

**EFFECTO DE DOS SALES DE ESTRADIOL APLICADAS AL  
FINALIZAR UN TRATAMIENTO CON PROGESTÁGENOS  
SOBRE LA DINÁMICA FOLICULAR, OVULACIÓN Y  
FERTILIDAD EN VACAS PARA CARNE**

**Pablo Esteban Vispo**

Trabajo de tesis para ser presentado como requisito parcial para optar al  
título de MAGISTER SCIENTICIAE EN PRODUCCIÓN ANIMAL  
Orientado en Reproducción

**Unidad Integrada Balcarce**

(Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Instituto Nacional de Tecnología  
Agropecuaria-Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Mar del Plata)

**Balcarce, Argentina**

**EFFECTO DE DOS SALES DE ESTRADIOL APLICADAS AL  
FINALIZAR UN TRATAMIENTO CON PROGESTÁGENOS  
SOBRE LA DINÁMICA FOLICULAR, OVULACIÓN Y  
FERTILIDAD EN VACAS PARA CARNE**

**Pablo Esteban Vispo**

**Comité Consejero**

.....

Ricardo H. Alberio MV. Ph. D  
Director de Tesis

.....

Juan F Aller MV. M. Sc.  
Co-Director de Tesis

.....

Rodolfo C. Stahringer MV. Ph. D.  
Co- Director de Tesis

**EFFECTO DE DOS SALES DE ESTRADIOL APLICADAS AL  
FINALIZAR UN TRATAMIENTO CON PROGESTÁGENOS  
SOBRE LA DINÁMICA FOLICULAR, OVULACIÓN Y  
FERTILIDAD EN VACAS PARA CARNE**

**Pablo Esteban Vispo**

**Aprobado por:**

.....  
**Daniel Cavestany MV. Ph. D.**  
Evaluador Externo

.....  
**Santiago Callejas MV. M. Sc. Dr.**  
Evaluador Externo

.....  
**Julián Bartolomé MV. Ph. D.**  
Evaluador Externo

## DEDICATORIA

Para Amanda Candela la luz y la fuerza de mi vida con todo el cariño del mundo tu papá.

## **AGRADECIMIENTOS**

A todo el grupo de Reproducción de la EEA Balcarce que en mayor o menor medida ayudaron a que pueda realizar la experiencia.

Un especial agradecimiento a mi Director el Dr Ricardo Alberio por la posibilidad de integrar en parte ese maravilloso grupo de trabajo.

## ÍNDICE

	Página
Índice de Cuadros	ix
Índice de Figuras	xi
Resumen	xiii
Abstract	xv
1 INTRODUCCIÓN	1
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Ciclo estral del Bovino	3
2.1.1 Generalidades	3
2.1.2 Crecimiento y Dinámica folicular bovina	4
2.2 Anestro posparto	7
2.2.1 Generalidades	7
2.2.2 Fisiología del anestro posparto	7
2.2.3 Dinámica folicular en el anestro posparto	10
2.3 Tratamientos Hormonales y manipulación del desarrollo folicular para la realización de una IATF	11
2.3.1 Tratamientos con Prostaglandinas F2 $\alpha$ y sus análogos	12
2.3.2 Tratamientos que utilizan Hormona liberadora de Gonadotropinas (GnRH)	13
2.3.3 Tratamientos que utilizan Progesterona/Progestagenos y Estradiol	16
2.3.4 Tratamientos tendientes a minimizar la manipulación de los animales	20
1.1 Hipótesis	23
1.2 Objetivos	23
3 MATERIALES Y MÉTODOS	24

3.1 Aspectos Generales	24
3.1.1 Ubicación Geográfica	24
3.2 Tratamientos	24
3.3 Estudios Ecográficos	26
3.4 Muestreo Sanguíneo	27
3.5 Medición de progesterona plasmática	27
3.6 Análisis Estadísticos	27
4 RESULTADOS	29
4.1 ESTUDIOS REALIZADOS EN VACAS CICLICAS	29
4.1.1 Experimento 1	29
4.1.2 Resultados	30
4.1.3 Experimento 2	33
4.1.4 Resultados	34
4.1.5 Experimento 3	37
4.1.6 Resultados	37
4.2 ANIMALES EN ANESTRO POSPARTO	41
4.2.1 Experimento 4	41
4.2.2 Resultados	42
4.2.3 Experimento 5	45
4.2.4 Resultados	46
4.2.5 Experimento 6	49
4.2.6 Resultados	50
5 ENSAYOS DE FERTILIDAD	54
5.1 Experimento 7	54
5.2 Resultados	55
5.3 Experimento 8	56

5.4 Resultados	57
7 DISCUSIÓN	59
8 CONCLUSIONES	77
9 BIBLIOGRAFÍA	78



## INDICE DE CUADROS

	Pagina
<b>Cuadro 1.</b> Diámetro (mm) del folículo dominante y ovulatorio ( $X \pm EE$ ) luego de un tratamiento Indugest Plus, y BE ó CPE a las 0 ó 24 horas de retirado el dispositivo.	30
<b>Cuadro 2.</b> Diámetro (mm) del folículo ovulatorio ( $X \pm EE$ ), después de un tratamiento Indugest Plus según el tipo sal utilizada, BE ó CPE.	30
<b>Cuadro 3.</b> Tasa de ovulación en porcentaje (vacas que ovularon/vacas tratadas) hasta las 96 horas luego de un tratamiento Indugest Plus y BE ó CPE aplicado a las 0 ó 24 hs del retiro de la esponja según si tuvieron o no un cuerpo lúteo al finalizar el tratamiento	32
<b>Cuadro 4.</b> Tasa de ovulación en presencia de un CL (vacas que ovularon/vacas con ó sin CL al retirar la esponja)	32
<b>Cuadro 5.</b> Tasa de crecimiento (mm/día) del folículo dominante ( $X \pm EE$ ) luego de un tratamiento con Indugest Plus y BE ó CPE al retirar el dispositivo ó 24 horas más tarde	33
<b>Cuadro 6.</b> Diámetro (mm) del folículo dominante y ovulatorio ( $X \pm EE$ ) luego de un tratamiento con Indugest Plus, y BE ó CPE a las 0 ó 24 horas de retirado el dispositivo	34
<b>Cuadro 7.</b> Tasa de ovulación (%) (vacas que ovularon/vacas tratadas) hasta las 96 horas luego de un tratamiento Indugest Plus y BE ó CPE aplicado a las 0 ó 24 h de retirado el dispositivo según si tuvieron o no un cuerpo lúteo al finalizar el mismo	36
<b>Cuadro 8.</b> Tasa de ovulación en presencia de un CL (vacas que ovularon/vacas con o sin CL al retirar la esponja)	36
<b>Cuadro 9.</b> Tasa de crecimiento (mm/día) de los folículos ovulatorios ( $X \pm EE$ ), luego de un tratamiento Indugest Plus y BE ó CPE a las 0 ó 24 horas de finalizado el mismo	36
<b>Cuadro 10.</b> Diámetro (mm) del folículo dominante ( $X \pm EE$ ) al retiro del dispositivo, luego de un tratamiento con DIB para la sincronización de celo, según la presencia de un cuerpo lúteo	38
<b>Cuadro 11.</b> Diámetro (mm) del folículo dominante y ovulatorio ( $X \pm EE$ ) luego de un tratamiento con un dispositivo conteniendo progesterona, y BE ó CPE a las 0 ó 24 horas de retirado el dispositivo	38
<b>Cuadro 12.</b> Tasa de ovulación (%) (vacas que ovularon/vacas tratadas) hasta las 96 horas luego de un tratamiento con DIB y BE o CPE aplicado a las 0 ó 24 horas de retirado el dispositivo según si tuvieron o no un cuerpo lúteo al finalizar el mismo	40

<b>Cuadro 13.</b> Tasa de ovulación en presencia de un CL (vacas que ovularon/vacas con o sin un CL al retirar el dispositivo)	40
<b>Cuadro 14.</b> Tasa de crecimiento de los folículos ovulatorios (mm/día) ( $X \pm EE$ ) luego de un tratamiento con progesterona por 8 días y BE o CPE a las 0 o 24hs de finalizado el mismo	40
<b>Cuadro 15.</b> Diámetro (mm) de folículos dominante y ovulatorio ( $X \pm EE$ ) después del protocolo Indugest Plus y BE ó CPE aplicado a las 0 ó 24 horas de finalizado el mismo	42
<b>Cuadro 16.</b> Tasa de ovulación (vacas que ovularon/vacas tratadas) hasta las 96 horas luego de un tratamiento Indugest Plus y BE ó CPE aplicado a las 0 ó 24 horas después de finalizado el mismo	44
<b>Cuadro 17.</b> Tasa de crecimiento (mm/día) de los folículos ovulatorios ( $X \pm EE$ ), luego de un tratamiento Indugest Plus y BE o CPE a las 0 o 24hs de finalizado el mismo	44
<b>Cuadro 18.</b> Diámetros (mm) de los folículos dominante y ovulatorio ( $X \pm EE$ ) luego del tratamiento Indugest Plus y BE o CPE aplicado al finalizar el mismo	47
<b>Cuadro 19.</b> Tasa de ovulación (vacas que ovularon/vacas tratadas) hasta las 96 horas luego de un tratamiento Indugest Plus y BE o CPE aplicado al momento de finalizado el mismo	48
<b>Cuadro 20.</b> Tasa de crecimiento (mm/día) de los folículos ovulatorios ( $X \pm EE$ ), luego de un tratamiento Indugest Plus y BE o CPE a las 0 o 24 horas de finalizado el mismo	48
<b>Cuadro 21.</b> Diámetro de folículos dominante y ovulatorio ( $X \pm EE$ mm) después del protocolo DIB por 8 días y BE o CPE aplicado a las 0 o 24 horas de finalizado el mismo	50
<b>Cuadro 22.</b> Tasa de ovulación (vacas que ovularon/vacas tratadas) hasta las 96 horas luego de un tratamiento con DIB y BE o CPE aplicado a las 0 u 24 horas después de finalizado el mismo	52
<b>Cuadro 23.</b> Tasa de crecimiento de los folículos ovulatorios ( $X \pm EE$ ), luego de un tratamiento con progesterona por 8 días y BE o CPE a las 0 o 24 horas de finalizado el mismo	52

## INDICE DE FIGURAS

	Pagina
<b>Figura 1.</b> Representación esquemática del protocolo Indugest Plus con los 4 grupos experimentales	25
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática del protocolo DIB con los 4 grupos experimentales	26
<b>Figura 3.</b> Momento de la ovulación en horas ( $X \pm EE$ ) después de un tratamiento Indugest Plus y BE o CPE aplicados al retirar el dispositivo o 24 horas más tarde	31
<b>Figura 4.</b> Distribución de las ovulaciones después de un tratamiento Indugest Plus y BE ó CPE aplicado a las 0 ó 24 horas de finalizado el mismo	32
<b>Figura 5.</b> Momento de la ovulación ( $X \pm EE$ ) después de un tratamiento con progestágeno de 8 días y BE o CPE aplicado a las 0 ó 24hs de finalizado el mismo	35
<b>Figura 6.</b> Distribución de las ovulaciones luego de un tratamiento con Indugest Plus y BE o CPE a las 0 ó 24 horas	35
<b>Figura 7.</b> Momento de la ovulación ( $X \pm EE$ ) después de un tratamiento con progesterona de 8 días y BE ó CPE aplicado a las 0 ó 24 horas de finalizado el mismo	39
<b>Figura 8.</b> Distribución de las ovulaciones luego de un tratamiento con DIB y BE ó CPE aplicado a las 0 ó 24 horas después de finalizado el mismo	39
<b>Figura 9.</b> Momento de la ovulación ( $X \pm EE$ ) después de un tratamiento con Indugest Plus y BE ó CPE aplicado a las 0 ó 24 horas de finalizado el mismo	43
<b>Figura 10.</b> Número de vacas ovuladas y su distribución durante 96 horas luego del tratamiento con Indugest Plus y BE ó CPE aplicado a las 0 ó 24 horas de finalizado el mismo	43
<b>Figura 11.</b> Concentración media de progesterona (ng/ml) plasmática en animales que ovularon y que no ovularon ( $X \pm EE$ ) luego de un tratamiento con Indugest plus de 8 días de duración	45
<b>Figura 12.</b> Momento de la ovulación en horas según el tipo de sal utilizada ( $X \pm EE$ ) luego de un tratamiento con Indugest Plus	47
<b>Figura 13.</b> Distribución de las ovulaciones luego del tratamiento con Indugest Plus y BE ó CPE al momento de retirar el dispositivo	48

- Figura 14.** Momento de la ovulación después de un tratamiento con progesterona de 8 días y BE o CPE aplicado a las 0 ó 24 horas de finalizado el mismo 51
- Figura 15.** Distribución de las ovulaciones luego de un tratamiento con DIB y BE ó CPE aplicado a las 0 ó 24 horas después de finalizado el mismo 51
- Figura 16.** Concentración media de progesterona plasmática y CL de vida media normal luego de un tratamiento con progesterona de 8 días de duración (Día 0= retiro del dispositivo) 53
- Figura 17.** Concentración media de progesterona plasmática (ng/mL) determinada en animales según hallan ovulado o no ( $X \pm EE$ ). Luego de un tratamiento con progesterona de 8 días de duración e inyectado BE ó CPE en ese momento ó 24 horas más tarde 53
- Figura 18.** Tasa de preñez (número de vacas que se preñaron/número de vacas con diagnóstico de gestación) después de un tratamiento de 8 días con progesterona o progestágeno y BE o CPE aplicado a las 0 ó 24 horas de finalizado el mismo 56
- Figura 19.** Tasa de preñez (número de vacas que se preñaron/número de vacas con diagnóstico de gestación) después de un tratamiento con progesterona de 8 días y BE o CPE aplicado a las 0 ó 24 hs de finalizado el mismo 58

## RESUMEN

El objetivo de los siguientes trabajos fue estudiar la dinámica folicular final, la ovulación y la fertilidad en vacas para carne, después de un tratamiento con dispositivos impregnados con acetato de medroxiprogesterona (MAP) o progesterona natural (P4) y la aplicación de benzoato o cipionato de estradiol (BE o CPE) en dos momentos respecto al retiro de los dispositivos. Para ello se realizaron 8 experimentos (E), 6 para estudios de parámetros fisiológicos, diámetro del folículo dominante (FD) y ovulatorio (FO), tasa de crecimiento del FO, momento y porcentaje de ovulación (O). Tres de estos estudios fueron con vacas ciclando y sin ternero y 3 con vacas en anestro con cría al pie. Los otros estudios se realizaron en establecimientos agropecuarios para estudios de fertilidad. Los animales de los E 1, 2, 4 y 5 se sincronizaron mediante el protocolo denominado como **Indugest plus**, que consistió en la colocación durante 8 días de esponjas intravaginales de poliuretano impregnadas con 200mg de MAP. Junto con la colocación de la esponja las vacas fueron inyectadas (IM) con 10mg de MAP y 3mg de BE disueltos en aceite de girasol (Solución Indugest 1). En los experimentos con vacas cíclicas se inyectó (IM) 0,150mg de D-(+)-Cloprostenol sódico (Cloprostenol, PAUL) al retirar los dispositivos. Al momento de retirar el dispositivo (día 8) los animales fueron distribuidos al azar para recibir 0,7mg de BE (Solución Indugest 2) o 0,5mg de CPE (König, Argentina) vía intramuscular en ese mismo momento o 24 horas más tarde. Los animales de los E 3 y 6 fueron tratados con el protocolo denominado como **DIB** (Syntex, Argentina) que consistió en la aplicación durante 8 días de dispositivos de silicona inerte, conteniendo 0,5 g de progesterona más inyección (IM) con 2mg de BE (Syntex) (día 0). Al momento de retirar los dispositivos (día 8) se aplicó IM 400µg de Cloprostenol sódico (Ciclase DL, Syntex) a los animales del E 3 (vacas cíclicas) pero no en el E 6 de vacas en anestro. Como en el caso anterior, los animales fueron asignados al azar para ser inyectados con 1mg de BE (Syntex) ó con 0,5mg de CPE (Syntex), en el momento de retiro del dispositivo ó 24 horas más tarde. La tasa de ovulación se analizó mediante una tabla de contingencia utilizando la distribución Chi cuadrado y la corrección de Fisher si fuera necesario, mediante el procedimiento **FREQ**. Las variables continuas fueron analizadas mediante ANOVA utilizando el procedimiento **GLM**. La fertilidad fue analizada mediante el procedimiento **GENMOD**, todas las variables fueron analizadas con el paquete estadístico SAS (1998). En las vacas cíclicas, no se observaron diferencias estadísticas significativas ( $p > 0,05$ ) entre

tratamientos, en el diámetro del FD al retiro de los dispositivos, en el diámetro del FO, la tasa de crecimiento del FO, ni en el momento ni la tasa de ovulación. Se observó efecto del CL ( $p=0,0006$ ) y ( $p=0,002$ ) en los E 2 y 3 respectivamente sobre el diámetro del folículo dominante. En las vacas en anestro posparto del E 6, hubo diferencia significativa ( $p=0,0006$ ) en la tasa de ovulación, donde ni un animal del tratamiento CPE24 ovuló, en el tiempo establecido de observación. Además el tratamiento BE0 adelantó el momento de la ovulación respecto de los otros tratamientos que ovularon. La tasa general de preñez en los E 7 y 8 fue respectivamente del 38,3% y de 49,7%. No hubo efecto ( $p>0,05$ ) del tratamiento sobre la tasa de preñez en ambos E. La aplicación de (BE) como (CPE) a las 0 ó 24 horas de finalizado un tratamiento intravaginal con MAP o P4, no afecta el diámetro, el momento, ni la tasa de ovulación, de los folículos ovulados en vacas sin cría al pie. Al tratar animales en anestro posparto con el mismo esquema, el tratamiento CPE aplicado a las 24 horas de retirada la fuente de progesterona puede tener el efecto de estimulación no adecuado. Es posible obtener tasas de preñez del 40% en una IATF realizada a las 48-49 horas después de finalizado un tratamiento con progestágenos. La aplicación de BE o CPE a las 0 horas de finalizado el tratamiento, no tuvo efectos diferentes en la tasa de preñez de vacas con cría al pie.

**Palabras clave:** acetato de medroxiprogesterona, benzoato de estradiol, cipionato de estradiol, vacas cíclicas, vacas en anestro.

## ABSTRACT

Effect of two estradiol salts injected at the end of a progesterone treatment on follicular dynamic, ovulation and fertility in beef cows

The objectives of this work were to study the final follicular growth, ovulation time and fertility in cyclic and anestrous suckled cows after receiving treatment with a intravaginal device impregnated with medroxyprogesterone acetate (MAP) or natural progesterone (P4) and the injection of estradiol benzoate (EB) or cypionate (EC) at two different times respect of the device removal. A total of eight experiments (E) were designed, six for physiological parameters studies, such as dominant follicle (DF) and ovulatory follicle (OF), follicular diameter, growth rate of the ovulated follicles and ovulation time (O). Three of those studies were conducted in cycling cows and three in anestrous suckled cows. The other two studies were made under farm conditions to study fertility. Animals in E 1, 2, 4, and 5 were treated with a protocol named **Indugest plus**. The cows received intravaginal sponges impregnated with 250 mg of MAP for 8 days plus an intramuscular injection of 10 mg of MAP and 3 mg of BE in sunflowers oil (Indugest 1 solution) at day 0. In E 1 and 2, the cows received an injection of 0,150 mg de D-(+)-Cloprostenol (PAUL, Argentina) at the device withdrawal. In the 8<sup>th</sup> day animals were randomly distributed to receive an intramuscular injection of 0.7 mg of EB (Indugest 2 solution) or 0.5 mg of EC (König, Argentina) at that moment or 24 h later. Animals in the E 3 and 6 were treated with a protocol named **DIB** (Syntex, Argentina). The cows received a silicon intravaginal device containing 0.5 g of progesterone for 8 days plus an intramuscular injection with 2 mg of EB (Syntex, Argentina) at day 0. At the device withdrawal (day 8) animals in E 3 (cycling cows) received 400 µg of Cloprostenol (Ciclase DL, Syntex). The cows of both E were randomized to received 1 mg of EB (Syntex, Argentina) or 0.5 mg de EC (Syntex, Argentina) at the device withdrawal or 24 h later. The ovulation was analyzed with Chi square test and Fischer's corrections were done when necessary, by FREC procedure. The continuous variable data were analyzed by ANOVA using the general lineal model procedure. The fertility was analyzed by GENMOD procedure, all variables were analyzed with SAS programs. In cyclic cows there were no statically differences ( $p>0.05$ ) between treatments for FD or FO diameter, growth rate of the OF, time and ovulation rates. We observed an effect of CL ( $p=0,0006$ ) and ( $p=0,002$ ) in E 2 and in E 3 respectively on the FD diameter. In postpartum anestrous cows in E6 a

statistical difference was observed ( $p=0.0006$ ) in the ovulation rate, where no animal in the EC24 ovulated at least in the observation period. Although treatment EBO accelerated the moment of ovulation respect the other treatments that ovulated. The overall pregnancy rate of experiments 7 and 8 were 38.3 and 49.7% respectively. No treatments effects were observed ( $p>0.05$ ) on the pregnancy rate of both experiments. In conclusion, the injection of EB or EC at 0 or 24 h after the end of an intravaginal treatment with MAP or P4 did not affect the follicle diameter and ovulation rate in cycling cows. However, when postpartum anestrous suckled cows were treated the treatment EC24 did not have an appropriate stimulatory effect. It is possible to obtain pregnancy rate of 40% with artificial insemination performed between 48 and 49 hs after the end of either MAP or P4 treatment. The injection of EB or EC at the device removal (0 h) had no effect on the pregnancy rate in suckled cows.

**Key words:** medroxiprogesterone acetate, estradiol benzoate, estradiol cypionate, cyclic cows, anestrous cows.



## INTRODUCCIÓN

En Argentina, el uso de la Inseminación Artificial (IA) fue desarrollado a partir de 1960. Por razones de manejo, estuvo durante muchos años restringida a las vaquillonas y vacas secas, puesto que la detección de celo diaria en vacas con cría es dificultosa y genera pérdidas, tanto a nivel de los terneros como de las pasturas sobre las que se realiza este manejo (Alberio, 2001).

Por otra parte, situaciones como campos con monte, falta de potreros que reducen la eficiencia de la detección de celo, falta de equipamiento apropiado, poco interés del productor de mantener servicios de IA durante 60 ó 90 días, sumados a la dificultad de aplicar la tecnología a vacas con cría al pie, ha significado un retroceso en el uso de la técnica hacia fines del siglo XX.

Sin embargo, estas mismas razones han contribuido a estimular el desarrollo de tratamientos que permiten la IA sin necesidad de detectar celos, ya que son capaces de inducir y agrupar celos y ovulaciones, tanto de vacas con cría como de otras categorías del rodeo como vaquillonas de 15 meses (Alberio, 2003).

Estos tratamientos se asocian, normalmente, con la práctica denominada Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF) en la cual es condición fundamental para su éxito, una buena sincronización de la ovulación. Estas tecnologías asociadas (tratamientos de sincronización e IATF), son capaces de resolver en buena medida las condiciones arriba mencionadas que constituyen los aspectos más limitantes de los programas de la IA convencional.

Si bien existen muchos esquemas farmacológicos de control del ciclo estral (Pursley et al., 1995; Martínez et al., 2001; Thatcher et al., 2002; Bó et al., 2003; Colazo et al., 2004a), uno de los más difundidos en nuestro país es el que implica la utilización de un dispositivo intravaginal de liberación controlada de progestágeno/progesterona durante un período de 7 a 9 días. Asociado con esto, se realiza la administración de estradiol por vía intramuscular (IM) tanto al momento de colocar el dispositivo como al momento de su extracción. En el primer caso, para controlar la onda folicular presente y en el segundo, para estimular el pico preovulatorio de LH y actuar en forma directa sobre el crecimiento folicular final y la ovulación (Day, 2004; Bó et al., 2005). Esta aplicación de estradiol se hace por lo general 24hs después de retirado el dispositivo intravaginal. También al retirar el dispositivo se aplica PGF2 $\alpha$  para lisar el cuerpo lúteo presente si lo hubiere. Con este

esquema, la IATF suele realizarse a las 52-56 horas de retirado el dispositivo, por lo que el esquema completo implica 4 movimientos de los animales (colocación del dispositivo, retiro del dispositivo, inyección de estradiol e IATF).

El grupo de biotecnología de la reproducción del INTA Balcarce, desarrolló una modalidad equivalente, utilizando un dispositivo de poliuretano embebido con acetato de medroxiprogesterona (MAP), acompañado con una inyección de MAP y benzoato de estradiol (BE). A la extracción del dispositivo se realiza una segunda administración de BE, produciendo tasas de ovulación y preñez semejantes a la logradas cuando el BE es inyectado a las 24 horas (Ross et al., 2004; Manes et al., 2007) reduciendo la manipulación de los animales en un 25%.

A pesar de esto, el momento óptimo de administrar la segunda dosis de estradiol continúa en discusión debido a los resultados dispares publicados por los distintos grupos de investigación, en cuanto al sincronismo de la ovulación y eventual tasa de preñez según sea que el BE sea aplicado al momento de retirar el dispositivo (hora 0) o a las 24hs (Bó et al., 2005).

Al aplicar la segunda dosis de BE a la hora 0 (al retiro del dispositivo), se estaría produciendo la inducción del crecimiento de folículos de menor tamaño y, en principio con menor capacidad ovulatoria (Sartori et al., 2001; Burke et al., 2001). Esto se traduciría en una menor sincronización de la ovulación (Cutaia et al., 2005) y, a causa de ello, la tasa de concepción podría verse afectada (Mussard et al., 2003; Perry et al., 2007). A pesar que esto es posible, la tasa de preñez no se ha visto afectada aplicando el BE a la hora cero y el argumento para ello sería que lo que se gana por el aspecto mencionado, se pierde por el mayor estrés a que son sometidos los animales en ese esquema. Como alternativa para cumplir con ambos conceptos, se ha postulado reemplazar al BE por el cipionato de estradiol (CPE). Este es un éster de estradiol de mayor vida media que el BE (Vynckier et al., 1990), que además simula de una manera equivalente los eventos que ocurren en forma espontánea (Chenault et al., 1975 citado por Stevenson et al., 2004). Por su mayor vida media podría entonces, proveer a los folículos de tiempo suficiente para su maduración final, antes de provocar el pico ovulatorio de LH, el cual también sería más sostenido. De esta manera podrían ser resueltos ambos problemas señalados posibilitando la inyección del CPE en la hora 0 (reducción de movimientos y de estrés) con una mejora de la actividad biológica por la mayor vida media de la droga.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Ciclo estral del bovino

#### 2.1.1. Generalidades

El ciclo estral (CE) se define como la sucesión de eventos que se dan entre dos períodos de receptividad sexual, tiene una duración de entre 17 y 25 días en el bovino, y se divide en dos fases: estrogénica o folicular (proestro, estro) y lútea o progestacional (metaestro y diestro).

El celo, estro o calor tiene una duración aproximada de 18 horas y se caracteriza por la aceptación de la hembra a ser montada por sus compañeras de rebaño o por el toro. La ovulación, en promedio, tiene lugar 12 horas después de la finalización del mismo.

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), sintetizada y secretada de forma pulsátil por el hipotálamo, estimula la síntesis y secreción de hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) por la hipófisis, las cuales regulan la función gonadal.

Las principales estructuras ováricas son los folículos, productores de estradiol (E2) y el cuerpo lúteo (CL) productor de progesterona (P4). Los esteroides ováricos afectan la secreción de gonadotropinas hipofisarias a través de mecanismo de retroalimentación negativa o positiva (Price y Webb, 1988; Fortune et al., 2004).

Para un análisis más detallado podemos dividir el ciclo estral en dos fases: la fase folicular, que incluye el período periovulatorio y la fase lútea.

En la fase folicular, debido a la lisis del CL, los niveles de P4 disminuyen a sus valores mínimos en 24 – 36 horas. A partir de este hecho que hace desaparecer el retrocontrol negativo de la P4 sobre hipotálamo e hipófisis, el incremento en la frecuencia de pulsos de LH/FSH y su liberación armónica por la hipófisis estimula el desarrollo, selección y desviación de un folículo, que secreta cantidades crecientes de E2 (Rivera, 1993; Ireland et al., 2000; Ginther et al., 2001). Particularmente, el patrón de secreción pulsátil de LH cambia en esta fase, haciéndose más frecuente y de mayor amplitud, llegando a 1 pulso de LH/FSH cada 60 min. El grado de desarrollo folicular al momento de la luteólisis determina el tiempo que transcurre hasta que un folículo completa su crecimiento y es capaz de producir cantidades suficientes de E2 como para iniciar el celo y la onda preovulatoria de LH. Precisamente esta última

etapa define el período periovulatorio en que se producen importantes fenómenos, como el inicio del celo, el pico preovulatorio de gonadotropinas y la ovulación

La base endocrina del celo se puede explicar por el incremento de estradiol producido en los folículos de rápido crecimiento y actuando con retroacción positiva sobre el hipotálamo. Estos estrógenos son los responsables del comportamiento estral y de la inducción del pico preovulatorio de LH (Gordon, 1997). El mecanismo de acción de los estrógenos durante este período es mediante el estímulo de la síntesis y secreción de GnRH por el hipotálamo y el aumento de la sensibilidad y número de receptores hipofisarios para dicha hormona.

El pico preovulatorio de LH es el responsable del crecimiento final del folículo dominante que se transformará en ovulatorio así como de la alta producción de E2 en este período (Ginther et al., 2001b) y de la ruptura del folículo ovulatorio y formación del CL. Comienza así la segunda fase o fase lútea. El CL alcanza su desarrollo completo durante la primera semana post ovulación, a partir de las células de la granulosa y teca del folículo ovulado formando los dos tipos de células esteroideogénicas, las células luteales grandes y las pequeñas. Ambas secretan P4 como principal producto y una serie de hormonas de relativa importancia como las prostaglandinas y la oxitocina.

La P4 prepara el endometrio para la implantación y mantiene la gestación. Si esta no sucede, la prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF) liberada desde el endometrio uterino durante el final de la fase lútea, será la responsable de la luteólisis y la consecuente disminución en la concentración de progesterona, creándose así las condiciones para una nueva ovulación.

### **2.1.2 Crecimiento y Dinámica Folicular en el bovino**

Durante la gametogénesis se dan dos procesos, la ovogénesis y la foliculogénesis. La foliculogénesis puede ser definida como la transformación que sufren los folículos desde una reserva de folículos primordiales hasta su participación en una onda folicular culminando con su ruptura y permitiendo la ovulación. La función principal del folículo ovárico es participar en el proceso de ovogénesis sirviendo de contenedor e interactuando en forma activa con el ovocito que se encuentra en su interior.

Los folículos primordiales se establecen en la vida fetal, no son renovables y son el punto de partida de la foliculogénesis. Se caracterizan por contener un ovocito inmaduro y una capa plana de células somáticas rodeándolo (Fortune, 2003). Una vez

que se establece la reserva de folículos primordiales y después del nacimiento, el crecimiento folicular es continuo, terminando en la ovulación del folículo maduro a partir de la pubertad o en la atresia del folículo y la muerte del ovocito en su interior (Picton, 2001). No está claro el proceso por el cual algunos folículos primordiales comienzan a crecer, pero aparentemente en esta etapa su crecimiento es independiente del estímulo de las gonadotropinas (Ireland et al., 2000; Fortune, 2003). A medida que avanzan en su crecimiento estos folículos adquieren sensibilidad a las gonadotropinas. Cada tanda de crecimiento de folículos se denomina onda folicular y esta es definida como el patrón cíclico de crecimiento sincrónico de un conjunto de folículos antrales (Ireland et al., 2000)

Durante un ciclo estral generalmente se dan 2 o 3 ondas de crecimiento folicular dependiente de gonadotropinas; cada onda de crecimiento folicular posee acontecimientos bien establecidos que son reclutamiento, emergencia, selección, desviación, dominancia (Driancourt, 2000; Fortune et al., 2004) y ovulación o atresia folicular. Esto último ocurre en los folículos que no ovulan (Sunderland et al., 1994).

Ginther et al. (1998) definieron la emergencia de una onda folicular, como el primer día en el que el futuro folículo dominante alcanza un diámetro de 4mm en bovinos. Este momento está asociado a un aumento previo en la concentración de FSH el cual está en el origen de la emergencia. La selección es el mecanismo por el cual, usualmente uno de varios folículos de una onda, alcanza la dominancia en especies monovulatorias. Este proceso culmina cuando el folículo de mayor tamaño continúa desarrollando pasando a convertirse en dominante y el resto reduce o cesa su crecimiento volviéndose subordinados, punto conocido como desviación. Esto se produce en promedio cuando los folículos de mayor diámetro poseen entre 7,7 y 8,5mm, aproximadamente 2 días luego de la emergencia.

El futuro folículo dominante emerge en promedio unas seis horas antes que el resto de los folículos de la onda (Ginther et al., 1997) y crece en paralelo con los folículos subordinados manteniendo unos 0,5mm de diferencia hasta la desviación, tiempo suficiente para establecer la dominancia. El pico de FSH que estimuló la emergencia de la onda, comienza a descender, y esto es atribuido a factores secretados por los folículos a partir del tamaño de 5mm tal como inhibina y estradiol. El descenso en la concentración de FSH parece ser clave en el proceso de desviación y en este proceso el FD es esencial ya que el mismo debe desarrollar la habilidad para suprimir la FSH circulante por debajo de las concentraciones requeridas por los otros

folículos pero manteniendo un nivel que permita su propio desarrollo (Ginther, 2000). Esto lo logra cambiando su sensibilidad a la hormona FSH por la mayor sensibilidad a LH. Algunos de los hechos que confirman esto son: 1) la concentración de LH aumenta aproximadamente unas 32 horas antes de la desviación, y se mantiene así unas 48 horas antes de descender, 2) los folículos no crecen más allá de los 7mm cuando se suprime la LH (Gong et al., 1995), 3) la vida del folículo dominante puede ser extendida mediante el incremento en la frecuencia de los pulsos de LH (Fortune et al., 1991) y 4) el folículo dominante expresa receptores para LH en concordancia con el momento de la desviación (Evans & Fortune, 1997).

Además de las hormonas gonadotróficas, se han detectado sistemas integrados por factores de crecimiento similar a insulina (IGF), que actuando en forma endocrina, autocrina y paracrina, estimulan la función ovárica, mediante sinergismo con las gonadotropinas para estimular el crecimiento y la esteroidogénesis de las células ováricas (Lucy, 2000). Este sistema integrado por IGF I e IGF II y sus receptores, está regulado por una serie de proteínas fijadoras de IGF (IGFBP) que se originan localmente en el ovario o provienen del flujo sanguíneo. Entonces la respuesta en última medida podría estar regida por la cantidad de IGFBP más que por la concentración de IGFs, ya que la concentración de IGF I y II absoluta en fluido folicular no cambia mayormente durante el desarrollo folicular. En cambio la concentración de IGFBP se altera drásticamente teniendo mayor concentración los folículos en atresia. Las IGFBP impiden la unión de las IGF a sus respectivos receptores, evitando un futuro crecimiento o diferenciación en folículos, experimentando atresia.

La cantidad de IGFBP, durante el crecimiento folicular, es controlada a dos niveles principalmente, durante la transcripción y a través de la degradación por proteasas.

Según Fortune et al. (2004), las proteasas están presentes en el fluido folicular de folículos dominantes, estrógeno-activos, las cuales degradan a las IGFBP manteniendo sus concentraciones bajas, permitiendo la acción de las IGF en estos.

Se llega así a un folículo que por su capacidad de producción de estrógenos es capaz de producir la onda preovulatoria de LH, la cual es seguida unas 10 a 20 horas más tarde por la ovulación.

El pico de LH causa, entre otras cosas, despolarización de las membranas plasmáticas de las células foliculares generando potenciales de acción y cambios en la concentración de  $Ca^{++}$  citosólico que contribuirían a la actividad degradativa de la colagenasa proveniente de los fibroblastos de la teca externa, disminuyendo el grosor

de la pared folicular (Espey, 1994). Además, se inhibe la síntesis de estradiol y comienza la síntesis de progesterona, hay mayor flujo sanguíneo en el folículo ovulatorio (simulando una reacción inflamatoria), se disocia el cumulus ooforus, se reanuda la meiosis y se libera el primer cuerpo polar.

A medida que avanza este proceso se forma el estigma y la ovulación sería producto de las contracciones ováricas provocadas por las PGF.

Después de la ovulación el ovocito detiene su actividad meiótica siendo liberado en metafase II. En la estructura folicular se produce una hemorragia profunda llenando la cavidad folicular y dando lugar al cuerpo hemorrágico.

## **2.2. Anestro Posparto**

### **2.2.1 Generalidades**

El anestro posparto es la ausencia de celo y ovulación posteriores al parto, o más precisamente, es el periodo que le toma a una hembra para restablecer los mecanismos neuroendocrinos que regulan la función reproductiva después del parto (Yavas & Walton, 2000). Su duración es muy variable en los bovinos y particularmente en aquellos que amamantan a sus crías en los cuales, en condiciones adecuadas de alimentación y manejo, se reestablece la actividad sexual entre los 50 y 100 días (Rhodes et al., 2003). Este estado de anestro está producido principalmente por el amamantamiento y modulado por otros factores (nutrición, edad, época del año, raza, etc.) quienes son los causantes de tales grandes variaciones (Short et al., 1990).

Este período de reposo sexual tiene especial importancia en la eficiencia reproductiva de un rodeo de cría, ya que su duración condiciona el intervalo entre partos, considerando que el objetivo de un sistema eficiente es lograr un ternero por vaca por año.

### **2.2.2 Fisiología del Anestro Posparto**

Luego del parto, y cumplidas las etapas de amamantamiento y cuidado de sus crías, la hembra cambia su estrategia reproductiva que hasta ese momento fue de reposo sexual al restablecimiento de la actividad para posibilitar una nueva preñez. Es así que la relativa inactividad ovárica que prevaleció durante la preñez tardía (presencia de ondas incompletas ya que no llegan a la ovulación), debe ser remplazada por una secuencia de eventos, que culmine con el estro, la ovulación de un folículo sano y el desarrollo de una función luteal normal (Rhodes et al., 2003).

Durante el período posparto se llevan a cabo importantes cambios anatómicos y fisiológicos que llevan a restablecer la capacidad reproductora de la hembra bovina.

Este período comprende dos procesos que se dan en simultáneo, la involución uterina y la restitución del eje hipotálamo-hipófisis-ovario.

Inmediatamente después del parto, comienza la involución uterina que incluye pérdida y reparación de tejidos (Yavas & Walton, 2000a), proceso que demora unos 20 o 30 días (Short et al., 1990).

Las hormonas implicadas en este proceso son la oxitocina y la PGF2 $\alpha$  principalmente. La oxitocina es liberada en respuesta al estímulo táctil de la ubre, y a su vez está vinculada con la liberación de PGF2 $\alpha$  por parte del endometrio uterino. La involución uterina parece ser dependiente de la magnitud y concentración de esta última hormona y es por ello que las vacas que amamantan, tienen una involución uterina más rápida que las que no lo hacen.

Durante este período el útero sería una barrera no solo al paso de espermatozoides sino también a la implantación (Short et al., 1990). Sin embargo, la involución uterina no afecta, por sí misma, la duración del anestro posparto. Además, en vacas que amamantan, no va a interferir con la una nueva preñez (salvo que coexistan problemas patológicos) debido a que muy pocos o ningún animal manifestará celo y ovulará con suficiente antelación como para que la involución interfiera en la concepción.

En cuanto a la restitución del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, este período puede a su vez ser dividido en tres etapas: la restitución del depósito de LH en la hipófisis anterior, el aumento de la sensibilidad del hipotálamo a la retroalimentación positiva de estrógeno y el escape del SNC de los efectos de la presencia y succión del ternero.

Si bien durante casi toda la gestación las ondas foliculares están presentes, en el último mes se producen desajustes entre los picos de FSH y la emergencia de folículos observándose picos sin emergencia notable de folículos de diámetro mayor a 5mm (Ginther et al., 1996). La causa aparente de esto sería que al final de la gestación, la concentración de gonadotrofinas es muy baja en sangre debido a que el eje hipotálamo-hipófisis-ovario se encuentra bajo el efecto de feedback negativo de los esteroides ováricos y placentarios E2; P4 (Rhodes et al., 2003). Esto causa una depresión en la liberación de GnRH por parte del hipotálamo y una disminución de la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH (Lamming et al., 1981). Esto resulta en la acumulación de FSH en la adenohipófisis por supresión en su liberación, en el



agotamiento de los depósitos de la fracción liberable de LH en la hipófisis anterior y en la supresión de la maduración folicular final (Yavas & Walton, 2000a).

Luego del parto y la consecuente desaparición del efecto negativo de la progesterona y estradiol que se encontraban elevados durante la preñez, se produce la reanudación temprana de los pulsos de FSH hacia el día 5 posparto (Rhodes et al., 2003; Ginther et al., 1996) que se mantendrá constante con fluctuaciones equivalentes a la de animales cíclicos. El crecimiento folicular ovárico se reanudará hacia el día 5 a 7 posparto.

Aparentemente la FSH requiere estimulación mínima por parte de la GnRH y como la supresión de la GnRH es incompleta se postula que esa temprana reanudación resulta de los pulsos iniciales de GnRH de baja frecuencia, mientras que los pulsos de LH se reanudan en forma posterior cuando la frecuencia de los pulsos es mayor. Por esto es que no se considera a la hormona FSH sea una limitante para el reinicio de la ciclicidad ovárica.

Por el contrario, al momento del parto el reservorio de LH en la hipófisis se encuentra agotado y gradualmente se incrementa, recuperándose entre los días 15 a 30 posparto (Yavas & Walton, 2000a). Este tiempo será de mayor duración en las vacas que amamantan por las restricciones que este acto ejerce sobre el SNC. Short et al. (1990) definieron a la baja concentración sérica de LH, debida a una baja frecuencia pulsátil, como el principal defecto endocrino que existe en el anestro posparto. Según Nett (1987) el agotamiento del depósito de LH en la hipófisis sería el principal factor que limitaría a la reanudación de la ciclicidad en el posparto temprano o dicho de otra manera, el agotamiento de la LH en hipófisis anterior es la principal causa de la falta de reanudación en los pulsos de LH y ovulación en el posparto temprano. Este efecto próximo al parto es independiente del mamado. La reanudación de los pulsos de LH resulta en el aumento de la concentración media de LH circulante, y su recuperación en el posparto de vacas es similar a la de los animales en la pubertad. De la misma manera que el incremento en la frecuencia de LH es seguido del pico preovulatorio y ovulación en animales cíclicos, la reanudación de los pulsos de LH es un requisito para la recuperación de los ciclos en animales en anestro. El aumento de los pulsos de LH lleva a la presencia del pico preovulatorio y la ovulación de un folículo dominante (Walters et al., 1982a).

Luego del restablecimiento del reservorio de LH en la hipófisis, la falta de concentración adecuada de LH para el restablecimiento de la ciclicidad se hace

dependiente del amamantamiento y por ello en las vacas lecheras la restauración de la actividad sexual es muy temprana. En las vacas con ternero, cualquier tipo de destete (cuanto más intenso, más efectivo), incrementa los pulsos de LH (Walters et al., 1982b), produciendo la ovulación a los pocos días (Quintans et al., 2004). La supresión en la descargas de LH por el mamado, se efectúa a través de la inhibición de las descargas de GnRH del hipotálamo. El mamado sensibiliza al hipotálamo al feedback negativo de los estrógenos ováricos, acción modulada por péptidos opiodes endógenos (endorfinas y encefalinas), liberados en el cerebro. Este mecanismo va disminuyendo en magnitud con el paso del tiempo y al cada vez menor vínculo materno-infantil (Short et al., 1990).

Aparentemente el lazo existente entre madre e hijo juega un rol preponderante en esta inhibición y, como se dijo más arriba, sería el factor determinante en la duración del anestro posparto (Stagg et al., 1998), siendo el nivel nutricional posparto un modulador del mismo. Sanz et al. (2003) proponen también a la conducta materna de ciertos biotipos como factor importante en el restablecimiento de los pulsos de LH, causando en las vacas con mayor habilidad materna un anestro posparto más profundo y por ende un intervalo posparto mayor.

### **2.2.3 Dinámica Folicular en el anestro posparto**

Desde el punto de vista ovárico, los folículos dominantes son detectados a partir de la 2da o 3ra semana posparto. Sin embargo estos folículos generalmente no ovulan (debido al déficit de LH) y se atresian, comenzando así una nueva onda. La presencia de folículos dominantes así como su tasa de crecimiento, van incrementando a medida que transcurre el período posparto. En vacas de aptitud carnífera que amamantan a sus crías, varias ondas foliculares preceden a aquella que va a culminar con la ovulación de un folículo dominante en el posparto (Murphy et al., 1990). La ovulación del folículo dominante se produce cuando su producción de estradiol será suficiente como para producir el pico preovulatorio de LH y FSH en una hipófisis susceptible a responder a este estímulo (Day, 2004).

La primera ovulación posparto generalmente no es precedida por celo (celo silencioso) y es seguida comúnmente por un ciclo de corta duración, debido a que el cuerpo lúteo formado es de vida corta (aproximadamente 8 días) (Foote & Hunter, 1964; Murphy et al., 1990; Rhodes et al., 2003).

Este fenómeno también es observado en animales en anestro inducidos a ovular con destete o con inyecciones de GnRH así como su combinación y también es lo que se observa en vaquillonas luego de su primera ovulación en la pubertad.

El CL formado durante un ciclo estral corto es más pequeño y produce menor cantidad de P4 (Rutter & Randel, 1984). Aunque las funciones de un CL en el postparto temprano son normales, este es destruido por concentraciones elevadas de PGF2 $\alpha$ , la cual es parte del mecanismo involucrado en la involución uterina.

La liberación prematura de PGF2 $\alpha$  por el útero, parece ser la principal causa de cuerpos lúteos de vida corta en la primera ovulación (Copellin et al., 1989; Zoller et al., 1989; Cooper et al., 1991; Short et al., 1990).

Las bajas concentraciones de progesterona y de estradiol antes de la primera ovulación, resultan en un menor número de receptores para progesterona y mayor número de receptores para oxitocina en el endometrio facilitando el desarrollo del feedback positivo entre la oxitocina y la PGF2 $\alpha$  (Zoller et al., 1993; Mann & Lamming, 2000).

Un aumento de la concentración de progesterona en el anestro posparto produce varios efectos tales como: promover la primera ovulación, favorecer la expresión de celo y generar una función lútea normal y reinicio de la ciclicidad. El tratamiento de vacas en anestro posparto con progesterona, produjo mayores cantidades de E2, tanto circulante como en el líquido folicular y aumento en la frecuencia de pulsos de LH y mayor expresión de receptores para LH en células de la granulosa y tecaes, de folículos preovulatorios, lo cual estimularía su desarrollo y maduración, resultando esto en un CL de funcionamiento y vida media normal (Yavas & Walton, 2000b).

### **2.3 Tratamientos hormonales y manipulación del desarrollo folicular para realizar una Inseminación Artificial a tiempo fijo**

Los sistemas económicos imperantes en la actualidad obligan a la aplicación de prácticas de manejo eficientes, a fin de mejorar la rentabilidad en las explotaciones ganaderas. La optimización de la eficiencia reproductiva es uno de los principales factores que contribuyen para mejorar el retorno económico (Bó et al., 2003; 2005). La inducción y sincronización de los celos es una de las prácticas que va en este sentido facilitando la utilización de reproductores superiores a través de la IA además de mejorar la eficiencia reproductiva acortando la duración del período de servicio y la parición (Odde, 1990). Esta práctica se puede llevar a cabo utilizando diferentes

estrategias basadas en los conocimientos de la endocrinología reproductiva tanto de los ciclos estrales normales como aquella que transcurre durante los períodos de anestro (posparto o prepuberal).

### **2.3.1 Tratamientos con prostaglandinas F2 $\alpha$ y sus análogos.**

Las propiedades luteolíticas de la prostaglandina y sus análogos han sido utilizadas para sincronizar el celo en bovinos. Sin embargo solo se ha logrado una agrupación de celos distribuidos en 6 días aproximadamente cuando es aplicada en animales con cuerpo lúteo (Odde, 1990; Macmillan & Burke, 1996). Si bien existen varias combinaciones posibles en la utilización de PGF $_{2\alpha}$  y sus análogos (PGF) para mejorar esta sincronía, generalmente no llegan a cumplir con el objetivo de producir un agrupamiento tal de los celos que permita la inseminación a tiempo fijo por lo que su uso implica la detección de celos. Por otra parte, su uso está regido por el estadio del ciclo al momento de la aplicación, no siendo efectiva su aplicación en provocar la luteólisis en cuerpos lúteos insensibles por falta de receptores (CL de menos de 5 días de vida). Para enmendar esta limitante, se desarrolló una estrategia con doble aplicación de PGF con un intervalo de 10 a 12 días lo que conduce a que todos los animales estarán en un estadio del ciclo capaz de responder con luteólisis a la segunda aplicación de PGF (Lauderdale et al., 1974; Rekwot et al., 1999). Sin embargo un intervalo de 14 días entre ambas aplicaciones se reportó como superior en cuanto a la tasa de concepción (Folman et al., 1990). Esto se debe a que el estadio del ciclo en que se aplica la PGF afecta la proporción de ganado manifestando estro así como el intervalo desde la aplicación hasta su manifestación. Bovinos inyectados entre los días 10 a 15 del ciclo estral tienen mayor respuesta y más tardía que animales inyectados los días 6 a 9 (Odde, 1990). Esta variación está modulada por el estado de desarrollo del folículo dominante al momento del tratamiento con PGF (Mapletof et al., 2005). También estos han sugerido que el intervalo se reduce en vaquillonas comparado con animales adultos.

Esta variación así como el incremento en la respuesta estral, han sido corregidas con diferentes combinaciones que implican la inyección de E2, GnRH o hCG, entre 24 y 48 horas luego de la administración de PGF aunque no se han logrado mejoras sistemáticas en la tasa de preñez después de una inseminación a tiempo fijo (Peters et al., 1977 citado por Odde; 1990. Macmillan & Burke, 1996). Otros autores han tenido

resultados inconsistentes generando dudas de los beneficios de las combinaciones de PGF y BE (Ryan et al., 1995).

En conclusión, la variabilidad en las respuestas así como la baja respuesta, y esto asociado con el hecho de la alta incidencia de inactividad sexual cíclica al comienzo de la época de servicio (50% aproximadamente, Day, 2004) han resultado en la necesidad de aplicación de otras variantes, más relacionadas con la inducción de los celos y al mismo tiempo con la capacidad de controlar la función lútea y el desarrollo folicular, posibilitando la aplicación de la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) sin detección de celos y con tasas de fertilidad cercanas a las naturales de la especie. Dentro de estas se encuentran el uso de GnRH, la asociación de progestágenos y estradiol y variantes dentro de estos esquemas generales

### **2.3.2 Tratamientos que utilizan Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)**

Uno de los aspectos que ha sido desarrollado en la década del 90 como elemento complementario de los tratamientos de inducción del celo existentes hasta entonces, fue intentar el control de la onda folicular de manera que al finalizar cualquier tratamiento puesto en marcha, el folículo ovulatorio fuese proveniente de una nueva onda. La mayoría de los estudios sobre este tema se focalizaron en remover el efecto supresor del folículo dominante y así permitir la emergencia de una nueva onda folicular en un momento específico luego del tratamiento (Bó et al., 1995). Para lograr este efecto sobre el FD se han evaluado diferentes alternativas.

La GnRH sintética estuvo disponible en la década del 70 como tratamiento para quistes foliculares. Posteriormente también fue determinado que la aplicación de una inyección de GnRH producía la ovulación del FD presente y en caso de su ausencia, la atresia de los folículos presentes en el ovario (Twagiramungu et al. 1995). Esto conduce a la aparición de una nueva onda folicular dentro de los dos días de aplicada la GnRH.

Un programa que tuvo éxito en la sincronización de la ovulación, para implementar la IATF, sin necesidad de la detección de celo es el Ovsynch, en el cual se inyecta GnRH y PGF en forma secuenciada, de la siguiente manera: una aplicación de GnRH 7 días previos a la inyección de PGF, y una segunda aplicación 48 horas posteriores a la PGF, seguida de la IATF unas 16 a 24 horas aproximadamente. (Pursley et al., 1995, Peters & Pursley, 2003, Thatcher et al., 2002). La primera inyección de GnRH debería producir la ovulación del folículo dominante presente (o la atresia de folículos

de gran tamaño) y el comienzo de una nueva onda folicular en 2 días aproximadamente. La aplicación de PGF tiene por objeto producir la luteólisis del CL formado y la segunda inyección de GnRH, producir una sincronización del pico de LH y la ovulación en un periodo de 8 horas (Pursley et al., 1995). Diferentes intervalos se han practicado entre la administración de la primera dosis de GnRH y la de PGF, también entre la PGF y la segunda dosis de GnRH y entre esta y el momento de la IA., lográndose la mejor tasa de concepción, cuando la PGF se aplicó a las 48 horas de la segunda dosis de GnRH.

El efecto del momento de la inseminación fue testeado por Geary & Whittier (1997) y Geary et al. (2001) quienes lograron similares tasas de preñez inseminando a las 0 y 24 horas posteriores a la segunda aplicación de GnRH en vacas de carne. Igualmente Pursley et al. (1998) implementando el programa Ovsynch, inseminó a las 0, 8, 16, 24 y 32 horas luego de la segunda dosificación con GnRH, y tuvo una tasa de preñez que no difirió entre los tratamientos 8, 16, 24, siendo menor en los tratamientos 0 y 32. Sin embargo, la tasa de parición fue similar en los tratamientos 0, 8, 16, 24 debido a una menor mortandad entre el diagnóstico y la parición en el grupo 0 con respecto a los demás.

Estos experimentos dieron pie a una variante del programa Ovsynch llamada Co-Synch, donde la inseminación se efectúa al momento de la segunda administración de GnRH, reduciendo de este modo la manipulación de los animales en un movimiento.

Martínez et al., (2002) ensayaron reducir el intervalo entre la primera aplicación de GnRH y la PGF de 7 a 6 días, e implementar la inseminación a las 48 horas, junto con la segunda aplicación de GnRH (Co-Synch), sin encontrar diferencia en la tasa de preñez 53,3% vs. 52,0%. También se investigó la utilización de la segunda dosis de GnRH, en su momento óptimo y para ello, Peters y Pursley (2003), diseñaron dos experimentos para evaluar el momento de la segunda aplicación de GnRH. En el primer experimento cotejaron el sistema Ovsynch original contra uno modificado en donde la segunda aplicación se realizaba junto con la PGF el día 7, y la IA se realizó en ambos grupos a las 16 horas después de la administración final de GnRH. En un segundo experimento 457 animales fueron divididos al azar, para formar cuatro tratamientos en donde la GnRH fue administrada a las 0, 12, 24 y 36 horas de la PGF. Como consecuencia, concluyeron que el empleo de GnRH en conjunto con la PGF o 24 h. posteriores a su aplicación, resultaron en una menor fertilidad comparados con la versión original (48 hs después de la PG).

Otras alternativas testeadas por los investigadores es el uso del estradiol para inducir el pico de LH y sincronizar la ovulación, en lugar de la GnRH (Heatsynch). Fernández et al. (2001), en animales para carne de raza indica, utilizaron benzoato de estradiol con resultados semejantes a la GnRH. Thatcher et al. (2002) y Pancarci et al. (2002) utilizaron cipionato de estradiol, también con resultados equivalentes. Como ventaja podemos citar el menor costo del estradiol con respecto a la GnRH y una mejor tonicidad uterina que es bien recibida por parte de los inseminadotes, además de proporcionar una alternativa a los productores que utilizan esta tecnología.

También hay evidencias que el tratamiento Ovsynch, es más eficaz en animales adultos en lactancia que en vaquillonas (85% vs. 54% de ovulación luego de la primera inyección de GnRH) (Whisnant et al., 2000). Se ha demostrado que el estadio del ciclo estral al inicio del programa Ovsynch afecta la tasa de preñez. Los animales en los que se inicia el tratamiento en el diestro o metaestro tardío o sea 1-4 o 13-21 días del ciclo estral tuvieron tasas de preñez inferiores que los que se iniciaron en otro momento (Vasconcelos et al., 1997; Mapletoft et al., 2005).

Entonces, cuando se inicia el tratamiento y el folículo presente no se encuentra en un estadio adecuado, este podría no ovular en respuesta a la GnRH, y por lo tanto no se produciría una buena sincronización en la emergencia de la onda, provocando estros y ovulaciones anteriores al tiempo esperado. Del mismo modo, si hubiera luteólisis espontánea en forma anticipada, el folículo podría madurar en forma prematura y ovular, disminuyendo la tasa de preñez a la IATF (Thatcher et al., 2002).

La presincronización de los animales con PGF o con GnRH mejora las tasa de preñez en animales sujetos a un programa Ovsynch entre un 12% y 18% como lo indican algunos autores (Moreira et al., 2001; DeJarnette et al., 2001; Thatcher et al., 2002). Esto permite la administración de la primera inyección de GnRH entre los días 5-12 del ciclo. La presincronización también redujo la proporción de vaquillonas en celo antes de la IATF, lo cual sugiere que podría ser útil en la aplicación exitosa de programas Co-synch u Ovsynch en vaquillonas.

También se ha implementado en los programas Ovsynch el suplemento con fuentes exógenas de progestágenos, con el fin de reducir la incidencia de estros prematuros, utilizándose entre la aplicación de GnRH y PG por siete o seis días. Con esto se han logrado mejoras significativas en las tasas de preñes en vaquillonas (39,1% vs 68,0%) (Martínez et al., 2002) y en vacas de carne con un posparto promedio de 58 días posparto (72,5% vs. 47,7%) (Kawate et al., 2004). Deberíamos

decir aquí que esta variante del esquema Ovsynch podría tener algún beneficio en animales en anestro. Sin embargo cuando este sistema es cotejado con un programa progesterona/estradiol convencional, las tasas de preñez son semejantes o incluso inferiores, además de ser económicamente oneroso para el productor.

### **2.3.3 Tratamientos que utilizan Progesterona/Progestágenos y estradiol.**

Unos de los tratamientos más utilizados en Argentina para inducir y sincronizar las ovulaciones en ganado bovino es el tratamiento a base de progesterona/progestágeno combinado con estradiol y un agente luteolítico como la PG. La progesterona tiene la propiedad de suprimir el estro y evitar la ovulación, acciones mediadas por un cambio en la frecuencia de pulsos de LH.

Además en vacas en anestro con una leve subnutrición o que amamantan en las cuales su condición anovulatoria se debería primariamente a cambios en la excitabilidad del hipotálamo al estradiol, tratamientos que aumentan la concentración circulante de progesterona pueden ayudar a solucionar esta condición mediante su propiedad potencial de alterar los pulsos de GnRH/LH y permitir el crecimiento folicular hacia los estadios finales sumado a su capacidad de restaurar la sensibilidad del hipotálamo al efecto de feedback positivo del estradiol (Wiltbank et al., 2002). Un corto período de aumento de concentración de progesterona endógena o exógena durante el período postparto, es importante para la expresión de celo y una subsecuente función luteal normal (McDougall et al., 1992; Rivera et al., 1998). El mecanismo de acción parece involucrar cambios en el número de receptores para estradiol en el hipotálamo e incrementar la producción de estradiol. El tratamiento de vacas en anestro con progesterona resulta en el aumento de estradiol en el licor folicular y en la concentración circulante, el aumento de la liberación pulsátil de LH y el aumento de receptores en las células tecales y de la granulosa para LH en folículos preovulatorios, comparado con animales no tratados (Rhodes et al., 2003).

Los primeros protocolos que utilizaron progestágenos para el control del ciclo estral se basaban en la extensión del período de diestro un tiempo suficiente como para que se produjese la luteólisis espontánea durante el tratamiento. Estos protocolos incluían inyecciones repetidas de progesterona/progestágenos por períodos mayores a 12 o 14 días; el cese de las inyecciones producía la manifestación del celo en los animales tratados en un intervalo de 2 a 6 días (Spratt, 1999). Estos protocolos eran efectivos en la sincronización de los celos, sin embargo, la fertilidad era inferior a la



observada en celos naturales (Odde, 1990). Las causas posibles de esta reducción de la fertilidad, eran alteraciones en el crecimiento folicular, desarrollo de folículos persistentes que conteniendo oocitos envejecidos (Savio et al., 1993; Kinder et al., 1996), con un incremento de los folículos atréticos. También el transporte espermático parece estar afectado y la tasa de clivaje de embriones está retardada en hembras expuestas a progestágenos o una combinación de ellas. Los métodos para la regresión del CL fueron luego mejorados mediante la inclusión de estrógenos en el tratamiento para incrementar el número de hembras manifestando celo y ovulación (Gonzalez-Padilla et al., 1975).

Debido a la poca practicidad y baja eficacia en la fertilidad, se diseñaron tratamientos que permitían mantener niveles suficientes de progestágenos en sangre sin necesidad de la inyección diaria. Estos consistieron en la utilización de implantes subcutáneos (Wiltbank et al., 1971) o en la administración de progestágenos vía oral con la dieta lo que aseguraba una liberación lenta y niveles sanguíneos aceptables durante períodos variables (Sprott, 1999). También se diseñaron esponjas intravaginales que se mostraron eficaces en asegurar estos niveles durante períodos relativamente cortos (Sreenan y Mulvehill, 1975). Estos últimos dispositivos fueron reemplazados posteriormente por otros de silicona con la progesterona incorporada que tenían la ventaja de presentar menor nivel de pérdida a lo largo del tratamiento (Roche et al., 1976). A partir de estos trabajos, fue desarrollada una gran variedad de dispositivos intravaginales y también otros implantes subcutáneos que existen comercialmente en la actualidad (Mapletoft et al., 2002; Colazo et al., 2004b; Baruselli et al., 2004). Los dispositivos de liberación intravaginal son considerados en la actualidad los de mayor simpleza en su manipulación, aseguran niveles apropiados en sangre de la hormona utilizada y posibilitan apropiados niveles de fertilidad después de la inseminación.

Además de los dispositivos arriba mencionados, se han desarrollado varias estrategias de aplicación pero manteniendo en todos los casos los aspectos básicos generales de combinar progesterona con estradiol. En la actualidad la estrategia más ampliamente utilizada y recomendada en nuestro país es la siguiente:

- 1- aplicación de un dispositivo conteniendo progesterona/progestágeno por un período de entre 7 y 9 días (recomendado 8 días)
- 2- concomitante con la aplicación del dispositivo, inyección de benzoato de estradiol

- 3- al momento de retirar el dispositivo o 24 horas antes, aplicación de un agente luteolítico. Esta droga puede ser excluida si se tratan animales en anestro,
- 4- una segunda aplicación de sales de estradiol al momento de retirar el dispositivo o a las 24 horas de su retirada
- 5- con este esquema es esperada la ovulación a las 60 horas aproximadamente del retiro del dispositivo (Day, 2004).
- 6- de acuerdo con lo anterior, la inseminación se lleva a cabo en todos los animales entre 50 y 56 hs después de retirado el dispositivo

La aplicación de benzoato de estradiol al momento de iniciar un tratamiento con progesterona/progestágeno, contribuye a la regresión de la onda folicular presente en este momento y como consecuencia da lugar a la emergencia de una nueva onda folicular entre 3 y 5 días más tarde. Se evita así el desarrollo de folículos persistentes que se observa frecuentemente cuando se aplica un progestágeno que produce niveles subluteales de progesterona en sangre. Estos folículos van a liberar por lo general, ovocitos envejecidos. El agregado de la inyección de la sal de estradiol coordinaría, entonces, el desarrollo folicular para permitir una ovulación sincronizada de un folículo con un ovocito joven y por lo tanto con expectativas de poseer una mejor aptitud a ser fecundado y producir un embrión y un cuerpo lúteo de mejor calidad que los obtenidos a partir de ovocitos presuntamente envejecidos (Rivera et al. 1998).

Bó et al. (1995b), utilizando un implante con progestágenos más 5mg de estradiol 17 $\beta$  aplicado 24 más tarde, en diferentes momentos del ciclo, concluyó que esta combinación, resultó en la emergencia de una nueva onda folicular alrededor de 4 días más tarde, independientemente del estadio de desarrollo del folículo dominante al momento del tratamiento. En experimentos siguientes ajustó la dosis de E-17 $\beta$ , no encontrando diferencias significativas en la regresión del folículo dominante y en la emergencia de la onda siguiente al utilizar 1 o 5mg, pero si cuando la dosis era 0,1 o 0,5mg (Bó et al., 2000).

Otras formulaciones y dosis también han sido objeto de estudio con el fin de obtener una mejor sincronización de la emergencia de la onda folicular. Caccia y Bó (1998) utilizaron 1, 2,5 o 5mg de benzoato de estradiol, más 50mg de P4, obteniendo la mejor sincronía en el reinicio de la nueva onda con 2,5mg. Diferentes sales de estradiol como Benzoato (BE), valerato (VE) y cipionato de estradiol (CPE), han sido

comparadas en su capacidad para inducir y sincronizar la emergencia de la nueva onda folicular (Mapletoft et al., 1999; Thundathil et al., 1997; Colazo et al., 2003; Martínez et al., 2007). En conclusión se ha observado que todas las formulaciones si bien son efectivas en la inducción de una nueva onda, lo son en forma más tardía o variable que cuando lo que se aplicó fue la de 5mg de E-17 $\beta$ . Sin embargo, cuando se utilizaron dosis de entre 1 o 3 mg de BE o 2mg de VE, estas fueron tan eficaces en sincronizar la emergencia como la dosis de 5mg. de E-17 $\beta$ .

Los trabajos de Bó et al. (1994) y Martínez et al. (2005) indican que las concentraciones de FSH disminuyen entre las 6 y las 12 horas de aplicado el estradiol, alcanzando el valor mínimo a las 24 horas y resurgiendo entre 48, 72 o hasta las 96 horas más tarde. La emergencia de la nueva onda folicular parece resultar del resurgimiento de la FSH, la cual se informó que ocurre luego de que las concentraciones de estrógeno disminuyen por debajo de un umbral (O'Rourke et al. 2000). De acuerdo a esto, el intervalo desde el tratamiento a la emergencia de la onda folicular, parece ser dependiente tanto de la sal de estradiol utilizada como de su dosis.

La segunda inyección de estradiol en un sistema de sincronización de la ovulación para la IATF tiene la finalidad inducir un pico de LH sincronizado y por ende una ovulación sincronizada. Short et al. (1979) investigaron la acción del estradiol en la inducción del pico de LH y el efecto del amamantamiento sobre este en bovinos ovariectomizados e intactos, resultando de este estudio que la respuesta de la LH inducida por el estradiol parece ser del tipo todo o nada. Se demostró además que niveles de progesterona endógena superiores a 1 ng/ml inhiben esta respuesta.

Kesner et al. (1981) trabajando con vacas ovariectomizadas concluyeron que al incrementar la concentración sérica de estradiol primero hay una reducción, pero luego se incrementa la sensibilidad de la glándula pituitaria para producir un pico de LH en respuesta a la GnRH

En animales en anestro y cíclicos tratados con dispositivos conteniendo progestágeno/progesterona, la administración de 1 mg BE 24-30 horas de retirado el dispositivo incrementó el número de animales expresando celo (Fike et al., 1997; Lemaster et al., 1999). Lammoglia et al. (1998) en vacas tratadas con P4, administrando 0,38 o 1 mg de BE a las 24-30 horas de retirado el dispositivo, obtuvo 86 y 100% celo respectivamente. El tratamiento con BE resultó en un pico de LH entre 16 y 20 horas más tarde, y la ovulación ocurrió aproximadamente 24-32 horas

después del tratamiento (Mapletoft et al., 2005), con un incremento de la tasa de preñez sobre los animales control, cuando la IATF se realizó a las 52-54 de retirado el dispositivo.

Burke et al. (2001) analizaron el efecto de la madurez del folículo con respecto a la inducción de celo y ovulación con BE, concluyendo que 0,75 mg de BE aplicados 24 horas luego del retiro de un dispositivo intravaginal, induce el celo y ovulación en la mayoría de las vaquillonas con respecto a las que no lo reciben, independientemente de la madurez del folículo dominante.

Todo lo anterior pone en evidencia la importancia de la aplicación de sales de estradiol al finalizar el tratamiento con progestágenos como una forma de asegurar una ovulación sincrónica y una alta tasa de preñez a la IATF.

#### **2.3.4 Estrategias tendientes a minimizar la manipulación de los animales**

En los tratamientos habituales que utilizan la combinación progesterona/progestágenos y estradiol, y de acuerdo a lo descrito previamente, los animales a ser tratados deben soportar por lo menos cuatro encierres (Colocación del dispositivo, retiro del dispositivo, inyección del BE e IATF) dentro de los cuales, los tres últimos se realizan en días sucesivos. Por tal razón, durante varios años se realizaron investigaciones con el objetivo de simplificar esta modalidad reduciendo el número de encierres, particularmente aquellos previos a la IATF disminuyendo así no solo los trabajos que demanda el mismo sino también el estrés que sufren los animales con los sucesivos movimientos.

Una alternativa evaluada fue la utilización de GnRH en el momento de la IATF en lugar del estradiol aplicado 24hs después de finalizado el tratamiento con progestágenos. Si bien en este trabajo las tasas de preñez no difirieron, se hace referencia a que el estradiol sería preferible a la GnRH por tener un intervalo PG-celo más corto y menos variable, sugiriendo que a la IATF podría tener mayor éxito en fertilidad (Martínez et al., 2001). Thatcher et al. (2002) advierten sobre la ventaja de utilizar estradiol para producir el pico de LH, argumentando que el pico de LH producido por el estradiol dura aproximadamente 10 horas, siendo más largo que el inducido por GnRH haciéndose comparable al pico de LH espontáneo. Además, como hemos apuntado antes, el uso de estradiol es bien recibido por los técnicos inseminadores por producir mayor tonicidad uterina facilitando el trabajo de enhebrado

del cuello. Por último es de destacar el menor costo del estradiol con respecto a la GnRH.

Otra alternativa es la de realizar la aplicación de BE al momento de retirar el tratamiento con progestágeno (Ross et al., 2004). El inconveniente que le fue adjudicada a esta estrategia es que el BE se aplicaba demasiado temprano en el proceso de foliculogénesis terminal produciendo la ovulación de folículos de menor tamaño y tal vez con ovocitos de una relativa inmadurez. Ambas situaciones se podrían traducir en bajas en la tasa de concepción obtenidas en la IATF. Sin embargo, hay un número importante de trabajos que no han encontrado diferencias de preñez entre ambos momento de administración del BE (Cavaliere et al., 2002; Ross et al., 2004; Cutaia et al., 2005; Fernandez Francia et al., 2005; Sorroarain et al., 2005; Manes et al., 2007). No obstante, en algunos trabajos se ha observado una menor respuesta reproductiva, lo cual podría deberse a una menor sincronía de la ovulación y una mayor incidencia de celos anovulatorios (Cavalleri et al., 2002; Day, 2004), una menor respuesta ovulatoria al pico de LH en folículos dominantes  $\geq 10$  mm (Sartori et al., 2001), y una menor fertilidad cuando los folículos que ovulan son reducidos en tamaño (11,5 mm), posiblemente debido a un desarrollo insuficiente del CL y una menor concentración de progesterona circulante (Vasconcelos et al., 2001). Todo ello confluye en la postulación que la maduración del folículo ovulatorio al momento de la ovulación puede influir sustancialmente la tasa de concepción (Mussard et al., 2003) y el momento de aplicar el BE podría jugar en la fertilidad posterior al actuar sobre folículos de relativa inmadurez.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, un mayor intervalo entre el retiro de la fuente de progesterona y el pico de LH (proestro) permitiría una mejor maduración final del folículo dominante y con ello una mejora en parámetros que se traducirían en una mayor tasa de concepción. Esto no sería cabalmente logrado con la inyección del BE al retirar los dispositivos con progestágeno. Una alternativa propuesta en los últimos años es el reemplazo del BE por el cipionato de estradiol (CPE), que es un éster de estradiol de mayor vida media que el BE (Vynckier et al., 1990) por ser una sal de cadena más larga y por lo tanto menos soluble en agua.

Por otra parte, la esterificación del hidróxilo del carbono  $17\beta$ , en el estradiol- $17\beta$ , lleva a la protección de este grupo contra el ataque metabólico por parte de una estearasa que lo hidroliza, causando una prolongación del efecto. Por lo tanto, el cipionato de estradiol, producido por la esterificación del estradiol con ácido

ciclopentanopropionico, tiene una actividad biológica mucho más sostenida que el estradiol-17 $\beta$  (Mapletoft et al., 2003).

Se ha observado, además, que el celo y el pico preovulatorio de LH son casi simultáneos cuando se utiliza CPE en forma muy similar a lo que ocurre en animales que ovulan y manifiestan celo en forma espontánea (Chenault et al., 1975; Stevenson et al., 2004). Lefebvre et al. (1992), al utilizar 2mg de CPE en animales ovariectomizados no encontró diferencia en la duración del celo con respecto a vaquillonas que mostraron celo espontáneo, intuyéndose así que dosis reducidas de CPE podrían ser útiles en programas de sincronización.

Colazo et al. (2003) diseñaron varios experimentos para evaluar al CPE como modulador de la emergencia folicular y la ovulación determinando que aplicación de 0,5mg de CPE al retiro del dispositivo o 24hs más tarde resultaron en una ovulación armónica con una tasa de preñez aceptable a la IATF.

En otro experimento con dispositivos intravaginales y BE realizado en vaquillonas cruza indica con el objetivo de comparar los porcentajes de preñez, se empleó 1mg de BE o 0,5mg de CPE como inductores de la ovulación, al momento de retirar los dispositivos o 24 horas más tarde y realizando la IATF en forma diferida para el grupo inyectado con BE0 entre las 47 y 49hs y para el resto a las 52-54hs En este trabajo se obtuvo una mejor tasa de preñez en las vaquillonas tratadas con CPE a las 24 horas (Cutaia et al., 2005).

Sin embargo, Orgando et al. (2005), trabajando con vacas para carne no encontraron diferencias significativas en la preñez a la IATF cuando utilizo como inductor de la ovulación 1mg de BE a las 24hs o 0,5mg de CPE a las 0 y 24 horas de finalizado un esquema de sincronización de la ovulación con dispositivos CIDR e inseminadas a tiempo fijo entre las 52 y 56hs posteriores al retiro del dispositivo. En otro experimento diseñado por el mismo autor, observó que el diámetro del folículo ovulatorio, las tasas de preñez y las concentraciones séricas máximas de estradiol fueron semejantes para los grupos BE24 y CPE0. (Martins et al., 2005, citado por Baruselli et al., 2007). En un diseño similar realizado en vacas indicas, observaron que el intervalo entre la retirada del progestágeno y la ovulación fue semejante entre los grupos BE24 y CPE0 (70,0 $\pm$ 1,48 vs. 70,7 $\pm$ 2,40 h). También ha sido demostrado que la dosis más apropiada de CPE como inductor de la ovulación puede ser entre 0,5 y 1mg, siendo ambas igualmente efectivas (Penteado et al., 2006 citado por Baruselli 2007; Madero et al., 2007).

De acuerdo con lo anterior se elaboró la hipótesis que se describe a continuación y se propusieron los siguientes objetivos.

## **2.4 Hipótesis**

La utilización del cipionato de estradiol al finalizar un tratamiento con acetato de medroxiprogesterona o progesterona natural mejora la tasa de ovulación, su sincronía y su fertilidad en vacas cíclicas y en anestro, en relación con lo obtenido por la aplicación del benzoato de estradiol en el mismo momento.

### **2.4.1 Objetivos**

1. Evaluar el efecto de dos sales de estradiol (BE o CPE) aplicadas a diferentes momentos de la finalización de un tratamiento con progestágenos (0 y 24hs) sobre diferentes características de la dinámica folicular.
2. Determinar la evolución de la dinámica folicular terminal cuando estos tratamientos son aplicados en vacas cíclicas o en anestro.
3. Evaluar la fertilidad después de la realización de IATF posterior a la aplicación de los tratamientos antes mencionados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron ocho experimentos: 6 en la Estación Experimental Agropecuaria INTA Balcarce (EEA Balcarce) para estudios de parámetros fisiológicos (3 con vacas destetadas y 3 con vacas con cría al pie) y 2 en establecimientos agropecuarios de la zona para evaluar la fertilidad posterior a los tratamientos.

### 3.1 Aspectos Generales

#### 3.1.1 Ubicación geográfica

Los 6 primeros experimentos se realizaron en la reserva 6 de la EEA Balcarce, provincia de Buenos Aires, Argentina (37°45' latitud sur; 53°18' longitud oeste).

Los animales en todos los casos se encontraron en pastoreo sobre un potrero con pasturas degradadas de raygrass (*lolium perenne*), festuca (*festuca arundinacea*) y trébol blanco (*trifolium repens*).

### 3.2. Tratamientos

Los animales de los experimentos 1, 2, 4 y 5 se trataron mediante el protocolo denominado, de ahora en más, como **Indugest plus**. El mismo consistió en:

1- Colocación durante 8 días de esponjas intravaginales de poliuretano, de 12cm de diámetro y 5cm de alto, impregnadas con 250mg de Acetato de medroxiprogesterona (MAP) (Dispositivo Indugest Plus). Previo a su colocación, las esponjas fueron inyectadas con 2 ml de oxitetraciclina al 5%.

2- Simultáneamente con la colocación de la esponja las vacas fueron inyectadas (IM) con 10mg de MAP y 3mg de BE (Indugest 1) disueltos en aceite de girasol.

3- En los experimentos con vacas sin ternero al pie (ciclado), se inyectó (IM) 0,150mg de D-(+)-Cloprostenol (Laboratorios-PAUL, Argentina) al retirar los dispositivos.

4- Al momento de retirar el dispositivo (día 8) los animales fueron distribuidos al azar para recibir 0,7mg de BE o 0,5mg de CPE vía intramuscular en ese mismo momento o 24 horas más tarde dando lugar a los siguientes grupos experimentales:

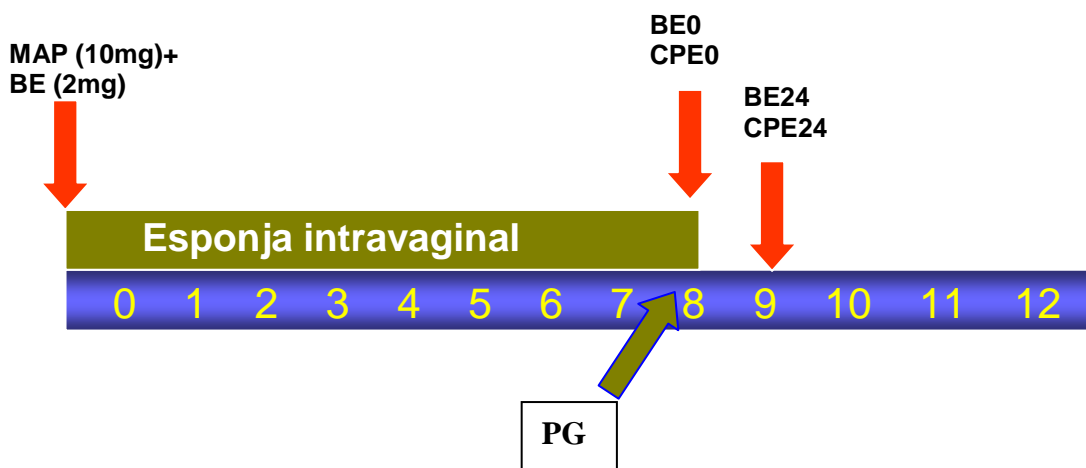


**BE0:** 0,7mg de BE (IM) al retiro de la esponja.

**CPE0:** 0,5mg de CPE (IM) al retiro de la esponja.

**BE24:** 0,7mg de BE (IM) 24 horas luego de retirada la esponja.

**CPE24:** 0,5mg de CPE (IM) 24 horas después de retirada la esponja.



**Figura 1:** Representación esquemática del protocolo Indugest Plus con los 4 grupos experimentales

Los animales de los experimentos 3 y 6 fueron tratados con el protocolo denominado de ahora en más como **DIB** (Syntex, Argentina) que consistió en:

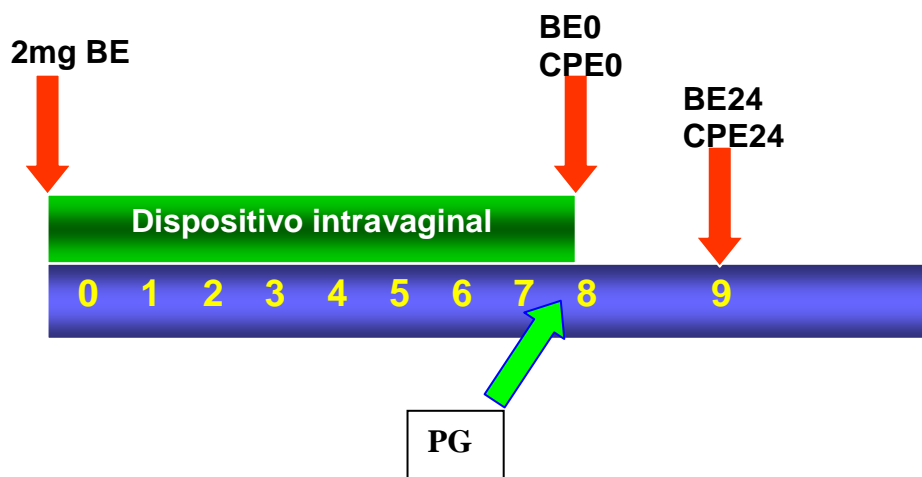
- 1- Aplicación durante 8 días de dispositivos de silicona inerte, conteniendo 0,5g de progesterona.
- 2- Simultáneamente con la colocación del dispositivo las vacas fueron inyectadas (IM) con 2mg de BE (Syntex, Argentina) (día 0).
- 3- En el momento de retirar los dispositivos (día 8) se aplicó IM 400 ug de Cloprostenol sódico (Ciclase DL, Syntex) a los animales del experimento 3 (cíclicos) pero no a los animales del experimento 6 (anestro).
- 4- Los animales fueron asignados al azar para ser inyectados con 1mg de BE (Syntex, Argentina) o con 0,5mg de CPE (Syntex, Argentina), en el momento de retiro del dispositivo o 24hs más tarde dando lugar a los siguientes grupos experimentales:

**BE0:** 1mg de BE (IM) al retiro del dispositivo.

**CPE0:** 0,5mg de CPE (IM) al retiro del dispositivo.

**BE24:** 1mg de BE (IM) 24 horas luego de retirado el dispositivo.

**CPE24:** 0,5mg de CPE (IM) 24 horas luego de retirado el dispositivo.



**Figura 2:** Representación esquemática del protocolo DIB con los 4 grupos experimentales

### 3.3. Estudios ecográficos

Se observaron los ovarios de cada vaca mediante ultrasonografía, comenzando en el día del retiro del dispositivo, 24 horas más tarde y cada 12 horas hasta completar las 96 horas de retirado el dispositivo. A través de la ecografía: se determinó, la ocurrencia de la ovulación, su momento, el tamaño del folículo dominante al retiro del dispositivo, el tamaño del folículo ovulatorio y la presencia de cuerpo lúteo al finalizar el mismo. Se registraron en un esquema todos los folículos  $\geq 5\text{mm}$  y del CL respetando la ubicación de los mismos en el ovario. El diámetro de los folículos fue calculado como el promedio de los dos diámetros mayores. Al folículo de mayor tamaño al retiro del dispositivo se lo consideró folículo dominante.

Se definió como ovulación a la desaparición del folículo dominante y como diámetro del folículo ovulatorio se tomó al último registro para ese folículo dominante en principio que se consideró que ovuló. El momento de la ovulación fue considerado como el promedio en horas entre el último registro y el siguiente. La tasa de crecimiento (mm/día) fue calculada para cada folículo que ovuló, como la diferencia en mm entre el folículo dominante y el folículo ovulatorio, dividido por las horas transcurridas y multiplicado por 24. Este resultado fue analizado como una variable continua.

### 3.4. Muestreo sanguíneo

En los Experimentos 4 y 6 (vacas en anestro) se tomaron muestras luego de retirado el dispositivo los días 7, 12, 17, para evaluar la formación y vida media del cuerpo lúteo, considerándose normales aquellos que mantuvieran niveles elevados de progesterona ( $> 1\text{ ng/mL}$ ) en los tres muestreos.

Todas las muestras de sangre se tomaron por punción de la vena yugular y colocadas en tubos heparinizados, que fueron centrifugados a 2000 rpm durante 15 minutos antes que transcurriera una hora del momento de extracción. El plasma obtenido se conservó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de realizar la medición hormonal.

### 3.5 Medición de progesterona plasmática

La medición de progesterona se realizó mediante la prueba de RIA en fase sólida (radioinmunoensayo COAT-A-COUNT, Siemens Medical Solutions Diagnostic, Los Angeles, CA, USA). Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. El coeficiente de variación intraensayo para todas las muestras comprendidas entre 0,1 y 40 ng/ml fue  $< 7\%$  y el coeficiente de variación interensayo fue de 3,5%. La sensibilidad estimada del método fue de 0,01 ng/ml.

### 3.6 Análisis estadísticos

- Las variables analizadas fueron:
  - Diámetro del folículo dominante y ovulatorio
  - Momento de ovulación
  - Distribución de la ovulación
  - Tasa de ovulación
  - Tasa de crecimiento del folículo ovulatorio
  - Vida media del cuerpo lúteo
  - Concentración de Progesterona

La tasa de ovulación se analizó mediante una tabla de contingencia utilizando la distribución Chi cuadrado y la corrección de Fisher si fuera necesario, mediante el procedimiento FREQ del paquete estadístico SAS.

Las variables continuas fueron analizadas mediante análisis de varianza utilizando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (SAS, 1998), según el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijk}$ : Variable respuesta de la k-esima observación correspondiente al i-esimo tratamiento y al j-esimo momento de aplicación.

$\mu$ : Media general.

$\alpha_i$ : Efecto del i-esimo tratamiento sobre la variable respuesta.

$\beta_j$ : Efecto del j-esimo momento de aplicación sobre la variable respuesta.

$\gamma_{ij}$ : Efecto de la interacción del i-ésimo tratamiento con j-ésimo momento de aplicación sobre la variable respuesta.

$\varepsilon_{ijk}$ : Error experimental sobre el cual se deben cumplir los supuestos de normalidad, homogeneidad de varianza e independencia.

La vida media del CL se evaluó en aquellos animales que ovularon solamente. Y fue agregado al modelo en los animales cíclicos.

La concentración de progesterona plasmática fue analizada mediante dos métodos área bajo la curva (fórmula trapezoidal) y el dato obtenido se utilizó como variable continua y como medidas repetidas utilizando el procedimiento MIXED de SAS. Para ello se utilizó el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijk}$ : Variable respuesta de la k-ésima observación correspondiente al i-ésimo tratamiento y al j-ésimo día.

$\mu$ : Media general.

$\alpha_i$ : Efecto del i-ésimo tratamiento sobre la variable respuesta.

$\beta_j$ : Efecto del j-ésimo día sobre la variable respuesta.

$\gamma_{ij}$ : Efecto de la interacción del i-ésimo tratamiento con el j-ésimo día sobre la variable respuesta

$\epsilon_{ijk}$ : Error experimental sobre el cual se deben cumplir los supuestos de normalidad, homogeneidad de varianza e independencia.

Como variable repetida se utilizó al día. La estructura de covarianza utilizada fue la simple.

## RESULTADOS

### 4.1 ESTUDIOS REALIZADOS EN VACAS CÍCLICAS

#### 4.1.1 EXPERIMENTO 1

El objetivo de este Experimento fue evaluar el efecto del BE y del CPE, aplicados al momento de finalizar un tratamiento con progestágenos o 24 horas más tarde sobre la tasa de ovulación, la distribución de las ovulaciones, el diámetro de los folículos dominante y ovulatorio, el momento de la ovulación y la tasa de crecimiento del folículo ovulatorio, en vacas adultas sin cría al pie.

#### **Época**

El trabajo se realizó desde el 12 hasta el 24 de Marzo de 2007.

#### **Animales utilizados**

Se emplearon 36 vacas de la raza Aberdeen Angus, multíparas, cíclicas y sin cría al pie, con un peso de  $472,5 \pm 6,8$  kg ( $X \pm EE$ ) y una condición corporal de  $5,9 \pm 0,1$  ( $X \pm EE$ ) (escala 1-9).

#### **Tratamientos**

Los animales se sincronizaron mediante el protocolo del **Indugest plus**, detallado anteriormente.

#### **Estudios ecográficos**

Se comenzó al retiro de la esponja prosiguiendo cada 24 horas hasta completar las 96 horas de retirado el dispositivo. Las demás consideraciones fueron las mismas descriptas previamente.

#### 4.1.2 RESULTADOS

##### Pérdidas de dispositivos

No registraron pérdidas de dispositivos

##### Estado fisiológico

El 77,7% (28/36) de las vacas tenían un cuerpo lúteo al inicio del tratamiento, de las cuales seis (21,4%) pertenecientes a cada uno de los tratamientos BE y ocho (28,5%) a cada tratamiento CPE. Al momento de retirar la esponja, seis (16,6%) animales presentaron un folículo menor a 8mm. De estos, dos (5,5%) no superaron el diámetro de 8mm en todo el período experimental, uno perteneciente al grupo BE24 y el otro al CPE0, ambos con cuerpo lúteo.

##### Diámetro del folículo dominante al retiro de la esponja y del folículo ovulatorio

El diámetro del folículo dominante al retiro de la esponja no difirió ( $p > 0,05$ ) entre tratamientos (Cuadro 1) ni tampoco fue afectado por la presencia del cuerpo lúteo. Sin embargo, se observó una diferencia significativa entre tratamientos en el diámetro del folículo ovulatorio según la sal de estradiol utilizada, resultando mayor en vacas tratadas con CPE (Cuadro 2), pero no hubo efecto del momento de aplicación del tratamiento. No hubo efecto de la interacción sal de estradiol por momento de aplicación sobre el diámetro del folículo ovulatorio (Cuadro 1). Tampoco hubo efecto de la presencia del CL en este parámetro.

**Cuadro 1.** Diámetro (mm) del folículo dominante y ovulatorio ( $X \pm EE$ ) luego de un tratamiento Indugest Plus, y BE ó CPE a las 0 ó 24 horas de retirado el dispositivo

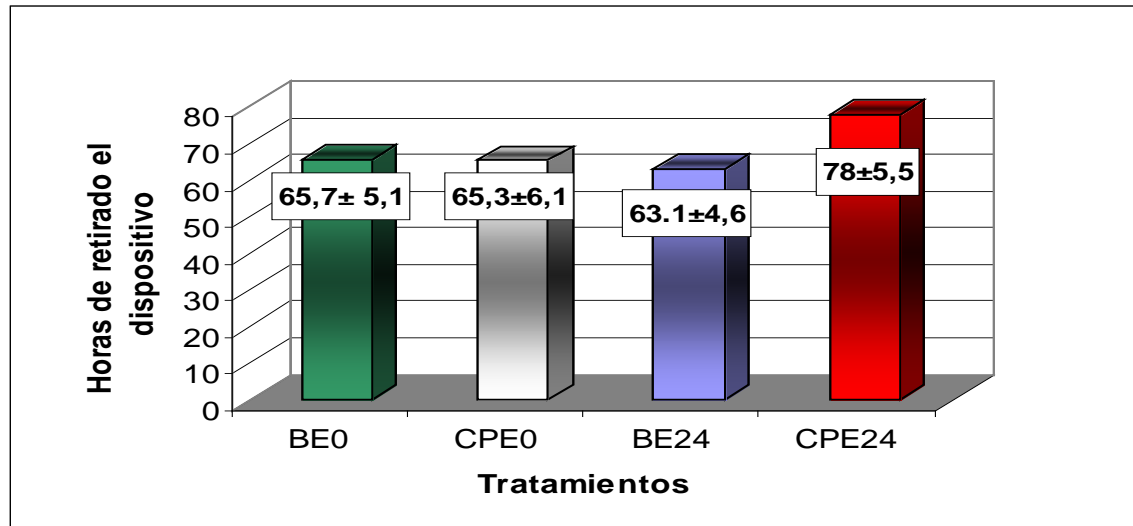
Tratamiento	Fol. Dominante			Fol. Ovulatorio		
	N	Diámetro	Valor p	N	Diámetro	Valor p
BE0	9	9,27±0,57		6	11,42±0,76	
CPE0	9	9,66±1,08		4	14,37±0,91	
BE24	9	9,55±0,81		7	11,64±0,68	
CPE24	9	8,55±0,48	0,76	5	12,19±0,82	0,16

**Cuadro 2.** Diámetro (mm) del folículo ovulatorio ( $X \pm EE$ ), después de un tratamiento Indugest Plus según el tipo sal utilizada, BE ó CPE

Tratamiento	N	Diámetro	Valor p
BE	13	11,53±0,51	
CPE	9	13,28±0,61	0,04

### Momento de la ovulación

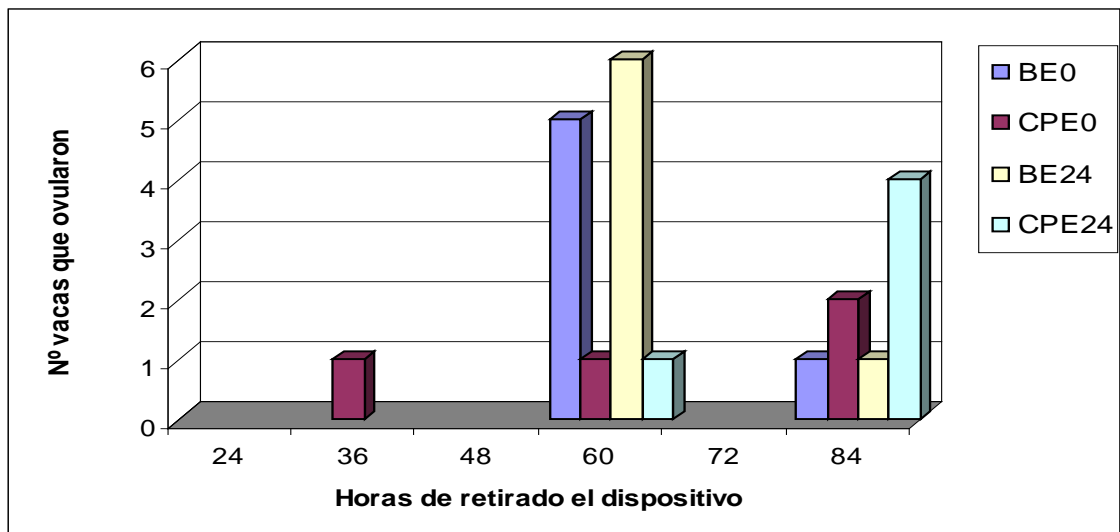
No se observó efecto ( $p > 0,05$ ) de la sal utilizada, del momento de la aplicación, de la interacción, ni de la presencia de una estructura luteal sobre el momento de la ovulación (Figura 3).



**Figura 3.** Momento de la ovulación desde el retiro del implante a la ovulación en horas ( $X \pm EE$ ) después de un tratamiento Indugest Plus y BE o CPE aplicados al retirar el dispositivo o 24 horas más tarde

### Distribución de las ovulaciones

La distribución de las ovulaciones se muestra en la figura 4 y en ella se puede observar que un 83,3% (5/6) de las vacas pertenecientes al grupo BE0 y un 85,7% (6/7) del grupo BE24 ovularon antes de las 72 horas. En contraposición el grupo CPE0 fue más variable en su distribución ya que sólo el 50% (2/4) ovuló antes de las 72 horas en tanto que en el tratamiento CPE24 el 80% (4/5) ovuló luego de las 72 horas. En todos los casos al menos el 75% de las ovulaciones se produjeron en un período de 24 horas.



**Figura 4:** Distribución de las ovulaciones después de un tratamiento Indugest Plus y BE ó CPE aplicado a las 0 ó 24 horas de finalizado el mismo

#### Tasa de ovulación

La tasa de ovulación general fue del 61,1% (22/36). No se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre tratamientos en la tasa de ovulación (Cuadro 3).

**Cuadro 3:** Tasa de ovulación en porcentaje (vacas que ovularon/vacas tratadas) hasta las 96 horas luego de un tratamiento Indugest Plus y BE ó CPE aplicado a las 0 ó 24 hs del retiro de la esponja según si tuvieron o no un cuerpo lúteo al finalizar el tratamiento

	BE0	CPE0	BE24	CPE24	Valor p
<b>CCL</b>	50 (3/6)	37,5 (3/8)	83,3 (5/6)	50 (4/8)	
<b>SCL</b>	100 (3/3)	100 (1/1)	66,6 (2/3)	100 (1/1)	
<b>Total</b>	66,6 (6/9)	44,4 (4/9)	77,7 (7/9)	55,5 (5/9)	0,5

CCL: presencia de cuerpo lúteo. SCL: sin cuerpo lúteo.

En el cuadro 4 puede observarse que, la presencia de una estructura luteal al finalizar el tratamiento tendió a deprimir la tasa de ovulación ( $p = 0,08$ ).

**Cuadro 4:** Tasa de ovulación (%) en presencia de un CL (vacas que ovularon/vacas con ó sin CL al retirar la esponja)

	OVULACION	Valor p
<b>CCL</b>	53,5 (15/28)	
<b>SCL</b>	87,5 (7/8)	
<b>Total</b>	61,1 (22/36)	0,08

CCL: presencia de cuerpo lúteo. SCL: sin cuerpo lúteo. OV: ovuló.



### Tasa de crecimiento del folículo ovulatorio

La tasa de crecimiento del folículo ovulatorio no se vio afectada por el tratamiento, por el momento de la aplicación de las sales de estradiol, ni por la interacción entre estos (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Tasa de crecimiento (mm/día) del folículo dominante ( $X \pm EE$ ) luego de un tratamiento con Indugest Plus y BE ó CPE al retirar el dispositivo ó 24 horas más tarde.

Tratamiento	N	Tasa de crecimiento	Valor p
BE0	6	0,63±0,20	
CPE0	4	1,07±0,24	
BE24	7	0,72±0,18	
CPE24	5	0,94±0,22	0,62

#### 4.1.3 EXPERIMENTO 2

Puesto que en el Experimento1 no se alcanzó la precisión deseada en las observaciones ováricas realizadas cada 24 horas, el ensayo fue repetido en similares condiciones con el objetivo de mejorar la información obtenida intensificando estas observaciones (cada 12hs) particularmente en lo concerniente a ocurrencia de la ovulación, distribución de la misma, momento de la ovulación, diámetro de los folículos dominante y ovulatorio, tasa de crecimiento del folículo dominante.

#### Época

El trabajo se realizó desde el 4 de Abril hasta el 14 de Mayo de 2007.

#### Animales utilizados

Se emplearon 36 vacas de la raza Aberdeen Angus, multíparas, cíclicas y sin cría al pie, con un peso de  $462,5 \pm 6,3\text{kg}$  ( $X \pm EE$ ) y una condición corporal de  $5,7 \pm 0,1$  ( $X \pm EE$ ) (escala 1-9).

#### Tratamientos

Los animales fueron tratados mediante el protocolo del Indugest descrito en el E 1.

#### Estudios ecográficos

Se monitorearon los ovarios de cada vaca en varios planos, al retiro de la esponja, 24 horas más tarde y cada 12 horas hasta completar las 96 horas de retirado el dispositivo.

#### 4.1.4 RESULTADOS

##### Pérdidas de dispositivos

No registraron pérdidas de dispositivos

##### Estado fisiológico

El 69,4% (25/36) de los animales tuvo un cuerpo lúteo al momento de retirar la esponja y estuvieron distribuidos de la siguiente manera: seis (24%) del tratamiento BE0, cuatro (16%) del tratamiento BE24, ocho (32%) del tratamiento CPE0 y siete (28%) correspondientes al tratamiento CPE24.

Cinco animales (13,8%), dos pertenecientes al grupo CPE24, dos al grupo BE0 y uno del BE24 no presentaron, al retiro del dispositivo, un folículo dominante mayor a los 8mm de diámetro. Los tres animales tratados con BE (8,3%, 3/36) no desarrollaron folículos mayores a los 9mm en el transcurso de las ecografías postratamiento y todos presentaron estructura luteal al finalizar el tratamiento. Dos animales (5,5%) del tratamiento CPE24 tuvieron ovulación doble al final del estudio.

##### Diámetro del folículo dominante al retiro de la esponja y del folículo ovulatorio.

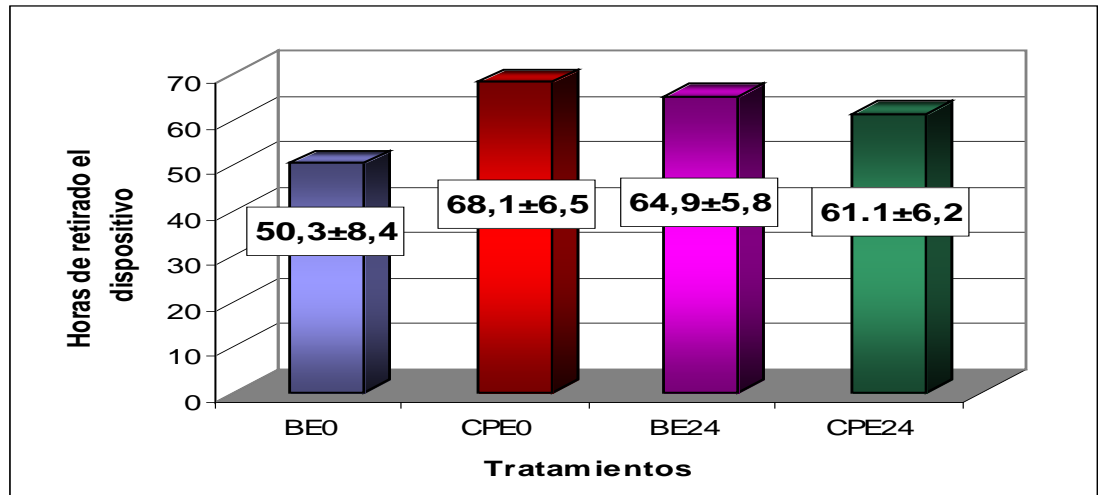
El tamaño del folículo dominante al retiro del dispositivo y el del folículo ovulatorio no fueron afectados por la sal de estradiol, el momento de aplicación ni por su interacción (Cuadro 6). Por el contrario, se observó efecto de la presencia del cuerpo lúteo sobre el tamaño del folículo dominante ( $8,76 \pm 0,42$  vs.  $11,81 \pm 0,65$ mm  $P < 0,0006$ ; con CL y sin CL respectivamente).

**Cuadro 6.** Diámetro (mm) del folículo dominante y ovulatorio ( $X \pm EE$ ) luego de un tratamiento con Indugest Plus, y BE ó CPE a las 0 ó 24 horas de retirado el dispositivo.

Trat	Fol. Dominante			Fol. Ovulatorio		
	N	Diámetro	Valor p	N	Diámetro	Valor p
BE0	9	$10,5 \pm 0,7$		3	$12,55 \pm 1,48$	
CPE0	9	$11,07 \pm 0,7$		6	$14,39 \pm 1,15$	
BE24	9	$9,83 \pm 0,6$		6	$11,96 \pm 1,03$	
CPE24	9	$9,73 \pm 0,7$	0,5	4	$12,54 \pm 1,1$	0,48

##### Momento de la ovulación

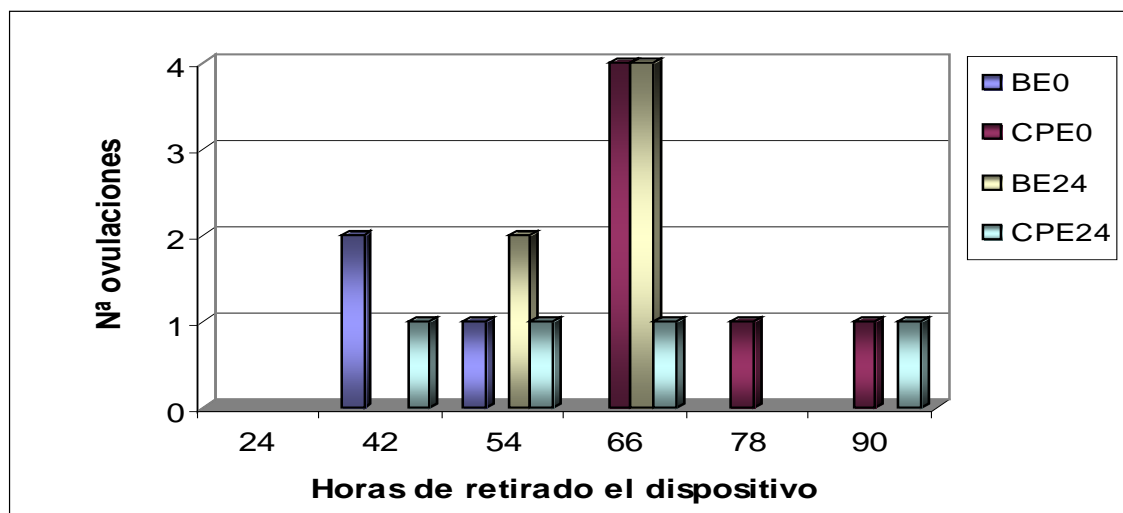
No hubo diferencias ( $p > 0,05$ ) en el momento de ovulación entre tratamientos (Fig. 5).



**Figura 5.** Momento de la ovulación ( $X \pm EE$ ) después de un tratamiento con progestágeno de 8 días y BE o CPE aplicado a las 0 ó 24hs de finalizado el mismo.

#### Distribución de las ovulaciones

La distribución de la ovulación se grafica en la figura 6 donde se puede observar que el 100% de los animales pertenecientes a los grupos BE0 (3/3) y BE24 (6/6) ovuló en forma previa a las 72 horas de retirado el dispositivo y en un lapso de 12 horas. Mientras que sólo un 66,6% (4/6) del tratamiento CPE0 y un 75% (3/4) del tratamiento CPE24 ovuló en ese período y un 83,3% (5/6) y 50% (2/4) respectivamente lo hizo en un intervalo de 12 horas. Los tratamientos que produjeron una mejor concentración de la ovulación fueron el BE0; BE24 y el CPE0, en tanto que el CPE24 produjo una dispersión marcada (Fig. 6).



**Figura 6.** Distribución de las ovulaciones luego de un tratamiento con Indugest Plus y BE o CPE a las 0 ó 24 horas.

### Tasa de ovulación

La tasa de ovulación general 52,7% (19/36) no fue afectada por las sales de estradiol, por el momento de aplicación de las mismas ni por su interacción (Cuadro 7). Sin embargo, este parámetro fue deprimido por la presencia de cuerpos lúteos al finalizar el tratamiento (40 vs. 81,8%;  $P=0.02$  en vacas con y sin CL respectivamente) (Cuadro 8).

**Cuadro 7.** Tasa de ovulación (%) (vacas que ovularon/vacas tratadas) hasta las 96 horas luego de un tratamiento Indugest Plus y BE ó CPE aplicado a las 0 ó 24 h de retirado el dispositivo según si tuvieron o no un cuerpo lúteo al finalizar el mismo

	BE0	CPE0	BE24	CPE24	Valor p
<b>CCL n=25</b>	0 (0/6)	75 (6/8)	25 (1/4)	43 (3/7)	
<b>SCL n=11</b>	100 (3/3)	0 (0/1)	100 (5/5)	50 (1/2)	
<b>Total n=36</b>	33.3(3/9)	66.6(6/9)	66.6 (6/9)	44.4 (4/9)	0,39

CCL: presencia de cuerpo lúteo. SCL: sin cuerpo lúteo.

**Cuadro 8.** Tasa de ovulación (%) en presencia de un CL (vacas que ovularon/vacas con o sin CL al retirar la esponja)

	OVULACION	Valor p
<b>CCL n=25</b>	40 (10/25)	
<b>SCL n=11</b>	81,8 (9/11)	
<b>Total n=36</b>	52,7 (19/36)	0,02

CCL: presencia de cuerpo lúteo. SCL: sin cuerpo lúteo.

### Tasa de crecimiento del folículo ovulatorio

La tasa de crecimiento promedio de los folículos desde el retiro de la esponja hasta la ovulación no fue afectada por los tratamientos ( $p>0,05$ ) (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Tasa de crecimiento (mm/día) de los folículos ovulatorios ( $X \pm EE$ ), luego de un tratamiento Indugest Plus y BE ó CPE a las 0 ó 24 horas de finalizado el mismo.

Tratamiento	N	$X \pm EE$	Valor p
<b>BE0</b>	3	0,60 $\pm$ 0,29	
<b>CPE0</b>	6	0,74 $\pm$ 0,22	
<b>BE24</b>	6	0,79 $\pm$ 0,20	
<b>CPE24</b>	4	0,56 $\pm$ 0,21	0,20

### **4.1.5 EXPERIMENTO 3**

Este experimento se llevó a cabo con el objetivo de realizar determinaciones similares a las realizadas en los Exptos. 1 y 2 pero en el cual las sales de estradiol evaluadas fueron aplicadas después de realizar un tratamiento con progesterona natural a diferencia de los dos anteriores en que se utilizó un progestágeno sintético. Por no llevarse a cabo en forma simultánea con los anteriores no se realizó la comparación con los mismos pero el objetivo es determinar si las tendencias observadas anteriormente se repiten al cambiar el tipo de progestágeno utilizado. Se evaluó como en los casos anteriores la tasa de ovulación, la distribución de las ovulaciones, el diámetro de los folículos dominante y ovulatorio, el momento de la ovulación y la tasa de crecimiento del folículo ovulatorio.

#### **Época**

El trabajo se realizó entre el 4 de octubre y el 8 de noviembre del 2007.

#### **Animales utilizados**

Se emplearon 35 vacas de raza Aberdeen Angus, multíparas, cíclicas y sin cría al pie, con un peso de  $463,2 \pm 6,4$  kg ( $X \pm EE$ ) y una condición corporal de  $5,3 \pm 0,1$  ( $X \pm EE$ ) (escala 1-9).

#### **Tratamientos**

Los animales fueron tratados con el protocolo DIB descrito en la metodología general.

#### **Estudios ecográficos**

Se monitorearon los ovarios de cada vaca en forma similar al experimento anterior, al retiro del DIB, 24 horas más tarde y cada 12 horas hasta completar las 96 horas de retirado el dispositivo.

## **RESULTADOS**

### **Pérdidas de dispositivos**

No registraron pérdidas de dispositivos

### Estado fisiológico

El 71,4% de los animales (25/35) presentó un cuerpo lúteo al retirar el dispositivo, cuatro (11,4%) correspondientes al grupo BE0, ocho (22,8%) a cada uno de los tratamientos CPE0 y BE24 y cinco (14,2%) al grupo CPE24. Un animal presentó ovulación doble perteneciente al grupo BE0.

Dos vacas presentaron folículo de más de 20mm de diámetro a la ultrasonografía (quistes foliculares) en el grupo CPE24, de las cuales una prosiguió con actividad ovárica y ovuló un folículo de 14mm, y el otro, si bien también presentó actividad ovárica, no ovuló en el tiempo preestablecido de observación experimental.

### Diámetros del folículo dominante al retiro del DIB y del folículo ovulatorio

No hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre tratamientos en el diámetro del folículo dominante al retiro del dispositivo (Cuadro 11), aunque sí se observó efecto por la presencia de estructuras luteales (Cuadro 10).

**Cuadro 10.** Diámetro (mm) del folículo dominante ( $X \pm EE$ ) al retiro del dispositivo, luego de un tratamiento con DIB para la sincronización de celo, según la presencia de un cuerpo lúteo.

	N	Diámetro	Valor p
CCL	25	10,64 $\pm$ 0,53	
SCL	10	14,17 $\pm$ 0,86	0,002

CCL: presencia de cuerpo lúteo. SCL: sin cuerpo lúteo.

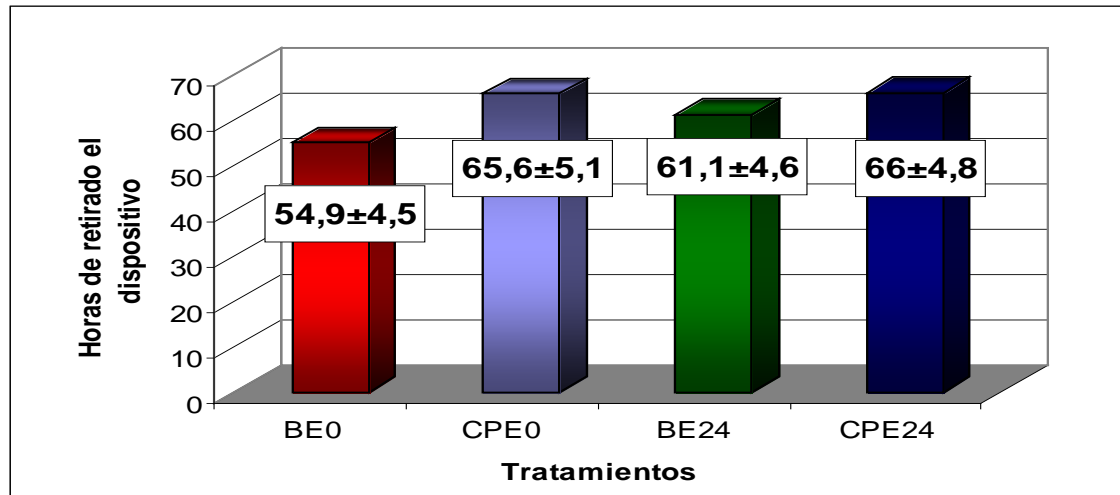
Tampoco hubo diferencias significativas en el diámetro de los folículos ovulatorios entre las sales de estradiol aplicadas, su hora de aplicación o su interacción (Cuadro 11).

**Cuadro 11.** Diámetro (mm) del folículo dominante y ovulatorio ( $X \pm EE$ ) luego de un tratamiento con un dispositivo conteniendo progesterona, y BE ó CPE a las 0 ó 24 horas de retirado el dispositivo.

Trat	Fol. Dominante			Fol. Ovulatorio		
	N	Diámetro	Valor p	N	Diámetro	Valor p
BE0	8	10,87 $\pm$ 0,91		7	12,45 $\pm$ 1,09	
CPE0	9	12,14 $\pm$ 0,95		6	14,44 $\pm$ 1,15	
BE24	9	13,09 $\pm$ 0,95		8	14,91 $\pm$ 1,01	
CPE24	9	13,52 $\pm$ 0,86	0,18	6	16,05 $\pm$ 1,15	0,17

### Momento de la ovulación

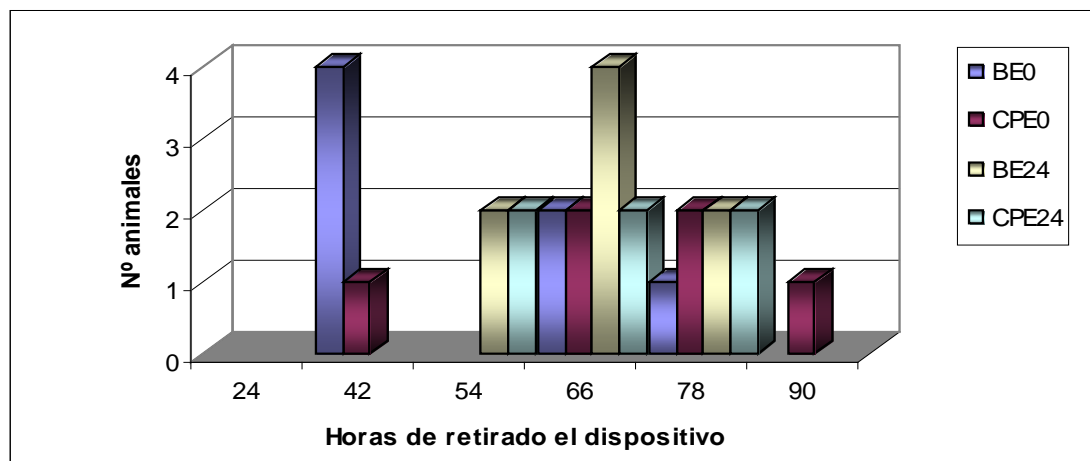
No hubo efecto significativo ( $p>0,05$ ) de la sal de estradiol, de la hora de aplicación ni de su interacción sobre el momento de ovulación (Figura 7).



**Figura 7.** Momento de la ovulación ( $X\pm EE$ ) después de un tratamiento con progesterona de 8 días y BE ó CPE aplicado a las 0 ó 24 horas de finalizado el mismo

### Distribución de las ovulaciones

La distribución de las ovulaciones entre los tratamientos se muestra en la figura 8, donde podemos ver que el 85,7% (6/7); 50,0% (3/6); 75,0% (6/8) y 66,6% (4/6) de las vacas correspondientes a los tratamientos BE0; CPE0; BE24 y CPE 24 respectivamente ovuló dentro de las 72 horas de retirado el dispositivo. En un intervalo de 12 horas ovularon 57,1% (4/7); 66,6% (4/6); 75,0% (6/8) y 66,6% (4/6) de estos mismos tratamientos.



**Figura 8.** Distribución de las ovulaciones luego de un tratamiento con DIB y BE ó CPE aplicado a las 0 ó 24 horas después de finalizado el mismo

### Tasa de ovulación

La tasa de ovulación general fue del 77,1% (27/35). No se observó diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre tratamientos en la tasa de ovulación ni tampoco la hubo por efecto de la presencia de un cuerpo lúteo (Cuadros 12 y 13).

**Cuadro 12.** Tasa de ovulación (%) (vacas que ovularon/vacas tratadas) hasta las 96 horas luego de un tratamiento con DIB y BE o CPE aplicado a las 0 ó 24 horas de retirado el dispositivo según si tuvieron o no un cuerpo lúteo al finalizar el mismo

	BE0	CPE0	BE24	CPE24	Valor p
<b>CCL (n=25)</b>	75,0 (3/4)	62,5 (5/8)	87,5 (7/8)	60,0 (3/5)	
<b>SCL (n=10)</b>	100 (4/4)	100 (1/1)	100 (1/1)	75,0 (3/4)	
<b>Total</b>	87,5(7/8)	66,6(6/9)	88,8 (8/9)	66,6 (6/9)	0,51

CCL: presencia de cuerpo lúteo. SCL: sin cuerpo lúteo.

**Cuadro 13.** Tasa de ovulación en presencia de un CL (vacas que ovularon/vacas con o sin un CL al retirar el dispositivo)

	OVULACION	Valor p
<b>CCL n=25</b>	72,0 (18/25)	
<b>SCL n=10</b>	90,0 (9/10)	
<b>Total n=35</b>	77,1(27/35)	0,25

CCL: presencia de cuerpo lúteo. SCL: sin cuerpo lúteo.

### Tasa de crecimiento del folículo ovulatorio

No se registraron diferencias significativas ( $p = 0,16$ ) entre las sales de estradiol, el momento de aplicación o su interacción en la tasa de crecimiento folicular (Cuadro 14).

**Cuadro 14.** Tasa de crecimiento (mm/día) del folículo ovulatorio ( $X \pm EE$ ) luego de un tratamiento con progesterona por 8 días y BE ó CPE a las 0 ó 24 horas de finalizado el mismo.

Tratamiento	N	$X \pm EE$	Valor p
<b>BE0</b>	7	0,84 $\pm$ 0,16	
<b>CPE0</b>	6	1,02 $\pm$ 0,17	
<b>BE24</b>	8	0,96 $\pm$ 0,15	
<b>CPE24</b>	6	0,62 $\pm$ 0,17	0,16



## **4.2 ANIMALES EN ANESTRO POSPARTO**

### **4.2.1 EXPERIMENTO 4**

El objetivo del experimento fue determinar los cambios en el crecimiento folicular final, la ovulación y desarrollo posterior del cuerpo lúteo, en vacas con cría al pie (anestro) después de un tratamiento con el protocolo Indugest Plus y aplicación de BE o CPE al momento de retirar la esponja o 24 horas más tarde.

#### **Época**

La experiencia fue realizada desde el 6 de Noviembre hasta el 4 de Diciembre de 2006.

#### **Animales utilizados**

Se utilizaron 36 vacas Aberdeen Angus multíparas, con cría al pie, con una condición corporal de  $4,5 \pm 0,1$  ( $X \pm EE$ ) en la escala de 1-9 (1-emaciada), (9-obesa); con un peso de  $440,0 \pm 8,9\text{kg}$  ( $X \pm EE$ ). El intervalo parto-tratamiento fue de  $37,5 \pm 0,6$  días ( $X \pm EE$ ).

#### **Tratamientos**

Las vacas fueron tratadas mediante el protocolo Indugest Plus descrito previamente.

#### **Estudios ecográficos**

Los ovarios de cada vaca fueron examinados por medio de ultrasonografía transrectal (ecógrafo de tiempo real ALOKA SSD500 equipado con un transductor de tiempo real lineal de 7,5 MHz), al retiro de la esponja, 24 horas más tarde y cada 12 horas hasta completar las 96 horas de retirado el dispositivo.

#### **Muestreo sanguíneo**

Se tomaron muestras los días 7, 12, y 17 de retirado el dispositivo, para evaluar la formación y vida media del cuerpo lúteo, considerándose normales aquellos que mantuvieron niveles de progesterona  $> 1$  ng/mL en las 3 muestras.

#### **Análisis estadísticos**

Las variables analizadas así como las pruebas estadísticas para su análisis fueron las mismas que se utilizaron anteriormente salvo que aquí se analizó también la vida media del cuerpo lúteo y la concentración de progesterona.

#### 4.2.2 RESULTADOS

##### Pérdida de esponjas

Un animal (2,8%), correspondiente al grupo CPE 24, perdió la esponja durante el tratamiento por lo que fue excluido del análisis.

##### Estado fisiológico

Dos animales (5,7%), presentaron estructuras luteales al momento del retiro de las esponjas, haciendo suponer que los mismos estaban ciclando en dicho momento.

Cuatro animales (11,4%) fallaron en presentar un folículo dominante > 8mm al retirar el dispositivo, dos pertenecientes al tratamiento BE0, uno al tratamiento CPE0 y uno al tratamiento CPE24.

##### Diámetros del folículo dominante al retiro de la esponja y del folículo ovulatorio

No se encontraron diferencias en el diámetro del folículo dominante al retirar la esponja entre tratamientos (Cuadro 15) ni al comparar las dos sales de estradiol utilizadas (BE =  $7,5 \pm 0,4$ mm; CPE =  $7,0 \pm 0,4$ mm;  $p = 0,43$ ).

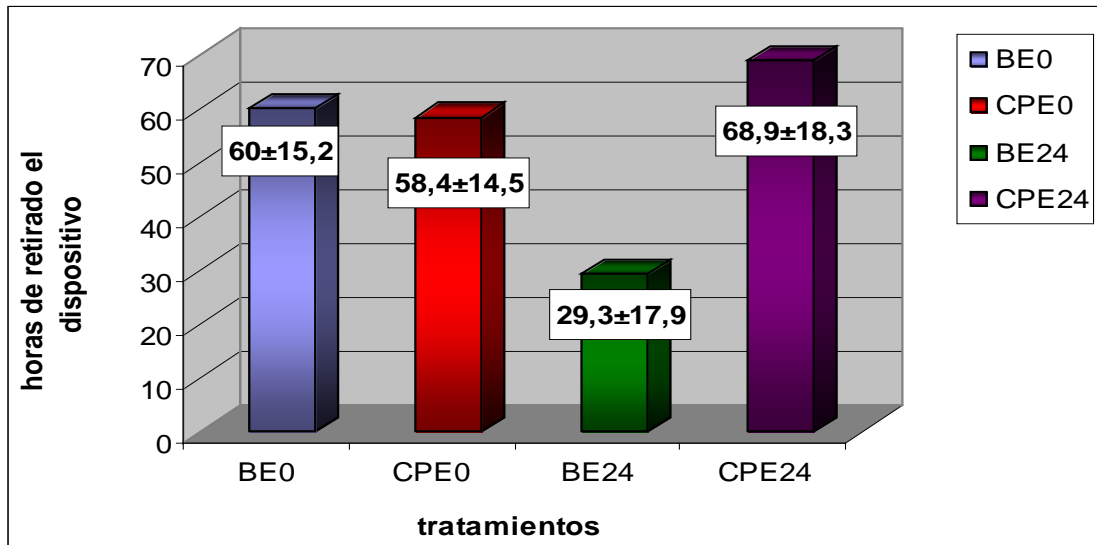
No se observaron diferencias en el diámetro del folículo ovulatorio debido al tipo de sal de estradiol utilizada ni a la hora de su aplicación (Cuadro 15).

**Cuadro 15:** Diámetro (mm) de folículos dominante y ovulatorio ( $X \pm EE$ ) después del protocolo Indugest Plus y BE ó CPE aplicado a las 0 ó 24 horas de finalizado el mismo

Tratamientos	FOL. DOM.			FOL. OVUL		
	N	Diámetro	Valor p	N	Diámetro	Valor p
BE0	9	$7,6 \pm 0,6$		3	$11,3 \pm 1,0$	
CPE0	9	$7,4 \pm 0,7$		3	$11,9 \pm 0,9$	
BE24	9	$7,5 \pm 0,5$		2	$9,7 \pm 1,1$	
CPE24	8	$6,7 \pm 0,5$	0,91	2	$10,8 \pm 1,2$	0,81

##### Momento de la ovulación

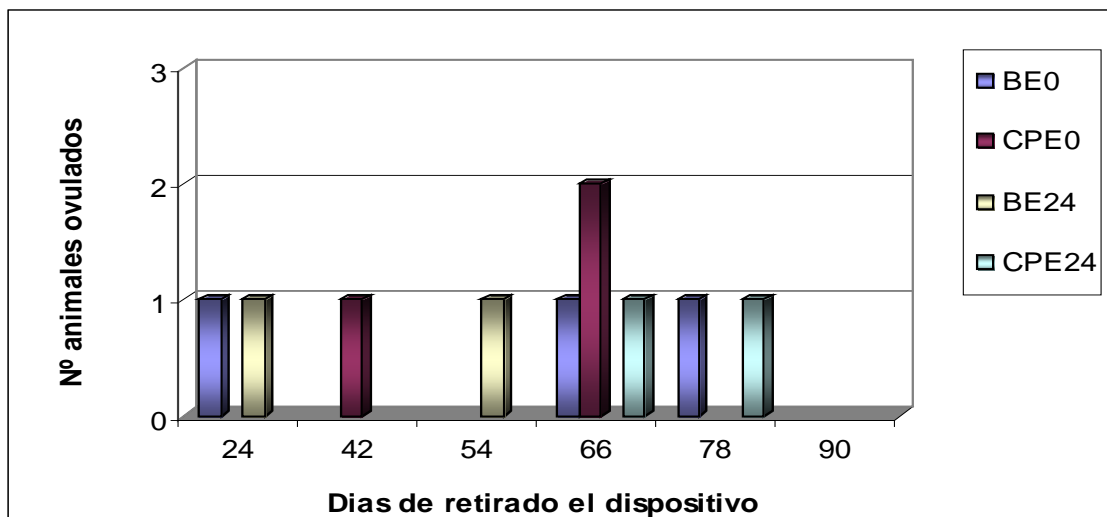
No se observaron efectos del tipo de sal utilizada, del momento de su aplicación o de su interacción sobre el momento de ovulación (Figura 9).



**Figura 9.** Momento de la ovulación (X±EE) después de un tratamiento con Indugest Plus y BE ó CPE aplicado a las 0 ó 24 horas de finalizado el mismo.

### Distribución de la ovulación

La figura 10 muestra la distribución de las ovulaciones desde el retiro de la esponja hasta el cuarto día (96hs). El 66,6% (2/3) del tratamiento BE0 ovuló antes de las 72 horas de retirado el dispositivo, mientras que el 100% de los tratamientos CPE0 (3/3) y BE24 (2/2), en tanto que solo el 50,0% (1/2) del tratamiento CPE24 lo hizo en el mismo período.



**Figura 10:** Número de vacas ovuladas y su distribución durante 96 horas luego del tratamiento con Indugest Plus y BE ó CPE aplicado a las 0 ó 24 horas de finalizado el mismo

#### Tasa de ovulación

La tasa de ovulación general fue de 28,5% (10/35). No hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre tratamientos en la tasa de ovulación medida hasta las 96 horas del retiro del dispositivo en la totalidad de animales (Cuadro 16) observándose en general una respuesta muy reducida en todos los casos.

**Cuadro 16.** Tasa de ovulación (%)(vacas que ovularon/vacas tratadas) hasta las 96 horas luego de un tratamiento Indugest Plus y BE ó CPE aplicado a las 0 ó 24 horas después de finalizado el mismo

	BE0	CPE0	BE24	CPE24	Valor p
OV	33,3(3/9)	33,3(3/9)	22,2(2/9)	25,0(2/8)	0,9

OV: vacas que ovularon.

#### Tasa de crecimiento del folículo ovulatorio

No hubo diferencias significativas entre tratamientos  $p > 0,05$  en la tasa de crecimiento para las distintas sales, el momento de aplicación de las mismas, ni la interacción entre ambos (Cuadro 17).

**Cuadro 17.** Tasa de crecimiento (mm/día) de los folículos ovulatorios ( $X \pm EE$ ), luego de un tratamiento con Indugest Plus y BE ó CPE a las 0 ó 24 horas de finalizado el mismo

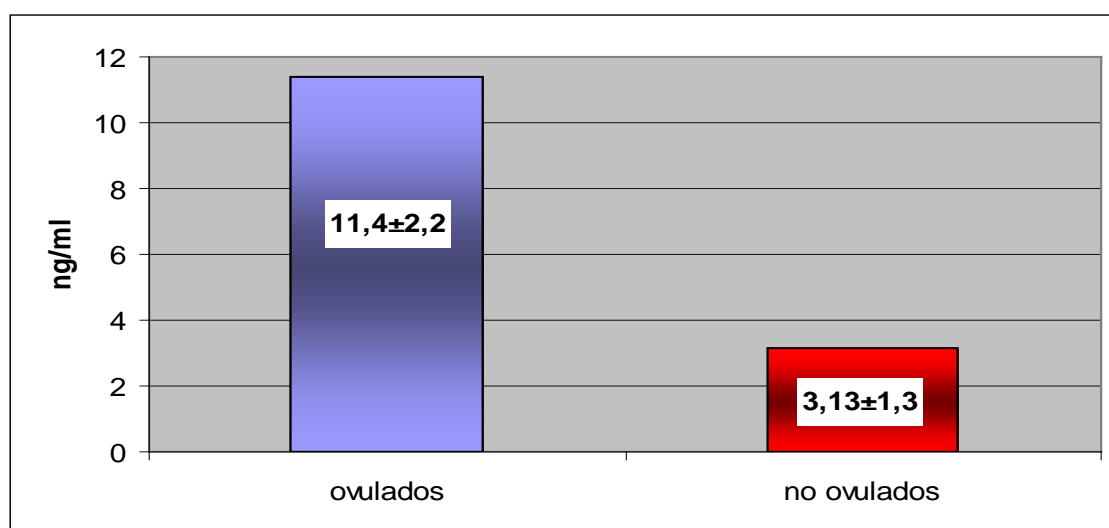
Tratamiento	N	$X \pm EE$	Valor p
BE0	3	1,00 $\pm$ 0,40	
CPE0	3	1,54 $\pm$ 0,38	
BE24	2	0,72 $\pm$ 0,47	
CPE24	2	0,92 $\pm$ 0,48	0,64

#### Vida media del cuerpo lúteo

De los 10 animales que se consideró como ovulados desarrollaron un cuerpo lúteo sólo cuatro, determinado mediante los niveles sanguíneos de progesterona. También hubo 4 animales que presentaron niveles de progesterona superiores a 1 ng/mL a los 12 días de retirado el dispositivo, de los cuales dos mantuvieron los niveles hasta el día 17 en que fue la siguiente determinación, en cambio los otros dos sólo lo hicieron el día 12 en forma puntual. De los animales aquí evaluados, no se observó ninguno con los niveles de progesterona superiores a un 1 ng/mL en el período evaluado.

### Concentración de progesterona

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para la concentración media de progesterona ( $p > 0,05$ ) cuando se analizó el área bajo la curva. En cambio, se observaron diferencias significativas entre animales que ovularon y que no ovularon ( $p = 0,0032$ ) bajo el mismo criterio.



**Figura 11:** Concentración media de progesterona (ng/mL) plasmática (área bajo la curva) en animales que ovularon y que no ovularon ( $X \pm EE$ ) luego de un tratamiento con Indugest plus de 8 días de duración

Cuando se realizó el análisis mediante el procedimiento mixed tampoco se observó un efecto ni del tratamiento, ni del momento, pero si se observó un efecto según hayan ovulado o no ( $p = 0,0005$ ).

#### 4.2.3 EXPERIMENTO 5

El presente experimento fue realizado para reanalizar algunas de las respuestas observadas en el experimento anterior que se consideraron fuera de los patrones esperados. Las determinaciones realizadas fueron las mismas pero sólo se realizó la aplicación del BE y CPE al momento de retirar los dispositivos por no disponer de un número de animales apropiado para incluir los 4 tratamientos.

#### Época

El experimento fue realizado en el mes de diciembre de 2006.

#### Animales utilizados

Se utilizaron 23 vacas Aberdeen Angus, multíparas y con ternero al pie, con una condición corporal de  $4,6 \pm 0,1$  ( $X \pm EE$ ) y un intervalo parto-tratamiento de  $38,2 \pm 0,8$  ( $X \pm EE$ ) días al comenzar el tratamiento.

### **Tratamientos**

Los animales recibieron el tratamiento inductor (**Indugest plus**), pero al retirar el dispositivo (día 8) los animales se asignaron en forma aleatoria para recibir 0,7mg de BE o 0,5mg de CPE (Laboratorios-König, Argentina), dando lugar a los siguientes tratamientos:

**BE:** 0,7mg de BE (IM) al retiro de la esponja.

**CPE:** 0,5mg de CPE (IM) al retiro de la esponja.

### **Estudios ecográficos**

Los parámetros estudiados fueron los mismos que en los ensayos anteriores y la metodología utilizada en su recopilación también.

### **Análisis estadístico**

Las variables analizadas y las pruebas estadísticas utilizadas fueron las mismas que en experimentos anteriores.

## **4.2.4 RESULTADOS**

### **Pérdidas de dispositivos**

Un animal (4,3%), perteneciente al grupo BE perdió la esponja por lo que fue excluido del posterior análisis estadístico.

### **Estado fisiológico**

Dos animales (8,6%) no tenían folículo dominante mayor a 8 mm al momento de retirar el dispositivo, pertenecientes uno a cada grupo respectivamente.

Un animal (4,1%) perteneciente al grupo CPE presentó ovulación doble luego de retirar la esponja.

### **Diámetro del folículo dominante al retiro de la esponja y del folículo ovulatorio**

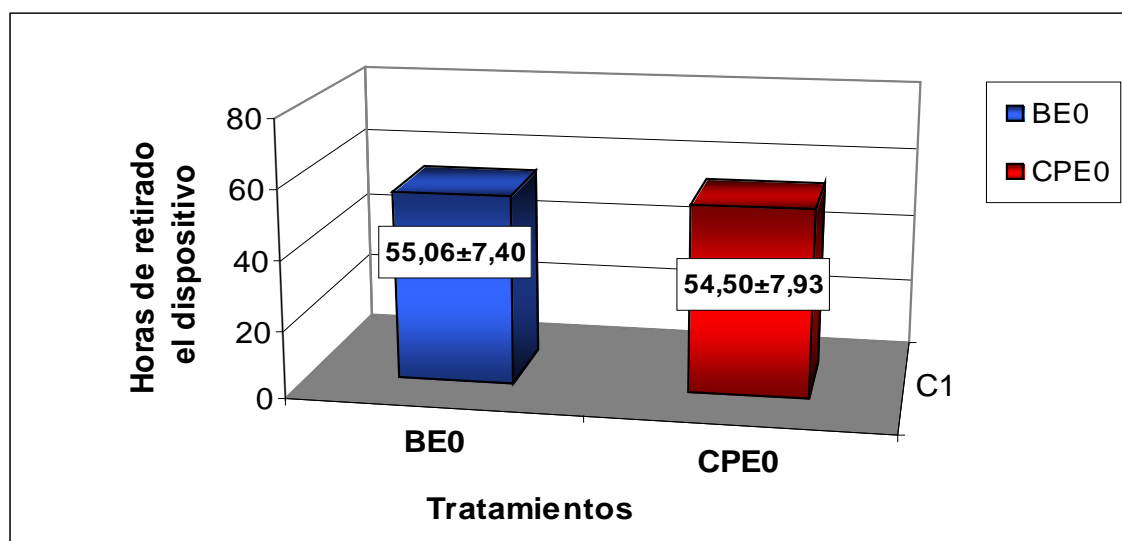
El tamaño del folículo dominante al retirar el dispositivo no presentó diferencias significativas entre tratamientos ( $p=0,60$ ) ni tampoco se observaron diferencias en el tamaño del folículo ovulatorio ( $p=0,31$ ) (Cuadro 18).

**Cuadro 18:** Diámetro (mm) del folículo dominante y ovulatorio ( $X \pm EE$ ) luego del tratamiento con Indugest Plus y BE ó CPE aplicado al finalizar el mismo

Trat	FOL. DOMINANTE			FOL. OVULATORIO		
	N	Diámetro	Valor P	N	Diámetro	Valor P
BE0	11	$10,8 \pm 0,9$		8	$13,7 \pm 0,4$	
CPE0	11	$10,1 \pm 0,9$	0,6	7	$12,9 \pm 0,5$	0,3

### Momento de la ovulación

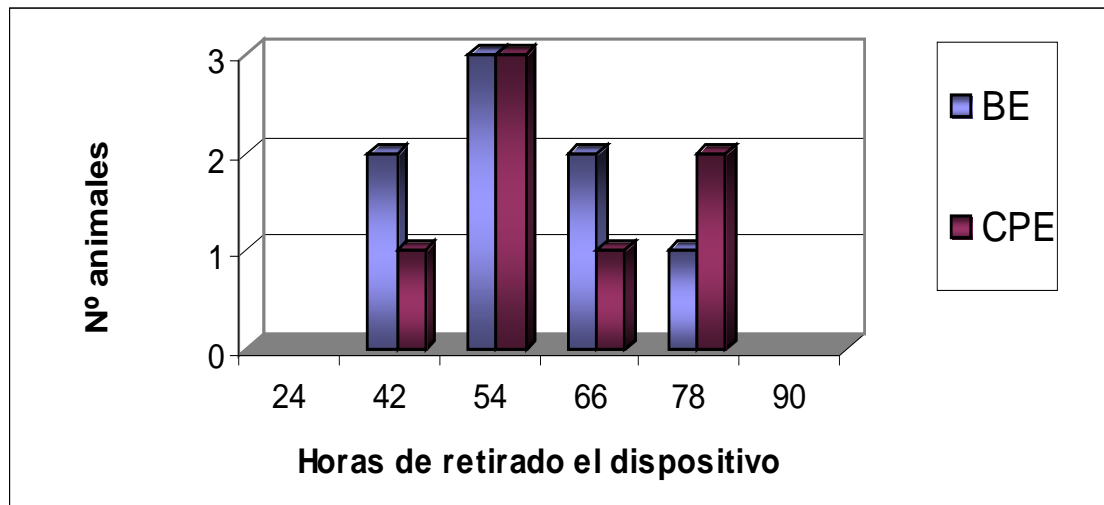
No se observó un efecto significativo de los tratamientos ( $p>0,05$ ) sobre el momento de la ovulación medido en horas (Figura 12).



**Figura 12:** Momento de la ovulación en horas según el tipo de sal utilizada ( $X \pm EE$ ) luego de un tratamiento con Indugest Plus

### Distribución de las ovulaciones

El 87,5% (7/8) de las vacas del Grupo BE y el 71,4% (5/7) pertenecientes al grupo CPE ovularon dentro de las 72hs. después de la aplicación de las sales de estradiol (Figura 13).



**Figura 13:** Distribución de las ovulaciones luego del tratamiento con Indugest Plus y BE ó CPE al momento de retirar el dispositivo

#### Tasa de ovulación

La tasa de ovulación general fue del 68,2% (15/22), mientras que las tasas parciales fueron 72,7% (8/11) y 63,6% (7/11), para los grupos BE0 y CPE0 respectivamente ( $P > 0,05$ ) (Cuadro 19).

**Cuadro 19.** Tasa de ovulación (%) (vacas que ovularon/vacas tratadas) hasta las 96 horas luego de un tratamiento Indugest Plus y BE o CPE aplicado al momento de finalizado el mismo

	BE	CPE	GENERAL	Valor p
OV	72,7(8/11)	63,6(7/11)	68,2 (15/22)	0,87

OV: vacas que ovularon.

#### Tasa de crecimiento del folículo ovulatorio

No hubo diferencia significativa ( $p=0,26$ ) en la tasa de crecimiento del folículo ovulatorio entre los dos tratamientos, que fueron de  $1,05 \pm 0,22$  mm/día para el grupo BE y de  $0,66 \pm 0,24$  mm/día ( $X \pm EE$ ) para el grupo CPE.

**Cuadro 20.** Tasa de crecimiento (mm/día) del folículo ovulatorio ( $X \pm EE$ ), luego de un tratamiento con Indugest Plus y BE ó CPE a las 0 ó 24 horas de finalizado el mismo

Tratamiento	N	$X \pm EE$	Valor p
BE	8	$1,05 \pm 0,22$	
CPE	7	$0,66 \pm 0,24$	0,26



#### **4.2.5 EXPERIMENTO 6**

Tal como se hizo en el experimento 3 con las vacas cíclicas, el objetivo de este Experimento fue determinar el efecto de las dos sales de estradiol (BE y CPE) aplicadas a la hora 0 y 24 pero después de la utilización de un tratamiento con progesterona natural en lugar de un progestágeno sintético. Como en casos anteriores, los efectos de los tratamientos aplicados se evaluaron sobre la tasa de ovulación, la distribución de las ovulaciones, el diámetro de los folículos dominante y ovulatorio, el momento de la ovulación, la tasa de crecimiento del folículo ovulatorio, la vida media del cuerpo lúteo y la concentración de progesterona plasmática.

#### **Época**

El trabajo se realizó entre el 8 de noviembre y el 19 de diciembre del 2007.

#### **Animales utilizados**

Se utilizaron 36 vacas pluríparas, con cría al pie, de la raza Aberdeen Angus, con una condición corporal de  $4,5 \pm 0,1$  ( $X \pm EE$ ) en la escala de 1-9; con un peso de  $428 \pm 6,1$  kg ( $X \pm EE$ ), con un posparto al inicio del tratamiento de  $39,6 \pm 0,9$  ( $X \pm EE$ ) días.

#### **Tratamientos**

Los 36 animales fueron tratados con el protocolo DIB de acuerdo a lo descrito previamente.

#### **Estudios ecográficos**

Se monitorearon los ovarios de cada vaca por medio de ultrasonografía transrectal y siguiendo las pautas de la metodología general se recopiló y analizó la información en forma similar a los experimentos anteriores.

#### **Muestreo sanguíneo**

Se tomaron muestras los días 7, 12, y 17 de retirado el dispositivo, para evaluar la formación y vida media del cuerpo lúteo, considerándose normales aquellos que mantuvieron niveles de progesterona  $> 1$  ng/mL en las 3 muestras como mínimo.

#### **Análisis estadístico**

Las variables estudiadas fueron las mismas y fueron analizadas de la misma manera que en el experimento N° 4, aquí se analizó también la vida media del cuerpo lúteo y la concentración de progesterona.

#### 4.2.6 RESULTADOS

##### Pérdidas de dispositivos

No registraron pérdidas de dispositivos

##### Estado fisiológico

Dos animales 5,5% (2/36) no presentaron folículos > 10mm, en todo el período de estudio con ultrasonografía (uno perteneciente al tratamiento CPE24 y otro al grupo BE24).

##### Diámetro del folículo dominante al retiro de la esponja y del folículo ovulatorio

El folículo dominante al retiro del dispositivo mostró una diferencia significativa en los animales que fueron asignados al tratamiento CPE24 ( $P < 0,05$ ) observándose los mayores tamaños con el BE24 y el CPE0 (Cuadro 21), cuando estos fueron excluidos no hubo diferencia significativa entre los tratamientos restantes.

**Cuadro 21:** Diámetro de folículos dominante y ovulatorio ( $X \pm EE$ ; mm) después del protocolo DIB por 8 días y BE o CPE aplicado a las 0 ó 24 horas de finalizado el mismo

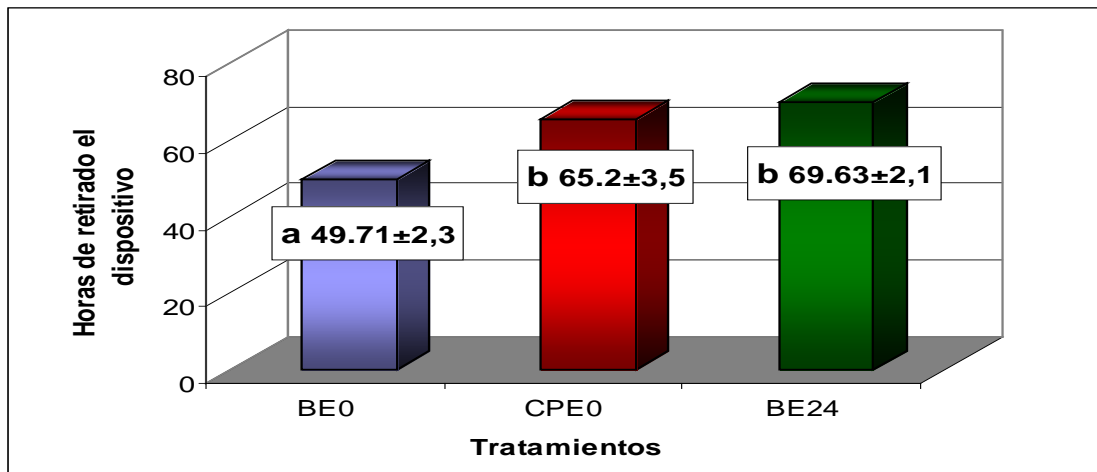
Tratamientos	FOL. DOM.			FOL. OVUL		
	N	Diámetro	Valor p	N	Diámetro	Valor p
<b>BE0</b>	9	9,9 ± 0,48 ab		8	11,18 ± 0,28	
<b>CPE0</b>	9	10,7 ± 0,48 a		7	12,74 ± 0,25	
<b>BE24</b>	9	11,0 ± 0,48 a		4	13,37 ± 0,42	
<b>CPE24</b>	9	8,8 ± 0,48 b	0,004	0	0	0,12

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ )

Por su lado, el tratamiento CPE24 tuvo los menores valores con respecto a los grupos BE24 y CPE0. En cuanto al folículo ovulatorio, no se observaron diferencias ( $p > 0,05$ ) entre los animales de los tratamientos que ovularon (Cuadro 21).

##### Momento de la ovulación

Se observó un efecto significativo de los tratamientos sobre el momento de ovulación (Figura 14).

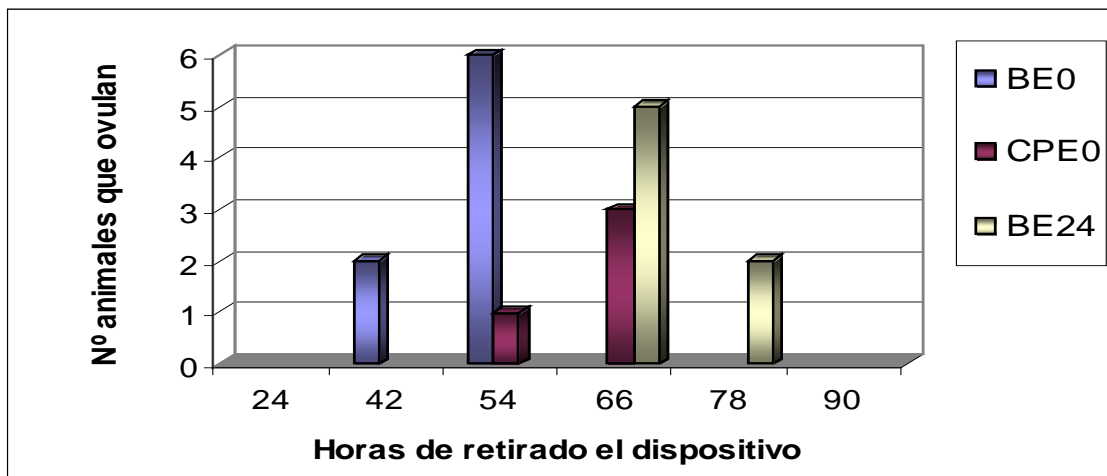


**Figura 14.** Momento de la ovulación después de un tratamiento con progesterona de 8 días y BE o CPE aplicado a las 0 ó 24 horas de finalizado el mismo. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos

Como podemos apreciar, en este caso el tratamiento BE0 presentó un momento de ovulación más adelantada con respecto a los tratamientos CPE0 y BE24, mientras que entre estos no hubo diferencias.

#### Distribución de las ovulaciones

En los tres tratamientos en que hubo ovulación, más del 70% de los animales lo hicieron en forma muy sincronizada (en un lapso de 12 horas) y dentro de las 72 horas de retirado el dispositivo, además en el tratamiento BE0 se observó que la ovulación fue adelantada con respecto a los otros tratamientos.



**Figura 15.** Distribución de las ovulaciones luego de un tratamiento con DIB y BE ó CPE aplicado a las 0 ó 24 horas después de finalizado el mismo

### Tasa de ovulación

Se observó una tasa de ovulación general del 52,8% (19/36) observándose diferencias significativas entre tratamientos ( $p=0,0006$ ) (Cuadro 22).

**Cuadro 22.** Tasa de ovulación (%) (vacas que ovularon/vacas tratadas) hasta las 96 horas luego de un tratamiento con DIB y BE ó CPE aplicado a las 0 ó 24 horas después de finalizado el mismo

	BE0	CPE0	BE24	CPE24	Valor p
OV	a88,8 (8/9)	a44,4 (4/9)	a77,7 (7/9)	b0 (0/9)	0.0006

OV: vacas que ovularon. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) entre tratamientos

Como se observa en el Cuadro 22, en el tratamiento CPE24 no se observaron ovulaciones hasta las 96 hs de finalizado el tratamiento DIB lo cual deprimió la tasa de ovulación general. Cuando se analizaron los otros tres tratamientos sin el CPE24, no se registró diferencia significativa ( $p>0,05$ ) en la tasa de ovulación a pesar de los bajos valores observados en el CPE0.

### Tasa de crecimiento del folículo ovulatorio

No se observó efecto significativo ( $p>0,05$ ) de los tratamientos sobre la tasa de crecimiento de los folículos ovulatorios (Cuadro 23).

**Cuadro 23.** Tasa de crecimiento (mm/día) de los folículos ovulatorios ( $X \pm EE$ ), luego de un tratamiento con progesterona por 8 días y BE ó CPE a las 0 ó 24 horas de finalizado el mismo

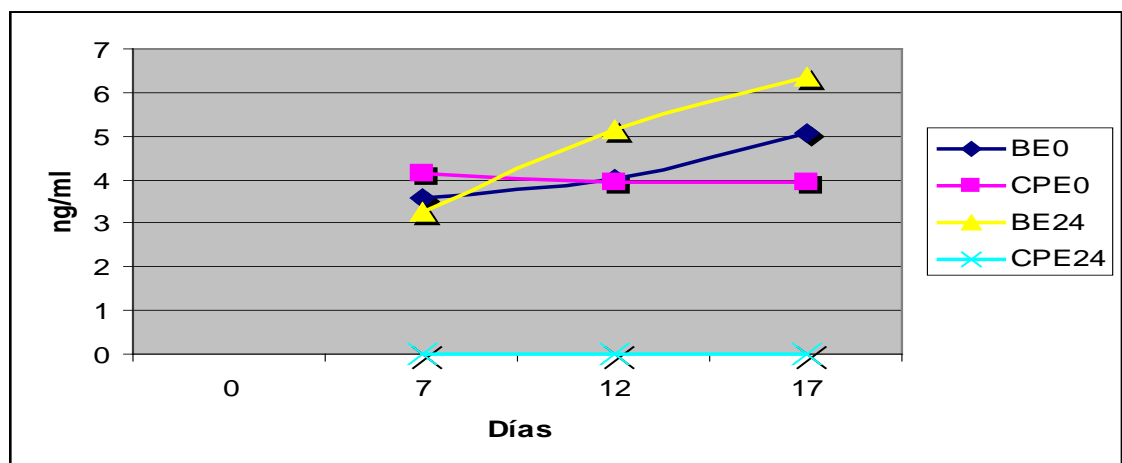
Tratamiento	N	$X \pm EE$	Valor p
BE0	8	0,39 $\pm$ 0,12	
CPE0	4	0,54 $\pm$ 0,18	
BE24	7	0,58 $\pm$ 0,11	0,54

### Vida media del cuerpo lúteo

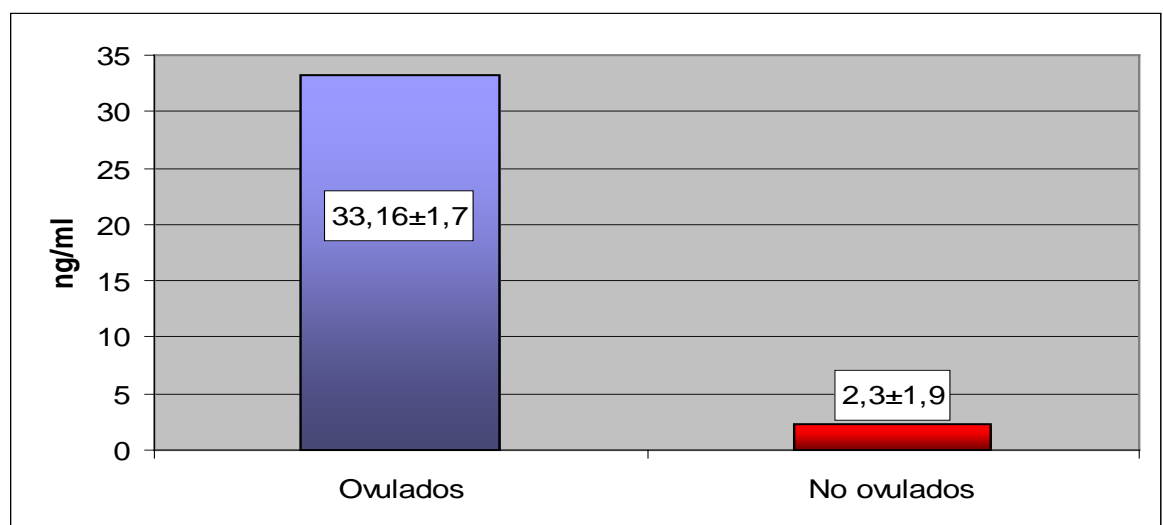
En este ensayo los diecinueve animales observados como ovulados fueron confirmados luego a través de sus niveles de progesterona. Hubo dos animales que presentaron niveles de progesterona superiores a 1 ng/mL y que no fueron registrados como ovulados, en la recopilación de datos con la ecografía. Todos los animales presentaron niveles adecuados en los tres muestreos sanguíneos. Con la excepción de un animal que sólo supero el nivel en dos muestreos y uno de los no considerados como ovulados que lo hizo sólo en un muestreo.

### Concentración de progesterona.

Cuando se analizó el total de progesterona producido en plasma, mediante el área bajo la curva, se observó un efecto del tratamiento BE vs. CPE ( $p>0,05$ ), una marcada tendencia según la hora de aplicación ( $p=0,07$ ), pero no un efecto de la interacción. Al analizar entre muestreos no se observó efecto del tratamiento, pero si una tendencia en efecto del tiempo ( $p=0,055$ ). También hubo un efecto cuando se evaluó los animales ovulados versus los no ovulados.



**Figura 16.** Concentración media de progesterona plasmática y CL de vida media normal luego de un tratamiento con progesterona de 8 días de duración (Día 0= retiro del dispositivo)



**Figura 17.** Concentración media de progesterona plasmática (ng/mL) determinada en animales según hallan ovulado o no ( $X \pm EE$ ). Luego de un tratamiento con progesterona de 8 días de duración e inyectado BE ó CPE en ese momento ó 24 horas más tarde

## **5 ENSAYOS DE FERTILIDAD**

### **5.1 EXPERIMENTO 7**

Los objetivos del experimento fueron evaluar en condiciones de campo la factibilidad y fertilidad, que se podía obtener al utilizar tanto el protocolo Indugest Plus o con el DIB, con la aplicación de CPE y BE al momento de retirado los dispositivos o a las 24hs en animales de primera parición.

#### **Ubicación geográfica**

El trabajo se realizó en el establecimiento agropecuario “El Sapo” en la localidad de Carhué, partido de Adolfo Alsina, provincia de Buenos Aires, Argentina.

#### **Época**

El trabajo se realizó entre el 2 de octubre y el 27 de noviembre del 2007.

#### **Animales utilizados**

Se utilizaron 192 vacas de primera parición, de 36 meses de edad, sin cría al pie, de un rodeo con base Hereford y sus cruza, con una condición corporal media aproximada de 4,5 (escala de 1-9); con un peso de 420kg promedio, con más de 90 días de paridas al inicio del tratamiento. Las vacas estuvieron mantenidas sobre pasturas de alfalfa (*Medicago sativa*), festuca (*Festuca arundinacea*), cebadilla (*Bromus unioloides*) y ray grass (*Lolium perenne*).

#### **Tratamientos**

Los animales se dividieron al azar en dos grupos, uno de 80 (tratados con el protocolo Indugest Plus) y otro de 112 vacas (tratadas con el protocolo DIB). Al retiro de los dispositivos de cada grupo se aplicó BE o CPE a las 0 ó a las 24hs y en todos los casos se aplicó 500µg de cloprostenol sódico (Ciclase DL, Syntex IM) al momento del retiro de los dispositivos.

#### **Inseminación artificial a tiempo fijo (IATF)**

Se realizó la IATF a las (47-51hs) de la hora de extracción de los dispositivos. Todas las vacas fueron inseminadas por el mismo operador con semen congelado/descongelado en pajuelas de 0,5ml, de un toro Aberdeen Angus de probada fertilidad.

### **Diagnóstico de gestación**

Para evaluar la tasa de preñez (animales preñados/animales inseminados), se realizó ultrasonografía transrectal a los 45 días de la IATF utilizando un ecógrafo ALOKA SSD500 equipado con un transductor lineal de 5MHz.

### **Análisis estadístico**

La variable analizada fue la tasa de preñez, mediante el procedimiento GENMOD del paquete estadístico SAS (SAS, 1998).

Para ello se utilizó el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \alpha_j + \gamma_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijk}$ : Variable respuesta de la k-ésima observación correspondiente al i-ésimo tratamiento y al j-ésimo dispositivo.

$\mu$ : Media general.

$\tau_i$ : Efecto del i-ésimo tratamiento sobre la variable respuesta.

$\alpha_j$ : Efecto del j-ésimo momento de aplicación sobre la variable respuesta.

$\gamma_{ij}$ : Efecto de la interacción del i-ésimo tratamiento con el j-ésimo momento de aplicación sobre la variable respuesta.

$\varepsilon_{ijk}$ : Error experimental.

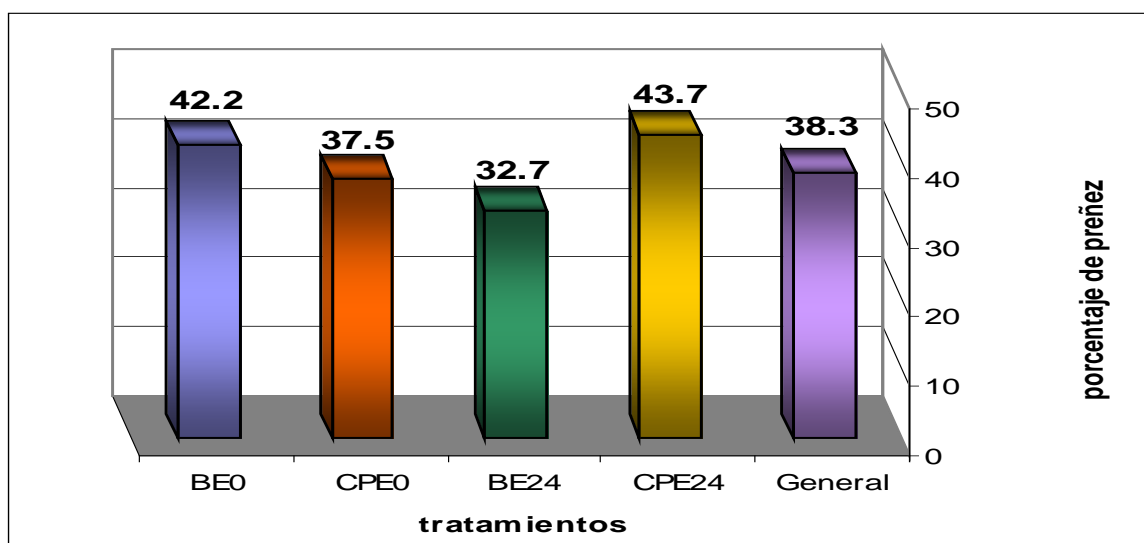
## **5.2 RESULTADOS**

### **Pérdida de dispositivos**

Dos animales 2,5% (2/80) de BE0 y CPE24 respectivamente, perdieron la esponja. No hubo pérdidas del dispositivo DIB. Diez animales del total de los tratados (5,2%; 10/192) no fueron diagnosticados por no presentarse al momento del examen, por lo que todos estos fueron excluidos del análisis posterior.

### **Tasa de preñez**

La tasa general de preñez analizada como el número de vacas preñadas/número de vacas con diagnóstico de gestación fue del 38,3%, y su distribución en cada grupo se muestra en la Figura 18.



**Figura 18.** Tasa de preñez (%)(número de vacas que se preñaron/número de vacas con diagnóstico de gestación) después de un tratamiento de 8 días con progesterona o progestágeno y BE o CPE aplicado a las 0 ó 24 horas de finalizado el mismo

No hubo efecto ( $p > 0,05$ ) del dispositivo, de la sal de estradiol utilizada, del momento en que se aplicó, ni de su interacción sobre la tasa de preñez de los animales.

### 5.3 EXPERIMENTO 8

El objetivo de este trabajo fue similar al del anterior pero en el mismo solo se utilizó el protocolo DIB.

#### Ubicación geográfica

El trabajo se realizó en el establecimiento agropecuario “La Flor” en la localidad de Olazcoaga, partido de Bragado, provincia de Buenos Aires, Argentina.

#### Época

El trabajo se realizó entre el 10 de octubre y el 26 de noviembre del 2007.

#### Animales utilizados

Se utilizaron 221 vacas multíparas, con cría al pie, de un rodeo con base Hereford y sus cruza, con una condición corporal media aproximada de 4,5 en la escala de 1-9; con un peso de 480kg promedio, con un posparto de alrededor de 85 días al inicio del



tratamiento y mantenidas sobre pasturas de alfalfa (*Medicago sativa*), festuca (*Festuca arundinacea*), cebadilla (*Bromus unioloides*) y ray grass (*Lolium perenne*).

### **Tratamientos**

Los animales fueron tratados con el protocolo DIB ya descrito y se aplicó BE y CPE al finalizar el mismo o 24hs más tarde. Al retiro de los dispositivos se aplicó 500µg de cloprostenol sódico (Ciclase DL, Syntex) en forma IM a todos los animales.

### **Inseminación artificial a tiempo fijo**

Se realizó la IATF de los animales a las (47-50hs) desde la extracción del dispositivo, por el mismo operario y con el mismo semen utilizado en el ensayo anterior.

### **Diagnóstico de gestación**

Para evaluar la tasa de preñez (animales preñados/animales inseminados), se realizó el diagnóstico de gestación 37 días después de la inseminación artificial por medio de un ecógrafo ALOKA SSD500 equipado con un transductor lineal de 5MHz.

### **Análisis estadísticos**

Fueron similares al del experimento anterior.

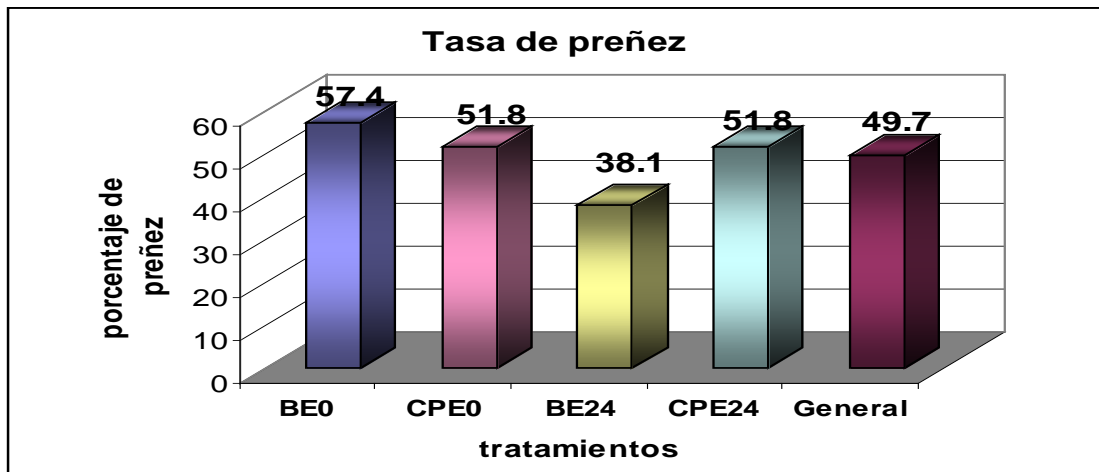
## **5.4 RESULTADOS**

### **Pérdida de dispositivos**

El 1,3% (3/221) de los animales perdieron el dispositivo, correspondientes a los grupos BE0, CPE0 y BE24 respectivamente. Un animal del tratamiento CPE24 no se presentó al momento del diagnóstico. Estos cuatro animales fueron excluidos del análisis.

### **Tasa de preñez**

La tasa de preñez se analizó como número de vacas que se preñaron/número de vacas con diagnóstico de gestación. La preñez general fue del 49,7% (108/217) y no fue afectada por las sales, ni por la hora de aplicación (Figura 19).



**Figura 19.** Tasa de preñez (%)(número de vacas que se preñaron/número de vacas con diagnóstico de gestación) después de un tratamiento con progesterona de 8 días y BE o CPE aplicado a las 0 ó 24 hs de finalizado el mismo

## Discusión

Existen actualmente diversos tratamientos hormonales capaces de inducir y sincronizar la ovulación en bovinos (Alberio et al., 1984; Pursley et al., 1995; Colazo et al., 2003). Uno de los más difundidos en nuestro país utiliza dispositivos intravaginales de liberación controlada de progestágeno/progesterona durante un período de 7 a 9 días. Asociado con esto, se realiza la administración de distintas sales de estradiol por vía intramuscular (IM), tanto al momento de colocar el dispositivo como al momento de su extracción.

Tomando en cuenta este protocolo básico, se realizó una serie de estudios con la finalidad de intentar mejorar algunos aspectos de la técnica, que facilitarían la utilización de los tratamientos sin afectar su eficiencia biológica. Los resultados obtenidos en esta serie de ensayos son la continuación de una línea de trabajo que viene llevando adelante el Grupo de Biotecnología de la Reproducción de la EEA Balcarce.

En este estudio fueron analizados varios aspectos relativos a estos tratamientos con sales de estradiol, su momento de aplicación y a continuación se presentan los comentarios referidos a estos análisis

### **Pérdidas de dispositivos**

Los trabajos realizados, tanto con vacas cíclicas (sin cría al pie) como con vacas en anestro (con cría al pie), tuvieron 8 días de duración. Esta duración de los tratamientos fue tomada a partir de un estudio previo (Manes, 2007) que demostró que ésta sería la duración más apropiada para disponer de folículos de tamaño susceptible de recibir el estímulo de la LH para inducir la ovulación en forma sincrónica.

En las vacas sin cría al pie no se registraron pérdidas del dispositivo INDUGEST. Esta observación coincide con lo obtenido en los trabajos de Sreenan (1975) y Scena et al. (1994) en donde se obtuvieron muy bajos índices de pérdidas de esponjas intravaginales. Sreenan (1975), utilizando dispositivos de poliuretano (esponjas similares a las de este estudio), observó que al disminuir la duración de los tratamientos mejoró sensiblemente el grado de retención de estos, de un 80% en tratamientos de 20 días a un 90 a 100% en los de 10 días de duración. En otro trabajo con vacas con cría y un tratamiento de 7 días de duración. Callejas et al. (2005) no observaron pérdidas de los dispositivos coincidiendo con lo observado por Scena et al. (1994) al evaluar un dispositivo similar en vacas primíparas en anestro.

En nuestros estudios en vacas con cría al pie (anestro), se observó un porcentaje de pérdidas que osciló entre 2,8% y 4,3% (experimentos 4 y 5: respectivamente). En los ensayos de fertilidad, la pérdida registrada fue de 2,5% en el Exp. 7 (dispositivo esponja) y 1,3% en el Exp. 8 (dispositivo DIB). Por el contrario, en el trabajo de Colazo et al. (2004), se informaron pérdidas del 7 al 15,2% (dispositivo CIDR) en vacas con 67 días de intervalo posparto. Estos autores observaron que, las vacas que no perdieron los dispositivos presentaron un mayor intervalo posparto que aquellas que lo perdieron. Aparentemente se produciría una pérdida de tonicidad del útero después del parto, la cual también se reflejaría en las paredes vaginales. Esta tonicidad de las paredes vaginales se recuperaría a medida que transcurre el intervalo posparto, favoreciendo la retención del dispositivo. Scena et al. (1994) informaron una recuperación total de los dispositivos intravaginales en vacas de segundo servicio, atribuyendo estos resultados al menor tamaño vaginal y a la mayor elasticidad de los tejidos de las hembras primíparas.

En nuestros trabajos donde se evaluó la dinámica folicular y la ovulación, es válido remarcar que los intervalos parto-inicio del tratamiento fueron inferiores a los utilizados por Colazo et al. (2004), no alcanzando a los 40 días en promedio; pero en los ensayos de fertilidad, éste se extendió hasta los 80–90 días en promedio. Asimismo, las vacas empleadas fueron múltiparas y se encontraban seguramente en un período de recuperación de elasticidad tisular, pudiendo ser esta la causa de la pérdida del dispositivo tipo esponja de poliuretano. La discrepancia de nuestros resultados con los de Colazo et al. (2004), podría deberse a los distintos dispositivos utilizados en cada caso. Aparentemente, el dispositivo tipo esponja pareciera tener un mayor grado de persistencia en comparación al dispositivo tipo CIDR, y esto se debería a una mayor superficie de contacto con las paredes del tracto genital, que favorecería su retención.

### **Estado fisiológico**

Un desafío importante en el ganado para carne alimentado a pasto es lograr un tratamiento hormonal simple y versátil, para animales en distinta condición fisiológica (anestro o ciclando). En nuestros trabajos no se realizó un diagnóstico inicial de ciclicidad, y la misma se estableció mediante el análisis retrospectivo de la información recabada por medio de la ultrasonografía. Este hecho se debió a problemas técnicos, por los cuales no se contó con el ecógrafo al inicio de los trabajos. Por ello, al momento de aplicar el tratamiento se revisaron las vacas mediante palpación

transrectal, y al momento de retirar los dispositivos (día 8) se determinaron las estructuras ováricas mediante ecografía transrectal.

En los tres ensayos con animales sin cría al pie, el porcentaje de cuerpos lúteos (CL) detectado se aproximó al 70% al momento de retirar el dispositivo. La duración promedio de un ciclo estral bovino es de 21 días y con una fase luteal de 17 días aproximadamente (Rivera, 1993; Gordon, 1996). De acuerdo con ello, si se realiza una sola observación ovárica en animales en los cuales la totalidad se encuentra ciclando, se debería encontrar aproximadamente entre el 75% y 80% de animales con CL. De acuerdo con esto, el porcentaje de vacas ciclando en los ensayos realizados puede estimarse que estuvo entre el 90 y el 100%. Esto es lo esperable en animales como los de este grupo con un intervalo posparto de más de 90 días, que a su vez tuvieron una condición corporal media superior a 5 (escala 1 a 9) y sin cría al pie.

Por el contrario, en el caso de las vacas con cría, se considera que en condiciones de manejo en pastoreo el intervalo parto-primera ovulación oscila entre 50 a 90 días (Murphy et al., 1990; Rhodes et al., 2003). En los tres ensayos realizados con vacas con cría estas fueron consideradas en anestro, aun que en el experimento 4 dos animales presentaron actividad luteal al retiro del dispositivo, ya que el posparto fue corto en todos los casos (entre 37 y 39 días en promedio) y ningún otro animal presentó un cuerpo lúteo al momento de retirar el dispositivo.

### **Diámetro del folículo dominante**

En los experimentos aquí realizados, se utilizó un protocolo basado en la aplicación de progesterona y estradiol para sincronizar la onda folicular, tanto para vacas cíclicas como en anestro. Estos protocolos producen una supresión de las hormonas FSH y LH lo que provoca una atresia de los folículos existentes independientemente del estadio del ciclo, provocando el inicio de una nueva onda folicular entre 3 y 5 días más tarde (Bó et al., 1995; Kinder et al., 1996; Martínez et al., 2005).

El inicio de la onda comienza con un período de reclutamiento folicular en donde folículos de un diámetro de 2mm en la especie bovina, son estimulados por hormonas gonadotróficas a desarrollarse. Un pico de hormona folículo estimulante (FSH) se libera, en concordancia con la emergencia de la onda folicular (Adams et al., 1992). Los dos folículos mayores llegan a un diámetro aproximado de 8,5mm y 7,7mm unos 3 días luego de este pico. En este momento se inicia el desvío del diámetro de los

folículos, caracterizado por el continuo crecimiento del folículo de mayor tamaño para transformarse en dominante y la atresia de los folículos restantes (Ginther, 2000.; Ginther et al., 2001).

En consecuencia, al finalizar los tratamientos de sincronización de ovulaciones aquí empleados, deberían observarse folículos de entre 8mm y 10mm para ser considerados como aptos para ovular.

En los experimentos 1 y 2, realizados con dispositivos INDUGEST, el diámetro promedio del folículo dominante al retiro del dispositivo fue de  $9,2 \pm 0,7$ mm y  $9,7 \pm 0,7$ mm respectivamente. En el experimento 3, con dispositivo DIB, el diámetro promedio del folículo dominante fue de  $11,7 \pm 0,8$ mm. En ningún caso hubo un efecto de los tratamientos en cada experimento. Pero como hasta aquí los experimentos fueron similares, salvo el tipo de progestágeno utilizado (natural o de síntesis), se combinaron y se analizaron los tamaños de los folículos dominantes al finalizar los tratamientos y se observó una diferencia significativa a favor del ensayo que utilizó DIB respecto de los ensayos con dispositivos INDUGEST ( $p=0,0001$ ). La explicación más razonable de este efecto sería el porcentaje y el tiempo en que se produjo la emergencia de la nueva onda folicular. La absorción y el metabolismo del estradiol aplicado al inicio de los tratamientos para producir la emergencia de la nueva onda folicular es fundamental y varias formulaciones y dosis han sido evaluadas (Thundathil et al., 1997; Mapletoft et al., 1999; Colazo et al., 2003; Martínez et al., 2007). Se ha observado que todas las formulaciones son efectivas en la inducción de la emergencia de una nueva onda, aunque en forma más tardía o variable que cuando se utiliza 5mg estradiol-17 beta (Mapletoft et al., 2003). De acuerdo a esto, el intervalo desde el tratamiento hasta la emergencia de la nueva onda folicular, parecería ser dependiente, tanto de la sal de estradiol utilizada como de su dosis y si bien se trató del mismo tipo sal (BE), en el caso del INDUGEST fue de 3mg y de 2mg en el caso de los DIB.

Se observó un efecto debido a la presencia del cuerpo lúteo al momento de retirar el dispositivo sobre el diámetro del folículo dominante en los experimentos 2 ( $8,7 \pm 0,4$  vs  $11,8 \pm 0,6$ mm.  $P=0,0006$ ) y 3 ( $10,6 \pm 0,5$  vs  $14,2 \pm 0,9$ mm.  $P=0,002$ ) en vacas con CL y sin CL respectivamente. Meneghetti et al. (2009) aplicaron en vacas Nelore amamantando un dispositivo durante 9 días (CIDR 1,9g progesterona) asociado con 2mg de BE al inicio. Además inyectaron PGF a los 7 ó 9 días después de la colocación y al momento de la extracción se inyectó 0,5mg de CPE. Esto produjo que en las vacas que presentaron cuerpo lúteo y se aplicó la PGF en el día 7, hubiese una

disminución en la concentración de progesterona sérica al día 9 (día del retiro del dispositivo). Al analizar esta información, se encontró una relación lineal positiva entre la disminución de la concentración sérica de progesterona al momento del retiro del dispositivo y la tasa de preñez a la IATF. Los autores atribuyeron esa relación a una mayor frecuencia de pulsos de LH y consecuentemente, una mayor tasa de crecimiento del folículo dominante, posibilitando una ovulación con mayores probabilidades de gestación.

Es posible que un rango óptimo de concentración sérica de progesterona exista durante un tratamiento con progesterona, dado que altas concentraciones de esta hormona podrían causar un efecto negativo en el desarrollo folicular y su posterior fertilidad (Kinder et al., 1996; Dias et al., 2009). Las vacas que se encuentran ciclando y en las que se implementa un protocolo que utiliza progesterona y estradiol, tendrán entonces dos fuentes de progesterona: el dispositivo aplicado y el CL presente. Esta situación provocaría un mayor aumento en la concentración sérica de progesterona que tendría los efectos negativos observados en estos animales. De acuerdo con ello, esta categoría de animales debería ser tratada con PGF dos a tres días previos a la finalización del tratamiento, para evitar estos efectos negativos observados en forma tan marcada en nuestro trabajo.

Para el caso de las vacas en anestro, el diámetro promedio del folículo dominante fue en general menor al registrado anteriormente en vacas cíclicas y también se observó una diferencia entre los ensayos que se realizaron con los diferentes dispositivos. Sobre todo en el experimento 4 donde se utilizó el dispositivo esponja, esta diferencia se hizo muy marcada con folículos de  $7,0 \pm 0,7$ mm. Sin embargo no hubo diferencias estadísticas entre tratamientos en este experimento.

Por el contrario, en el experimento 6 donde se utilizó el dispositivo DIB y vacas en anestro, se registró una diferencia en el diámetro promedio del folículo dominante entre tratamientos, presentando los menores valores el tratamiento CPE24.

Se ha comprobado que vacas en anestro tratadas con dispositivos intravaginales conteniendo progesterona asociado con la aplicación de estradiol al inicio, reduce la persistencia del folículo dominante existente en ese momento, pero también retrasa la subsecuente emergencia y desarrollo folicular en una proporción de animales (Rhodes et al., 2002). Aparentemente la causa de esto último sería debido a una disminución pronunciada en el soporte gonadotrófico sobre el desarrollo de folículos antrales dependientes de gonadotrofinas. Este soporte gonadotrófico disminuido estaría

relacionado con el hecho que en las vacas en anestro existe una sensibilidad incrementada al efecto del feedback negativo de estradiol en la liberación de LH en comparación a vacas que se encuentran ciclando (McDougall et al., 1998). De acuerdo con esto, la respuesta a la inyección de BE al inicio del tratamiento con progestágenos, podría tener efectos diferentes entre animales de acuerdo a la magnitud de su anestro en el momento de la aplicación, ya que el tamaño de los folículos presentes también sería diferente.

De todas maneras, no queda clara la razón por lo que esto pudo haber sucedido en forma tan marcada en el tratamiento CPE 24 y no manifestarse en los demás tratamientos. Si bien los animales fueron distribuidos al azar entre los tratamientos, es posible que hayan existido diferencias entre ellos, a pesar que el grupo de animales fue seleccionado por condición corporal y por intervalo posparto. Esta depresión tan marcada del folículo dominante, podría ser la causa de la falta de ovulación posterior observada en este tratamiento.

### **Diámetro del folículo ovulatorio**

Luego que los folículos han superado la etapa de desviación en el crecimiento folicular, la dominancia es en general bien marcada y esta etapa está regulada por la LH que es necesaria para el posterior crecimiento de estos folículos (Ginther et al., 1996; Driancourt et al., 2000). El pico preovulatorio de LH es responsable de la ruptura del folículo destinado a la ovulación y la formación del cuerpo lúteo (Gordon, 1997). Esto es lo que sucede en un ciclo normal, y es lo que se intenta reproducir hacia el final de un tratamiento hormonal de inducción de la ovulación con progestágenos.

Por la manera de liberación y metabolismo de la progesterona en los dispositivos intravaginales, primero se produce una depresión y luego un incremento en la concentración sérica de LH hacia el final del tratamiento y luego del retiro del dispositivo (Roche et al., 1981; Kinder et al., 1996). La importancia en el incremento de la LH en animales previamente expuestos a progesterona para la inducción de la ovulación, es obvia, ya que mimetiza el incremento de LH que ocurre en el proestro.

Sin embargo, la ocurrencia de este incremento de la LH, luego del retiro de un dispositivo con progesterona no garantiza la ocurrencia de la ovulación (Day 2004).

Sartori et al. (2001) determinaron que la capacidad de ovular está relacionada con un aumento en la expresión de receptores para LH en las células de la granulosa de los folículos dominantes y que este cambio también sería necesario para un posterior



desarrollo del folículo. Otra observación que realizó fue que los folículos adquieren la capacidad ovulatoria aproximadamente a los 10mm, pero requieren un mayor estímulo de LH para ovular que los de mayor diámetro. Es por ello que hay un efecto positivo entre la relación del tamaño folicular y la ovulación, el cual se explicaría por la adquisición de mayor capacidad para ovular de los folículos a medida que se desarrollan (Gimenes et al., 2008).

En nuestros trabajos con vacas cíclicas, no se observaron diferencias estadísticas entre tratamientos para el último registro del tamaño folicular ovulatorio.

Los folículos que ovularon al finalizar el tratamiento mostraron un diámetro máximo promedio al momento de la última determinación de 12,2mm (Exp. 1), 12,9mm (Exp. 2) y los 14,4mm (Exp. 3) en los animales cíclicos. El diámetro máximo promedio de las vacas que se encontraron en anestro fue 11,1mm (Exp. 4), 13,3mm (Exp. 5) y 12,2mm (Exp. 6) respectivamente. Igualmente, Ross et al. (2004) al evaluar el diámetro del folículo a las 48 hs de retirado el dispositivo (momento esperado del pico de LH) en las vacas que lograron ovular, fue de 11,5mm.

Manes et al. (2007) en un trabajo utilizando dispositivos con MAP por 7, 8 ó 9 días, observaron que en el tratamiento de nueve días de duración asociado con la inyección de benzoato de estradiol a las 24 horas de retirada la progesterona, el diámetro folicular fue mayor al momento de ovular con respecto a los otros tratamientos. Esta discrepancia de nuestros resultados con respecto a los observados por Manes et al. (2007) podría deberse a que, en nuestra serie de ensayos, los dispositivos permanecieron solamente 8 días. En tanto que estos autores consideraron esperable este resultado debido al mayor tiempo de maduración del folículo (9 días) permitiéndole tener un mayor período de crecimiento.

Nuestros resultados sugieren que el estado fisiológico de los animales no influiría en el diámetro al cual un folículo se encuentra con capacidad de ovular, o mejor dicho al diámetro que este puede alcanzar previo a la ovulación, luego de un tratamiento de sincronización con progestágenos y estradiol. Estos tamaños foliculares tienen en general una magnitud que supera a la de los diámetros considerados como mínimos para una respuesta adecuada. Estos resultados no coinciden con lo observado por Rhodes et al. (2002), quienes observaron un diámetro máximo mayor en las vacas cíclicas, respecto a las que estaban en anestro. La explicación de nuestra observación podría deberse a lo observado por Perry et al. (2005), quienes determinaron que el tamaño al cual un folículo es maduro y apto para ovular, es muy variable y no tiene

efectos negativos en la fertilidad cuando esta ocurre espontáneamente. Pero cuando es inducido por la aplicación de GnRH, esta puede provocar que el pico de LH sea previo a que algunos folículos tengan su madurez fisiológica. En sus resultados tampoco encontró diferencias en el tamaño del folículo ovulatorio a la inseminación para vacas cíclicas y en anestro sincronizadas ( $13,9 \pm 0,2$  vs  $14,8 \pm 0,3$ mm respectivamente). Burke et al. (2001) observaron en vaquillonas que la madurez del folículo dominante no es limitante para ovular si este es inducido con BE, mientras que sólo lograron el mismo efecto en el 50,0% de vacas en anestro y concluyeron que, en esta categoría, los folículos inmaduros responden en menor medida a un estímulo ovulatorio y los que lo hacen tienen un desarrollo de tejido luteal disminuido.

En consecuencia, en nuestros trabajos, el haber inducido a ovular los folículos, tanto en animales cíclicos como en anestro, podría no permitir un proestro prolongado, y con ello la ovulación de folículos de menor diámetro y no permitir que las vacas cíclicas lleguen a un tamaño folicular mayor, evitando las diferencias entre ambos grupos de animales (cíclicas y anestro).

### **Tasa de ovulación**

La tasa de ovulación no se vio afectada en ninguno de los ensayos por el tipo de sal de estradiol utilizada, por el momento de su aplicación ni por la interacción entre ambos. El porcentaje de ovulación general para los experimentos 1 y 2 (dispositivo INDUGEST) con vacas cíclicas fue de 61,1% y 52,7% respectivamente. Datos coincidentes fueron obtenidos por Rieszter et al. (2004) en tratamientos de sincronización similares, los cuales oscilaron entre el 66,6 y 50%. Sin embargo, con el uso del DIB se observó una respuesta mayor (experimento 3) con un 77,1% de ovulación. Ross et al. (2004) obtuvieron una ovulación sincronizada en el 50,0% de animales cíclicos sin la aplicación de prostaglandina al retirar el tratamiento con progestágeno, y atribuyeron la baja tasa de ovulación a posibles cuerpos lúteos activos al momento del retiro de la esponja. Manes et al. (2007) con un tratamiento con INDUGEST similar al utilizado en nuestro estudio aplicado en vacas cíclicas, obtuvieron un 70,0% de ovulación, aproximándose más a los resultados obtenidos en nuestro estudio con DIB. En el experimento 1, el porcentaje de ovulación tendió a ser menor por la presencia de cuerpos lúteos (53,5% vs. 87,5%  $p=0,08$ ), mientras que en el experimento 2, este efecto se hizo presente en forma significativa (40,0% vs. 81,8%  $p=0,02$ ) lo cual podría ser causa de la baja tasa de ovulación promedio obtenida en

ambos trabajos. Dicho efecto no se observó en el caso del experimento 3 (72% vs 90%  $p=0,25$ ). Estos cuerpos lúteos podrían haber mantenido su funcionalidad debido a una falla en la acción luteolítica de la prostaglandina o debido a una aplicación tardía de la misma, incrementado los niveles de progesterona circulante al momento del retiro del dispositivo. Finalmente, estos niveles de progesterona circulante podrían haber sido los causantes del bloqueo del pico de LH y por consiguiente de la ovulación.

En cuanto a los animales en anestro, la tasa de ovulación se vio afectada en los experimentos por causas diferentes. La tasa de ovulación general en el experimento 4, estuvo deprimida a un nivel del 28,6% independientemente del tratamiento con sales de estradiol. En cambio, en el experimento 5, la tasa de ovulación fue del 68,2% y tampoco mostró diferencias entre los tratamientos. En el experimento 6, la tasa de ovulación fue intermedia (52,8%), y en este caso se registraron diferencias entre tratamientos, ya que el grupo CPE24 no presentó ovulaciones, al menos en el tiempo de observación establecido. Sin embargo, los restantes tratamientos cuando fueron comparados entre sí, no manifestaron diferencias significativas. Salvo el caso del experimento 4 y en el tratamiento CPE24 del experimento 6 con vacas en anestro, las tasas de ovulación obtenidas fueron equivalentes a las observadas en trabajos anteriores realizados con tratamientos hormonales similares (Ross et al, 2002; Rieszer et al., 2004; Manes et al., 2007). Sin embargo, existen trabajos que reportan un porcentaje de ovulación del 70-80%, con posterior formación del CL de vida media normal, luego de la inserción de dispositivos CIDR (Fike et al., 1997; Rivera et al., 1998; Wheaton y Lamb, 2007). Lo usual es lograr un 60% de reinicio de ciclicidad con tratamientos de este tipo, dependiendo de la duración del tratamiento, del tipo de animal, del sistema de producción y de la cantidad de días posparto al inicio del tratamiento (Day, 2004).

Echternkamp et al. (1984) evaluaron la influencia del estrés generado por el manejo de los animales sobre la secreción tónica de LH, el cortisol y la progesterona, concluyendo que ésta última no se modifica en animales sometidos a estrés, pero sí se observó una supresión de la liberación tónica de LH, especialmente la liberación pulsátil, cuando los niveles de cortisol aumentaron unas diez veces (Hollenstein et al., 2006.) Sus resultados sugieren que la influencia del estrés en la liberación de gonadotropina y su subsecuente respuesta reproductiva es dependiente de la magnitud de la respuesta adrenal y de la adaptación animal al estrés. Dicho esto, es necesario

minimizar el estrés en los animales para obtener secreción de LH capaz de generar una respuesta adecuada en el crecimiento final del folículo dominante y lograr un buen tamaño del folículo ovulatorio. Por ello, el estrés sufrido por los animales en el primer experimento, así como el corto intervalo parto tratamiento en este estudio, podrían explicar al menos en parte la baja tasa de ovulación obtenida. Con respecto a la falta de ovulación en el tratamiento CPE24 del experimento 6 con vacas en anestro, parecería ser que el estímulo suministrado por el estradiol llegaría a destiempo y por ello la ovulación no se produciría, al menos en los términos establecidos de observación.

### **Distribución y momento (intervalo en horas) de las ovulaciones**

La inducción de la ovulación en los tratamientos con progestágenos destinados a utilizar la IATF es generalmente facilitada a través de la utilización de drogas que tienen la propiedad de hacer que folículos de diferente tamaño, en diferentes vacas pero todos potencialmente maduros, alcancen la ovulación de manera relativamente sincrónica. Esto puede ser logrado usando diferentes hormonas, como ser, la gonadotropina coriónica humana (hCG) o la hormona luteinizante (LH), que actúan en forma directa sobre los folículos; o actuando en forma indirecta a través de hormonas que inducen el pico preovulatorio de LH, como la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) o los ésteres de estradiol (Meneghetti et al., 2009).

El intervalo entre la aplicación del agente inductor y la ovulación varía de acuerdo al producto utilizado. Dentro de estos, los ésteres de estradiol son los que más se han difundido por sus efectos reproducibles, su bajo costo y su facilidad de aplicación. Su aplicación tiene por finalidad producir un pico de LH sincronizado entre los animales tratados, que se produce entre 16 a 20 horas después de su inyección y observándose manifestación de celo entre las 36 y 48 horas post aplicación (Lammoglia et al., 1998; Martinez et al., 2007). Con este tratamiento es posible obtener una ovulación sincronizada entre 60 a 80 horas posteriores a la finalización del tratamiento con progestágenos, dependiendo si el estrógeno fue inyectado junto al retiro del progestágeno o 24hs más tarde. Esto tiene fundamental importancia porque determina el momento óptimo para realizar la IATF (generalmente entre 54-56hs del retiro del dispositivo). El momento de ovulación en nuestro trabajo, para las vacas sin cría al pie, no fue diferente entre tratamientos y en promedio en los tres ensayos se produjo a las 56,9hs, 63hs, 66,3hs y 68,3hs de retirado el tratamiento con progestágeno para BE0,

BE24, CPE0 y CPE24 respectivamente. También se observó que el tratamiento BE0 tendió a adelantar la ovulación entre 6 y 10hs con respecto a los otros tratamientos. Esto no difiere de los resultados obtenidos por Manes et al. (2007), quienes observaron que en las vacas del grupo que recibió el benzoato de estradiol al finalizar el tratamiento las ovulaciones se adelantaron con respecto al grupo que lo recibió a las 24 horas de finalizado el tratamiento. Estos datos son coincidentes con los observados en nuestros trabajos, realizados tanto en vacas cíclicas como en anestro.

Sin embargo, en vacas índicas usando protocolos de 8 días de duración con BE inyectado al momento de retirar o 24 horas más tarde, los intervalos desde el retiro del dispositivo a la ovulación en horas registrados fueron diferentes ( $56,8 \pm 1,9$  vs.  $74,4 \pm 1,7$  para tratamientos BE0 y BE24 respectivamente) (Cavallieri et al., 2002). Esto también fue observado por (Ayres et al., 2008) ( $59,4 \pm 2,0$  vs.  $69,3 \pm 1,7$  respectivamente) en un ensayo similar.

En caso del CPE, que es una sal de mayor vida media, produce un pico de LH en forma más retrasada y de mayor duración (10 horas) con respecto al BE, comparable al pico que se produce en una ovulación espontánea (Thatcher et al., 2002). En programas donde el inductor final fue CPE, el intervalo entre su aplicación y la ovulación fue de  $55,4 \pm 2,7$  horas y la inseminación se realizó a las 48 horas de inyectado el CPE (Thatcher et al., 2002). En otro ensayo, Colazo et al. (2003) evaluaron el CPE como inductor de la ovulación inyectado al finalizar un tratamiento de 8 ó 9 días de duración con progesterona (CIDR) o 24 horas más tarde.

Estos autores, observaron sólo un efecto de la duración del tratamiento (8 ó 9 días), sobre el intervalo desde el retiro del dispositivo a la ovulación ( $88,3 \pm 3,8$  vs.  $76,4 \pm 4,1$  horas respectivamente).

Siguiendo esta misma metodología, los mismos autores realizaron posteriormente otro estudio en el cual el progestágeno se retiró a los 7 días y el CPE fue aplicado al momento de retirar el dispositivo ó 24 horas más tarde. El intervalo entre el retiro del dispositivo y la ovulación no fueron estadísticamente diferentes ( $81,6 \pm 5,0$  y  $86,4 \pm 3,0$ hs respectivamente). Con este esquema de trabajo se realizaron realizó las inseminaciones a las 56-60hs de retirado el dispositivo.

Si comparamos nuestros resultados con lo expuesto por otros autores, parecería que los intervalos obtenidos en nuestros experimentos fuesen más cortos que los publicados por otros autores.

En el caso del trabajo de Colazo et al. (2003), utilizaron el CPE para el control de la emergencia folicular. Este ester de estradiol al ser de mayor vida media aparentemente prolonga el efecto inhibitor sobre FSH y LH y por consiguiente retrasa la emergencia de la nueva onda folicular lo que a su vez pudo haber retrasado el momento de la ovulación.

Con respecto al momento de ovulación en vacas con cría al pie (anestro) no se registró efecto de los tratamientos en los experimentos 4 y 5. En cambio, en el experimento 6 se observó un efecto del tratamiento, en donde el grupo BE0 tuvo las ovulaciones adelantadas ( $49,7 \pm 2,3$ hs post retiro del progestágeno) con respecto a las de vacas de los grupos BE24 y CPE0 ( $69,6 \pm 2,1$  y  $65,2 \pm 3,5$ hs respectivamente). En el grupo CPE24 no se registraron ovulaciones, al menos en el intervalo de tiempo fijado para la recolección de datos de 96 horas post retiro del dispositivo. Martins et al. (2005) trabajaron con vacas índicas sin cría tratadas con dispositivos intravaginales con progesterona en donde se aplicó BE o CPE al retiro del tratamiento, o a las 24 horas, observaron que la aplicación de BE24 y CPE0 tuvo un comportamiento similar en cuanto al momento de ovulación ( $70,0 \pm 1,4$  y  $70,7 \pm 2,4$ hs respectivamente); si bien el momento de ovulación del tratamiento BE0 fue numéricamente diferente, esto no lo fue estadísticamente ( $65,1 \pm 1,8$ hs). En cambio, la aplicación de CPE24 tuvo un intervalo mucho mayor ( $86,0 \pm 3,1$ hs).

En cuanto a la distribución de las ovulaciones podemos decir que un 33,3% (6/18); 85,7% (18/21); 43,7%(7/16) y 46,6% (7/15) correspondiente a los tratamientos BE0; BE24; CPE0 y CPE24 respectivamente, de nuestra serie de experimentos con vacas ciclando. Para las vacas con cría al pie un 66,6%(12/18); 66,6%(6/9); 71,4%(10/14) y 50,0%(1/2) de los tratamientos BE0; BE24; CPE0 y CPE24 respectivamente, ovularon en un intervalo de 12 horas entre las 54-66 horas de retirado el dispositivo.

Si consideramos que la inseminación se realizaría a las 48 hs de extraído el dispositivo, además de tener en cuenta, la apreciación hecha por Roeloffs et al. (2006) en donde los mejores resultados en cuanto a fertilidad y calidad embrionaria, se obtienen en el intervalo IA-ovulación de 12-24 horas, observamos que para los animales ciclando el mejor resultado se obtiene con el tratamiento BE24. En cambio cuando los animales se encuentran en anestro el tratamiento CPE0 sería el más factible de éxito.

Otro punto es que al menos un 75,0% de las ovulaciones ocurrieron en un período de 24 horas en todos los casos.

### **Tasa de crecimiento del folículo ovulatorio**

Los folículos, desde que una cohorte emerge hasta que uno de ellos llega a la ovulación, atraviesan por varias etapas de crecimiento. Inmediatamente después de la emergencia, hay una etapa llamada de crecimiento conjunto, donde todos los folículos parecen desarrollarse a un ritmo parejo. Previo a la etapa de desviación, comienzan a mostrar diferentes tasas de crecimiento entre el folículo de mayor diámetro y los subordinados. Esta tasa de crecimiento es de alrededor de  $1,4 \pm 0,1$  y  $1,0 \pm 0,1$  mm/16hs para el dominante y subordinado respectivamente (Ginther et al., 2001c). Si estos valores se tomaran en un periodo de 24hs daría como resultado una tasa de 2,1 y 1,5 mm/día respectivamente en esta etapa de desarrollo.

En la etapa de desviación ya se produce un fenómeno denominado selección, en donde el número de folículos se reduce al número que posteriormente ovulará, y sólo el folículo dominante se desarrolla a una tasa continua de crecimiento, mientras hay una declinación o cese de la tasa de crecimiento de los otros folículos (Ginther et al., 2001b). Finalmente se observa la etapa de dominancia, donde sólo el folículo seleccionado desarrolla y los demás comienzan su atresia. El FD culmina en la ovulación, o en el caso de ser una onda folicular no ovulatoria, después de un tiempo de meseta o fase estática (sin crecimiento), ingresa junto a los otros folículos en una etapa involutiva.

Atkins et al. (2010) en un experimento en vacas cíclicas con cría, observaron que la tasa de crecimiento (1,01 mm/día) del folículo ovulatorio en los últimos 5 días fue mayor cuando el diámetro del folículo era mayor a 11mm comparada con un folículo menor a 11mm (0,89 mm/día). En nuestros experimentos estas diferencias no se pudieron constatar, aunque no hubo diferencias entre tratamientos en la tasa de crecimiento del folículo ovulatorio para los animales con actividad cíclica (promedios entre  $0,68 \pm 0,2$  y  $0,87 \pm 0,2$  mm/día). Tampoco se registraron diferencias para la tasa de crecimiento del folículo ovulatorio para los distintos tratamientos de cada ensayo en vacas en anestro, los cuales oscilaron entre 0,5 y 1,0 mm/día. Ross et al. (2004) en su trabajo con dispositivos INDUGEST, observaron una tasa de crecimiento del folículo dominante de  $1,0 \pm 0,2$  mm/día para la totalidad de los animales. Igualmente Rivera et al. (1998), registraron un tasa de crecimiento folicular desde el momento de la identificación hasta el momento en que cesó su desarrollo de  $1,0 \pm 0,04$  y  $1,1 \pm 0,04$  mm/día para vacas Angus multíparas tratadas con un CIDR o un CIDR+E-17 $\beta$  respectivamente. Similares resultados obtuvieron Rieszer et al. (2004) y Manes et al.

(2007). La posible explicación para los valores observados en nuestro estudio, podría ser que los momentos de observación ecográfica, fueron hacia el final de la curva de crecimiento del folículo ovulatorio (observación retrospectiva). Es por ello que la mayoría de los folículos se encontraron en un período de meseta en la tasa de crecimiento, previo a la ovulación y esto haya contribuido a obtener resultados inferiores.

### **Vida media del cuerpo lúteo y concentración de progesterona**

En general, la primera ovulación posparto no es precedida por un celo (celo silencioso) y es seguida por un CL de vida media corta generando un ciclo de corta duración. Estos ciclos de corta duración son comunes también en la pubertad, al momento de la primera ovulación. Una característica de los ciclos de corta duración es la presencia de un CL de menor tamaño que en un ciclo normal y una concentración subluteal de progesterona circulante (Yavas y Walton 2000b).

Los ciclos de corta duración luego del posparto son causados por una luteólisis prematura, a causa de una liberación anticipada de prostaglandina F<sub>2α</sub> desde el endometrio uterino (Short et al., 1991; Cooper et al., 1991). Las bajas concentraciones de progesterona antes de la primera ovulación son la causa de la baja cantidad de receptores para progesterona y de una gran cantidad de receptores de oxitocina en las células endometrio uterino, promoviendo el feedback positivo entre la oxitocina y la prostaglandina F<sub>2α</sub> (Zoller et al., 1993). El estradiol en bajas concentraciones parece tener el mismo efecto (Mann y Lamming, 2000).

La exposición a fuentes de progesterona endógena o exógena por un período corto en el posparto, es importante tanto para la expresión del celo como para obtener una subsecuente vida media normal del CL generado (Mc Dougall et al., 1992).

El aumento de la concentración de progesterona en vacas en anestro, reduciría el número de receptores de estradiol en el hipotálamo, y con ello reduciría el feedback negativo de este para la liberación de GnRH, permitiendo una mayor liberación de LH (Rhodes et al., 2003), algo muy similar a lo que ocurre en vaquillonas prepúberes (Day y Anderson, 1998). En consecuencia, este aumento de la concentración de LH producido por la progesterona, estimularía al folículo dominante a desarrollarse y madurar, estimulando además el desarrollo de receptores de LH en las células de la granulosa y de la teca, produciendo un mayor licor folicular y con ello una mayor concentración de estradiol circulante (Rhodes et al., 2002).



En el experimento 4 donde se utilizaron vacas en anestro y con cría al pie, los datos de progesterona obtenidos después de la ovulación, indican que ninguna vaca presentó un CL de vida media normal, luego de un tratamiento con INDUGEST. Incluso, en muchos casos las ovulaciones observadas no coincidieron con un aumento de la progesterona plasmática posterior. Anteriormente hemos considerado que la baja tasa de ovulación lograda en este ensayo podría deberse al estrés sufrido por los animales debido al intenso sangrado al que fueron sometidos. En el experimento 5 si bien no se realizó un sangrado posterior para verificar la vida media posterior del CL, si se logró que, una buena proporción de animales sea inducida a ovular. Pero en el experimento 6 también con vacas en anestro, los resultados fueron totalmente diferentes a los obtenidos en el experimento 4 ya que en este caso todos los CL formados tuvieron una vida media normal y el porcentaje de vacas inducidas fue del 52,0%.

Los resultados del experimentos 4 no coinciden con los resultados obtenidos por Ross et al. (2004), quienes, utilizando un tratamiento similar al nuestro, observaron que sólo un 25,0% de las vacas inducidas a ovular tuvieron CL de vida media corta.

La eficiencia de los tratamientos de progesterona de corta duración para inducir ciclos estrales es variable y según Day (2004) puede oscilar entre 0 y 66,0%. En un trabajo con dispositivos CIDR aplicado a vacas multíparas (Wheaton y Lamb, 2007) lograron un 43,0% de inducción a la ciclicidad y 76,0% cuando se trató de vacas primíparas.

Aparentemente, el tratamiento de vacas en anestro con progesterona tiene mayor o menor probabilidad de éxito de acuerdo a que estas se encuentren más próximas a restablecer la ciclicidad en forma espontánea. Sin embargo, Mackey et al. (2000) en un trabajo con vacas en anestro con un intervalo parto-tratamiento de 30 días, al restringir el amamantamiento de las crías, lograron incrementar los pulsos de LH al doble, lo cual fue en gran medida reforzado cuando a los tratamientos se adicionó dispositivos y estradiol. Al retirar los dispositivos se determinó una frecuencia suficiente de LH capaz de estimular la primera ovulación posparto, la expresión de celo y evitar ciclos de corta duración en la mayoría de los animales. Sin embargo el 15% de animales no respondieron con un aumento de los pulsos de LH. Esta falta de respuesta se atribuyó a factores más potentes como nutricionales o inclusive genéticos, y que los tratamientos fueron insuficientes como para atenuar tal situación e inducir una ovulación. Estos animales se retrasaron en retomar su ciclicidad y

consecuentemente pueden ser categorizados como en un anestro profundo (Wiltbank, 2002).

La unión vaca-ternero y el amamantamiento también influyen de manera negativa en el intervalo posparto inhibiendo la liberación pulsátil de LH al aumentar la sensibilidad por parte del hipotálamo al feedback negativo del estradiol (Stagg et al., 1998).

Una explicación para nuestros trabajos podría deberse en todos los casos, a que las vacas en anestro posparto, sobre pastura natural y amamantando a sus crías, se mantienen en anestro por mayor tiempo y magnitud, que las que no amamantan a sus crías. Y esto haya influido negativamente en el porcentaje de inducción logrado con los tratamientos.

### **Ensayos de Fertilidad**

Luego de haber realizado los experimentos para estudiar la dinámica ovárica final tanto en vacas cíclicas como en anestro, se realizaron dos experimentos con la finalidad de evaluar la fertilidad.

En el Exp. 7 realizado con vacas de primera parición no se observaron diferencias en las tasas de preñez luego de la aplicación de los distintos tratamientos (BE0=42,2%; CPE0=37,5% BE24=32,7% y CPE24=43,7%). También se evaluó el desempeño del dispositivo esponja versus un dispositivo comercial, ambos productos presentaron una tasa de preñez similar (Indugest Plus=40,5% vs DIB=36,7%).

En el Exp. 8 realizado con vacas con cría al pie, tampoco se observó un efecto de los tratamientos sobre la tasa de preñez cuando se evaluaron en conjunto (BE0=57,4% CPE0=51,8% BE24=38,1% CPE24=51,8%).

Cabe aclarar que el momento de inseminación aquí empleado fue, en ambos ensayos, a las 48-49 hs después de retirado los dispositivos y esto equivaldría a decir, que según el momento de ovulación observado en los experimentos anteriores, se inseminó unas 3 a 8 horas antes del momento de ovulación para el tratamiento BE0 y unas 18 a 20 horas antes de los otros tratamientos aproximadamente.

En el trabajo de Ayres et al. (2008) se evaluaron dos momentos de aplicación de BE (0 ó 24hs después de retirado el dispositivo) y dos momentos de inseminación (48 ó 54 horas post retiro), se observó que cuando las vacas del tratamiento BE0 fueron inseminadas a las 54hs, la tasa de concepción disminuyó con respecto a la IATF

realizada a las 48hs, tal vez debido a que la IATF se realizó demasiado tarde, en coincidencia con el momento de ovulación.

Colazo et al. (2003) utilizando vaquillonas inyectadas con CPE a las 0 ó 24 horas o BE a las 24 horas de finalizado un tratamiento con dispositivo (CIDR) de 7 días de duración más estradiol-17  $\beta$  al inicio, y prostaglandina al momento del retiro, no obtuvieron diferencias en las tasas de preñez (CPE0=63,3%; CPE24=64,6%; BE24=63,1%). En este trabajo también se realizó la IATF en dos momentos de retirado los dispositivos, a las 54-56hs para el tratamiento (CPE0) y 56-58hs en los tratamientos (BE24 y CPE24). Según los momentos de ovulación observados, realizaron las inseminaciones unas 20 horas antes aproximadamente, del momento de ovulación esperado.

En cambio (Cutaia et al. 2005) utilizando un dispositivo DIB durante 8 días más 2mg de estradiol al inicio del tratamiento y prostaglandina en el día del retiro, asignó los animales a cuatro grupos según el tipo de sal de estradiol (BE o CPE) y el momento de aplicación (0 ó 24hs) después de retirado el DIB. La IATF se realizó a las 47-49 horas para el grupo BE0 y 52-54 horas para los grupos BE24 y CPE. Estos autores determinaron que mediante la aplicación de 0,5mg de CPE a las 24hs de retirado el dispositivo, se obtienen porcentajes de preñez superiores a los obtenidos mediante la aplicación de la misma en el momento de retirado el DIB o que mediante la aplicación de 1mg de BE. (BE0=42,8%; CPE0=48,2%; BE24=45,9%; CPE24=63,2%;  $p=0,04$ ).

El momento óptimo al cual la IATF debería ser realizada depende primordialmente de la vida media de los espermatozoides para asegurar la fertilización de un ovocito viable.

Roelofts et al. (2006) con el objetivo de examinar el efecto del intervalo entre la inseminación y la ovulación, sobre la fertilización y el desarrollo posterior del embrión, determinaron que el intervalo con mayores tasas de fertilización a la IA es entre 36-24 y 24-12 horas antes de la ovulación (85% y 82% respectivamente) comparado a la IA posterior a la ovulación; si bien el período óptimo para obtener una alta tasa de fertilización se extiende desde las 36 hasta las 12 horas antes de la ovulación. La probabilidad de desarrollo del embrión es mayor en el intervalo de 24-12 horas antes de la ovulación.

Como en nuestros ensayos de fertilidad se realizó la inseminación a las 48-49 horas independientemente del tipo de tratamiento aplicado y sin hacer una

determinación del estado fisiológico (cíclica o anestro) de las vacas, es probable que este momento de inseminación haya favorecido al tratamiento BE0.

Al combinar ambos ensayos, sólo se obtuvo un efecto de la locación sobre la preñez final (38,3% 49,7% para experimentos 7 y 8 respectivamente). Este efecto aquí observado sería debido a la categoría de los animales utilizados en cada ensayo, ya que la vaca de primera parición es una categoría más exigente desde el punto de vista nutricional que la vaca múltipara.

## Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos en estos estudios se concluye lo siguiente:

- La pérdida de ambos tipos de dispositivos (poliuretano y silicona) en vacas es mínima, no superando en ningún caso el 5%.
- En animales en distinto estado fisiológico (ciclado y anestro), el tratamiento de 8 días de duración con progesterona natural, genera un folículo dominante de mayor tamaño comparado con un tratamiento con MAP.
- La aplicación de benzoato o cipionato de estradiol a las 0 ó 24 horas de finalizado un tratamiento intravaginal con MAP o progesterona natural, no afecta el tamaño del folículo ovulatorio en vacas cíclicas ni en anestro, produciendo folículos capaces de responder al pico preovulatorio de LH.
- El momento de ovulación es similar en ambas categorías de animales y la mayor parte de las ovulaciones se suceden antes de las 72 horas en las vacas cíclicas. En ambos grupos, al menos un 70% ovula en un período de 24 horas.
- Al tratar animales en anestro posparto, el tratamiento CPE aplicado a las 24 horas de retirada la fuente de progesterona puede no tener el efecto de estimulación deseado.
- Es posible obtener tasas de preñez del 40% después de una IATF realizada a las 48-49 horas después de finalizado un tratamiento con progestágenos, tanto con dispositivos que utilizan MAP como P4.
- La aplicación de BE o CPE a las 0 horas de finalizado el tratamiento, genera similares tasas de preñez en vacas con cría al pie.
- El momento de inseminación utilizado en este estudio pareció adaptarse muy bien a todos los tratamientos.

## BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H.; GINTHER, O.J. 1992. Association between surges of follicles-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 9: 177-188.
- ALBERIO, R.H.; PALMA, G.; BUTLER, H.; SCHIERSMANN, G.C.S.; TORQUATI, O. 1984. Fertilidad luego de tratamiento con progesterona intravaginal en vacas con ternero al pie. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 4(2):193-200.
- ALBERIO, R.H.; BUTLER, H. 2001. Sincronización de celos en hembras receptoras. En: Gustavo A. Palma. *Biología de la reproducción*. Pugliese y Siena, Argentina. pp. 61-77.
- ALBERIO, R.H. 2003. Nuevas biotecnologías reproductivas Aspectos biológicos y económicos Grupo de Biología de la Reproducción – INTA Balcarce [on line]<<http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/ganaderia/bovinos/reproduccion/alberio.htm>> [consulta: 08 abril 2008].
- ATKINS, J.A.; SMITH, M.F.; WELLS, K.J.; GEARY, T.W. 2001. Factors affecting preovulatory follicle diameter and ovulation rate after gonadotropin-releasing hormone in postpartum beef cows. Part II: Anestrous cows. *J. Anim. Sci.* 88: 2311-2320.
- AYRES, H.; MARTINS, C.M.; FERREIRA, R.M.; MELLO, J.E.; DOMINGUEZ, J.H.; SOUZA, A.H.; VALENTIN, R.; SANTOS, I.C.C.; BARUSELLI, P.S. 2008. Effect of timing of estradiol benzoate administration upon synchronization of ovulation in suckling Nelore cows (*Bos indicus*) treated with a progesterone-releasing intravaginal device. *Anim. Reprod. Sci.* 109: 77-87.
- BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O.; NASSER, L.F.; BÓ, G.A. 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83: 479-486.
- BARUSELLI, P.S.; SALES, J.N.; CREPALDI, G.A.; MARQUES, M.O.; PENTEADO, L.; BÓ, G.A. Aplicação integrada de programas de controle da avulsão e manejo reprodutivo em Bovinos de corte criados em condições extensivas. 7º Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina, pp 55-79.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; TRIBULO, H.E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R.J., 1994. Follicular wave dynamics after estradiol-17 $\beta$  treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology* 41, 1555–1569.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.P.; MAPLETOFT, R.J. 1995a. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 43: 31-40.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. 1995b. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 39: 193-204.

- BÓ, G.A.; BERGFELT, D.R.; BROGLIATTI, G.M.; PIERSON, R.A.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J. 2000. Local versus systemic effects of exogenous estradiol-17b on ovarian follicular dynamics in heifers with progesterone implants. *Anim. Reprod. Sci.* 59: 141-157.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTINEZ, M.F. 2003. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 78: 307-326.
- BÓ, G.A.; CUTAIA, L.; CHESTA, P.; BALLA, E.; PICINATO, D.; PEREZ, L.; MARAÑA, D.; AVILES, M.; MENCHACA, A.; VENERANDA, G.; BARUSELLI, P.S. 2005. Implementación de programas de Inseminación Artificial en rodeos de cría de Argentina. 6º Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba Argentina. pp. 97-128.
- BURKE, C. R.; MUSSARD, M. L.; GRUM D. E.; DAY, M. L. 2001 Effects of maturity of the potential ovulatory follicle on induction of oestrus and ovulation in cattle with oestradiol benzoate. *Anim. Reprod. Sci.* 66: 161-174.
- CACCIA, M.; BÓ, G.A. 1998. Follicle wave emergence following treatment of cidr-b implanted beef cows with estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology* 49: 341.
- CALLEJAS, S. 2001. Fisiología del ciclo estrol Bovino. En: Gustavo A. Palma. *Biología de la reproducción*. Pugliese y Siena, Argentina. pp. 37-59.
- CAVALIERI, J.; COLEMAN, C.; RODRÍGUEZ, H.; MACMILLAN, K.L.; FITZPATRICK, L.A. 2002. The effect of timing of administration of estradiol benzoate on characteristics of oestrus, timing of ovulation and fertility in *Bos indicus* heifers synchronised with a progesterone releasing intravaginal insert. *Aust. Vet. J.* 80: 217-223.
- CHENAULT, J.R.; THATCHER, W.W.; KALRA, P.S.; ABRAMS, R.M.; WILCOX, C.J. 1975. Transitory changes in plasma progesterone, estradiol, and luteinizing hormone approaching ovulation in the bovine. *J. Dairy Sci.* 58:709-717.
- COLAZO, M.G.; KASTELIC J.P.; MAPLETOFT, R.J. 2003. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. *Theriogenology* 60: 855-865.
- COLAZO, M.G.; KASTELIC, J.P.; WHITTAKER, P.R.; GAVAGA, Q.A.; WILDE, R.; MAPLETOFT, R.J. 2004a. Fertility in beef cattle given a new or previously used CIDR insert and estradiol, with or without progesterone. *Anim. Reprod. Sci.* 81: 25-34.
- COLAZO, M.G.; KASTELIC, J.P.; MARTÍNEZ, M.F.; WHITTAKER, P.R.; WILDE, R.; AMBROSE, J.D.; CORBETT, R.; MAPLETOFT, R.J. 2004b. Fertility following fixed-time AI in CIDR-treated beef heifers given GnRH or estradiol cypionate and fed diets supplemented with flax seed or sunflower seed. *Theriogenology* 61: 1115-1124.

- COOPER, D.A.; CARVER, D.A.; VILLENEUVE, P; SILVIA, W.J.; INSKEEP, E.K. 1991 Effects of progestogen treatment on concentrations of prostaglandins and oxytocin in plasma from the posterior vena cava of post-partum beef cows. *J. Reprod. Fertil.* 91: 411-442.
- COPELIN, J.P.; SMITH, M.F.; KEISLER, D.H.; GARVERICK, H.A. 1989. Effect of active immunization of prepartum and post-partum cows against prostaglandin F-2-alpha on lifespan and progesterone secretion of short-lived corpora lutea. *J.Repr.Fert.*, 87: 199-207.
- CUTAIA, L.; BALLA, E.; BÓ, G.A. 2005. Efecto del momento de la administración de benzoato o cipionato de estradiol para inducir la ovulación en vaquillonas tratadas con dib e inseminadas a tiempo fijo. 6º Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina, 394. Abstrc.
- DAY, M. L.; ANDERSON, L. H. 1998. Current concepts on the control of puberty in cattle. *J. Anim. Sci.* 76(Suppl. 3):1-15.
- DAY, M.L. 2004. Hormonal induction of estrous cycles in anestrous *Bos taurus* beef cows. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83: 487-494.
- DEJARNETTE, J.M.; DAY, M.L.; HOUSE, R.B.; WALLACE, R.A.; MARSHALL, C.E. 2001. Effects of GnRH pretreatment on reproductive performance of postpartum suckled beef cows following synchronization of estrus using GnRH and PGF2 $\alpha$ . *J. Anim. Sci.* 79: 1675-1682.
- DIAS, C.C.; WECHSLER, F.S.; DAY, M.L.; VASCONCELOS, J.L.M. 2009. Progesterone concentrations, exogenous eCG and timing of prostaglandinF2 $\alpha$  treatment affect fertility in postpuberal Nelore heifers. *Theriogenology.* 72: 378-385.
- DRIANCOURT, M.A. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55: 1211-1239.
- ECHTERNKAMP, S.E. 1984. Relationship between LH and cortisol in acutely stressed beef cows. *Theriogenology.* 22: 305-311.
- ESPEY LL. 1994. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol. Reprod.* 50:233-238.
- EVANS, A.C.O.; FORTUNE, J.E. 1997. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology* 138: 2963-2971.
- EVANS, A.C.O.; O'KEEFFE, P.; MIHM, M.; ROCHE, J.F.; MACMILLAN, K.L.; BOLAND, M.P. 2003. Effect of oestradiol benzoate given after prostaglandin at two stages of follicle wave development on oestrus synchronisation, the LH surge and ovulation in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 76: 13-23.



- FERNANDES, P.; TEIXEIRA, A.B.; CROCCI, A.J.; BARROS, C.M. 2001. Timed artificial insemination in beef cattle using GnRH agonist, PGF<sub>2</sub> $\alpha$  and estradiol benzoate (BE). *Theriogenology*. 55: 1521-1532.
- FERNANDEZ FRANCIA, G.; LARES, S.; FORMIA, N.; GIOVANINNI, R.; VIDELA DORNA, I.; DE LA SOTA, L. 2005. Eficacia de la utilización de benzoato de estradiol aplicado a las 0 o 24 horas del retiro de un dispositivo intravaginal con progesterona sobre la tasa de preñes en vaquillonas para leche. 6<sup>o</sup> Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina, 401. Abstrc.
- FIKE, K.E.; DAY, M.L.; INSKEEP, E.K.; KINDER, J.E.; LEWIS, P.E.; SHORT, R.E.; HAFS, H.D. 1997. Estrus and Luteal Function in Suckled Beef Cows That Were Anestrous When Treated with an Intravaginal Device Containing Progesterone With or Without a Subsequent Injection of Estradiol Benzoate. *J. Anim. Sci.* 75: 2009-2015
- FOLMAN, Y.; KAIM, M.; HERZ, Z.; ROSENBERG, M. 1990. Comparison of methods for the synchronization of estrous cycles in dairy cows. 2. Effects of progesterone and parity on conception. *J. Dairy Sci.* 73:2807.
- FOOTE, W.D.; HUNTER, J.E. 1964. Progesterone and Estrogen Post-Partum Intervals of Beef Cows Treated with J. *Anim. Sci.* 23:517-520.
- FORTUNE, J.E.; SIROIS, J.; TURZILLO, A.M. ; LAVOIR, M. 1991. Follicle selection in domestic ruminants. *J. Reprod. Fertil.* 43: 187-198.
- FORTUNE, J.E. 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 78: 135-163.
- FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M. ; YANG, M.Y. 2004. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83: 109-126.
- GEARY, T.W.; WHITTIER, J.C. 1997. Modification of the Ovsynch estrous synchronization protocol for use in beef cows. *J. Anim. Sci.* 75: 236. Abstrc.
- GEARY, T.W.; WHITTIER, J.C.; HALLFORD, D.M.; MAC NEIL, M.D. 2001. Effect of calf removal on pregnancy of cows synchronized with the Ovsynch or Cosynch protocol. *J. Anim. Sci.* 79: 1-4. Abstrc.
- GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; CARVALHO, N.A.T.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; SOUZA, A.H.; MADUREIRA, E.H.; TRINCA, L.A.; SARTORELLI, E.S.; BARROS, C.M.; CARVALHO, J.B.P.; MAPLETOFT, R.J.; BARUSELLI, P.S. 2008. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos Indicus* heifers. *Theriogenology*. 69:852-858.
- GINTHER, O.J.; KOT, K.; KULICK, L.J.; MARTIN S.; WILTBANK, M.C. 1996. Relationships between FSH and ovarian follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 108: 271-279.

- GINTHER, O.J.; KOT, K.; KULICK, L.J.; WILTBANK, M.C. 1997. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology* 48: 75-87.
- GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; KULICK, L.J.; KOT, K. 1998. Pulsatility of systemic FSH and LH concentrations during follicular-wave development in cattle. *Theriogenology* 50: 507-519.
- GINTHER, O.J. 2000. Selection of dominant follicle in cattle and horses. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 61-79.
- GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; DONADEU, F.X.; KOT, K. 2001a. Follicle selection in monovular species. *Biol. Reprod.* 65: 638-647.
- GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; BEG, M.A.; KOT, K. 2001b. Follicle selection in cattle: Role of luteinizing hormone. *Biol. Reprod.* 64: 197-205.
- GINTHER O.J.; BERGFELT D.R.; BEG.; M.A.; KOT, K. 2001c. Follicle Selection in Cattle: Relationships among Growth Rate, Diameter Ranking, and Capacity for Dominance. *Biol Reprod.* 65(2): 345-50.
- GONG, J.G.; BRAMLEY, T.A.; GUTIERREZ, C.G.; PETERS, A.R.; WEBB, R. 1995. Effects of chronic treatment with a gonadotropin-releasing hormone agonist on peripheral concentrations of FSH and LH, and ovarian function in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 105: 263-270.
- GONZALEZ-PADILLA, E.; NISWENDER, G.D.; WILTBANK, J.N. 1975. Puberty in Beef Heifers. II. Effect of Injections of Progesterone and Estradiol-17 $\beta$  on Serum LH, FSH and Ovarian Activity. *J. Anim. Sci.* 40:1105-1109.
- GORDON, I. 1997. El ciclo estral de la vaca y manifestaciones asociadas. En: GORDON, I. Reproducción controlada del ganado vacuno y búfalos. Acribia, España. pp. 103-128.
- HOLLENSTEIN, K.; JANETT, F.; BLEUL, U.; HÄSSIG, M.; KÄHN W.; THUN, R. 2006. Influence of estradiol on adrenal activity in ovariectomized cows during acute stress. *Anim. Reprod. Sci.* 93: 292-302.
- IRELAND, J.J.; MIHM, M.; AUSTIN, E.; DISKIN, M.G. ; ROCHE, J.F. 2000. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: Key concepts, Studies, Advancements, and Terms. *J. Dairy Sci.* 83: 1648-1658.
- KAWATE, N.; ITAMI, T.; CHOUSHI, T.; SAITOH, T.; WADA, T.; MATSOUKA, K.; UENAKA, K.; TANAKA, N.; YAMANAKA, A.; SAKASE, M.; TAMADA, H.; INABA, T.; SAWADA, T. 2004. Improved conception in timed-artificial insemination using a progesterone-releasing intravaginal device and Ovsynch protocol in postpartum suckled Japanese Black beef cows. *Theriogenology* 61: 399-406.
- KESNER, J.S.; CONVEY, E.M.; ANDERSON, C.R. 1981. Evidence that estradiol induces the preovulatory LH surge in cattle by increasing pituitary sensitivity to LHRH and then increasing LHRH release. *Endocrinology* 108:1386.

- KINDER, J.E.; KOJIMA, F.N.; BERGFELD, E.G.M.; WEHRMAN, M.E.; FIKE K.E. 1996. Progesterin and Estrogen Regulation of Pulsatile LH Release and Development of Persistent Ovarian Follicles in Cattle. *J. Anim. Sci.* 74: 1424-1440.
- LAMMING, G.E.; WATHES, D.C.; PETERS, A.R. 1981. Endocrine patterns of the postpartum cow. *J. Reprod. Fert.*, 30: 155-170.
- LAMMOGLIA, M.A.; SHORT, R.E.; BELLOWS, S.E.; BELLOWS, R.A.; MACNEIL, M.D.; HAFS, H.D. 1998. Induced and Synchronized Estrus in Cattle: Dose Titration of Estradiol Benzoate in Peripubertal Heifers and Postpartum Cows After Treatment with an Intravaginal Progesterone-Releasing Insert and Prostaglandin F<sub>2α</sub>. *J. Anim. Sci.* 76:1662-1670.
- LAUDERDALE, J.W.; SEGUIN, B.E.; STELLFLUG, J.N.; CHENAULT, J.R.; THATCHER, W.W.; VINCENT, C.K.; LOYANCANO, A.F. 1974. Fertility of cattle following PGF<sub>2a</sub> injection. *J. Anim. Sci.* 8:964-967.
- LEFEBVRE, D.M.; BLOCK, E. 1992. Effect of recombinant bovine somatotropin on estradiol-induced estrous behavior in ovariectomized heifers. *J. Dairy Sci.* 75:1461-1464.
- LEMASTER, J.W.; YELICH, J.V.; KEMPFER, J.R.; SCHRICK, F.N. 1999. Ovulation and Estrus Characteristics in Crossbred Brahman Heifers Treated with an Intravaginal Progesterone-Releasing Insert in Combination with Prostaglandin F<sub>2α</sub> and Estradiol Benzoate. *J. Anim. Sci.* 77: 1860-1868.
- LUCY, M.C. 2000. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J. Dairy Sci.* 83: 1635-1647.
- MACKEY, D.R.; SREENAN, J.M.; ROCHE, J.F.; DISKIN, M.G. 2000. The effect of progesterone alone or in combination with estradiol on follicular dynamics, gonadotropin profiles, and estrus in beef cows following calf isolation and restricted suckling. *J. Anim. Sci.* 78: 1917-1929.
- MACMILLAN, K.L.; BURKE, C.R. 1996. Effects of oestrous cycle control on reproductive efficiency. *Anim. Reprod. Sci.* 42: 307-320.
- MADERO, S.; DE DOMINIS, O.; CANTALLOPS, F.; USLENGHI, G.; CALLEJAS, S. 2007. Efecto de dos dosis de cipionato de estradiol administradas al finalizar un tratamiento con dispositivos intravaginales con progesterona sobre el porcentaje de preñez a la IATF. 7º Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina, 226 Abstrc.
- MANES, J. 2007. Efecto de la duración de un tratamiento con progestágenos y el momento de aplicación de benzoato de estradiol sobre la dinámica folicular de vacas cíclicas y en anestro posparto. Tesis *Magister Scientiae*. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina. pp. 35-81

- MANN, G.E.; LAMMING, G.E. 2000. The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrous cycle in the cow. *Anim. Reprod. Sci.* 64:171-180.
- MAPLETOFT, R.J.; MARTINEZ, M.F.; ADAMS, G.P.; KASTELIC, J.; BURNLEY, C.A. 1999. The effect of estradiol preparation on follicular wave emergence and superovulatory response in norgestomet-implanted cattle. *Theriogenology*. 47: 41. Abstrc.
- MAPLETOFT, R.J.; MARTÍNEZ, M.F.; COLAZO, M.G.; KASTELIC, J.P. 2002. The use of controlled internal drug release devices for the regulation of bovine reproduction. *J. Anim. Sci.* 81(E. Suppl. 2): E28–E36.
- MAPLETOFT, R.J.; COLAZO, M.G.; MARTÍNEZ, M.F.; KASTELIC, J.P. 2003. Ésteres de estrógeno para la sincronización de la emergencia de la onda folicular y la ovulación en animales tratados con dispositivos con progesterona. 5º Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba Argentina. pp. 55-67.
- MAPLETOFT, R.J.; COLAZO, M.G.; MARTINEZ, M.F.; KASTELIC, J.P. 2005. Aplicación de IA a tiempo fijo en programas de bovinos de carne de Canadá. 6º Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba Argentina. pp. 81-94.
- MARTINEZ, M. F.; KASTELIC, J.P.; ADAMS, G.P.; COOK, B.; OLSON, W. O.; MAPLETOFT, R.J. 2002. The use of progestins in regimens for fixed time artificial insemination in beef cattle. *Theriogenology* 57: 1049-1059.
- MARTÍNEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; BÓ, G.A.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R.J. 2005. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 86: 37-52.
- MARTÍNEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; COLAZO, M.G.; MAPLETOFT, R.J. 2007. Effects of estradiol on gonadotrophin release, estrus and ovulation in CIDR-treated beef cattle. *Domestic Animal Endocr.* 33: 77-90.
- MARTINS, C.M.; CASTRICINI, E.S.C.; SÁ FILHO, M.F.; GIMENES, L.U.; BARUSELLI, P.S. 2005. Dinámica folicular de vacas nelore tratadas com Cipionato ou Benzoato de estradiol em protocolos de inseminacao artificial em tempo fixo. *Acta Sci. Vet.* 33: 285. resumen.
- MENEGHETTI, M.; SA´ FILHO, O.G.; PERES, R.F.G.; LAMB, G.C.; VASCONCELOS, J.L.M. 2009. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols. *Theriogenology*. 72: 179-189.
- MCDOUGALL, S.; BURKE, C,R,; MACMILLAN, K.L.; WILLIAMSON, N,B. 1992 The effect of pretreatment with progesterone on the oestrous response to oestradiol-17β benzoate in the post-partum dairy cow. *N. Z. Soc. Anim. Prod.* 52: 157-160.
- MCDOUGALL, S.; MACMILLAN, K. L.; WILLIAMSON, N. B. 1998. Factors associated with a prolonged period of postpartum anoestrus in pasture-fed dairy cattle. *Proc. World Assoc. Buiatrics* 20:657-662.

- MOREIRA, F.; ORLANDI, C.; RISCO, C.A.; LOPES, F.; MATTOS, R.; THATCHER, W.W. 2001. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84: 1646-1659. Abstrc.
- MURPHY, M.G.; BOLAND M.P.; ROCHE J.F. 1990. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in postpartum beef suckler cows. *J. Reprod. Fert.* 90 523-533.
- MUSSARD, M.L.; BURKE, C.R.; DAY, M.L. 2003. Ovarian follicle maturity at induced ovulation influences fertility in cattle. In: *Proceedings of the Annual Conference of the Society for Theriogenology.* 179-185.
- NETT, T.M. 1987. Function of the hypothalamic-hypophyseal axis during the postpartum period in ewes and cows. *J. Reprod. Fert.* 34: 201-220.
- ODDE, K.G. 1990. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. *J. Anim. Sci.* 68: 817-830.
- ORGANDO, P.P.; SCHLABITZ, P.E.; OLIVEIRA, G.H.; MACHADO, T.M.P.; BORGES, J.B. 2005. Avaliação de protocolos de iatf utilizando cidr, benzoate de estradiol ou cipionato de estradiol em vacas de corte. VI Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba Argentina. 411 Abstrc.
- O'ROURKE, M.; DISKIN, M.G.; SREENAN, J.M.; ROCHE, J.F. 2000 The effect of dose and route of oestradiol benzoate administration on plasma concentrations of oestradiol and FSH in long-term ovariectomised heifers, *Anim. Reprod. Sci.* 59: 1-12.
- PANCARCI, S.M.; JORDAN, E.R.; RISCO, C.A.; SCHOUTEN, M.J.; LOPES, F.L.; MOREIRA, F.; THATCHER, W.W. 2002. Use of estradiol cypionate in a presynchronized timed artificial insemination program for lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85: 122-131.
- PERRY, G.A.; SMITH, M.F.; ROBERTS, A.J.; MACNEIL, M.D.; GEARY, T.W. 2007. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 85: 684-689.
- PETERS, M.W.; PURSLEY, J.R. 2003. Timing of final GnRH of the Ovsynch protocol affects ovulatory follicle size, subsequent luteal function, and fertility in dairy cows. *Theriogenology.* Abstrc.
- PICTON, H.M. 2001. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology.* 55: 1193-1210.
- PURSLEY, J.R.; MEE, M.O.; WILTBANK, M.C. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF $2\alpha$  and GnRH. *Theriogenology* 44: 915-923.

- PURSLEY, J. R.; SILCOX, R.W.; WILTBANK, M.C. 1998. Effects of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy lost, and gender ratio after synchronization in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:2139-2144. Abstrc.
- PRICE, C.A.; WEBB, R. 1988. Steroid control of gonadotropin secretion and ovarian function in heifers. *Endocrinology.* 122: 2222-2231.
- QUINTANS, G.; VIÑOLES, C. ; SINCLAIR, K.D. 2004. Follicular Growth and ovulation in postpartum beef cows following calf removal and GnRH treatment. *Anim. Reprod. Sci.* 80: (1-2) 5-14.
- REKWOT, P.I.; OYEDIPE, E.O.; MUKASA- MUGERWA, E.; SEKONI, V.O.; AKINPELUMI, O.P.; ANYAM, A.A. 1999. Fertility in Zebu cattle (*Bos indicus*) after prostaglandin administration and Artificial Insemination. *Vet. J.* 158: 53-58.
- RHODES, F.M.; BURKE, C.R.; CLARK, B.A.; DAY, M.L.; MACMILLAN, K.L. 2002. Effect of treatment with progesterone and oestradiol benzoate on ovarian follicular turnover in postpartum anoestrous cows and cows which have resumed oestrous cycles. *Anim. Reprod. Sci.* 69:139-50.
- RHODES, F.M.; MCDUGALL, S.; BURKE, C.R.; VERKERK, G.A.,; MACMILLAN, K.L. 2003. Treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. *J. Dairy Sci.* 86: 1876-1894.
- RIESZER, N.; ROBSON, C.; ALLER, J.F.; CALLEJAS, S.S.; ALBERIO, R.H. 2004. Control del desarrollo folicular ovárico con progesterona o con acetato de medroxiprogesterona, en vacas cíclicas y en anestro posparto. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 24 (1): 293-294.
- RIVERA, G. 1993. Regulación neuroendocrina de la función ovárica. En: Palma, G.A.; Brem, G. Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina. Hemisferio Sur, Argentina. pp. 43-63.
- RIVERA G.M.; GOÑI C.G.; CHAVES M.A.; FERRERO S.B.; BÓ G.A. 1998. Ovarian follicular wave synchronización and induction of ovulation in postpartum beef cows. *Theriogenology* 49: 1365-1375.
- ROCHE, J. F. 1976. Retention rate in cows and heifers of intravaginal silastic coils impregnated with progesterone. *J. Reprod. Fertil.* 46: 253-255.
- ROELOFS J.B.; GRAAT, E.A.M.; MULLAART, E.; SOEDE, N.M.; VOSKAMP-HARKEMA, W.; KEMP, B. 2006. Effects of insemination-ovulation interval on fertilization rates and embryo characteristics in dairy cattle. *Theriogenology* 66: 2173-2181.
- ROSS, P.J.; ALLER, J.F.; CALLEJAS, S.S.; BUTLER, H.; ALBERIO, R.H. 2004. Estradiol benzoate given 0 or 24 h after the end of a progestagen treatment in postpartum suckled beef cows. *Theriogenology.* 62: 265-273.
- RUTTER, L.M.; RANDEL, R.D. 1984. Luteal competency during the resumption of ovarian cyclicity in postpartum Brahman cows. *Theriogenology.* 21: 713.

- RYAN, D.P.; SNIJDERS, S.; YAAKUB, H.; O'FARRELL, K.J. 1995. An evaluation of estrus synchronization programs on management of dairy herds. *J. Anim. Sci.* 73: 3687-3695.
- SAKASE, M.; KAWATE, N.; NAKAGAWA, C.; FUKUSHIMA, M.; NODA, M.; TAKEDA, K.; UENO, S.; INABA, T.; KIDA, K.; TAMADA, H.; SAWADA, T. 2007. Preventive effects of CIDR-based protocols on premature ovulation before timed-AI in Ovsynch in cycling beef cows. *Short Communication The Vet. J.* 173: 691-693.
- SANZ, A.; CASASUS, I.; VILLALBA, D.; REVILLA, R. 2003. Effects of suckling frequency and breed on productive performance, follicular dynamics and postpartum interval in beef cows. *Anim. Reprod. Sci.*
- SARTORI, R.; FRICKE, P.M.; FERREIRA, J.C.P.; GINTHER, O.J.; WILTBANK M.C. 2001. Follicular Deviation and Acquisition of Ovulatory Capacity in bovine Follicles *Biol. Reprod.* 65: 1403-1409.
- SAVIO, J.D.; THATCHER, W.W.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R.L.; WOLFENSON, D. 1993. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *J. Reprod. Fertil.* 97: 197.
- SCENA, C.G.; CORRARO, G.M.; MESTRE, J.; ALBERIO, R.H. 1994. Efecto de esponjas intravaginales sobre el anestro postparto de vacas de segundo servicio. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 14: 75-83.
- SHORT, R. E.; RANDEL, R. D.; STAIGMILLER, R. B.; BELLOWS, R. A. 1979. Factors Affecting Estrogen-Induced LH Release in the Cow. *Biol. Reprod.* 21: 683-689.
- SHORT, R.E.; BELLOWS, R.A.; STAIGMILLER, R.B.; BERARDINELLI J.G.; CUSTEP E.E. 1990. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. *J. Anim. Sci.* 68:799-816.
- SORROARAIN, N.; VACA, R.J.A.; FERNANDEZ FRANCIA, M.G.; LARES, S.F.; DE LA SOTA, R.L.; BALDO, A. 2005. Eficiencia de la utilización de benzoato de estradiol a las 0 o 24 horas de retirado el dispositivo intravaginal con progesterona para inducir la ovulación en vacas multíparas para carne. VI Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba Argentina. 425 Abstrc.
- SPROTT L. R. 1999 Management and financial considerations affecting the decision to synchronize estrus in beef females. In: *Proceedings of the American Society of Animal Science.* [on line] <<http://www.asas.org/symposia/1998-1999.htm>> [consulta: 10 abril 2008]. pp 1-10.
- SREENAN, J. M.; MULVEHILL, P. 1975. The application of long- and short-term progestagen treatments for oestrous cycle control in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 45: 367-369.
- STAGG, K.; SPICER, L.J.; SREENAN, J.M.; ROCHE, J.F.; DISKIN, M.G. 1998. Effect of calf isolation on follicular Dynamics, Gonadotropin and Metabolic Hormone

- changes, and interval to first ovulation in beef cows fed either of two energy levels postpartum. *Biol. Reprod.* 59: 777-783.
- STEVENSON, J.S.; TIFFANY, S.M.; LUCY M. C. 2004. Use of Estradiol Cypionate as a Substitute for GnRH in Protocols for Synchronizing Ovulation in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 87:3298-3305
- SUNDERLAND, S.J.; CROWE, M.A.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F.; IRELAND, J.J. 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil.* 101: 547- 555.
- THATCHER, W.W.; MOREIRA, F.; PANCARCI, S.M.; BARTOLOME, J.A.; SANTOS J.E.P. 2002. Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. *Dom. Anim. Endocrinology* 23: 243-254.
- THUNDATHIL, J.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R.J.1997. The Effect of Estradiol Cypionate (ECP) on Ovarian Follicular Development and Ovulation in Dairy Cattle. *Can. J. Vet. Res.* 61: 314-316.
- TWAGIRAMUNGU, H.; GUILBAULT, L.A.; DUFOUR, J.J.; 1995. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrous in cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 73: 3141-3151.
- VASCONCELOS, J.L.M.; SILCOX, R.W.; ROSA, G.L.; PURSLEY, J.R.; WILTBANK, M.C. 1997. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle and conception rate after synchronization of ovulation with GnRH on different days of the estrous cycle. *J. Dairy Sci.* 80: 148.
- VYNCKIER, L.; DEBACKERE, M.; DE KRUIF, A.; CORYN, M. 1990. Plasma estradiol-17 beta concentrations in the cow during induced estrus and after injection of estradiol-17 beta benzoate and estradiol-17 beta cypionate--a preliminary study. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1: 36-42.
- WALTERS, D.L.; KALTENBACH, C.C.; DUNN T.G.; SHORT R.E. 1982a. Pituitary and Ovarian Function in Postpartum Beef Cows. I. Effect of Suckling on Serum and Follicular Fluid Hormones and Follicular Gonadotropin Receptors. *Biol. Reprod.* 26: 640-646.
- WALTERS, D.L.; SHORT, R.E.; CONVEY, E.M.; STAIGMILLER, R.B.; DUNN T.G.; KALTENBACH, C. C. 1982b. Pituitary and Ovarian Function in Postpartum Beef Cows. II. Endocrine Changes Prior to Ovulation in Suckled and Non suckled Postpartum Cows Compared to Cycling Cows. *Biol. Reprod.* 26: 647-654.
- WHEATON, J.E.; LAMB, G.C. 2007. Induction of cyclicity in postpartum anestrous beef cows using progesterone, GnRH and estradiol cypionate (ECP). *Anim. Reprod. Sci.* 102: 208-216.
- WHISNANT, C.S.; WASHBURN, S.P.; FARIN, P.W. 2000. Current concepts in synchronization of estrous and ovulation of dairy cows. In: *Proceedings of the American Society of Anim. Sci.* 1999. [on line] <<http://www.asas.org/symposia/1998-1999.htm>> [consulta: 10 abril 2008]. pp 1-8.



- WILTBANK, J.N.; STURGES, J.C.; WIDEMAN, D.; LEFEVER, D.G.; FAULKNER, L.C. 1971. Control estrus and ovulation using subcutaneous implanta and estrogens in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 33: 600-606.
- WILTBANK, M. C.; GÜMEN, A.; SARTORI, R.. 2002 Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* 57: 21-52.
- YAVAS, Y.; WALTON, J.S. 2000b. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. *Theriogenology*. 54: 25-55.
- ZOLLERS, W.G. Jr.; GARVERICK, H.A.; SMITH, M.F. 1989. Oxytocin-induced release of prostaglandin F2a in postpartum beef cows: comparison of short versus normal luteal phases *Biol. Reprod.* 41: 262-267.
- ZOLLERS, W.G. Jr.; GARVERICK H.A.; SMITH M.F.; MOFFATT R J.; SALFEN B.E.; YOUNGQUIST R.S. 1993. Concentrations of progesterone and oxytocin receptors in endometrium of post partum cows expected to have a short or normal oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil.* 97: 329-337.