos de los rodeos de cría y lecheros, parte de esta mejoría se obtienen mediante la adquisición de conocimientos y el uso de nuevas herramientas tecnológicas. La producción ganadera se realiza en su mayoría sobre campo natural por lo cual la producción dependerá de factores climáticos que intervienen en el rendimiento de las pasturas y por lo tanto en el estado nutricional de las vacas (Quintans y Vázquez, 2002).

En cuanto a la lechería, la vaquillona es uno de los puntos clave sobre los que hay que trabajar para mejorar los rendimientos de un tambo, ya que esta categoría tiene influencia directa sobre el crecimiento del rodeo lechero (Repetto, Mendoza, Antúnez y Cajarville, 2016). Para lograr óptimos resultados económicos se debe aspirar a que las vaquillonas tengan su primer parto a los 24 meses de edad, por lo que se deberían preñar a los 15 meses. Si bien hay tambos en Uruguay que logran alcanzar estos resultados, la gran mayoría aún se encuentra lejos del óptimo (Sotelo, 2012 citado en Repetto et al., 2016), donde el promedio de las vaquillonas tiene su primer parto a los 36 meses de edad. Alcanzar estos objetivos es un desafío en nuestros sistemas de producción. Para la raza Holstein la pubertad se alcanza a entre los 8 y 11 meses de edad cuando alcanzan un 40 – 50% del equivalente a su peso adulto, lo que determina que para que lleguen a este objetivo, el manejo nutricional debe de ser muy eficiente (Repetto et al., 2016).

Rodríguez-Zamora et al. (2012) afirman que la rentabilidad de un sistema de producción se ve influida por la eficiencia reproductiva del rodeo, y que esta última debe ser uno de los puntos de la producción a los que más atención hay que brindarle cuando se pretende alcanzar mejores resultados.

Para lograr obtener un ternero por vaca por año, se debe tener en cuenta que la gestación de la vaca dura aproximadamente 283 días, lo cual nos deja solamente con 82 días para volver a preñar a esa hembra si queremos lograr el objetivo planteado. Además, el animal tiene un periodo fisiológico inevitable que es el anestro post parto con una duración de 40 a 60 días, lo que en consecuencia nos dejaría solamente con una ventana de 22 a 42 días, 1 o 2 ciclos estrales para volver a preñarla (Bó et al., 2012). Por otra parte, el bajo porcentaje de detección de celo (<50%) en la mayoría de los rodeos lecheros en Estados Unidos se ha presentado como una de las mayores problemáticas en estos sistemas ya que afecta directamente la tasa de eficiencia reproductiva (López, Satter y Wiltbank, 2004). En nuestro país los sistemas productivos lecheros son en base pastoril y la detección de celo se realiza dos veces por día. En determinados establecimientos los animales deben recorrer grandes distancias diarias y la precisión en la detección de celos no se ha estudiado en estas condiciones de producción con la profundidad suficiente como para generar conclusiones (Cavestany y Galina, 2001). Además, la primera ovulación luego del parto en ganado lechero es generalmente silenciosa, es decir que no presenta comportamiento de estro y es seguida de un intervalo interovulatorio (Crowe, Diskin y Williams, 2014).

La declinación en la fertilidad de vacas lecheras se ha asociado al incremento en el potencial genético enfocado en aumentar la producción de leche con una

declinación en la fertilidad de vacas lecheras (Butler y Smith, 1989). En un estudio realizado por Harrison, Young, Freeman y Ford (1989) se reportaron intervalos del parto a la primera detección de celo más largos (76.9 ± 7.5 días) en aquellas vacas cuya producción superaba los (4841 ± 60 kg por 120 días), mientras que en las vacas con una producción inferior a los 3932 ± 157 kg por 120 días, este mismo intervalo era de 46.8 ± 4.6 días. Por otro lado, se observó que un alto contenido proteico en la dieta ($>17\%$ de proteína cruda) aumenta la producción láctea y su concentración proteica, pero en detrimento de la performance reproductiva de las vacas (Butler, 1998).

La asociación entre el costo de los tratamientos y los problemas de manejo de los animales, como la baja detección de celo en los protocolos de inseminación artificial (IA), son una de las principales limitantes para el uso masivo de estas tecnologías. Una alternativa para aumentar el número de animales inseminados podría ser la utilización de protocolos que no requieran detección de celos, los cuales son conocidos como inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) (Bó, Cutaia y Tribulo, 2002).

En vaquillonas no se obtienen los mismos resultados que en vacas utilizando los mismos protocolos, debido a diferencias fisiológicas como, por ejemplo, la mayor cantidad de ondas foliculares que éstas generalmente tienen (Forde et al., 2011). Esto ha llevado a utilizar métodos alternativos o modificaciones a los protocolos más tradicionales como, por ejemplo, la adición de un dispositivo intravaginal de liberación de un progestágeno para suprimir la ovulación durante el tiempo que este dispositivo este colocado (Rabaglino, Risco, Santos y Tatcher, 2009). Otras alternativas como el uso de la gonadotrofina coriónica equina al momento del retiro del dispositivo con progestágeno han mostrado aumento en las tasas de preñez (Bó, de la Mata, Baruselli y Menchaca, 2016) lo que lleva al estudio más a fondo de dicha hormona.

El uso de la ultrasonografía se ha convertido en una herramienta fundamental para la comprensión e implementación de los protocolos de sincronización de celos ya que permite determinar el crecimiento folicular, la atresia, la ovulación y el subsecuente cuerpo lúteo (CL). A su vez todos estos sucesos están relacionados con la irrigación de las estructuras involucradas y es por ello que la implementación de la ecografía Doppler nos podría brindar mayor información sobre estas etapas con fines productivos o de investigación ya que nos posibilita realizar un seguimiento y cuantificación de la irrigación de las estructuras a estudiar (Rodríguez-Zamora et al., 2012; Rubio, Tirapu, Gómez, Zabalza, 2014).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Ciclo estral y manejo reproductivo

Ciclo estral

El ciclo estral de la hembra bovina está controlado por el eje hipotálamo - hipófisis - ovario - útero y tiene una duración de entre 18 y 24 días que se dividen en una fase luteal de 14 a 18 días y una fase folicular de 4 a 6 días (Forde et al., 2011). El hipotálamo es el órgano encargado de secretar la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la glándula pituitaria anterior o adenohipófisis secreta las gonadotropinas que son la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Los ovarios, más específicamente las estructuras que en ellos se pueden encontrar, que son los cuerpos lúteos y los folículos, secretan; progesterona (P4) y estrógenos (E2) e inhibinas, respectivamente. Por último, el útero secreta prostaglandina F2 α (PGF) (Forde et al., 2011).

El número de ondas foliculares presentes en un ciclo estral varía entre animales, pero se asume que es generalmente de 2 ondas en el ganado lechero y de 3 ondas en el ganado de carne y vaquillonas (Forde et al., 2011). Normalmente estas ondas se dividen en 3 etapas, la etapa de reclutamiento folicular, la etapa de selección folicular y la etapa de dominancia, en la que el folículo seleccionado ejerce dominancia sobre los subordinados. El destino final de este folículo será la atresia o la ovulación (Forde et al., 2011). En un ciclo que tiene 2 ondas, el folículo dominante de la primera onda no alcanza la ovulación dado que aún persiste el CL del ciclo anterior, y la producción de P4 del mismo inhibe el eje y la pulsatilidad de la LH que es responsable de generar la ovulación (Martínez, Adams, Kastelic, Bergfelt y Mapletoft, 2000). El folículo dominante de la segunda onda alcanza la madurez coincidiendo con la regresión del cuerpo lúteo del ciclo anterior, lo que desencadena una disminución de la concentración de P4 y una restauración de la pulsatilidad de LH, y por ende ese folículo alcanzará la ovulación (Martínez et al., 2000). La maduración folicular está relacionada al diámetro de dicha estructura y va a variar según la raza bovina. El diámetro necesario será de 10 o 12 mm en ganado *Bos indicus* y *Bos Taurus* respectivamente (Sartori, Rosa y Wiltbank, 2002; Gimenes et al., 2008 citado en Dorneles et al., 2013).

Una onda folicular comienza con la emergencia de una cohorte de aproximadamente 5 a 20 folículos de más de 5 mm de diámetro que comienzan a desarrollarse bajo el estímulo de la FSH (Mihm et al., 2000; Forde et al., 2011; Crowe et al., 2014). El aumento de la concentración de FSH lleva a un aumento en la actividad de la enzima aromatasa (P450arom; CYP19) en la granulosa de los folículos que convierte los andrógenos en estrógenos (Forde et al., 2011). Este aumento de estrógenos genera un descenso de la concentración de FSH dando así comienzo a la fase de selección, en la que la cohorte de folículos se reduce a la cuota ovulatoria para cada especie, que en el bovino es generalmente 1 (Crowe et al., 2014). Este folículo seleccionado continúa su crecimiento a pesar de la baja concentración de FSH gracias a que desarrolla receptores de LH en las células de la granulosa y al aumento intrafolicular del factor de crecimiento insulínico (IGF-1) (Crowe et al., 2014). En la

fase de dominancia el folículo seleccionado logra la madurez estructural y funcional y suprime el crecimiento de otros folículos indirectamente al producir una concentración de estrógenos capaz de bajar la concentración de FSH a niveles basales y directamente al secretar inhibina generando la atresia de los folículos subordinados (Mihm et al., 2000; Forde et al., 2011; Crowe et al., 2014).

En un estudio realizado por Bodensteiner, Wiltbank, Bergfelt y Ginther (1996) sobre 16 vaquillonas Holstein, se estudió mediante marcadores radioactivos la diferencia en número de receptores para FSH y LH en las células de la granulosa folicular de folículos dominantes y subordinados a los días 2 y 4 de la onda, tomando como el día 0 el día de la ovulación. Para la comparación se tomaban en cuenta el folículo más grande como el presuntamente dominante y al segundo más grande como el presuntamente subordinado. Al día 2 no se encontró diferencia entre el número de receptores de ambos folículos, solo se percibió una mayor concentración de estradiol en el líquido folicular del folículo dominante. En contraste al día 4 se encontraron en el folículo dominante, más receptores de FSH y de LH.

Pubertad en vaquillonas

La pubertad es la culminación de un proceso de maduración gradual que es iniciado antes del nacimiento y que se continúa durante los períodos pre y peri puberales (Kinder et al., 1987; Schillo et al., 1992 citado en Sejrnsen y Purup, 1997). El período comprendido entre los 40 y 60 días previos a la primera ovulación, donde ocurren variados cambios dinámicos es conocido como el período peri puberal (Day y Nogueira, 2013). La mayoría de los componentes del sistema endócrino que se requieren para estimular el comienzo de la pubertad son funcionales antes de que comience la pubertad propiamente dicha, pero su comienzo es bloqueado por el feedback negativo del estradiol sobre la secreción de LH (Kinder et al., 1987; Schillo et al., 1992 citado en Sejrnsen y Purup, 1997). En la pubertad ocurren cambios reproductivos que están marcados por factores que se dan desde el sistema nervioso central a los ovarios. La hembra comienza su pubertad a raíz de un folículo que logra la ovulación espontánea, la cual va a desencadenar la génesis de un CL activo, determinando el inicio de ciclos estrales constantes. Desde el punto de vista endocrinológico la ocurrencia de la pubertad resulta de la disminución del feedback negativo que genera el estradiol sobre la secreción de LH, lo que lleva a un aumento en la secreción de LH en respuesta al aumento de la liberación de GnRH desde el hipotálamo, y el crecimiento final y maduración de folículos ováricos llevando a la primera ovulación (Day y Nogueira, 2013) Generalmente, posterior a la primera ovulación el ciclo estral es corto (8 días) comparado con el ciclo normal que es de 21 días. Estos ciclos de corta duración se relacionan con una menor concentración de P4 y menor diámetro del CL en comparación con ciclos normales (Ballent, Landi, Bilbao y Dick, 2003).

En vaquillonas lecheras el comienzo de la pubertad usualmente ocurre de los 9 a los 11 meses de edad y con un peso promedio de 250 a 280 kg. (Sejrnsen y Purup, 1997). El nivel de alimentación que perciban las vaquillonas influye directamente en el momento de inicio de la pubertad. En vaquillonas Holstein cuando las ganancias de

peso diarias aumentan de 450g a 850g, el promedio de edad del primer celo es de 16,6 y 8,4 meses respectivamente (Sejrsen y Purup, 1997). En estudios realizados por Bath et al. (1978) sugerían que el desarrollo esquelético influía más que la edad sobre el inicio de la actividad sexual (citado en Ballent et al., 2003). También en otros estudios realizados por Ballent et al. (2003) consideraron que la altura a la cruz es el principal factor para predecir la edad en vaquillonas Holstein y el inicio de la pubertad. La altura es indirectamente uno de los principales indicadores para asegurar un desarrollo corporal adecuado. En los primeros 6 meses de vida sucede cerca del 50% de la ganancia de altura, un 25% se da entre los 7 y 12 meses y el restante 25% en el año anterior al primer parto (Kertz et al., 1998 citado en Repetto et al., 2016).

Inseminación a tiempo fijo

El éxito de un programa de la IATF depende de una alta tasa de ovulación durante un corto periodo de tiempo (Sa Filho, Crespilho, Santos, Perry y Baruselli, 2010).

La IATF cuenta con la gran ventaja de que se omite la detección de celos, lo cual es una gran problemática de los programas de IA con detección de celos (Bó et al., 2002). Así mismo, una sincronización de estro exitosa debe inducir la ovulación de un folículo saludable que resulte en un CL funcional que producirá una alta concentración de P4 (Dorneles et al., 2013). Mundialmente los resultados de fertilidad en vacas de tambo vienen en declive, se cree que es debido a la selección de animales con alta producción láctea y no por datos sobre fertilidad, parte de ellos se explica porque la alta producción va en detrimento de la manifestación de los signos de celo (Glauber, 2007). La problemática que genera la detección de celo se puede resolver en parte con la implementación de protocolos de IATF ya que al utilizar determinados fármacos podríamos inseminar los animales sin tener que detectar celo (Glauber, 2007).

El uso de esta tecnología presenta grandes ventajas sobre la categoría vaquillonas, como lo son, prescindir de la detección de celo, planificar de mejor manera las fechas de parto, la implementación de dietas y la disponibilidad de personal, entre otras (Ré, 2018).

Hormonas utilizadas

Para lograr una adecuada fertilidad en la tecnología de IATF se debe manejar y controlar tres puntos claves de la fisiología animal, los cuales son; el desarrollo folicular, la ovulación y la fase luteal (Bó et al., 2002). Los protocolos más tradicionales utilizados para las IATF son aquellos que utilizan GnRH y PGF y aquellos que utilizan progestágenos y estradiol (Bó et al., 2002).

Progesterona (P4) y progestágenos

Además de la función natural que la P4 tiene para lograr el mantenimiento de la gestación, esta hormona es utilizada en forma exógena en algunos protocolos para producir y regular una fase luteal de la vaca. Cuando se comenzó a utilizar esta hormona, los protocolos tenían una duración de 14 a 21 días, lo que resultaba en una buena sincronización de celos, pero se formaban folículos persistentes que llevaban a una disminución en la fertilidad por el envejecimiento del ovocito (Bó et al, 2002).

Al día de hoy los protocolos más utilizados se basan en la inserción de progestágenos mediante un dispositivo intravaginal o en menor proporción la inserción de implantes subcutáneos que mantienen las concentraciones de P4 a nivel plasmático por un periodo determinado (7 u 8 días), lo que da lugar a el crecimiento de una nueva onda folicular, la dominancia de un nuevo folículo y al retirarlo la maduración de un folículo dominante con capacidad de ovular (Baruselli, Márques, Reis y Bó, 2003). Otra gran ventaja del uso de esta hormona es que previene la formación de un CL de vida corta (Randel, 1981 citado en Bó et al., 2012).

Prostaglandinas (PGF)

En los programas de sincronización de celo las hormonas más utilizadas son la PGF y los análogos de la misma, que causan la luteólisis. Al administrar una dosis de PGF a vacas que están ciclando, alrededor del 70% de las vacas deberían entrar en celo. Este porcentaje se puede mejorar si previamente se realiza palpación rectal de las hembras para detectar la presencia del CL y así administrar solamente a vacas que se encuentran en la fase luteal (Bó et al., 2002). Al implementar un protocolo que utiliza PGF sin la asociación de otra hormona estamos sincronizando la luteólisis, pero no la ovulación, ya que el momento de la ovulación depende del estadio del folículo dominante al momento de administrar la PGF, por lo cual se deberá realizar la detección de celo, lo cual es una limitante para algunos sistemas de producción (Bó et al., 2002).

No todas las vacas que tengan presencia de CL serán sensibles a la PGF, algunos estudios demostraron que la sensibilidad del CL al momento de administrada la PGF influenció la respuesta luteolítica, y que la PGF no indujo efectivamente la luteólisis durante los primeros 5 a 6 días posteriores al estro (Momont, 1984; Kastelic, 1991; citados en Bó et al., 2002). Otros estudios arrojaron que el intervalo entre el tratamiento con PGF, la expresión del estro y la ovulación es determinada por el estado de desarrollo del folículo dominante al momento de la administración. Si la prostaglandina es administrada cuando el folículo dominante de una onda se encuentra en la fase de crecimiento tardío o en la fase estática temprana, la ovulación ocurrirá dentro de los próximos 3 a 4 días, mientras que si es administrada cuando el folículo dominante se encuentra en la fase media a tardía de la fase estática, cuando ya está dejando de ser viable, resultará en una ovulación del folículo dominante de la próxima onda folicular 5 a 7 días después (Momont, 1984; Kastelic, 1991; citados en Bó et al., 2002). Este intervalo es un reflejo del tiempo requerido para que el folículo

dominante de la nueva onda crezca y se desarrolle en un folículo preovulatorio (Bó et al., 2002).

Hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH)

La GnRH induce la ovulación o la luteinización del folículo más grande presente al momento de su administración (Macmillan y Thatcher, 1991).

El primer protocolo de IATF con GnRH utilizado fue el Ovsynch, que como su nombre lo dice, sincroniza la ovulación (Pursley, Mee y Wiltbank et al., 1995). En este tratamiento al día 0 se administra un análogo de la GnRH con el fin de sincronizar la onda folicular, siguiéndole a los 7 días una dosis de PGF que induciría la luteólisis. Posteriormente se administra una nueva dosis de GnRH 36 a 48 horas luego de la administración de PGF con el fin de sincronizar la ovulación. La IATF en estos protocolos debe realizarse entre las 15 y 24 horas luego de haberse administrado la segunda dosis de GnRH y para así obtener resultados aceptables. Los resultados de este protocolo en rodeos de cría son variables y con bajos porcentajes de concepción debido a altos porcentajes de vacas en anestro en el rodeo (Bó et al., 2002). Por estas razones se debe tener en cuenta que la elección de este protocolo va a depender de la categoría animal y su ciclicidad si esperamos tener resultados aceptables (Bó et al., 2012). La fundamentación de este tratamiento es que la primera aplicación de GnRH inducirá la liberación de LH, resultando en la ovulación o la luteinización del folículo dominante y la emergencia de una nueva onda folicular dentro de los siguientes 2 días. La administración de PGF 7 días después es para inducir la luteólisis, y la segunda inyección de GnRH es para inducir la liberación de LH y provocar la ovulación del nuevo folículo dominante de la nueva onda generada. El protocolo Ovsynch ha resultado ser más eficiente en vacas que en vaquillonas (Pursley, 1997; Martínez, 2001 en Bó et al., 2002). Resultados de diversos estudios confirmaron que la utilización de GnRH no siempre resulta en la ovulación o luteinización de los folículos dominantes y que la emergencia de una nueva onda folicular fue sincrónica solo cuando el tratamiento logró la ovulación (Martinez, Adams, Bergfelt, Kastelic y Mapletoft, 1999). Es por esta razón que la ovulación seguida de la segunda GnRH puede ser poco sincronizada si la primera inyección de GnRH no logró la sincronía de una nueva onda folicular. Además, se ha reportado que algunas vaquillonas pueden mostrar signos de celo antes de la segunda administración de GnRH, por esto se propuso, para prevenir una ovulación temprana, la inserción de un progestágeno en un protocolo Ovsynch durante 7 días, esto ha demostrado aumentar significativamente los índices de preñez en vaquillonas luego de una IATF (Martinez et al., 2002).

Estrógenos (E2)

El uso de estradiol en combinación con un tratamiento de progestágeno/progesterona fue introducido cuando se descubrió que la duración del tratamiento podía ser acortado a alrededor de 9 días si el estradiol era inyectado al momento de iniciado el tratamiento. Una inyección de estradiol mostró inducir la regresión luteal y así el estradiol fue incorporado a tratamientos para la sincronización del estro en ganado (Wiltbank, Rothlisberger y Zimmerman, 1961).

Una vez que el estradiol es metabolizado, la FSH aparece en la circulación y una nueva onda folicular emerge. La administración de 5 mg de estradiol-17P (E-17P) en ganado con implantes de P4 es seguida consistentemente por la emergencia de una nueva onda folicular 4,3 días después, independientemente de la fase folicular en que el ganado se encuentre al momento del tratamiento (Bó et al., 1995).

Otros estudios evaluaron el efecto de diferentes ésteres del estradiol en relación al desarrollo de la onda folicular. El benzoato de estradiol (BE) y el valerato de estradiol a una dosis de 5 mg y el cipionato de estradiol a una dosis de 1 mg resultaron en un tiempo de emergencia de onda menos predecible. De todas formas, la administración de BE a una dosis de 2 mg en combinación con 50 mg de progesterona IM, resultó en una emergencia de la onda en 4.1 días, con un rango de 3,5 a 5 días (Thundathil, 1997; Mapletoft, 1999; Moreno, 2001 citado en Bó et al., 2002).

El uso de los tratamientos de sincronización con estradiol y progesterona/progestágenos han ido en aumento en los últimos años tanto en ganado de leche como en el de carne (Martínez et al., 2001). Sin embargo, en Uruguay el uso de 17 β estradiol y sus derivados fue prohibido en el 2020 a través de la resolución N° 269/020 de noviembre de dicho año. El tratamiento consiste en la inserción de un progestágeno y la administración de 2mg de estradiol al día 0 (para sincronizar la emergencia de la onda folicular), una PGF al momento de la retirada del dispositivo (para provocar la luteólisis) que puede ser desde los días 7 a los 8 del tratamiento, y la subsecuente administración de 1mg de estradiol 24 horas después o una dosis de GnRH 48 a 54 horas después para producir la ovulación. Los índices de preñez para una IATF han sido similares a aquellos esperados en un protocolo con detección de celo. El segundo tratamiento con 1 mg de BE IM dado 24 horas después de la retirada del dispositivo con progestágeno fue crítico, ya que resultó en mayor sincronía de la ovulación y mayores índices de preñez que en aquellos animales a los cuales no se les administró (Kastelic, 1996; Cutaia, 2001; Martínez 2001 citado en Bó et al., 2002).

Gonadotropina coriónica equina (eCG)

El uso de la eCG al momento del retiro de un progestágeno en un protocolo de IATF se la asoció por aumentar la tasa de concepción del rodeo debido a un mayor crecimiento folicular, por ende, por producir un folículo más grande y con mayor respuesta a la ovulación. (Bó et al., 2002; Baruselli, Reis, Marquez, Nasser y Bó, 2004; Bó et al., 2012). Esta hormona será explicada en profundidad en capítulos posteriores.

Protocolos de IATF

Los protocolos a aplicar para realizar una IATF en vaquillonas son variados y en algunos casos existen diferencias con los utilizados en vacas adultas por las diferencias fisiológicas que presentan dichas categorías entre sí como, por ejemplo, la mayor cantidad de ondas foliculares que tienen las vaquillonas (Forde et al., 2011). Además de la edad; la raza y el manejo también son factores importantes a tener en cuenta al momento de seleccionar un protocolo.

Los protocolos que cuentan con la utilización de dispositivos de progesterona y sales de estradiol son de los más utilizados en Sudamérica (Ré, 2018). En esa región, uno de los protocolos más utilizados en vaquillonas consiste en la inserción de un DIV con 1 g de progesterona y 2 mg de BE al día 0. Al día 7 se retira el DIV y se administra PGF. Al día 8 del protocolo se inocula 1mg de BE y se realiza la IATF a las 56 horas post retiro del DIV (Ré, 2018).

Por otra parte, el protocolo Ovsynch es uno de los protocolos más utilizados en vacas lecheras y consiste en la aplicación de una primera dosis de GnRH para inducir la ovulación de un folículo dominante y así sincronizar la emergencia de una nueva onda folicular. Seguida a esta se le administrará, al día 7, una dosis de PGF y al día 9 una segunda administración de GnRH para inducir una ovulación sincrónica y realizar la IATF a las 16 h de haber administrado la segunda dosis de GnRH (Thatcher et al., 1993; Twagiramungu et al., 1995 citado en Ré, 2018; Pursley et al., 1995). Si bien el protocolo Ovsynch es muy utilizado en vacas lecheras, no presenta los mismos resultados en vaquillonas debido a que existe variación entre las ondas foliculares de vacas y vaquillonas, y estas últimas además presentan cierta inconsistencia en el momento de emergencia de las ondas. Estas particularidades en vaquillonas podrían generar que las mismas retornen al celo entre la primera administración de GnRH y la posterior administración de PGF y, por ende, una asincronía en la ovulación (Rabaglino et al., 2009). Para corregir esta asincronía se comenzó a implementar la utilización de dispositivos intravaginales con progestágenos durante 7 días para suprimir la ovulación (Rivera et al., 2005 citado en Rabaglino et al., 2009).

La mayoría de los protocolos utilizados en Canadá y Estados Unidos hoy en día son derivados del Ovsynch, y una variación de este es el Co-synch, en el cual se da la segunda dosis de GnRH al momento de la IATF (Colazo, 2014 extraído de Ré, 2018). Otra variación es el Co-synch al que se le agrega un DIV durante 5 días. Este es un protocolo que disminuye el tiempo de permanencia del DIV en el animal y prolonga el proestro. Este protocolo demostró un aumento en la tasa de concepción a la IATF en vaquillonas de leche (Rabaglino et al., 2009).

Según la Dairy Cattle Reproduction Council (2018), los protocolos CIDR-Synch de 5 días, con GnRH y 2 PGF y CIDR-Synch de 5 días, sin GnRH y 1 PGF son dos métodos de sincronización para IATF utilizados en vaquillonas de leche. El CIDR-Synch de 5 días con GnRH consiste en la administración de GnRH y un CIDR al día 0, al día 5 se retira el CIDR y se administra una dosis de PGF, 24 hs después se vuelve a administrar una dosis de PGF y a las 48 hs de esta última, se realiza la IATF junto con una administración de GnRH.

El protocolo CIDR-Synch de 5 días sin GnRH y 1 PGF consiste en colocar el dispositivo CIDR "día 0", a los 5 días retirar el dispositivo y suministrar una dosis de PGF, y a las 72 hs de esta realizar la IATF junto con una dosis de GnRH (Dairy Cattle Reproduction Council, 2018).

Gonadotropina coriónica equina (eCG)

Origen de la eCG

La eCG, anteriormente llamada gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG) pertenece a la familia de las hormonas glicoprotéicas al igual que la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) (De Rensis y Lopez-Gatius, 2014). Mientras que la LH y la FSH son secretadas por la glándula pituitaria en todas las especies de mamíferos, la eCG es producida en las copas endometriales de las yeguas preñadas (De Rensis y Lopez-Gatius, 2014). Esta hormona es responsable de mantener la preñez en la yegua gracias a que contribuye a la ovulación y mantenimiento de cuerpos lúteos secundarios (Squires, García y Ginther, 1974). Experimentos realizados por Cole y Goss (1943) demostraron que la eCG es producida por un conjunto de células endometriales en crecimiento que conforman las llamadas copas endometriales, presentes en el endometrio de la yegua. Esta hormona aparece en sangre entre los 37 y 40 días de gestación y desaparece a los 150 días aproximadamente (Cole y Hart, 1930; Clegg, Boda y Cole, 1954). Según Murphy y Martinuk (1991) el pico de secreción de esta hormona se da entre los 55 y 70 días de gestación y va decreciendo gradualmente hasta el día 130.

Las copas endometriales son estructuras que se encuentran en las especies pertenecientes a la familia Equidae y brindan un área de adherencia entre el útero y el conceptus, específicamente entre el útero y el alantoides, que es la estructura del conceptus que se dispone rodeando al amnios y al feto. Las copas endometriales tienen origen entre los 28 y 35 días de gestación a partir de una banda de células trofoblásticas ubicadas en el área avascular del corion que se encuentra entre el saco vitelino y el saco alantoideo rodeando la vesícula embrionaria. Una porción de las células trofoblásticas mencionadas anteriormente invade el tejido materno formando las células endocrinas de las copas endometriales (Tscherig, 2019). Durante la gestación de la yegua la progesterona aumenta luego de la ovulación como resultado del CL primario, el cual no regresa gracias al reconocimiento materno de la preñez y será indispensable para el mantenimiento de la preñez hasta aproximadamente los 40 días de gestación. Luego de que la eCG entra en circulación, sus efectos luteotróficos sobre el CL primario hacen que este aumente su producción de progesterona y que se desarrollen los cuerpos lúteos secundarios (Kelleman, 2013). Los cuerpos lúteos secundarios son derivados de la ovulación o de la luteinización de folículos secundarios desarrollados entre los días 17 y 50 de gestación (Murphy, 2012). Tanto el CL primario como los secundarios se mantendrán activos hasta los 150 – 180 días de gestación aproximadamente cuando se da su regresión; es durante este periodo que la unidad feto placentaria comienza a hacerse cargo del mantenimiento de la preñez al aumentar fuertemente la producción de progestágenos. Para este caso se utiliza el termino progestágenos ya que la unión feto placentaria no produce progesterona, sino que metabolitos o sustancias parecidas a la progesterona, así como el 5- α -pregnane-3,20-dione (Kelleman, 2013).

Como se menciona anteriormente la eCG en la yegua tiene la capacidad de contribuir en el mantenimiento del CL primario, en la ovulación de folículos secundarios y en el posterior desarrollo de cuerpos lúteos secundarios. Esto fue demostrado en un estudio realizado por Squires y col (1974) en el que se realizaba una necropsia y comparación a los 70, 140 y 210 días de comenzado el estro entre

yeguas preñadas y yeguas no preñadas histerectomizadas, que en consecuencia no presentaban copas endometriales y, por lo tanto, carecían de eCG endógena. En el mismo se concluyó que las yeguas preñadas en los tres periodos evaluados presentaban mayor peso del ovario, mayor peso de tejido extraluteal y mayor peso de líquido extraluteal que aquellas histerectomizadas. A la misma vez, se observó que estas últimas no presentaban cuerpos lúteos secundarios en ninguna de las evaluaciones y tampoco cuerpos lúteos primarios en las evaluaciones realizadas después de los 70 días. Esto demostraría que la eCG contribuye a la ovulación y formación de subsecuentes CL secundarios durante la preñez y que es esencial para el mantenimiento del CL primario más allá de los 70 días de gestación (Squires et al., 1974). En cuanto al desarrollo folicular, en este mismo estudio no se encontraron diferencias significativas entre el tamaño del folículo dominante, número de folículos mayores a los 20 mm y número de folículos medios (10 a 20 mm), por lo cual se cree que existen otros factores encargados del desarrollo folicular. Estos resultados contrastan con aquellos obtenidos por Cole, Howell y Hart en 1931 quienes afirmaron que la eCG, en sangre de yeguas preñadas, entre los días 40 y 120, era la responsable del desarrollo folicular en la gestación temprana (Squires et al., 1974).

En otros estudios también se ve descartada la posibilidad de que la eCG presente actividad sobre el desarrollo de los folículos. Según Saint-Dizier, Foulon-Gauze, Lecompte, Combarnous y Chopineau (2004) en los equinos la eCG y la LH se unen únicamente a los receptores LH/eCG y no tienen actividad tal como FSH. La eCG no se une a los receptores de FSH en los folículos de los equinos lo cual sugiere que dicha hormona es principalmente una hormona con efectos LH en esta especie (Murphy, 2012).

La eCG desde el punto de vista endocrinológico tiene la propiedad de tener afinidad por los receptores de FSH y LH en otras especies diferentes a los equinos (Murphy y Martinuk, 1991).

Gonadotrofina coriónica equina en bovinos

En bovinos dentro de las gonadotrofinas, la eCG es la que tiene mayor vida media, esto se debe a que su molécula cuenta con oligosacáridos altamente sializados que reducen el metabolismo y la filtración en el hígado y riñones respectivamente (De Rensis y Lopez-Gatius, 2014). Así mismo, luego de administrar una cantidad de 1500 UI a 3000 UI de eCG en vaquillonas, se puede llegar a mantener una concentración sanguínea activa durante 10 días (Menzer y Schams, 1979). También Schams et al., 1978, reporta una vida media de 45.6 horas al administrar una dosis más baja que la anterior (Murphy, 2012; Dorneles et al, 2013).

La destacada propiedad de la eCG que ha sido desarrollada en múltiples experimentos y contextos comerciales es su capacidad de expresar actividad FSH en especies no equinas. Mientras que la base biológica para este fenómeno sigue teniendo preguntas sin contestar, la posible explicación es que su actividad dual podría estar basada en una determinación estructural de la eCG o de los receptores de LH y FSH en especies no equinas (Murphy, 2012). Se cree que la capacidad de la eCG para inducir actividad FSH y LH es debida a características relacionadas a sus cadenas β primaria, secundaria y terciaria, o también podría estar relacionado al heterodímero de la cadena α - β (Murphy, 2012). La especificidad de los receptores de

gonadotropinas es conferida por dos puntos de contacto en los largos dominios extracelulares que interactúan con una única región del ligando. Estas regiones se cree que son esenciales para la transducción de la señal de la gonadotropina (Moyle et al., 2005 citado en Murphy, 2012).

El aumento en la producción del estradiol folicular inducido por la eCG parece estar relacionado con un aumento en el mRNA de la enzima citocromo P450 17 α hidroxilasa/17-20 lyasa y receptores de LH (Soumano et al., 1996; Soumano et al., 1998; citados en Dorneles 2013).

Mattioli et al. (2001) puso a prueba el efecto de la eCG sobre la irrigación folicular y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). La información presentada por este autor confirma que la producción del VEGF es regulada de forma diferente según el tamaño y la funcionalidad de los folículos. El análisis del mRNA del VEGF confirma que la eCG, al igual que lo hace fisiológicamente la FSH, estimula la producción del VEGF por parte de las células de la granulosa. Al comparar animales tratados y no tratados con eCG, se concluyó que los folículos de las vacas no tratadas acumulan niveles muy bajos del VEGF en el líquido folicular, mientras que los folículos pequeños que alcanzan los 4-5 mm en respuesta a la administración de eCG inician una gran producción de dicho factor. En los animales no tratados con eCG los niveles del VEGF fueron uniformemente bajos independientemente del tamaño de los folículos, nunca superando los 4 ng/ml. En cambio, los folículos de aquellos animales que fueron tratados con eCG registraron diferencias según su tamaño. Los folículos pequeños tenían niveles del VEGF similares a los animales no tratados (3.51 ng/ml), y en los folículos medianos se encontró una gran variabilidad en la concentración, con valores que iban de 1 a 18 ng/ml.

En un estudio realizado por Hosseini, Niasari-Naslaji, Vojgani y Gharagozloo (2018), se formaron 4 grupos para evaluar el efecto de la eCG (500 UI) administrada en distintos momentos de la primera onda folicular luego de la ovulación; grupo control, grupo fase de emergencia de la onda, grupo fase de dominancia folicular y grupo fase estática temprana. En este estudio se demostró que la eCG no tiene efecto sobre la cantidad de ondas foliculares en el bovino, pero que independientemente de la etapa del desarrollo folicular en el que se administraba, esta lograba el crecimiento folicular. También se observó que al administrar la eCG al día de la emergencia de la onda folicular acelera el crecimiento del folículo dominante de esa onda. Por otra parte, obtuvieron resultados diferentes según la etapa de desarrollo del folículo dentro de la primera onda al momento de la administración; obtuvieron codominancia al administrarla el día de la emergencia de la onda folicular, mientras que, si se administraba en alguna de las otras dos fases (dominante o estática temprana), se observaba persistencia del crecimiento del folículo, retraso en la regresión del folículo y aumento de la duración del ciclo. Además, la eCG podría aumentar el diámetro del CL cuando se administra en cualquier etapa del desarrollo del folículo, en este estudio el diámetro máximo del CL fue significativamente mayor en los grupos tratados en comparación con el control (Hosseini et al., 2018).

Previamente ha sido demostrado que existe una correlación positiva entre el volumen luteal y la producción de P4, 7 días luego de la ovulación en vaquillonas y vacas amamantando (Sartori et al., 2002). Por lo tanto, la ovulación de un folículo pequeño resulta en un CL pequeño, una menor producción de P4 y consecuentemente una menor tasa de preñez (Vasconcelos, Sartori, Olivera, Guenther y Wiltbank, 2001).

La eCG ha sido utilizada en protocolos de IATF en ganado bovino para aumentar el crecimiento folicular y, por ende, producir un folículo más grande y más sensible a la ovulación (Moraes 1997; Siqueira et al., 2009; citados en Dorneles et al., 2013). A partir de una serie de trabajos experimentales llevados a cabo por Bo et al. (2002) y Baruselli et al. (2004) se demostró que la administración de una dosis de eCG en el momento de retiro de un progestágeno en un protocolo de IATF en rodeos de cría con anestro posparto aumentó la tasa de concepción. Por su afinidad con los receptores de FSH y LH, logramos potenciar las gonadotropinas endógenas incrementando el crecimiento folicular y la tasa ovulatoria. Esta cualidad hace que sea una hormona indicada para ser utilizada en vacas que presenten anestro posparto y vaquillonas (Bó et al., 2002). Estos tratamientos podrían mejorar los índices reproductivos y potencializar el mejoramiento genético de los ganados.

El uso de protocolos que combinan eCG con dispositivos intravaginales de P4 son ampliamente utilizados en vacas en anestro posparto por su función similar a la FSH (Menchaca et al., 2005 citado en Bó et al., 2012) que ayuda al crecimiento folicular posparto (Williams et al., 1996 citado en Bó et al., 2012). Ya en el año 1993, Macmillan y Peterson ponían a prueba el efecto de la eCG en protocolos con monta natural de toros sobre vacas con ternero al pie. En una investigación se colocaron un dispositivo intravaginal de P4 por 14 a 21 días y a un grupo de vacas se le administraban 400 UI de eCG al momento del retiro y al otro grupo no. Los datos de este estudio arrojaron que el 88% de las vacas que no recibieron eCG fueron montadas dentro de las primeras 96 horas luego de retirado el dispositivo mientras que para el rodeo que si recibió la hormona el porcentaje ascendió a 93% (Macmillan y Peterson, 1993).

Un estudio realizado por Baruselli et al. (2004) (citado en Bó et al., 2012) confirma que el tratamiento con eCG genera un aumento en la concentración de P4 plasmático y un aumento en la tasa de preñez en protocolos de IATF utilizados en vacas anéstricas con cría al pie. Esto lleva a afirmar que el uso de esta hormona es una gran herramienta para reducir el periodo posparto y obtener una mayor eficiencia reproductiva de los sistemas de cría (Baruselli et al., 2003).

Como se ha hablado anteriormente, la nutrición y el estado corporal en los protocolos de IATF tienen un rol fundamental y van a influir directamente sobre los resultados de concepción que obtendremos en la aplicación de dicha tecnología. El uso de eCG es más benéfico en vacas en anestro que tienen algún tipo de restricción de pastura (Macmillan y Peterson, 1993). Bó et al. (2012) afirman que los animales requieren de una condición corporal de al menos 2.5 (3 como ideal) en una escala del 1 al 5, para lograr buenos resultados en protocolos en los que no se cuenta con la eCG.

Al utilizar eCG en protocolos de IATF que combinan P4 y BE en vacas con una condición corporal buena, no se obtiene un aumento en la eficiencia reproductiva tan evidente como los que se obtienen en vacas con baja condición corporal o en anestro (Cutaia et al., 2003 citado en Bó et al., 2012). En este mismo estudio de Bó et al. (2012), al administrar 400 UI de eCG a vacas británicas con cría al pie y buena condición corporal y en otro grupo compuesto por vacas con media a baja condición corporal, se concluyó que los porcentajes de preñez se vieron aumentados en este último grupo, hecho atribuible al uso de la eCG. El efecto fue más acentuado sobre todo en aquellas vacas que no presentaban CL al inicio del tratamiento. Por lo tanto, la adición de 400 UI de eCG al día 8 de iniciado un tratamiento de IATF (mismo día

de retiro del DIV), logran resultados de preñez de hasta un 50% en vacas con una condición corporal de 2 al comienzo del protocolo (Cutaia y Bó, 2004 citado en Bó et al., 2012). La nutrición sigue siendo de importancia aun en tratamientos que utilizan eCG, ya que la falta de alimento como puede ser una sequía durante el protocolo va a condicionar la tasa de preñez obtenida pudiéndose llegar a un 35% aunque se utilice dicha hormona (Colazo et al., 1999 citado en Bó et al., 2012).

Se ha demostrado también que el uso de eCG asociado con un destete temporario logra aumentar el número de vacas que ovulan (Cutaia y Bó, 2004 citado en Bó et al., 2012). A su vez al comparar vacas que recibieron tratamientos con eCG y vacas a las que se les aplicó destete temporario, se observa que aquellas con eCG presentan un mayor tamaño del folículo pre-ovulatorio (Cutaia y Bó, 2004 citado en Bó et al., 2012) y este factor podría ser el responsable de la ovulación de un folículo de mayor tamaño y consecuentemente un mayor CL con el incremento de la concentración de P4 en plasma, llevando a un mayor porcentaje de preñez (Colazo et al., 1999 y Cutaia et al., 2003 citados en citados en Bó et al., 2012; Baruselli et al., 2004).

En un estudio realizado por Bó et al. (2012) se evaluó sobre 9668 vacas el efecto que tenía administrar 400 UI de eCG en un protocolo de IATF sobre vacas cíclicas (n=8990) y vacas acíclicas (n=678). Cada grupo tenía su control, en el cual no se administraba dicha hormona. Se determinaban como vacas cíclicas aquellas que tenían CL o signos de celo al momento de iniciar el tratamiento y como acíclicas aquellas que solamente tenían folículos. Como resultado de este estudio se obtuvo que en aquellas vacas cíclicas la administración de eCG no aumentaba el porcentaje de preñez, en cambio, en aquellas vacas que no estaban ciclando, se alcanzó 10% más de preñez en las que utilizaban protocolos que incluían eCG en comparación con aquellas que no recibían eCG.

En otro estudio realizado por Cutaia et al. (2003) también se evaluó el efecto de agregar 400 UI de eCG a un protocolo de IATF sobre vacas de carne con una CC de 2 en promedio y entre los 60 y 80 días posparto, diferenciándolas así por su estado reproductivo en tres grupos (citado en Bó et al., 2012). Un grupo conformado por vacas que tenían presencia de CL, otro por vacas con folículos palpables y otro por aquellas que no presentaban estructuras palpables. A su vez, cada uno de estos tres grupos era dividido en dos subgrupos equitativos, para así formar los grupos control a los que no se les administraba eCG. Al igual que en el estudio anterior, en este estudio no se obtuvieron diferencias significativas en los porcentajes de preñez en aquellas vacas que estaban ciclando, mientras que en aquellas que solo tenían folículos o que no presentaban estructuras ováricas se obtuvieron mayores porcentajes de preñez cuando se les administraba eCG. El aumento fue de 19.7% para las que solo tenían folículos y de 23,6% para aquellas sin estructuras ováricas.

También se ha puesto a prueba el uso de la eCG en protocolos de transferencia de embriones en los cuales se ha intentado aumentar la P4 en la circulación de las hembras receptoras logrando inducir la múltiple ovulación mediante la inyección de eCG durante el protocolo de sincronización. Algunos investigadores reportaron que el tratamiento en vaquillonas Holstein con un dispositivo que contiene 1,55 g de progesterona (PRID, CEVA Salud Animal, Morelos, México) por 6,5 días, combinado con 100 mg de progesterona IM y 5 mg de E-17P IM al día 0, y 1000 IU eCG al día 4 (tiempo en que se espera la emergencia de la onda) resultaron en la formación de múltiples CL (2 a 5 por ovario), un mayor número de hembras receptoras

seleccionadas para la transferencia y una mayor tasa de preñez en comparación con aquellas que recibieron el mismo tratamiento pero sin el uso de eCG (Fuentes, 1997 citado en Bó et al., 2002).

En otro estudio, 100 vaquillonas Bos Taurus x Bos indicus fueron tratadas con un dispositivo CIDR-B por 7,5 días, combinado con 2 mg BE y 50 mg P4 IM al día 0. La mitad de las vaquillonas recibieron 800 IU de eCG al día 5, y todas las vaquillonas recibieron PGF al día 7 y 1 mg BE IM al día 8. Todos los animales fueron examinados por ultrasonografía 1 día previo a la transferencia de embriones y se tomaron muestras de sangre para determinar la concentración de P4 en el plasma sanguíneo. Los resultados revelaron que la administración de eCG resultó en un aumento del número de ovulaciones y por lo tanto de CL, un aumento de P4 en plasma y un aumento en los índices de preñez. Cabe destacar que, excluyendo las receptoras con múltiples cuerpos lúteos, el área de los CL y la concentración de P4 en plasma fue mayor para aquellas vaquillonas tratadas con eCG que tenían un solo CL, en comparación con aquellas que no recibieron eCG (Baruselli et al., 2001 citado en Bó et al., 2002).

En un estudio posterior, un lote de vacas cruza Bos Taurus x Bos indicus fue tratado con un dispositivo DIV-B combinado con 2 mg BE y 50 mg P4 IM al día 0. La mitad de las vacas recibieron 400 IU de eCG IM, y todas recibieron PGF al día 5. El DIV-B fue removido al día 8, y se le administró 1 mg de BE al día 9. Aunque este estudio no resultó en la misma cantidad de ovulaciones múltiples (2%) que el estudio mencionado anteriormente en el que se le administraba una mayor dosis de eCG (800 UI), el resultado si demostró que aumentaron el diámetro de los CL y los índices de preñez (Bó et al., 2002).

En conclusión, según todos los estudios presentados en esta unidad podemos decir que la eCG es ampliamente utilizada por su capacidad para inducir actividad tanto FSH como LH en bovinos. Esta hormona logra inducir el crecimiento folicular independientemente de la etapa de desarrollo en la que se encuentre el folículo, y es por esta característica que es utilizada en protocolos de IATF. Otra ventaja que presenta dicha hormona cuando utilizada, es que se obtienen diámetros luteales más grandes, mayor concentración de P4 y mayores tasas de preñez que cuando no es utilizada (Murphy, 2012; Bó et al., 2012; Hosseini et al., 2018).

El efecto de la eCG no es independiente de la condición corporal y la ciclicidad de los animales. La administración de eCG en vacas con una condición corporal comprometida o acíclicas conlleva a mejores resultados que en aquellas con una condición corporal óptima o vacas que están ciclando (Bó et al., 2012).

En cuanto a la transferencia de embriones, el uso de esta hormona provee una mejoría en la superovulación de las vacas donantes y una mayor sincronidad en las receptoras (Bó et al., 2002).

Gonadotrofina coriónica equina en vaquillonas

Otro punto importante a estudiar en los últimos años ha sido la variabilidad y la inconsistencia que se obtiene en los resultados de las IATF realizadas a vaquillonas (Cutaia et al., 2007 citado en Bó et al., 2012). En Uruguay existe escasa información sobre protocolos de IATF en vaquillonas pre púberes (Menchaca, Ibarra y Jaureguy, 2006). Una de las causantes de esta variabilidad podría ser la selección de una alta

taza de vaquillonas aún inmaduras para ser sometidas a un protocolo de IATF (Baruselli, Bó, Reis, Marquez y Sá Filho, 2005). Las herramientas hormonales con las que hoy contamos nos ayudarían a inducir y sincronizar la ovulación en vaquillonas que aún no han ciclado (Menchaca et al., 2006). En cuanto a las vaquillonas cíclicas, el mismo autor sugiere que podría deberse a altos niveles de progesterona en sangre durante el protocolo, que llevarían a una supresión de la magnitud y frecuencia de los pulsos de LH generando una alteración en el crecimiento del folículo dominante y por lo tanto, afectando la ovulación y la génesis del subsecuente CL (Baruselli et al., 2005).

Autores como Menchaca et al. (2006) probaron el uso de eCG en combinación con GnRH o BE en un protocolo de IATF en vaquillonas pre púberes de 15 meses. El experimento consistió en 486 vaquillonas de razas británicas de 14 a 16 meses que recibieron un tratamiento de 7 días con un DIV (1 g de progesterona, Dispositivo Intravaginal Bovino, Syntex, Argentina) y 2 mg de BE, IM (Benzoato de Estradiol, Syntex, Argentina), el mismo día de inserción del DIV. A su vez, las hembras que presentaban CL al retiro del DIV fueron tratadas con 150 mg de D-cloprostenol (Ciclase, Syntex, Argentina). Posteriormente se forman 4 grupos, de los cuales a 2 se les administró 300 UI de eCG, IM (Novormon, Syntex, Argentina), el día del retiro del DIV, mientras que, a uno de estos grupos se le administró 1 mg de BE a las 24 h de retirado el DIV y al otro un análogo de GnRH (50 mg de lecirelina, Gonasyn, Syntex, Argentina) a las 48 h de retirado el DIV, quedando así conformados los grupos (eCG + BE, n=118) y (eCG + GnRH, n=123). A los dos grupos restantes no se les administró eCG, pero si BE o GnRH conformando los grupos (BE, n=127) y (GnRH, n=118). A todos los grupos a las 52-56 h de retirado el DIV se realizó la IATF. Los resultados de este experimento arrojaron que los dos grupos que recibieron eCG obtuvieron un mayor porcentaje de preñez que los que no recibieron eCG (49,8% y 40,3%, respectivamente). También se obtuvo un aumento de la preñez en aquel grupo que recibió eCG y GnRH en comparación con el que solo recibió GnRH (55,3% y 42,4%, respectivamente). Lo mismo se observó al momento de comparar lo que sucedió con el BE, en este caso el grupo eCG y BE obtuvo 44,1 % y el que solo utilizaba BE obtuvo un 36,2 %. Por lo tanto, se puede concluir que según este experimento el uso de eCG en protocolos de IATF en vaquillonas pre púberes es propicio independientemente de si es utilizado con BE o con GnRH; a su vez con esta última se logran mayores tasas de preñez.

En el año 2007, Cutaia et al. (2007, citado en Bó et al., 2012) también realizaron un experimento para evaluar el efecto de la eCG en vaquillonas cebuínas de 18 a 24 meses de edad cíclicas. El experimento estuvo diseñado de la siguiente manera: a todos los animales (n=366) en el día 0 del tratamiento se les insertó un DIV con progesterona de segundo uso (DIB 1 g, Syntex Argentina) en conjunto con 2 mg de BE, IM. A partir de aquí las vaquillonas fueron divididas en 4 grupos distintos. Uno de ellos estaba conformado por vaquillonas que recibieron PGF, IM (75 µg de D (+) cloprostenol) "media dosis" en el día 0 del tratamiento y otra dosis igual a la anterior en el día 8 del tratamiento (Grupo PGF día 0 y 8). El siguiente grupo (PGF día 8), solo recibió una dosis de PGF (150 µg de D (+) cloprostenol) "dosis completa" al día 8. A su vez los dos grupos anteriormente nombrados fueron subdivididos a la mitad para recibir o no 400 UI de eCG al retiro del DIV. Todos los animales recibieron 1 mg IM de BE el día 9 y fueron inseminadas entre las 52 a 56 hs de retirado el DIV. En este caso, a diferencia del experimento anterior, no se obtuvo diferencias en las tasas de preñez

entre las vaquillonas que eran o no tratadas con eCG además del BE, aun cuando en este caso se le administraban 100 UI de eCG más que en el experimento de Menchaca et al. (2006) y la misma cantidad de BE (1 mg) posterior al retiro del DIV, con la diferencia de los días de duración del dispositivo. Además de lo que sucedió con la eCG, tampoco se encontraron diferencias significativas al comparar los grupos PGF Día 0 o PGF Día 0 y 8.

En otro estudio realizado por De Dominicis, Madero, Cantallops y Callejas (2007) se siguió estudiando esta temática, esta vez realizando dos experimentos iguales, pero en dos lotes distintos, uno conformado por 122 vaquillonas Aberdeen Angus de 15 meses y el otro compuesto por 122 vaquillonas de 27 meses y de la misma raza, ambos lotes con una condición corporal de 3. Para el grupo de las vaquillonas de 15 meses, el día 0 del tratamiento se les introdujo un DIV de segundo uso (DIB, 1 g P4, Syntex S.A) y 2 mg de BE IM (Estradiol 10, Río de Janeiro). Al día 8 del tratamiento se les retiró el dispositivo y se las dividió aleatoriamente en dos grupos, un grupo eCG (n=58) y un grupo control (n=64). El grupo eCG recibió 200 UI de eCG (Novormon, Syntex S.A) y el grupo control no recibió eCG. A ambos grupos ese mismo día se les administró 150 µg de D (+) Cloprostenol IM (Arsaprot, ARSA) y además 0,5 mg de Cipionato de Estradiol IM (ECP estradiol, Köning). A las 52 – 54 h de retirados los DIV se realizó la IATF. El mismo protocolo y procedimiento fue realizado para el lote de vaquillonas de 27 meses, que fueron divididas en dos grupos de 61 animales, con la diferencia de que el grupo eCG recibió 400 UI de dicha hormona. A los 32 días de realizada la IATF se evaluaron las preñeces mediante ecografía del total de los animales. Los datos obtenidos indicaron que para el lote de las vaquillonas de 15 meses no hubo diferencia significativa en cuanto a preñez entre el grupo eCG y el grupo control (62,1 % y 62,9% respectivamente). En tanto que para el grupo de las vaquillonas de 27 meses la conclusión fue la misma, grupo eCG 52,6 % y para el control 53,3 %. Por lo que se concluyó que administrar eCG al retiro de un DIV de segundo uso en un protocolo de vaquillonas de 15 a 27 meses con una condición corporal de 3 no aumenta los porcentajes de preñez (De Dominicis et al., 2007).

Diferencias en la dosis de eCG

El efecto de la eCG sobre el desarrollo de folículos medianos y grandes es variable y depende de la dosis administrada y en qué fase del ciclo estral se encuentre al momento de aplicarla. Generalmente con una dosis más grande se obtiene una respuesta ovárica mayor (Newcomb, Christie, Rowson, Walters y Bousfield, 1979).

Macmillan y Peterson (1993), evaluaron los resultados de la administración de 400 UI vs 600 UI de eCG en un rodeo de 855 vacas lecheras en anestro posparto. Los resultados arrojados por esta investigación fueron que aquellas vacas que recibieron la dosis más alta de eCG presentaron un mayor porcentaje de ovulación que aquellas que recibieron la dosis más baja (89% vs 77% respectivamente). Por otro lado, los porcentajes de detección de celo y de inseminación fueron mayores en aquellas que recibieron la dosis más alta (73% vs. 68%).

Diferentes dosis de eCG tienen diferentes efectos sobre la inducción del crecimiento del folículo preovulatorio. En vaquillonas lecheras, 500 UI de eCG fueron insuficientes para generar múltiples ovulaciones, pero una dosis de más de 1000 UI sí podía lograrlo (Bellows y Short, 1972; citado en De Rensis y Lopez-Gatius, 2014). Esta observación se ha confirmado y generalmente se acepta que la dosis “estándar” para inducir la maduración y consecuente ovulación del folículo preovulatorio es de 200 hasta 1000 UI, mientras que la dosis capaz de generar múltiples ovulaciones debe estar por encima de las 2500 UI.

Sin embargo, algunos estudios presentan resultados contrastantes en cuanto al uso y efecto de diferentes dosis de eCG. Estas diferencias pueden estar asociadas a las condiciones ambientales en que se encuentran los rodeos que son utilizados o a el estado de los animales al momento del estudio. O'Hara et al. (2016, citado en Hosseini et al., 2018) utilizando 750 y 1000 UI lograron inducir el crecimiento de varios folículos dominantes, pero el uso de 250 y 500 UI de eCG no fueron suficiente para inducir una codominancia; mientras que Hosseini et al. (2018) demostró que con 500 UI administrada el mismo día de la emergencia folicular era suficiente para lograr la codominancia. Por lo tanto, la dosis no es el único factor de importancia, sino que también el momento exacto de la administración (Hosseini et al., 2018).

Diferencia entre días de administración de eCG

Desde que se comenzó a utilizar la gonadotropina coriónica equina en protocolos de sincronización, varios autores estudiaron su efecto utilizándola el mismo día del retiro del dispositivo intravaginal de P4 y demostraron efectos productivos positivos en los rodeos, lo que llevó a que durante años se utilizara de dicha forma en los protocolos. Básicamente, se recomendaba que el tratamiento para vacas en anestro en los rodeos lecheros de Nueva Zelanda consistiese en insertar un CIDR durante 7 días y administrar una dosis de eCG al mismo día del retiro del dispositivo (Macmillan y Peterson, 1993).

Considerando la larga vida media y la afinidad por los receptores de FSH y LH (Murphy y Martinuk, 1991), la eCG administrada hasta 2 días antes del retiro del DIV puede ser una estrategia más racional para lograr mejorar el tamaño del folículo dominante al momento de la ovulación en ganado tratado con un protocolo diseñado para inducir la ovulación a las 24 h de retirado el DIV (Bó et al., 2002; Tovío, 2011; Dorneles et al., 2013; Aragunde, Viñoles, Gastal y Cavestany, 2022). Tovío (2011) evaluó el efecto de aplicar 400 UI de eCG al día 5 o al día 8 de colocado el DIV en un protocolo de sincronización de estro para transferencia de embriones en 70 vaquillonas Holstein en clima tropical. Se evaluó el desarrollo folicular al día 9, el desarrollo luteal al día 17, la concentración de P4 al día 9 y 17 y el porcentaje de preñez al día 52. Con respecto al desarrollo folicular, se comprobó que el diámetro de los folículos dominantes era mayor para aquellas vaquillonas en donde la eCG era administrada de forma más prematura. Por otro lado, el número de CL, el volumen del CL, las concentraciones de P4 y las tasas de preñez no se vieron afectadas entre los protocolos.

Dorneles et al. (2013) puso a prueba en vacas en anestro, amamantando, bajo estrés nutricional, la diferencia de administrar 400 UI de eCG dos días antes del retiro del DIV vs. el mismo día del retiro en un protocolo de IATF. Al día 0 a todas las vacas

se les administraban 2 mg de BE y un DIV con 250 mg de medroxiprogesterona, al día 6 se administraba 0,265 mg cloprostenol. Al día 8 se retiraron los dispositivos y se les administraba 100 mg de GnRH para inseminarlas a las 16 h posteriores. Además, se formaron 3 grupos al azar: a uno se le administró eCG el día 6, a otro grupo el día 8 y a un tercer grupo no se le administró, siendo este el grupo control. Los resultados obtenidos de este estudio fueron que el tamaño del folículo preovulatorio, volumen del CL, concentraciones séricas de P4 e índices de preñez fueron más altos en las vacas que recibieron eCG 2 días antes del retiro del DIV en comparación con aquellas que recibieron el mismo día de retirada del DIV. El tamaño del folículo preovulatorio es el factor más importante ya que afecta la tasa ovulatoria, volumen del CL, concentración de P4, y el índice de preñez (Sartori et al., 2002; Vasconcelos et al., 2001; Perry et al., 2007; Gimenes et al., 2008 citado en Dorneles et al., 2013). No hubo diferencia en la tasa ovulatoria entre el grupo eCG 6 y eCG 8, 70,4% y 68%, respectivamente. Además, el volumen del CL y la concentración de P4 al día 10 y 15 post ovulación fueron mayores en las vacas del grupo eCG 6 comparadas con las del grupo eCG 8. Sin embargo, la eCG independientemente de si es administrada el mismo día o dos días antes de la retirada del DIV, resultó en la formación de un CL competente que no sufrió luteólisis prematura aun cuando las vacas se encontraban en una pobre condición corporal. Por lo tanto, la administración de eCG puede haber prevenido la regresión luteal prematura por su efecto en los receptores de FSH y LH, lo que estimula la síntesis de esteroides en los folículos ováricos y CL (Mann y Laming, 2000; Martinez et al., 2005 citado en Dorneles et al., 2013).

Recientemente, Aragunde et al. (2022) demostraron en un protocolo de sincronización de celo para realizar una inseminación en tiempo fijo en vacas en anestro superficial con ternero al pie, que el uso de una dosis de 400 UI de eCG el día 5 (día 0 el día de aplicación del progestágeno) vs. el uso del eCG al día 7 (mismo día en que se retira el progestágeno), sincroniza mejor la ovulación de folículos preovulatorios, que tienden a ser de mayor diámetro dando lugar a un CL mayor, que produce más P4, aumentando la tasa de concepción.

Uso de la ultrasonografía en ganado

Ultrasonografía modo B y Doppler

Para alcanzar mayor eficiencia reproductiva del rodeo, el uso de la ecografía permite obtener resultados más certeros, de manera rápida y no invasiva sobre los animales, así como información sobre el estado de su aparato reproductor y el diagnóstico de patologías reproductivas. En las evaluaciones ecográficas del tracto reproductivo, cuando se suma la aplicación del modo Doppler es posible determinar el flujo sanguíneo de las estructuras ováricas, como lo es la pared folicular durante las etapas de crecimiento folicular y ovulación, y el desarrollo y regresión del CL (Rodríguez-Zamora et al., 2012).

El crecimiento folicular, la atresia, la ovulación y el subsecuente CL están directamente relacionados con la irrigación del folículo, por tanto, una variación en este flujo determinará cambios a nivel estructural, secretorio y funcional de dichas

estructuras (Rodríguez-Zamora et al., 2012). Por lo tanto, la ecografía Doppler permite predecir la mortalidad embrionaria, la calidad del ovocito del folículo preovulatorio, seleccionar hembras en respuesta a la superovulación y la selección de receptoras para transferencia de embriones, y realizar el diagnóstico de gestación precoz en los 19-24 días post inseminación artificial (Rodríguez-Zamora et al., 2012). Sin embargo, la ecografía Doppler aún no es de amplio uso en el manejo reproductivo a campo en los establecimientos particulares, pero si ha tomado importancia en el ámbito de la investigación.

Modo Doppler color

La ecografía Doppler es una herramienta muy útil y no invasiva para evaluar la perfusión sanguínea genital de las vacas durante los diferentes estadios del ciclo estral, preñez o puerperio. Esta tecnología permitió pasar de una imagen anatómica a una imagen fisiológica (Herzog y Bollwein, 2007).

Como definen Rubio Marco et al. (2014), la ecografía es una técnica moderna basada en el análisis de ultrasonidos. Los pulsos de energía ultra sonora emitidas por el transductor se transmiten en forma de ondas de presión, las cuales se propagan hacia los tejidos, reflejándose cuando atraviesan dos tipos de tejidos con propiedades físicas diferentes, generando una interfase acústica. Ese sonido reflejado o también llamado eco es detectado y resulta en lo que se conoce como una imagen ecográfica. Al medir la amplitud de estas ondas se obtiene información sobre la naturaleza de la interfase que está reflejando el pulso. Estas distintas interfases se representan en escala de grises, mientras que las ondas de baja amplitud, como el interior de vasos sanguíneos, darán imágenes en negro.

Los mismos autores afirman que además de poder clasificar las ondas reflejadas según su amplitud, estas también se pueden clasificar según su frecuencia: si un pulso de ultrasonido choca contra una superficie estática, esta reflejará la misma frecuencia, pero en el caso de chocar contra una superficie en movimiento, se generará un cambio en la frecuencia de la onda y este será proporcional a la velocidad de la estructura contra la que choca. Este cambio de frecuencia es el llamado efecto Doppler (Rubio Marco et al., 2014). Estas ondas sonoras incrementan su frecuencia al chocarse con objetos (eritrocitos que circulan en el torrente sanguíneo) que se están moviendo hacia el transductor, y disminuye su frecuencia al chocar contra objetos que se alejan del transductor. Este cambio en la frecuencia nos permite medir la velocidad a la que circula la sangre (Herzog y Bollwein, 2007).

Se pueden encontrar distintos sistemas de evaluación en el modo Doppler, los cuales serán desarrollados en el apartado siguiente. Por un lado, el sistema Doppler color, que representa la dirección del flujo, generando una imagen cualitativa o el sistema Doppler power, que representa la potencia integrada de la señal Doppler, permitiendo la cuantificación de señal independiente de la dirección del flujo.

Por otra parte, se encuentra el Doppler power (también conocido por modo angio). Esta herramienta estudia el cambio de la amplitud de onda y lo codifica en una escala de color entre rojo y naranja. Este, a diferencia del Doppler color no representa la frecuencia de la onda, sino que representa la potencia integrada de la señal (Rubio Marco et al., 2014). Por lo tanto, no brinda información sobre la velocidad del flujo,

limitándose a detectar únicamente la presencia del mismo con la ventaja de ser más sensible, pudiendo detectar flujos más lentos, siendo esta su principal ventaja.

El Doppler color nos brinda información sobre la presencia y dirección del flujo codificando el cambio de frecuencia de onda en colores rojo y azul, asignando el color rojo al flujo que se dirige hacia el transductor, y azul al flujo que se aleja del transductor (Rubio Marco et al., 2014). A su vez, según la velocidad de este flujo se verá un cambio en la intensidad de los colores.

Ultrasonografía en modo Doppler en el estudio de las estructuras ováricas

En los últimos años se ha estudiado el flujo sanguíneo de los folículos ováricos y de los cuerpos lúteos de la vaca mediante ecografía Doppler color (Matsui y Miyamoto, 2009). Se ha comprobado que los cambios hemodinámicos están relacionados con las remodelaciones cíclicas del tejido ovárico que ocurren durante el crecimiento folicular, la ovulación y el desarrollo de un nuevo CL (Acosta, Hayashi, Ohtani y Miyamoto, 2003).

La ecografía Doppler color puede proporcionar una estimación del estado fisiológico de los folículos y los cuerpos lúteos. Por ejemplo, las imágenes del flujo sanguíneo se pueden utilizar para evaluar el grosor de la pared folicular y proporcionar un diagnóstico diferencial de los quistes foliculares y lúteos. La evaluación del área de flujo sanguíneo en el CL puede ofrecer un complemento útil para estimar la función luteal y, además, podría aplicarse en el diagnóstico de preñez y pérdida fetal (Matsui y Miyamoto, 2009).

Algunos investigadores han sido muy influyentes en el estudio de la vascularidad de las estructuras ováricas, entre ellos Acosta et al. (2003), quienes en una investigación concluyeron que el incremento en el suministro sanguíneo de los folículos, específicamente en la base folicular rodeando el antro, estaba asociado con el crecimiento folicular y su habilidad para convertirse en un folículo dominante, mientras que una reducida vascularidad folicular está estrechamente relacionada con la atresia y llevara al folículo a un progresivo decrecimiento (Acosta et al., 2003). El mantenimiento de la vascularidad folicular y un apropiado suministro sanguíneo hacia el folículo es esencial para que se desarrolle el folículo dominante (Acosta, 2007) ya que, a través de este suministro las células foliculares se abastecen de gonadotropinas, nutrientes, substratos hormonales y otros componentes necesarios para la ovulación (Acosta et al., 2003). Consecuentemente solo un folículo dominante con una alta vascularidad tiene la chance de conseguir la maduración final y la capacidad para ovular (Acosta, 2007).

Además de los cambios locales a nivel ovárico, la tecnología Doppler ha permitido estudiar y relacionar temporalmente los sucesos ováricos con los sistémicos. Se ha demostrado así, que el aumento de la irrigación de la pared folicular está asociado con el momento en que aumentan las concentraciones plasmáticas de estradiol y el surgimiento de la LH durante el periodo preovulatorio en la vaca (Acosta et al., 2003). Además, se ha comprobado que los estrógenos causan una dilatación rápida de los vasos sanguíneos al aumentar la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO) en líquido folicular (Acosta et al., 2003).

Se ha estudiado la relación entre los cambios a nivel ovárico y que influencia tienen estos sobre los índices de preñez. Siddiqui et al. (2009) realizó un estudio sobre 34 vaquillonas Holstein de entre 15 y 20 meses con buena condición corporal a las que se les realizó un protocolo de IATF. Los animales recibieron una dosis de PGF cuando el diámetro del folículo más grande presente alcanzaba los 11mm, 36 h después se les administraba una dosis de un análogo de GnRH para inducir la ovulación. La inseminación fue realizada 26 h después de la GnRH. Los diámetros foliculares fueron registrados con ultrasonografía en modo B realizando un promedio entre el largo y el ancho del antro. A través del modo power Doppler fue medida subjetivamente la irrigación de la circunferencia de las paredes foliculares. Tanto el diámetro como el flujo sanguíneo fueron medidos a las 0 h (tratamiento GnRH) y a las 26 h (inseminación). Las preñeces fueron confirmadas mediante ecografía al día 42. El flujo sanguíneo de la pared folicular aumentó entre la hora 0 y la 26 en todas las vacas, pero al comparar entre las vacas que se preñaron (25) y las que no (9), las vacas que se preñaron tuvieron un mayor flujo sanguíneo a la hora 26. En cuanto a la hora 0, no hubo diferencias significativas en el flujo sanguíneo entre las preñadas y las que no. El diámetro folicular fue mayor en el grupo que se preñó en comparación con el que no se preñó. Con estos resultados el autor afirma que hay una relación positiva entre el aumento de irrigación del folículo preovulatorio y un establecimiento exitoso de la preñez en el ganado (Siddiqui, Almamun y Ginther, 2009).

Luego de realizada una revisión bibliográfica se concluye que la información acerca del uso de eCG en vaquillonas presenta algunas ambigüedades. Existen varias investigaciones que ponen a prueba la ecografía Doppler para estudiar la irrigación sanguínea folicular, pero en ninguno se estudia específicamente el efecto de la eCG sobre la irrigación folicular en un protocolo de IATF, ni las variabilidades al aplicarla en diferentes momentos del mismo. Aún queda mucho terreno por investigar en estas temáticas para llegar a obtener datos precisos al respecto, esperamos que al alcanzar los objetivos planteados en esta tesis podamos dilucidar o colaborar en dicha investigación.

HIPÓTESIS

La administración de eCG aumenta la irrigación y diámetro del folículo dominante independientemente si es aplicada dos días antes o al momento del retiro del dispositivo intravaginal de progesterona en un protocolo de inseminación en tiempo fijo en vaquillonas de la raza Holstein.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de la eCG administrada en distintos momentos de un protocolo de IATF sobre el desarrollo del folículo dominante en vaquillonas Holstein.

Objetivos específicos

1. Medir por ecografía modo B el crecimiento del folículo dominante entre los animales que reciben o no eCG en diferentes momentos en un protocolo de IATF.
2. Determinar el flujo sanguíneo del folículo dominante, mediante ecografía modo Doppler color, entre los animales que reciben o no eCG en diferentes momentos en un protocolo de IATF.

MATERIALES Y METODOS

Diseño experimental

Para cumplir con los objetivos planteados se realizó un experimento utilizando 30 vaquillonas (18-30 meses de edad) púberes de raza Holstein en la estación experimental de INIA "La Estanzuela" ubicada en el Km 11 de la ruta 50 en el departamento de Colonia. El presente experimento fue sometido y aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales de Experimentación de INIA (CEUA), inscripta ante la CNEA con el número de Registro 0009/11.

Para la investigación se planeó la formación de 3 grupos al azar con vaquillonas cuya condición corporal se encontrase entre 2,75 y 3,75 utilizando la escala de condición corporal de Edmonson, Lean, Weaver, Farver y Webster (1989), que estuviesen ciclando y que no presentasen ningún tipo de patología reproductiva. Se comenzó con un grupo de 45 vaquillonas del cual se descartaron 15 por presentar preñez, baja condición corporal ($< 2,75$), acíclicas o con patologías reproductivas. El grupo seleccionado quedó conformado por 30 vaquillonas de 18 a 30 meses de edad con las cuales se formaron 3 grupos de manera al azar, un grupo tratamiento 5 (T5) (n=10), un grupo tratamiento 7 (T7) (n=11) y un grupo control (TC) (n=9). Todos los animales fueron mantenidos a campo natural mejorado con agua de buena calidad ad libitum y de acuerdo con la disponibilidad de forraje fueron complementados con silo de maíz para alcanzar las exigencias nutricionales adecuadas de mantenimiento.

En los tres grupos se utilizó un protocolo de sincronización de celo con diferentes estrategias hormonales descritas en la Figura 1 del diseño experimental. Se sincronizó el celo las vacas administrando el día 0 (inicio del tratamiento), 2 mg de BE vía intramuscular (BE, Benzoato de estradiol zoovet, Zoovet, Santa Fe, Argentina) y un (DIV) impregnado con 750 mg de progesterona (Pro-ciclar p4 Zoovet, Santa Fe, Argentina). El día 7 se retiró el DIV y se les administró 0,150 mg de D-Cloprostenol (PG, Ciclar Zoovet, Santa Fe, Argentina).

Al grupo T5 se le administró eCG (400 UI intramuscular), (eCG, Biogón Plus, Biogénesis Bagó, Buenos Aires, Argentina) el día 5 del tratamiento (Figura 1A). Al grupo T7 se le administró eCG el día 7 del tratamiento (Figura 1B) y al grupo TC no se le administró eCG (Figura 1C).

A los 3 grupos se les realizó ecografía modo Doppler color vía transrectal con un equipo Sonoscape S9; con sonda lineal de 10 MHz (Shenzhen, China), cada 12 hs desde el día 5 am del tratamiento de ambos ovarios, hasta el día 9, que es el día de la ovulación, a excepción del día 8 pm en el que no se realizó muestreo por la dinámica de manejo del establecimiento. En cada estudio ecográfico se evaluó el diámetro mediante ecografía en modo B y el flujo sanguíneo mediante porcentaje de circunferencia del folículo dominante con presencia de puntos coloreados con ecografía Doppler. El ecógrafo Doppler se configuró con los siguientes ajustes; ganancia 40, frecuencia 3,0, filtro 185, profundidad Doppler 1 cm. Cuando el folículo contiene toda la circunferencia en color se le asigna 100% y cuando no tiene color 0%, los valores intermedios se los dividió en mitad, cuartos u octavos de la circunferencia (De Tarso et al., 2017). Los registros de la medición del diámetro y flujo sanguíneo de cada folículo se llevaron en planillas de seguimiento ovárico individuales por animal. En estas se dibujó un esquema de los ovarios con sus respectivos

folículos, el folículo más grande (presuntamente dominante) y el que le seguía en tamaño, que cada 12 hs presentaban crecimiento, se registró dos diámetros por folículo y el porcentaje asignado de flujo a los folículos por un mismo operario. Para poder evaluar adecuadamente la dinámica folicular, se corrigieron los datos de todos los animales al momento de la ovulación (hora 0), evaluando retrospectivamente el desarrollo folicular hasta el día 5 (am) del protocolo de sincronización (-108 h de la ovulación).

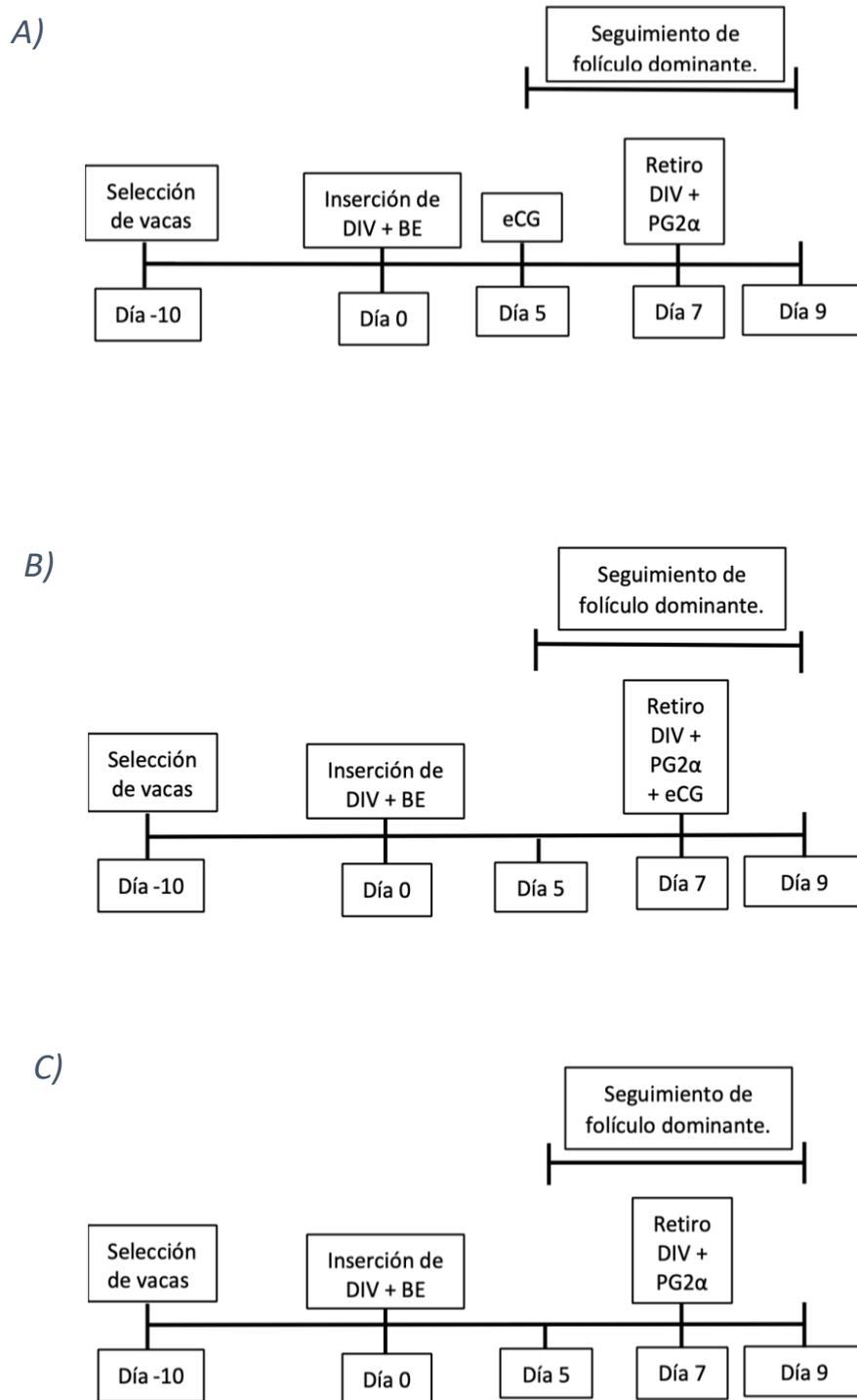


Figura 1: Diseño experimental de los tratamientos: A) tratamiento con eCG al día 5 del protocolo de sincronización (T5); B) tratamiento con eCG al día 7 del protocolo de sincronización (T7); C) sin tratamiento con eCG en el protocolo de sincronización, Control (TC).

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software Statistix v 10.0. La normalidad y homocedasticidad de los datos fueron evaluadas mediante las pruebas de Kolmogórov-Smirnov y Levene, respectivamente. Los datos de diámetro folicular y flujo sanguíneo fueron analizados mediante el modelo mixto ANOVA para medidas repetidas y las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante el método de LSD. La asociación entre el diámetro del folículo dominante y su flujo sanguíneo fue analizada mediante la prueba de regresión lineal, considerando la variable hora para la regresión ponderada. Los resultados son presentados como valores medios para cada conjunto de datos \pm error estándar de la media (SEM). El nivel de significancia estadística se definió en un nivel de probabilidad de $P < 0,05$.

RESULTADOS

Estudio de los diámetros entre grupos

El diámetro del folículo preovulatorio está representado en la Figura 2. Independientemente del tiempo, el diámetro folicular fue mayor ($P < 0,05$) en los tratamientos que reciben eCG. Independiente del grupo, el diámetro folicular aumenta a lo largo del tiempo ($P < 0,001$). Sin embargo, no hay interacción ($P > 0,05$) entre los tratamientos y las horas previo a la ovulación.

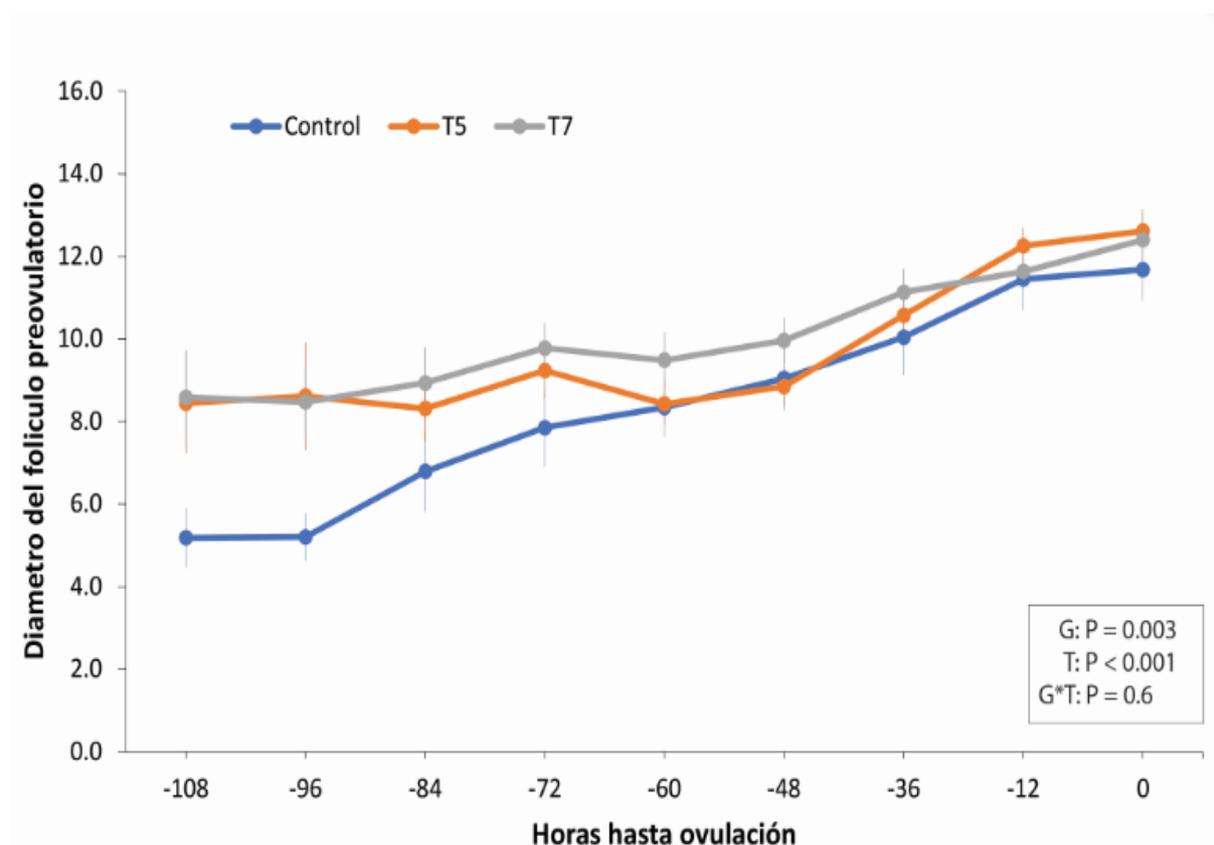


Figura 2: Promedio (\pm SEM) del diámetro del folículo preovulatorio desde -108 h hasta el momento de la ovulación (0 h) en cada tratamiento de sincronización de celo, siendo el T5 (eCG día 5), T7 (eCG día 7) o Control (sin eCG).

Estudio de los flujos sanguíneos entre grupos

El flujo sanguíneo del folículo preovulatorio está representado en la Figura 3. A lo largo del tiempo, el flujo sanguíneo de los folículos preovulatorios en todos los tratamientos fue similar ($P > 0,05$). Como es de esperar, el flujo sanguíneo del folículo preovulatorio aumenta ($P < 0,001$) a lo largo del tiempo independiente del tratamiento. No hay interacción ($P > 0,05$) de los tratamientos y las horas previo a la ovulación.

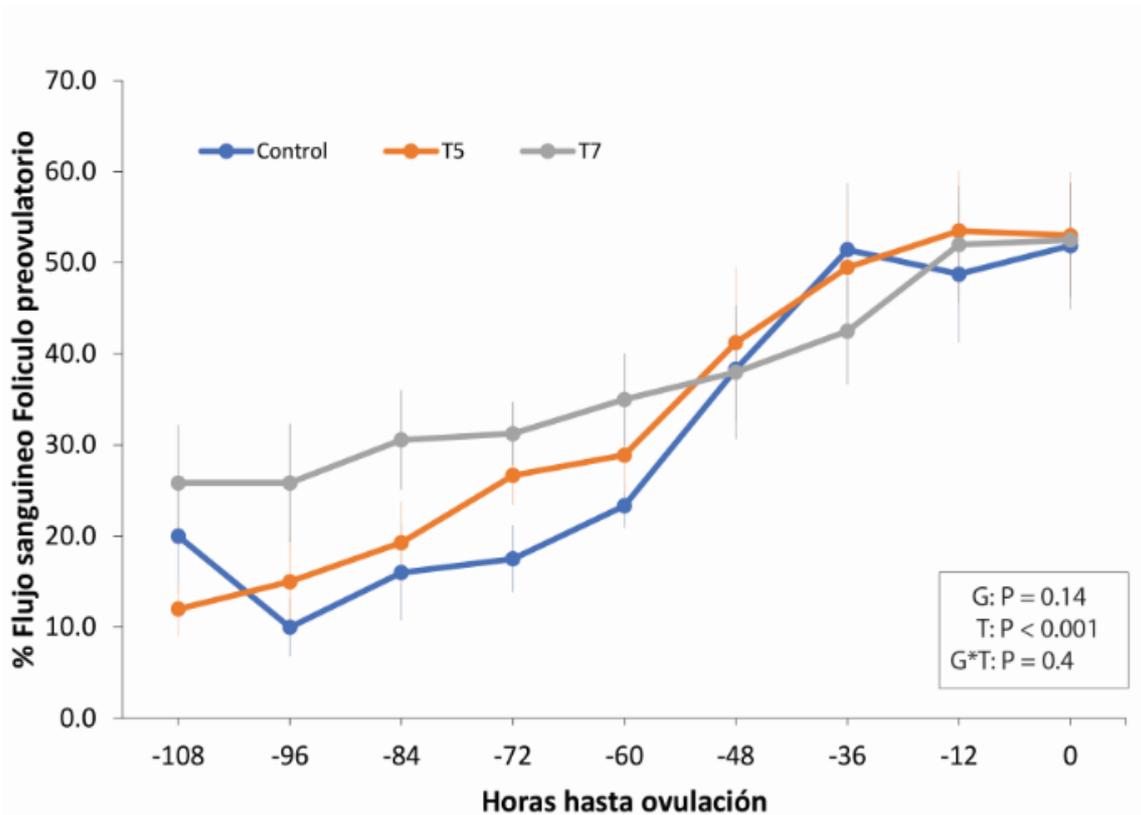


Figura 3: Promedio (\pm SEM) del flujo sanguíneo del folículo preovulatorio desde - 108 h hasta el momento de la ovulación (0 h) en cada tratamiento de sincronización de celo, siendo T5 (eCG día 5), T7 (eCG día 7) o Control (sin eCG).

Además, se observó que el flujo sanguíneo del folículo preovulatorio es correlacionado positivamente ($R=0,25$, $P = 0,0001$) con su diámetro folicular (Figura 4).

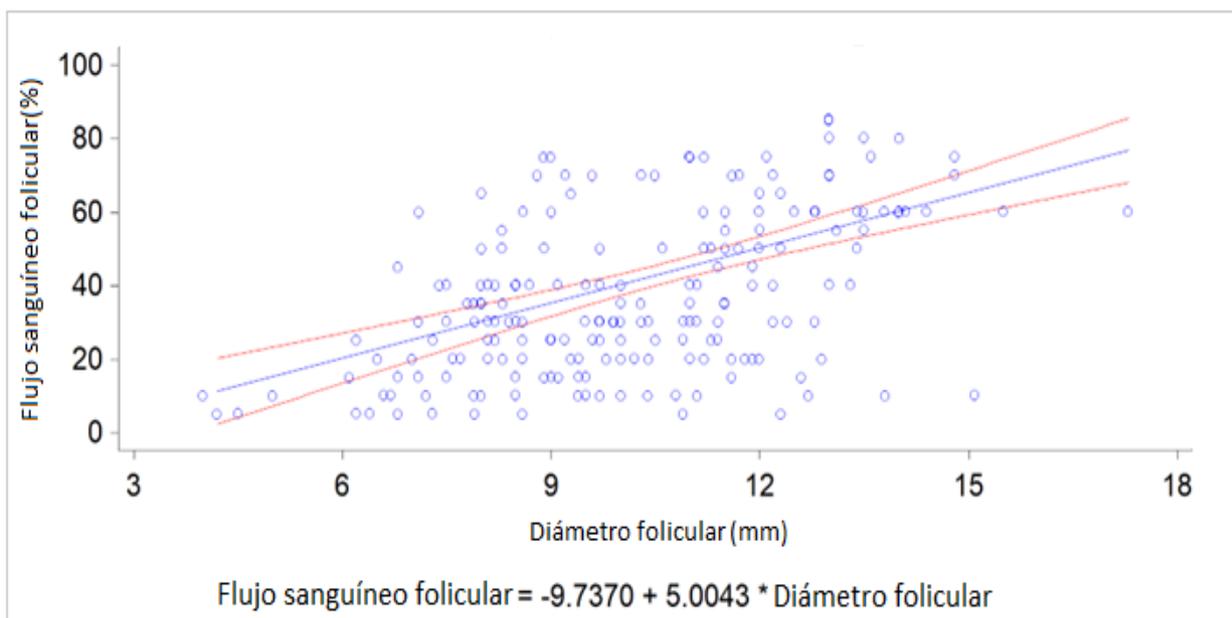


Figura 4: Correlación entre los valores del flujo sanguíneo con el diámetro del folículo preovulatorio de cada folículo evaluado entre -108 h hasta la ovulación (0 h) de las 30 vacas.

DISCUSIÓN

Crecimiento folicular y flujo sanguíneo

Según los resultados obtenidos todos los folículos independientemente del grupo crecen a lo largo del tiempo. Los grupos que recibieron eCG presentaron mayor tamaño folicular que el grupo control en todas las mediciones, pero, entre el grupo T7 y T5 las diferencias no fueron significativas.

En cuanto al flujo sanguíneo folicular, no hay diferencia estadística entre los folículos dominantes ante la administración de 400 UI de eCG al día 5 o 7 del protocolo ni tampoco en el grupo control en vaquillonas Holstein. Aun así, se vuelve a comprobar que la irrigación aumenta a medida que se acerca el momento de la ovulación (Acosta et al., 2003).

La incorporación de la eCG en los protocolos de sincronización e inseminación es relativamente nueva y ha llevado a diversos estudios para intentar dilucidar su efecto y su función en la hembra bovina y como mejorar la eficiencia de su utilización. Varios autores como Bó et al. (2002) y Baruselli et al. (2004) demostraron un aumento en la tasa de concepción en protocolos en los que se usaba la eCG, comparándolos con protocolos en los que no se utilizaba. Si bien en los estudios de dichos autores no se analizaban los cambios en el diámetro y flujo sanguíneo de los folículos, los resultados del presente estudio sugieren que la mejora en los resultados de preñez en vacas y vaquillonas que no están ciclando y con baja condición corporal ante la administración de eCG en diferentes momentos, no es debido a que dicha hormona genere un cambio en el flujo sanguíneo del folículo preovulatorio, y si pudiera estar relacionado a un aumento en su tamaño. Lo anterior lleva a pensar que existe otro mecanismo por el cual la eCG logra dichos incrementos, como podría ser el aumento en el diámetro, flujo sanguíneo y funcionalidad del CL subsecuente, así como lo demuestra Aragunde et al. (2023), en donde en un lote de vaquillonas semejante al de nuestro experimento y con los mismos tratamientos, se encontraron CL con mayor irrigación y tamaño en aquellos animales tratados con eCG. Es importante destacar que en los estudios realizados por Bó et al. (2002) que mencionamos anteriormente, se utilizaron vacas con condición corporal de 2,5 a 3,5 con cría al pie, y en el estudio realizado por Baruselli et al. (2004), se utilizaron vacas en anestro con cría al pie con una condición corporal de 1,5 a 2,5. Como se concluyó en el estudio de Bó et al. (2002) mencionado anteriormente, en esta categoría de animales con baja condición corporal, que se encuentran en anestro y con menos de 60 días pos parto se obtienen mejores resultados utilizando eCG. Esta podría ser la razón por la cual no encontramos variación en la irrigación folicular de nuestro estudio, ya que utilizamos vaquillonas con una condición corporal media o alta (2,75 a 3,75). La réplica de dicho protocolo y medición en vaquillonas acíclicas y con baja condición corporal sería de importancia para saber si estas dos variables tienen impacto en los resultados.

En estudios recientes realizados por Dorneles et al. (2013) y Aragunde et al. (2022) demostraron que en vacas en anestro con cría al pie la administración de 400 UI de eCG dos días antes del retiro del DIV logró mayores porcentajes de concepción que administrando la misma dosis al día del retiro del DIV. En tanto Tovío (2011) administrando la misma dosis tres días antes del retiro del DIV en vaquillonas Holstein no encontró diferencias en la tasa de preñez. A su vez Dorneles et al. (2013) y Tovío

(2011) encontraron que los folículos de aquellos animales a los que se les administró eCG 2 y 3 días antes, respectivamente, del retiro del DIV eran mayores que a las que se les administraba el mismo día del retiro, a su vez Aragunde et al. (2022) encontró la misma tendencia. Aunque en el presente estudio se observa que en las últimas dos mediciones (- 12 y 0 hs) el diámetro folicular para el grupo T5 es numéricamente mayor a los otros grupos, esta diferencia no obtuvo una significancia estadística. Si bien la finalidad de este estudio no es evaluar los porcentajes de preñez, sería de esperar obtener resultados similares a los de Tovío (2011) ya que en ambos estudios se utilizaron vaquillonas Holstein ciclando y no vacas en anestro, amamantando y con condición corporal comprometida, en las que como demostraron Bó et al. (2002) se obtienen mejores resultados de preñez, así como los obtuvieron Aragunde et al. (2022) y Dorneles et al. (2013).

El análisis estadístico demuestra que existe correlación entre el crecimiento del folículo preovulatorio y el aumento de su irrigación cuando se estudian todas las observaciones sin diferenciar los grupos. La baja correlación puede ser debida a que se determinaron los parámetros foliculares en un periodo de tiempo variable que va desde el día - 4 hasta la ovulación. Si se determinase la correlación el día de la IATF se esperaría una mayor correlación, pero en el presente estudio no se realizó porque solamente tendríamos cerca de 30 observaciones y esto tendría un poder estadístico por debajo de 0.5 para determinar la correlación entre las dos variables. Nuestros resultados coinciden con lo expuesto por de Tarso et al. (2017) donde se demostró dicha correlación con una $R= 0,34$ y $P < 0,001$, lo mismo fue demostrado en de Tarso, Apgar, Gastal y Gastal (2016). Posteriormente al realizar el estudio de la correlación de los grupos por separado, también se encuentra correlación entre el diámetro y el flujo sanguíneo. En el estudio realizado por de Tarso et al. (2017) se concluyó que existe correlación entre el flujo sanguíneo del folículo preovulatorio y la funcionalidad del subsecuente CL y su capacidad de síntesis de P4 plasmática. Con respecto a la correlación hallada entre el flujo sanguíneo y el diámetro folicular podemos sugerir que la medición de una de las variables es de utilidad para predecir de manera confiable el valor de la otra, lo cual puede ser una herramienta en la práctica para seleccionar indirectamente individuos que tendrán un CL más irrigado, por lo tanto, más funcional y con mayor producción de P4, lo que influye directamente en los resultados en la tasa de concepción.

CONCLUSIÓN

En un rodeo de vaquillonas Holstein ciclando con una condición corporal de 2,75 a 3,75, la administración de 400 UI de eCG al día 5 o al día 7 de un protocolo de IATF genera un aumento en el diámetro folicular independientemente del día de su administración. La administración de eCG en diferentes momentos de un protocolo de IATF no genera diferencias en el flujo sanguíneo de los folículos preovulatorios al compararlas con un grupo que no recibe la hormona, ni tampoco existen diferencias entre los tratamientos. El adelantar dos días la administración de eCG no genera un aumento en la irrigación ni en el diámetro del folículo preovulatorio.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, T. J. (2007). Studies of follicular vascularity associated with follicle selection and ovulation in cattle. *Journal of Reproduction and Development*, 53(1), 39-44.
- Acosta, T. J., Hayashi, K. G., Ohtani, M., y Miyamoto, A. (2003). Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction*, 125, 759-767.
- Allen, W. R., Hamilton, D. W., y Moor, R. M. (1973). The origin of equine endometrial cups II. *The Anatomical Record*, 177, 485-501.
- Aragunde Vieytes, R., Urioste, V., Cabrera, N., Ferrer, R., Garzon, J. P., y Gastal, G. (2023). Effect of time of eCG administration in a fixed-time artificial insemination protocol on ovulation, and corpus luteum area and blood flow of heifers. *Reproduction, Fertility and Development*, 35, 220-220.
- Aragunde, R., Viñoles, C., Gastal, G. D., y Cavestany, D. (2022). Equine chorionic gonadotropin administered on day 5 of a 7-days fixed-time artificial insemination program improves ovulation synchrony and corpus luteum function in anestrous beef cows. *Theriogenology*, 195, 62-68.
- Ballent, M., Landi, H. G., Bilbao, G., y Dick, A. (2003). Pubertad, peso vivo y desarrollo corporal en diferentes biotipos bovinos productores de leche: una actualización bibliográfica. *ITEA, Produccion Animal*, 99(2), 130-138.
- Baruselli, P. S., Bó, G. A., Reis, E. L., Marques, M. O., y Sá Filho, F. (2005). Introducao da IATF no manejo reproductivo de rebanhos bovinos de corte no Brasil. En *6º Simposio Internacional de Reproduccion Animal* (pp. 151-176), Cordoba, Argentina.
- Baruselli, P. S., Marques, M. O., Reis, E. L., y Bó, G. A. (2003). Tratamientos hormonales para mejorar la performance reproductiva de vacas de cría en anestro en condiciones tropicales. En *Resúmenes V Simposio Internacional de Reproducción Animal* (pp. 103-116). Huerta Grande, Córdoba.
- Baruselli, P. S., Reis, E. L., Marquez, M. O., Nasser, L. F., y Bó, G. A. (2004). The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 479-486.
- Bó, G., Adams, G., Caccia, M., Martínez, M., Pierson, R., y Mapletoft, R. (1995). Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science*, 39, 193-204.
- Bó, G. A., Baruselli, P. S., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tribulo, R., y Tribulo, H. (2002). The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 57, 53-72.
- Bó, G. A., Cutaia, L., Chesta, P., Balla, E., Picinato, D., Peres, L., . . . Baruselli, P. S. (2012). Implementacion de programas de inseminación artificial en rodeos de cría. En *VI Simpósio Internacional de Reproducción Animal*, Córdoba, Argentina.
- Bó, G. A., Cutaia, L., y Tribulo, R. (2002). Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos de carne: algunas experiencias realizadas en Argentina. *Taurus*, 4(14), 10-21.
- Bó, G. A., de la Mata, J. J., Baruselli, P. S., y Menchaca, A. (2016). Alternative programs for synchronizing and re-synchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology*, 86(1), 388-396.

- Bodensteiner, K. J., Wiltbank, M. C., Bergfelt, D. R., y Ginther, O. J. (1996). Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. *Theriogenology*, *45*, 499-512.
- Butler, W. (1998). Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *Dairy Science*, *81*, 2533-2539.
- Butler, W., y Smith, R. (1989). Interrelationships between energy balance and postpartum. Reproductive Function in Dairy Cattle. *Dairy Science*, *72*, 767-783.
- Cavestany, D., y Galina, C. S. (2001). Factors affecting the reproductive efficiency of artificial insemination programmes in a seasonal breeding pasture-based dairy system with the aid of milk progesterone. *Reproduction in Domestic Animals*, *36*, 85-89.
- Clegg, M. T., Boda, J. M., y Cole, H. H. (1954). The endometrial cups and allantochorionic pouches in the mare with emphasis on the source of equine gonadotrophin. *Endocrinology*, *54*(4), 448-463.
- Cole, H. H., Howell, C. E., y Hart, C. H. (1931). The changes occurring in the ovary of the mare during pregnancy. *The Anatomical Record*, *49*, 199-209.
- Cole, H. H., y Goss, H. (1943). The source of equine gonadotrophin. En *Essays in Biology* (pp. 107-119). Berkeley: U. C. Press.
- Cole, H. H., y Hart, G. H. (1930). The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, *93*(1), 67-68.
- Crowe, M., Diskin, M., y Williams, E. (2014). Parturition to resumption of ovarian cyclicity: comparative aspects. *The Animal Consortium*, *8*(1), 40-53.
- Dairy Cattle Reproduction Council. (2018). *Reproductive management strategies for dairy heifers*. Recuperado de <https://www.dcrcouncil.org/wp-content/uploads/2018/12/Dairy-Heifer-Protocol-Sheet-Updated-2018.pdf>
- Day, M. L., y Nogueira, G. P. (2013). Management of age at puberty in beef heifers to optimize efficiency of beef production. *Animal Frontiers*, *3*(4), 6-11.
- De Dominicis, O., Madero, S., Cantalops, F., y Callejas, S. (2007). Efecto de la ecg administrada al final de un tratamiento de sincronización de celos con progesterona sobre el porcentaje de preñez a la iatf en vaquillonas para carne. En *Simposio internacional de reproducción animal* (Vol. VII, pp. 227). Cordoba: IRAC.
- De Rensis, F., y López-Gatius, F. (2014). Use of equine chorionic gonadotropin to control reproduction of the dairy cow. *Reproduction in Domestic Animals*, *49*, 177-182.
- De Tarso, S. G., Apgar, G. A., Gastal, M. O., y Gastal, E. L. (2016). Relationships between follicle and corpus luteum diameter, blood flow, and progesterone production in beef cows and heifers: preliminary results. *Animal Reproduction*, *13*(2), 81-92.
- De Tarso S, S. G., Gastal A, G. D., Bashir, S. T., Gastal, M. O., Apgar, G. A., y Gastal, E. L. (2017). Follicle vascularity coordinates corpus luteum blood flow and progesterone production. *Reproduction, Fertility and Development*, *29*(3), 448-457.

- Dorneles Tortorella, R., Ferreira, R., Tonello dos Santos, J., Silveira de Andrade Neto, O., Henrique Barreta, M., Oliveira, J. F., . . . Pereira Neves, J. (2013). The effect of equine chorionic gonadotropin on follicular size, luteal volume, circulating progesterone concentrations, and pregnancy rates in anestrous beef cows treated with a novel fixed-time artificial insemination protocol. *Theriogenology*, *79*, 1204-1209.
- Edmonson, A. J., Lean, I. J., Weaver, L. D., Farver, T., y Webster, G. (1989). A body condition scoring chart for holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *72*(1), 68-78.
- Forde, N., Beltman, M. E., Lonergan, P., Diskin, M., Roche, J. F., y Crowe, M. A. (2011). Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Animal Reproduction Science*, *124*, 163-169.
- Glauber, C. E. (2007, Marzo). Engormix Articulos Tecnicos. Recuperado de <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/manejo-reproductivo-rodeo-bovino-t27014.htm>
- Harrison, R., Young, J., Freeman, A., y Ford, S. (1989). Effects of lactational level on reactivation of ovarian function, and interval from parturition to first visual oestrus and conception in high-producing holstein cows. *Animal Production*, *49*(01), 23-28.
- Herzog, K., y Bollwein, H. (2007). Application of doppler ultrasonography in cattle reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*, *42*(2), 51-58.
- Hosseini, A., Niasari-Naslaji, A., Vojgani, M., y Gharagozloo, F. (2018). Effect of time of eCG administration on the fate of ovarian follicle in Holstein heifers. *Iranian Journal of Veterinary Research*, *19*(1), 15-21.
- Kelleman, A. A. (2013). Equine pregnancy and clinical applied physiology. *American Association of Equine Practitioners*, *59*, 350-358.
- Lopez, H., Satter, L., y Wiltbank, M. (2004). Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*, *81*, 209 - 223.
- Macmillan, K. L., y Peterson, A. J. (1993). A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for oestrous synchronisation, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anoestrus. *Animal Reproduction Science*, *33*, 1-25.
- Macmillan, K. L., y Thatcher, W. W. (1991). Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biology of Reproduction*, *45*, 883-889.
- Martinez, M. F., Adams, G. P., Bergfelt, D., Kastelic, J. P., y Mapletoft, R. J. (1999). Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in heifers. *Animal Reproduction Science*, *57*, 23-33.
- Martínéz, M. F., Adams, G. P., Kastelic, J. P., Bergfelt, D. R., y Mapletoft, R. J. (2000). Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. *Theriogenology*, *54*, 757-769.
- Martinez, M. F., Kastelic, J. P., Adams, G. P., Cook, R. B., Olson, W. O., y Mapletoft, R. J. (2002). The use of progestins in regimens for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Theriogenology*, *57*(3), 1049-1059.
- Matsui, M., y Miyamoto, A. (2009). Evaluation of ovarian blood flow by colour Doppler ultrasound: practical use for reproductive management in the cow. *The Veterinary Journal*, *181*, 232-240.

- Mattioli, M., Barboni, B., Turriani, M., Galeati, G., Zannoni, A., Castellani, G., . . . Scapolo, P. A. (2001). Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. *Biology of Reproduction*, *65*, 1014-1019.
- Menchaca, A., Ibarra, D., y Jaureguy, F. (2006). El uso de eCG y gnrh asociado a un tratamiento con progesterona incrementa el porcentaje de preñez con iatf en vaquillonas de 15 meses. En *Jornadas Uruguayas de Buiatría* (Vol. XXXIV, pp. 202-203). Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú.
- Menzer, C., y Schams, D. (1979). Radioimmunoassay for PMSG and its application to in-vivo studies. *Journal of Reproduction y Fertility*, *55*(2), 339-345.
- Mihm, M., Austin, E. J., Good, T. E., Ireland, J. L., Knight, P. G., Roche, J. F., y Ireland, J. J. (2000). Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biology of Reproduction*, *63*, 811-819.
- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección General de Servicios Ganaderos. (2020, noviembre 12). Se suspende el uso de productos veterinarios que contengan Estradiol 17 β y sus derivados de tipo éster (Resolución N.º 269/020). Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/institucional/normativa/resolucion-n-269020-dgsg-se-suspende-uso-productos-veterinarios-contengan>
- Murphy, B. D. (2012). Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. *Animal Reproduction*, *9*(3), 223-230.
- Murphy, B. D. (2012). Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. *Animal Reproduction*, *9*(3), 223-230.
- Murphy, B. D., y Martinuk, S. D. (1991). Equine Chorionic Gonadotropin. *Endocrine Reviews*, *12*(1), 27-44.
- Newcomb, R., Christie, W. B., Rowson, L. E., Walters, D. E., y Bousfield, W. E. (1979). Influence of dose, repeated treatment and batch of hormone on ovarian response in heifers treated with PMSG. *Journal of Reproduction y Fertility*, *56*, 113-118.
- Pursley, J. R., Mee, M. O., y Wiltbank, M. O. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂, and GnRH. *Theriogenology*, *44*, 915-923.
- Quintans, G., y Vazquez, A. (2002). Efecto del destete temporario y precoz sobre el periodo posparto en vacas primiparas. *Seminario Técnico Cria y Recría Ovina y Vacuna* (pp. 110-122). Tacuarembó-Treinta y Tres: INIA
- Rabaglino, M. B., Risco, C. A., Santos, J. E., y Thatcher, W. W. (2009). Estrategias de manejo para optimizar la eficiencia reproductiva en vaquillonas lecheras de reemplazo . En *VIII Simposio Internacional de Reproducción Animal – IRAC* (pp. 179-182). Córdoba, Argentina.
- Ré, M. G. (2018). *Tratamientos que prolongan el proestro usando estradiol y progesterona en vaquillonas de leche* (Tesis de maestría). Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba.
- Repetto, J. L., Mendoza, A., Antunez, G., y Cajarville, C. (2016). Nuevos paradigmas en la cría y recría de hembras lecheras. En *XLIV Jornadas Uruguayas de Buiatría* (pp. 34-41). Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú.

- Rodriguez-Zamora, L. A., Abuelo, A., Bejar, J. P., Cazapal, C. F., Lopez, L., Pérez, A., . . . Quintela, L. A. (2012). *El uso de la ecografía doppler color en el control reproductivo vacuno*. Recuperado de http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/ecografia_ultrasonido/78-color.pdf
- Rubio Marco, I., Tirapu Tapiz, M., Gómez Herrero, H., y Zabalza Unzué, J. (2014). *Ecografía Doppler: Principios básicos y guía práctica para residentes*. Recuperado de <https://epos.myesr.org/poster/esr/seram2014/S-0379>
- Sá Filho, M. D., Crespilho, A. M., Santos, J. E., Perry, G. A., y Baruselli, P. S. (2010). Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Animal Reproduction Science*, 120(1-4), 23-30.
- Saint-Dizier, M., Foulon-Gauze, F., Lecompte, F., Combarrous, Y., y Chopineau, M. (2004). Cloning and functional expression of the equine luteinizing hormone/chorionic gonadotrophin receptor. *Journal of Endocrinology*, 183, 551-559.
- Sartori, R., Rosa, G. J., y Wiltbank, M. C. (2002). Ovarian structure and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science*, 85, 2813-2822.
- Sejrsen, K., y Purup, S. (1997). Influence of prepubertal feeding level on milk yield potential of dairy heifers: A Review. *Journal of Animal Science*, 73(3), 828-835.
- Siddiqui, M. A., Almamun, M., y Ginther, O. J. (2009). Blood flow in the wall of the preovulatory follicle and its relationship to pregnancy establishment in heifers. *Animal Reproduction Science*, 113, 287-292.
- Squires, L., García, M. C., y Ginther, O. J. (1974). Effects of pregnancy and hysterectomy on the ovaries of pony mares. *Journal of Animal Science*, 38(4), 823-830.
- Tovío Luna, N. (2011). *Efectos de la aplicación de eCG (Día 5 u 8) sobre el desarrollo del cuerpo lúteo, nivel de progesterona y tasa de preñez en hembras receptoras de embriones bovinos* (Tesis de maestría). Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Tscherig, B. B. (2019). *Gestación y causa de aborto en equinos II* (Informe final). Universidad Nacional de Río Negro, Choele Choe. Recuperado de <https://rid.unrn.edu.ar/bitstream/20.500.12049/2601/1/Tscherig%2C%20Betiana.pdf>
- Vasconcelos, J. L., Sartori, R., Olivera, H. N., Guenther, J. G., y Wiltbank, M. C. (2001). Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*, 56, 307-314.
- Wiltbank, J. N., Rothlisberger, J. A., y Zimmerman, D. R. (1961). Effect of human chorionic gonadotrophin on maintenance of the corpus luteum and embryonic survival in the cow. *Journal of Animal Science*, 20, 827-829.

