



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**APLICACIÓN DE eCG EN DIFERENTES MOMENTOS DENTRO
DE UN PROTOCOLO DE INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN EN
VACAS DE CARNE EN ANESTRO CON CRÍA AL PIE**

RAFAEL ARAGUNDE VIEYTES

TESIS DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

**URUGUAY
2018**



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**APLICACIÓN DE eCG EN DIFERENTES MOMENTOS DENTRO
DE UN PROTOCOLO DE INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN EN
VACAS DE CARNE EN ANESTRO CON CRÍA AL PIE**

RAFAEL ARAGUNDE VIEYTES

Director de Tesis: Dr. Daniel Cavestany, MS, PhD

**URUGUAY
2018**

INTEGRACIÓN DE TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

JORGE GIL, DMV, MS, PhD
Facultad de Veterinaria, LRA, CENUR
Universidad de la República, Uruguay

Raquel Perez, DMV, MS, PhD
Facultad de Agronomía, Depto. de Producción Animal y Pasturas
Universidad de la República, Uruguay

Gustavo Gastal, DMV, MS, PhD
Estación Experimental "La Estanzuela"
INIA, Uruguay



**FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados**

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

**“APLICACIÓN DE eCG EN DIFERENTES MOMENTOS DENTRO
DE UN PROTOCOLO DE INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN EN
VACAS DE CARNE EN ANESTRO CON CRÍA AL PIE”**

Por: Dr. Rafael ARAGUNDE VIEYTES

Director de Tesis: Dr. Daniel Cavestany

Tribunal

Presidente: Dr. Jorge Gil

Segundo Miembro: Dra. Raquel Pérez Clariget

Tercer Miembro: Dr. Gustavo Gastal

Fallo del Tribunal: APROBADO CON MENCIÓN

**Salón de Posgrado
Viernes 14 de diciembre de 2018**

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

“Pregúntate si lo que estás haciendo hoy te llevará a dónde quieres
llegar mañana”
Walt Disney

Dedicado a mis amores: Fer, Sol y Fran
|

AGRADECIMIENTOS:

- A Daniel Cavestany por la paciencia y el tiempo que dedicó en guiarme en la investigación, enseñarme a enfocarme en momentos exactos, pero a la vez darme libertad e independencia en el pensamiento y por su sinceridad a la hora de aconsejar y criticar.
- A Guillermo de Nava por su confianza y generosidad en arriesgar en establecimientos ganaderos comerciales a realizar una prueba sin antecedentes de cómo podría resultar.
- A Carolina Viñoles por brindarme el tiempo, lugar, animales, enseñarme a organizar el trabajo de forma minuciosa hasta el último detalle desde el comienzo hasta el final del experimento.
- Al personal de INIA “La Magnolia” Departamento de Tacuarembó por su amabilidad y adaptación a la rutina de nuestros horarios para realizar los experimentos.
- A Danilo Fila por su constante colaboración en el correr de toda la Maestría, cursos de posgrado y consejos en el análisis e interpretación de imágenes y niveles hormonales.
- Al Departamento de Reproducción Animal de Facultad de Veterinaria por brindarme el apoyo con materiales y equipos para llevar a cabo este trabajo.
- A Andres Hernández por su colaboración en los ensayos de campo.
- Al Laboratorio de Técnicas Nucleares por enseñarme el manejo de muestras de suero a la hora de analizarlas niveles hormonales.
- A Ma. Victoria de Brun por su buena disposición siempre a la hora de explicarme ciertos aspectos en biología molecular que escapaban de mi conocimiento.
- A mi estudiante de grado en ese entonces, la Dra. Ximena Goyetche por su responsabilidad en el seguimiento de experimentos.
- Al Personal de biblioteca por su rápida respuesta en el pedido de material bibliográfico y su paciencia a la hora de explicar cómo obtener cierta información.
- A Giovani Gnemi por compartir su visión de la tesis desde un punto de vista clínico.
- A la abuela Imelda por la presencia, cariño y cuidado a mi hijo Fran en esos momentos en los que los padres no podemos estar físicamente con él por la rutina del trabajo.

- A mis padres Mario y Tati, por la educación, valores, amor, comprensión y el tiempo que me dieron que perdurará durante toda la vida. A mi hermana Alejandra y mis sobrinos Nacho y Agus por su cariño e interés en este trabajo.
- Un especial agradecimiento a Fernanda, mi esposa, por el constante interés, paciencia, ánimo y amor brindado durante todo este proceso; siempre con la camiseta puesta, a mis hijos, Sol y Francisco por mantenerme con fuerza, buen humor y darme tanta felicidad de una forma inexplicable solo con palabras.

TABLA DE CONTENIDO

Índice	Página
RESUMEN	1
SUMMARY	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	4
2.1. Dinámica folicular	4
2.2. Manipulación de ondas foliculares	5
2.3. Anestro posparto y técnicas para el reinicio a la ciclicidad	7
2.4. Pérdidas embrionarias estrategias para la prevención	10
2.5. Gonadotrofina coriónica equina	12
3. HIPÓTESIS	15
4. OBJETIVOS	15
4.1. Objetivo general	15
4.2. Objetivos específicos	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS	16
5.1. Diseño experimental	16
5.2. Experimento I	16
5.3. Experimento II	17
5.4. Ultrasonografía	18
5.5. Determinación hormonal	18
5.6. Análisis estadístico	19
6. RESULTADOS	20
6.1. Experimento 1	20
6.2. Experimento 2	24
7. DISCUSIÓN	25
7.1. Experimento I	25

7.2. Experimento II	32
8. CONCLUSIONES	34
9. IMPLICANCIAS PRÁCTICAS	34
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	35

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS:

Número	Contenido	Página
Figura 1	Línea de tiempo y cronograma de tratamientos y actividades para grupo T5	17
Figura 2	Línea de tiempo y cronograma de tratamientos y actividades para grupo T7	17
Figura 3	Porcentaje de vacas de carne en anestro superficial con ternero al pie que Ovularon antes y después de las 16 h de la aplicación de GnRH para los grupos T5 y T7	20
Figura 4	Distribución de la ovulación desde la aplicación de GnRH en vacas de carne en anestro superficial con ternero al pie para los grupos y T5 y T7	21
Figura 5	Diámetro folicular los 5 días previos a la ovulación en vacas de carne en anestro superficial con ternero al pie para los grupos T5 y T7 (los asteriscos indican tendencia estadística).	21
Tabla 1	Diámetro folicular los días -2 y -1 en vacas de carne en anestro superficial con ternero al pie para los grupos y T5 y T7	22
Tabla 2	Niveles de estradiol en sangre los días los días -2 y -1 en vacas de carne en anestro superficial con ternero al pie para los grupos T5 y T7	22
Figura 6	Volumen de cuerpo lúteo desde la ovulación hasta el día 14 postovulación en vacas de carne con ternero al pie para los grupos T5 y T7.	23
Figura 7	Niveles de P4 en sangre desde la ovulación hasta el día 9 postovulación en vacas de carne con ternero al pie para los grupos T5 y T7, el asterisco indica diferencia significativa ($P < 0,05$).	24

RESUMEN

Para evaluar el efecto de la aplicación de la Gonadotropina Coriónica equina (eCG) en dos momentos en relación al retiro de un progestágeno en un protocolo de inducción de ovulación (dos días antes vs. el día de retiro de la fuente de progesterona) en vacas de carne en anestro superficial con ternero al pie, se realizaron dos experimentos en los que se evaluó la dinámica folicular, ovulación, desarrollo del cuerpo lúteo, niveles séricos de estradiol preovulatorios, niveles séricos de progesterona en fase luteal y porcentaje de preñez. El experimento 1 (N=22) consistió en un trabajo en el que se controló la dinámica ovárica mediante ultrasonografía, se detectó celo y se tomaron muestras de sangre para la determinación de estrógenos y progesterona. El experimento 2 (N=676) consistió en un trabajo en el que se determinó la tasa de preñez. En ambos experimentos se usaron vacas con ternero al pie con 60 a 90 días posparto y en anestro superficial pastoreando en campo natural mejorado. Se compararon dos tratamientos hormonales de inducción de la ovulación que consistieron en: Día 0: 2mg de benzoato de estradiol (BE) e inserción de un dispositivo intravaginal con 750mg de progesterona; administración de 400UI de eCG al grupo tratamiento (T5) el Día 5, y al grupo control (T7) el Día 7. Día 7: retiro del dispositivo administración de 0,150mg de D-Cloprostenol. Día 9: 8µg de un análogo sintético de GnRH. En el experimento 2 el protocolo fue el mismo, pero a las 16 horas posteriores a la GnRH se inseminaron las vacas a tiempo fijo (IATF). En el experimento 1 el grupo T5 tuvo una tendencia (P=0,09) a ser mayor la sincronía en la ovulación, ovularon en un período de tiempo menor y los folículos preovulatorios dos días antes de la ovulación tendieron a ser mayores que para el grupo T7 (T5 día -2= 12,4±0,6mm; día -1= 13,6±0,6mm vs. T7 día -2= 10,7±0,6mm; -1= 11,9±0,6mm; P=0,07 y P=0,06, respectivamente). El nivel de estradiol dos días antes de la ovulación fue igual para ambos grupos (T5 = 8,1±0,7pg/ml; T7 = 8,0±0,7pg/ml; P=0,89) y el día previo a la ovulación el grupo T5 tendió a ser más bajo que para el grupo T7 (T5 = 6,7±0,7pg/ml; T7 = 8,7±0,7pg/ml; P=0,06). El volumen de los cuerpos lúteos (CLs) no fue diferente entre grupos, aunque hubo una tendencia (P=0,07) el día 7 postovulación a ser mayores en el grupo T5 (6344±634mm³) que en el grupo T7 (5258±634mm³). La progesterona en sangre fue mayor para el grupo T5 que en el T7 9 días luego de la ovulación (T5 =3,59±0,38 ng/mL vs. T7 2,53±0,35 ng/mL; P=0,04). En el experimento 2 la tasa de concepción fue mayor en el grupo T5 que en el grupo T7 (T5= 72,2% vs. T7= 61,0%; P=0,04). Se concluye que aplicar 2 días antes la eCG en el protocolo utilizado y en esta categoría de vacas en anestro superficial con ternero al pie, aumenta la tasa de concepción probablemente debido a que presentan folículos preovulatorios más grandes, ovulan en un rango de tiempo menor y generan CLs más activos que producen más progesterona. El uso de eCG al Día 5 aumenta la eficiencia reproductiva en rodeos en condiciones pastoriles.

Palabras clave: eCG, anestro posparto, dinámica folicular, cuerpo lúteo, estradiol, progesterona, fertilidad.

SUMMARY

To evaluate the effect of the application of equine chorionic gonadotropin (eCG) at two moments in relation to the beginning of an ovulation induction protocol (two days before vs. the day of removal of the progesterone source) in anestrous suckled beef cows, two experiments were performed in which follicular dynamics, ovulation, corpus luteum development, preovulatory estradiol level, progesterone in the luteal phase and pregnancy rate were evaluated. Experiment 1 consisted of a controlled trial in which ovarian dynamic was determined by ultrasonography, estrus was controlled and blood samples were taken for hormonal assays. Experiment 2 consisted of a field trial in which the pregnancy rate was determined. In both experiments cows were 60 to 90 days of postpartum in anestrous in an improved natural pasture. Two synchronization protocols for induction of ovulation were performed, which consisted of: Day 0: 2mg of estradiol benzoate (BE) and insertion of an intravaginal device with 750mg of progesterone; administration of 400UI of eCG to the treatment group (T5) on Day 5, and to the control group (T7) on Day 7. Day 7: removal of the device administration of 0.150mg of prostaglandin. Day 9: 8µg of a synthetic analogue of GnRH. In experiment 2 the protocol was the same, but at 16 hours after GnRH the cows were inseminated at fixed time (FTAI). In experiment 1 the group T5 had a tendency to have a greater synchrony ($P=0.09$) in ovulation and the preovulatory follicles two days before ovulation tended to be larger than T7 group (T5 day -2 = 12.4 ± 0.6 mm; day -1 = 13.6 ± 0.6 mm vs. T7 day -2 = 10.7 ± 0.6 mm, -1 = 11.9 ± 0.6 mm, day -2 $P = 0.07$ and -1 $P = 0.06$). Estradiol level two days before ovulation was the same for both groups (T5 Day -2 = 8.1 ± 0.7 pg/ml, T7 Day -2 = 8.0 ± 0.7 pg/ml, $P = 0.89$) and the day before ovulation for group T5 resulted in a tendency to be lower than for T7 (T5 Day -1 = 6.7 ± 0.7 pg/ml; T7 Day -1 = 8.7 ± 0.7 pg/ml, $P=0.06$). Corpus luteum volume did not result with significant differences, there was a tendency on day 7 post-ovulation to be higher for group T5 (T5 Day 7 = 6344 ± 634 mm³, T7 Day 7 = 5258 ± 634 mm³, $P = 0.07$), progesterone level was greater for T5 group 9 days after ovulation (T5 Day 9 = 3.59 ± 0.38 ng/mL, T7 Day 9 2.53 ± 0.35 ng/mL, $P = 0.04$). In experiment 2, the conception rate was higher for group T5 (T5 = 72.2% vs. T7 = 61.0%, $P = 0.04$). It is concluded that advancing 2 days the eCG in these protocols and cow category, increases the conception rate by having bigger preovulatory follicles that ovulate in a shorter time range and from these ovulation more active CLs are generated producing more progesterone. The use of eCG at Day 5 increases reproductive efficiency in herds under grazing conditions.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores desafíos de los productores criadores es aumentar la cantidad de terneros producidos por año y por superficie. En Uruguay en el 2015 la existencia de vacunos fue de 11,9 millones, 4,2 millones, eran vacas en servicio y de estas se obtuvo 2,8 millones de terneros (DIEA, 2016) por lo tanto la tasa de procreo fue de 66,7%. Desde el año 1998 hasta el 2007 las cifras variaron de un 57,9% a 66,0%. Por lo tanto, queda claro que existe un enorme potencial para mejorar (De Nava, 2011). Debido a nuestro sistema de producción de bovinos de carne predominantemente con una base forrajera pastoril, en bovinos de carne, la vaca de primera cría con ternero al pie, es la categoría que limita la obtención de mayores tasas de procreos, esto es debido al prolongado anestro posparto que presentan (Menchaca et al., 2013).

La inseminación artificial (IA) es una herramienta importante para la mejora genética y permite la utilización de varios esquemas que mejoren la eficiencia reproductiva. El uso de tratamientos hormonales para la IA, da la posibilidad de concentrar los celos reduciendo el número de terneros en la cola de parición. La principal limitante de la IA en condiciones extensivas es la detección de celos ya sea por la propia falla durante la detección, la falta de celos y la dificultad de juntar los rodeos dos veces por día durante un período prolongado de tiempo. Por esto, se han desarrollado tratamientos que permiten inseminar sin tener que detectar celos, como el Ovsynch que fue el primero desarrollado y que permite además realizar una inseminación a tiempo predeterminado o fijo (IATF) (Pursley et al., 1995). Esto da la posibilidad de concentrar aún más los partos en ganado de carne produciendo lotes de terneros que pesan de 14 kg y 18 kg más al destete en vaquillonas y vacas respectivamente y son más uniformes en su condición corporal (De Nava, 2016). La gran limitante del uso de este tratamiento son las vacas que no están ciclando por lo que el tratamiento con progesterona exógena, ya sea administrada vía inyectable, o como dispositivo intravaginal (DIV) es necesaria para llevar a cabo un protocolo de IATF de vacas que se encuentran en anestro posparto (Cavestany, 2002).

Los tratamientos para la inducción de la ovulación y reinicio de la actividad ovárica basados en el uso de progestágenos son combinados con otras hormonas como el estradiol o la hormona estimulante de gonadotrofinas (GnRH), éstas son aplicadas para reiniciar una nueva onda folicular y para inducir la ovulación de un nuevo folículo dominante. En algunos protocolos de IATF, sobre todo los que son aplicados a vaquillonas y vacas en anestro, es recomendado el uso de la gonadotrofina coriónica equina (eCG) como promotor del desarrollo folicular y luteal, por su efecto positivo tanto en la secreción de hormona folículo estimulante (FSH) como de hormona luteinizante (LH) (Cutaia et al., 2003). La utilización de eCG aumenta el tamaño del folículo preovulatorio dando lugar a un cuerpo lúteo (CL) de mayor tamaño que produce mayor cantidad de progeste-

rona, el momento en el cual se debe aplicar esta hormona requiere generar más información para optimizar su uso (Ferreira et al., 2013; Menchaca et al., 2013).

El objetivo de esta tesis es generar información sobre la eficiencia reproductiva de vacas con cría al pie de 60 a 90 días de edad, a las que se les aplicó un protocolo de IATF, modificando el momento de aplicación de la eCG.

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

2.1 Dinámica folicular

La dinámica folicular es el proceso por el cual los folículos crecen, hasta que uno de ellos llega a la ovulación mientras que el resto se degeneran terminando en la atresia. Estos eventos suceden en forma ordenada y periódica y se da en una modalidad de ondas (Ginther et al., 1989; Evans et al., 1994).

La hembra bovina puede tener 2 o 3 ondas foliculares por ciclo estral. Cada onda folicular comienza con una etapa de reclutamiento, la baja pulsación del centro tónico hipotalámico estimula la secreción de FSH provocando el crecimiento de un grupo (cohorte) de 8 a 41 folículos antrales de aproximadamente 1 o 2 mm de diámetro (Ginther et al., 1989). Estos folículos crecen todos en un rango similar hasta llegar al desvío folicular, momento en el que uno de estos folículos, el folículo dominante (FD), aumenta la tasa de crecimiento frente al resto, esto ocurre a los 2,5 días del inicio de cada onda para todas las razas. Esta situación se produce cuando se alcanza 6 mm de diámetro folicular en el Bos índicus y 8,5 mm en el Bos Taurus (Sartorelli et al., 2005).

Hasta el final de la etapa de crecimiento o principio del desvío la mayoría de los folículos pueden lograr la dominancia, la eliminación del FD da lugar a un rápido crecimiento del folículo que le sigue en tamaño (Ginther, 2016). Entre 24 y 36 horas antes que comience el desvío de tasa de crecimiento del FD respecto al resto, éste, con 5 mm de diámetro, presenta diferencias funcionales y de composición de elementos intrafoliculares. La secreción de inhibina es el primer evento que marca el desvío del folículo dominante, esta produce la caída de FSH con la consecuente subordinación del resto de los folículos pertenecientes a esta onda (Gibbons et al., 1997). El factor de crecimiento tipo insulínico-1 (IGF1) y el estradiol (E2) intrafolicular, tienen una autorregulación positiva que junto a la inhibina continuará suprimiendo la secreción de FSH e indirectamente aumentando la LH en respuesta a el aumento de la pulsatilidad de GnRH (Hansel y Convey, 1983; Beg y Ginther, 2006; Haughian et al., 2013). Esta caída de FSH continúa siendo necesaria para el crecimiento del FD y se torna insuficiente para el crecimiento de los folículos subordinados (FS) que comienzan su regresión (Bergfelt et al., 2000). El FD comienza a ser menos dependiente de la FSH debido a una transición de receptores de FSH a receptores para la LH aumentando así la sensibilidad frente a la misma (Ireland y Roche, 1983).

Luego de esta primera fase de crecimiento del FD, el mismo comienza una fase estática que se da a el 5to día de la emergencia de la onda folicular, cuando el folículo alcanza los 10 mm aproximadamente, este se mantiene sin crecimiento durante 3 a 4 días, cuando comienza la fase de regresión hasta la atresia, esto ocurre bajo la influencia de altos niveles de progesterona (P4), que permite una alta amplitud, pero inhibe la frecuencia y la pulsatilidad de la LH (Rahe et al., 1980). Con niveles basales de P4 y el estímulo de E2 proveniente del FD, el hipotálamo aumenta la pulsatilidad de GnRH y los pulsos de LH comienzan a ocurrir cada 40 a 70 minutos durante 2 a 3 días otorgando capacidad ovulatoria al folículo y provocando la ovulación (Forde et al., 2011). La ovulación es un proceso que integra varios eventos, culminando con la liberación del contenido del folículo incluyendo, ovocito, corona radiata, cumulus oophurus y licor folicular (Adams y Singh, 2015).

2.2. Manipulación de las ondas foliculares

El conocimiento sobre la dinámica folicular y luteal es básico para la manipulación del ciclo estral en las distintas categorías de bovinos y producir un fuerte impacto en la eficiencia reproductiva. A partir de aquí se pueden proponer distintos tratamientos para distintas biotecnologías reproductivas como protocolos para realizar una inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), superovulación para la producción de embriones in vivo o in vitro y la transferencia embrionaria (Adams y Singh, 2015). Para la manipulación de ondas foliculares los tratamientos se basan en el uso de E2 o de GnRH dependiendo de los efectos que se busque o de las reglamentaciones que existan para el uso de las mismas en distintos países (Colazo y Mapletoft, 2014).

El E2 se utiliza en programas de IATF como ésteres: benzoato (BE) o cipionato de estradiol (CE) los que tienen, particularmente el CE, una vida media más larga que el E2 natural. El E2, al ser aplicado induce la atresia folicular y suprime la secreción de gonadotrofinas produciendo un efecto más marcado durante la fase luteal o en combinación con un progestágeno (Bolt et al., 1990). Una vez que el estradiol administrado es metabolizado, el nivel de FSH aumenta llegando a un pico máximo al 1,5 o 2 días provocando el reclutamiento folicular y dando inicio a nueva onda, dando lugar a una nueva onda folicular de la que se originará un FD entre el 4 y 5 día (Bo et al., 1995). El BE al ser aplicado sin el efecto supresor del progestágeno, si se retira el mismo al séptimo u octavo día en el que se tendrá la presencia del folículo dominante; estimulará la pulsatilidad de LH alcanzando el pico máximo entre las 16 a 18 horas, provocando la ovulación a las 24 a 32 horas del tratamiento (Colazo y Mapletoft, 2014; Macmillan y Burke, 1996). El CE provoca un pico de LH menor que el benzoato, más prolongado y sucede entre las 46 a 54 horas luego del tratamiento dando lugar a la ovulación en el mismo período de tiempo, mismo tamaño de folículo y la misma tasa de ovulación que el benzoato de estradiol. Estos resultados dan la

posibilidad de inducir la ovulación el mismo día del retiro del progestágeno sin alterar los índices de preñez (Colazo et al., 2003; Sales et al., 2012). Por otro lado, el CE demostró ser inconsistente para inducir la emergencia y sincronía de una nueva onda folicular al inicio de un protocolo con progestágenos en ganado lechero (Thundathil et al., 1999).

La GnRH se utiliza en distintos protocolos de IATF como análogos (buserelina, licerelina o gonadorelina) con el fin de estimular la ovulación de un FD, los tres análogos demostraron ser efectivos al estimular la ovulación, dando más cantidad y crecimiento más rápido de LH en sangre la buserelina y licerelina que la gonadorelina (Picard-Hagen et al., 2015). La GnRH fue la hormona utilizada para el primer protocolo propuesto de IATF realizado en ganado lechero en producción llamado Ovsynch (Pursley et al., 1995). En éste, los autores sugerían que la aplicación de la primera dosis de GnRH en cualquier momento del ciclo estral estimula la ovulación, luteinización o atresia de grandes folículos antrales. De esta forma, se obtiene un cuerpo lúteo que es eliminado mediante la administración de prostaglandina $f2\alpha$ (PGF) al séptimo día, de modo que al aplicar una segunda dosis de GnRH al noveno día ésta provoca la ovulación de un folículo generado. Dependiendo de la situación de la onda folicular en que se encuentre la vaca al inicio del tratamiento, luego de la administración de GnRH entre los días 3 y 6 de la emergencia de una onda folicular se producirá la ovulación de casi el 90% de los folículos, dando lugar a la emergencia de una nueva onda folicular a los 1,3 días luego del tratamiento (Macmillan y Thatcher, 1991; Martinez et al., 1999). Posteriormente, se observó que el momento en que se aplicaba la primera dosis de GnRH no produciría el mismo efecto en cualquier día del ciclo, si la primera dosis de GnRH es administrada entre los días 1 y 4 o del 14 al 21 del ciclo estral se obtienen tasas de preñez menores que si son tratadas del día 5 al 13 (Vasconcelos et al., 1999). En un estudio realizado en el que se compara el efecto de la GnRH y la LH aplicadas en distintos días del ciclo sexual, se observó que la GnRH es efectiva produciendo la ovulación en folículos de más de 9 o 10 mm y que se encuentren en la etapa tardía de crecimiento o fase estática temprana (Martinez et al., 1999). Durante el metaestro temprano (día 1-3) al aplicar GnRH el folículo que se pretende ovular no lo hará por falta de receptores para la LH y al momento de aplicar la PGF éste se encontrará en el período de atresia por lo que la ovulación fallará al aplicar la segunda GnRH (Colazo et al., 2009). Por otro lado, el comenzar el protocolo el día 15 del ciclo estral, donde habría un folículo dominante de una segunda onda, es probable que éste no responda ovulando por estar en una fase estática tardía y la prostaglandina endógena producirá la luteólisis del ciclo estral natural, debido a este fenómeno se adelantan los celos antes del día de aplicar la PGF y la tasa de preñez general del programa estará afectada (Moireira et al., 2000).

Debido a estos hallazgos, se propuso un nuevo esquema que incluye una pre-sincronización del ciclo (Presynch) de vacas ciclando con el objetivo de iniciar los tratamientos durante la fase luteal temprana. El esquema se basa en la aplicación de dos dosis de PGF separadas por 14 días y al día 12 de la segunda PGF se inicia el protocolo de IATF. De acuerdo a reportes en los que se compara la presincronización de vacas cíclicas y vacas acíclicas (Moreira et al., 2001) esto resulta en un incremento de la tasa de preñez de un 10% para las vacas ciclando por comenzar el protocolo en la fase luteal temprana y por el efecto de la PGF en el tracto reproductivo, en el caso de las vacas acíclicas el Presynch no incrementó la tasa de preñez por no tener CL donde actuar la PGF (Moreira et al., 2001). También se propuso el uso de P4 durante el período entre la administración de la primera GnRH y la PGF con el fin de prevenir las ovulaciones prematuras en ganado de carne sometido a un protocolo Cosynch (segunda GnRH al momento de la IATF), los resultados de éste trabajo demostraron un aumento marcado en vacas ciclando ya que se previno el celo y la ovulación (Lamb et al., 2001).

El uso del E2 en combinación con progestágenos al inicio de un tratamiento para IATF resultó ser más efectivo que iniciar el tratamiento con GnRH; en un estudio realizado en vaquillonas púberes, en el que se compararon los porcentajes de manifestación de celo, tasa de concepción y preñez con 1 mg de BE y 100 µg de gonadorelina al inicio del tratamiento con progestágenos, resultó en un 100% de celo y un 76% de preñez para el grupo del estradiol frente a un 55% de celo y un 48% de preñez (Martinez et al., 2001; Martinez et al., 2002). En otro estudio realizado en vacas con ternero al pie con un promedio de edad de 73 días, con progesterona oral durante 7 días e inducción de la ovulación con GnRH, el uso de E2 al inicio del tratamiento dio una mayor tasa de manifestación de celo y preñez de las vacas inseminadas a celo visto y mayor tasa de preñez para las vacas inseminadas a tiempo fijo que el grupo que se inició el tratamiento con GnRH (Thundathil et al., 1999). El uso de la GnRH como inductor de la ovulación es más efectiva que el E2. Se comparó un protocolo Ovsynch sustituyendo la aplicación de la segunda GnRH por BE comenzando ambos tratamientos durante la fase luteal temprana. La GnRH generó un pico de LH a las 2 horas de ser aplicada, provocando una ovulación en un rango de tiempo menor, el E2 generó el pico de LH luego de las 20 horas de ser aplicada produciendo la ovulación en un rango de tiempo mayor, concluyendo que la GnRH tiene un mayor poder de sincronización de la ovulación que el E2 (Cavestany et al., 2002).

2.3. Anestro posparto y técnicas para el reinicio a la ciclicidad

El retorno a la ciclicidad es una de las mayores limitantes para poder llegar a los objetivos de producción anual de terneros. En Uruguay el 80% de las vacas de cría con ternero al pie, con una condición corporal de menos de 4,5 (escala

de 1-8), en condiciones pastoriles, se encuentran en anestro, (ausencia de CLs en un período de 10 días) del 20 al 40% de éstas se encuentran en anestro profundo (ausencia de CLs y presencia de folículos < a 8 mm) y 60 a 80% en anestro superficial (ausencia de CLs y presencia de folículos > a 8 mm; Menchaca et al., 2013; Wiltbank et al., 2002). Esta condición se debe fundamentalmente a dos factores que son la nutrición y el amamantamiento, afectando en primer lugar a las vacas de primera cría. Hasta la última etapa de la gestación, el eje hipotálamo-hipofisario se encuentra bloqueado por una marcada retroalimentación negativa ejercida por la alta concentración de esteroides (estrógenos y progesterona) provenientes de la placenta y ovarios (Randel, 1990; Williams, 1990; Yavas y Walton, 2000a). Los estrógenos en los últimos 14 días de la gestación suben a una tasa de 248 pg/día hasta llegar a los 2660 pg/ml, por otro lado, la progesterona hasta el día antes del parto se mantiene en forma estable en un promedio de 13,9 ng/ml para pasar a 0,7ng/ml luego del parto (Henricks et al., 1972). Este estado hormonal inhibe la secreción de FSH y LH suprimiendo totalmente la actividad folicular durante los últimos 20 a 25 días previo al parto (Crowe et al., 1998) y las reservas hipofisarias de LH son bajas por el estradiol placentario de los días previos al parto (Nett et al., 1987). El parto da lugar al desbloqueo, cuatro días luego del mismo se reanuda el crecimiento folicular y la pulsatilidad de FSH ya sea en ganado lechero en producción o en vacas de carne con ternero al pie en las que se puede encontrar un FD dentro de los primeros 7 a 10 días posparto. La falla está en el estímulo a la ovulación y no en el crecimiento folicular, las reservas de LH se completan de forma más lenta que las de FSH y esto ocurre recién entre la segunda y tercera semana posparto (Crowe et al., 2014).

El fin del puerperio, dependerá del estatus nutricional y de la condición corporal que la madre tenga durante la gestación, al momento de parir y durante los siguientes 30 a 40 días posparto; las reservas energéticas de la madre incidirán directamente en el período de tiempo des del parto a el primer celo (Short et al., 1990). La condición corporal es una medida práctica para estimar las reservas energéticas que tiene la vaca y para predecir su actividad ovárica. En Uruguay se usa la escala del 1-8 teniendo como 1 a un animal en estado caquético y al 8 como obeso (Randel, 1990; Méndez et al., 1988). La reducción del consumo de la dieta necesaria para llevar a término la preñez, parto y puerperio, conduce a una baja en el contenido tanto de FSH como de LH a nivel de hipófisis, esto reduce la respuesta de las mismas frente al estímulo de GnRH exógena y a un retraso al inicio de una adecuada pulsatilidad de LH, para producir la maduración folicular y primera ovulación posparto (Yavas y Walton, 2000a).

No solo la lactancia y su exigencia energética mantienen esta demora en el reinicio de la actividad cíclica, sino que la presencia del ternero influye en forma negativa para acortar este periodo. De hecho, las vacas que son ordeñadas sin presencia de su ternero obtuvieron un período más corto del parto a la primera

ovulación con demostración de celo debido a un aumento en la pulsatilidad de LH más temprano (De Rensis y Peters, 1999). Desde el parto hasta los primeros 15 a 30 días posparto el contenido de LH hipofisaria no es suficiente para generar ningún impulso, luego de restablecerse la cantidad mínima de LH se necesita generar pulsos. Los niveles de opioides endógenos producidos por el cerebro como las endorfinas, encefalinas y dinorfinas causan la supresión de la pulsatilidad de GnRH, esto implica que la pulsatilidad de LH se encuentre inhibida (Yavas y Walton, 2000b). El olfato, la vista y el sonido son los principales sentidos por los que la madre identifica a su ternero, estos interfieren en la pulsatilidad de GnRH, generando una alteración en la frecuencia y amplitud de la LH desde centro tónico hipotalámico impidiendo la ovulación (Montiel y Ahuja, 2005).

Son muchas las estrategias que se han desarrollado para acelerar el reinicio de la actividad ovárica junto con el manejo sanitario y nutricional adecuado. El destete precoz y temporario con tablillas, asociado a tratamientos hormonales, resultó ser la medida más efectiva para acortar el período de parto al reinicio de la ciclicidad. Sin embargo, el uso de tratamientos hormonales únicamente, en condiciones de campo, no redujo este período (Pinheiro, 2009; De Castro, 2006; Mackey et al., 2000; Fanning et al., 1995).

Los tratamientos que se basan en el uso de progestágenos para realizar una IATF resultaron ser efectivos para reiniciar la ciclicidad en vacas que se encuentran en anestro posparto (Baruselli et al., 2004; Cutaia et al., 2003; Mackey et al., 2000; Bo et al., 1995; Fanning et al., 1995) y reducir pérdidas embrionarias (Diskin y Morris, 2008; Kerbler et al. 1997).

El efecto del tratamiento con progesterona previo a la inducción de la ovulación con GnRH o BE, demostró aumentar la cantidad de vacas que ovulan y de esta ovulación el cuerpo lúteo secretará mayores niveles de progesterona (Williams et al., 1982). El uso de progestágenos (priming) en vacas en anestro superficial, simula los niveles subluteales de progesterona en sangre que tienen las vacas luego de la primera ovulación posparto, con un ciclo estral más corto de lo habitual y sin demostración de celo (Yavas y Walton, 2000a). La incorporación de un progestágeno en el protocolo Ovsynch, colocado el día de la aplicación de la primera dosis de GnRH y retirándolo el día de la administración de PGF, aumentó la tasa de preñez en vacas lecheras en producción que se encontraban en anestro, por el contrario, en las vacas que se encontraban ciclando no hubo cambios en la tasa de preñez (Cavestany et al., 2003). También está asociado a un mayor nivel de estradiol circulante lo que facilitará la demostración de celo previo a la ovulación, generando CLs. de vida media dentro de los parámetros normales y con una mayor producción de progesterona en vacas en anestro con ternero al pie (Sheffel et al., 1982).

2.4. Pérdidas embrionarias, estrategias para la prevención

En vacas que han reiniciado su ciclo sexual y son inseminadas con semen de buena calidad la tasa de concepción es de 90% a 100%. Sin embargo, del 50% al 55% de éstas son reconocidas en útero con niveles suficientes de P4 para seguir adelante con la gestación (Diskin y Morris, 2008; Thatcher et al., 1995). La gran mayoría de las pérdidas embrionarias se dan durante las primeras tres semanas luego de la fecundación (Diskin y Morris, 2008). En vacas lecheras de alta producción, en la primera semana luego de la inseminación se da más del 50% de pérdidas embrionarias, mientras que en vaquillonas púberes y con buenas condiciones reproductivas al ser inseminadas la mayoría de las pérdidas embrionarias se dan entre los días 8 y 18 luego del celo (Sartori et al., 2010) más precisamente antes del día 14 (Dunne et al., 2000). El período crítico de supervivencia del embrión en bovinos es entre el día 15 y 17, momento en el que la acción del interferón-tau (IFN) producido por las células trofoblásticas del embrión impide la luteólisis con la consecuente reabsorción embrionaria (Binelli et al., 2001; Roche et al., 1981). Existe una correlación positiva entre la producción de P4 y la producción de IFN, por lo que es de entender que altas concentraciones de P4 durante la primera semana pos fecundación producirá cantidad suficiente de IFN y este último de P4 para prevenir una inminente luteólisis (Kerbler et al., 1997; Diskin et al., 2012).

Los niveles de P4 del ciclo anterior, en el momento en el que comienza la luteólisis está directamente relacionado con la vitalidad embrionaria, el efecto que produce niveles bajos de P4 podría ser una maduración prematura del ovocito, lo que altera un normal desarrollo del embrión (Diskin et al., 2012). Luego de la inseminación durante la fase luteal temprana y media, medida durante los días 5, 6 y 7 pos ovulación se encontró una relación positiva entre la supervivencia embrionaria y los niveles de P4 en vacas de carne y lecheras en producción (Diskin et al., 2006; Stronge et al., 2005), no solo está asociada la concentración de P4, también el atraso del aumento de P4, puede condicionar la retención embrionaria, el solo atrasar de 1 a 1,7 días se relaciona con el aumento de reabsorción embrionaria (Diskin et al., 2012; Mann y Lamming, 2001; Stronge et al., 2005), una mínima diferencia de 0,5 ng/ml de progesterona desde la ovulación hasta el día 4 pos ovulación influyen, positiva y directamente en la expresión de genes del endometrio para el grupo de proteínas RBP (Retinol Binding protein) relacionadas con la asimilación de nutrientes del concepto (McNeill et al., 2006). Es así que se han comenzado a diseñar distintas estrategias para aumentar los niveles de P4 en sangre durante los primeros días y semanas luego de la fecundación, esto reduciría las pérdidas embrionarias. La P4 puede ser suplementada de forma exógena por medio de dispositivos intravaginales (DIV) o podría ser endógena mediante la generación de CLs accesorios o mejorando el desarrollo de un CL de mejor calidad con una mayor producción de P4. La administración de P4 exógena resultó estar relacionada en forma po-

sitiva con la producción de IFN cuando es administrada durante los días 4 y 5 pos ovulación, por lo tanto, con una mayor retención embrionaria. Por el contrario, suplementar con P4 luego de este período no logró producir cambios significativos del IFN, lo que no traería beneficios en lo que respecta a la retención embrionaria (Mann et al., 1999). La suplementación con P4 exógena a partir del día 3 no afectó la supervivencia de los embriones ni aceleró el estadio embrionario pero aumentó la elongación del mismo entre los días 8 y 18 o sea luego de estar eclosionado, los mecanismos por los que la P4 induce el crecimiento embrionario está mediado por las secreciones endometriales, este aumento de P4 podría inducir cambios en la expresión de genes durante el clivaje temprano del embrión manifestándose más tarde en la elongación (Carter et al., 2008), sin embargo en otro experimento de suplementación de P4 en el que se midió tasa de preñez/inseminación en ganado lechero en producción la misma disminuyó dicha tasa (Parr et al., 2014).

La utilización de gonadotrofina coriónica humana (hCG), en un protocolo Ovsynch modificado en vacas lecheras en producción y en vacas de carne con ternero al pie el día 5 y 7 respectivamente, luego de la IATF, con la inserción de un DIV, produjo la ovulación del folículo dominante y desarrollo de CLs accesorios en más del 90% de las vacas tratadas. Así aumentó en forma significativa la concentración de P4 endógena en sangre debido a la hiperplasia y/o hipertrofia de CLs accesorios producidos (Nascimento et al., 2013; Dahlen et al., 2013). El uso de la hCG también fue comparado con la administración de GnRH, en protocolos con progestágenos tanto la hCG como la GnRH resultaron efectivas en la formación de CLs accesorios, pero solo las tratadas con hCG lograron aumentar la progesterona y las tasas de preñez (Stevenson et al., 2007; Stevenson et al., 2008). Por otro lado, el uso de la GnRH fue evaluada en los días 5 y/o 15 días pos inseminación con el fin de aumentar la tasa de preñez y resultó ser negativa en cualquiera de los días por separado o en ambos (Bartolomé et al., 2005).

En vacas multíparas de carne se encontró una marcada relación positiva entre el diámetro del folículo preovulatorio con la cantidad de P4 en sangre, el aumento de la misma y la tasa de preñez cuando la ovulación es inducida para una IATF, no encontrándose dicha relación en caso de que la ovulación sea espontánea, sugiriendo que la supervivencia del embrión requiere de un ovocito competitivo y maduro para sobrellevar una gestación (Perry et al., 2005). En otro estudio en vaquillonas de carne en el que se comparó el porcentaje de preñez con el diámetro folicular, la cantidad de E2 en sangre previo a la ovulación y la demostración de celos también resultó en tener una relación positiva para folículos entre 10,7 mm y 15,7 mm, la inducción de la ovulación de folículos con diámetros menores a 10,7 mm resultó en menos E2 en sangre, menor demostración de celo y menores índices de preñez. La alta concentración de E2 en el momento de la inseminación está asociada a altos porcentajes de

preñez por crear un ambiente uterino propicio para el semen y su transporte en el tracto reproductivo (Perry et al., 2007; Sá Filho et al., 2010) así como bajos niveles de E2 provenientes de folículos de menor tamaño están asociados a una luteólisis prematura de la fase luteal subsiguiente por la menor inhibición de receptores de oxitocina en el útero (Mann y Lamming, 2000) y a un CL de menor tamaño, menos concentración de P4 en sangre y menor porcentaje de preñez (Vasconcelos et al., 2001). El diámetro del CI generado de un folículo de mayor diámetro también tendrá un área mayor, secretará más cantidad de progesterona y ésta aumentará con mayor velocidad, aumentando el porcentaje de preñez (Baruselli et al., 2003). Una de las estrategias que se pueden implementar para esto es prolongar el proestro, el período de tiempo que se espera en los protocolos más usados desde el retiro del dispositivo a la IATF en vacas es de 52-56 horas y vaquillonas de 48 a 56 horas, en protocolos que buscan prolongar el proestro, el período de tiempo desde el retiro del dispositivo a la IATF es de 60 a 72 horas. Esto resultó en una tasa mayor de preñez y mayor concentración de progesterona en vaquillonas con una condición corporal adecuada, mientras que en vaquillonas con condición corporal por debajo de lo deseado estos resultados fueron menores. Mientras la condición corporal fue buena el crecimiento folicular tendió a ser mayor, los cuerpos lúteos fueron mayores y la progesterona durante los 12 días subsiguientes fue mayor cuando prolongamos el período de proestro (de la Mata, 2016). Estos tratamientos, cuando se los asoció a la aplicación de gonadotropina coriónica equina (eCG), aumentaron ya sea la tasa de preñez, porcentaje de ovulación y progesterona en sangre en todos los grupos, produciendo un efecto más marcado en categorías como vacas en anestro posparto y vaquillonas confirmando el efecto positivo de ésta sobre el desarrollo folicular (Bo et al., 2016; Cutaia et al., 2003; Menchaca et al., 2013).

El uso de la eCG demostró ser eficiente para promover el desarrollo folicular y luteal por su efecto liberador de FSH y LH (Murphy y Martinuk, 1991). Distintos protocolos de inseminación artificial a tiempo fijo en distintas categorías y sincronización de receptoras en programas de transferencia embrionaria la tienen incorporada por mejorar sustancialmente las tasas de fertilidad (Menchaca et al., 2013; Núñez et al. 2012; Duffy et al. 2004; Yavas y Walton 2000a; Viñoles et al., 1999).

2.5 La gonadotropina coriónica equina eCG

La eCG, denominada en sus orígenes PMSG (Gonadotropina sérica de yegua preñada), fue descrita por Cole y Hart y detectada casi simultáneamente por Zandec en 1936 (De Rensis y Lopez-Gatius, 2014). Es una de las hormonas reproductivas encargada de mantener la preñez en la yegua y es producida por las copas endometriales entre los 40 y los 140 días de gestación (Allen et al., 1973). Es una glicoproteína ácida compleja de alto peso molecular (72000

Dalton) compuesta por dos subunidades, la alfa con 96 aminoácidos y la beta con 149 aminoácidos, esta última es idéntica a la LH (Guillon y Combarous, 1983; Bousfield et al., 2001). Es una molécula que por su peso molecular y su contenido de ácido siálico, sobretodo en la subunidad beta, tiene una vida media larga ya que su eliminación vía hepática y renal es lenta, 26 horas en la yegua, más que la LH y FSH (Cole et al., 1967). La FSH producida por la adenohipófisis durante la preñez temprana de la yegua, continúa desarrollando folículos en forma de ondas, como si continuaran los ciclos estrales en plena temporada reproductiva, los folículos más desarrollados ovularán o serán luteinizados por la acción de tipo LH ejercida por la eCG (Urwin y Allen, 1982; Antczak et al. 2012). Estos nuevos CLs llamados accesorios aumentan la cantidad de progesterona en sangre y duran casi hasta la mitad de la gestación, evento necesario para mantener la preñez en dicha especie (Stewart y Allen, 1981).

Cuando se la aplica en rumiantes tiene un efecto de liberación de FSH y LH por presentar afinidad con los receptores de la granulosa y teca interna del folículo, (Cole et al., 1967; Stewart y Allen, 1981) por lo que puede ser usada en programas de IA, IATF o de superovulación cumpliendo la función de promotor de desarrollo folicular o de inducción de la ovulación que puede ser simple o producir múltiples ovulaciones, según la dosis aplicada será el efecto provocado (Murphy y Martinuk, 1991). La característica de tener una larga vida media en equinos también la mantiene en rumiantes, luego de la aplicar 1500 UI llega a su máxima concentración a las 24 horas descendiendo lentamente logrando ser detectada hasta 10 días después luego de ser inyectada (Menzer y Schams, 1979), obteniendo una vida media de 121 horas (Schams et al., 1978). Es aceptado que para inducir la ovulación se necesita aplicar un rango de dosis entre 200 UI y 1200 UI y para provocar múltiples ovulaciones se debe pasar las 2500 UI por lo menos (Bellows y Short, 1972). En los programas de IATF es recomendada para aumentar las tasas de preñez en vaquillonas con 300 UI y vacas con cría al pie con 400 UI por ser categorías que presentan dificultades de respuesta frente a distintos estímulos hormonales (Menchaca et al., 2005; Menchaca et al., 2006) al igual que vacas múltiparas con baja condición corporal y con falta de demostración de celo (Cutaia et al., 2003; Baruselli et al., 2004; Bo et al., 2016). Sin embargo, el uso de eCG no demostró provocar diferencias favorables en los parámetros antes mencionados, en vacas con ciclos sexuales regulares y con buena condición corporal (Souza et al., 2009), se considera que en vacas cíclicas y con buena condición corporal el uso de eCG podría producir ovulaciones múltiples si en el momento de aplicarla no existe la dominancia de ningún folículo (Duffy et al., 2004). Se estudiaron los efectos de la eCG a distintas dosis; en vacas lecheras en producción se buscó incrementar la tasa de preñez aumentando de 400 UI a 600 UI pero no se obtuvo ninguna diferencia (Ferreira et al., 2013). En vacas de carne con ternero al pie se encontró que el uso de 300 UI o 400 UI fue igual de eficiente, mejorando la

tasa de preñez sin mostrar diferencias significativas entre ambas dosis (Pessoa et al., 2016).

En los protocolos utilizados de IATF la eCG se usa en el momento del retiro del dispositivo de P4, a los 7 u 8 días de comenzado el tratamiento y con lo que se logra obtener folículos preovulatorios de mayor diámetro, lo que aumenta el porcentaje de ovulación, mejora el desarrollo de CL, produciendo más cantidad de P4, aumentando la tasa de preñez (Bo et al., 2016; Núñez et al., 2014; Bryan et al., 2009; Baruselli et al., 2004). Dos días después de la aplicación de eCG fue que se observó el mayor crecimiento de diámetro folicular resultando en un mayor diámetro de folículo preovulatorio y tasa de ovulación (Sá Filho, 2010). En un estudio realizado con dosis múltiples de eCG aplicada en distintos momentos con el objetivo de obtener ovulaciones dobles en búsqueda de mellizos, se concluyó la importancia del momento en la cual se aplica la misma. Al aplicar 800 UI de eCG antes del desvío folicular o sea tres días después de la aplicación del progestágeno con la inducción de una nueva onda folicular y tres días antes de la aplicación de PGF y del retiro del dispositivo de P4, se obtuvo un 30% más de preñeces dobles y un 15% más de preñez en general, correlacionado con una mayor cantidad de progesterona en sangre (Martinez et al., 2014).

Trabajos relacionados con la transferencia de embriones a tiempo fijo (TETF) buscaron obtener una respuesta a la eCG aplicada a dosis de 600 UI y 800 UI el día 2 del inicio de un protocolo de sincronización en receptoras para obtener más cantidad de CLs, por lo tanto más cantidad de P4; pero estos no dieron diferencias significativas en lo que respecta a los porcentajes de preñez, la diferencia se dio en los volúmenes de CL y concentración de progesterona entre los días 7 y 14 (Kenyon et al., 2012). Una de las características deseables de las receptoras es que al momento de la transferencia del embrión presenten cantidad de P4 suficiente como para llevar a término una gestación, para esto se usa eCG en distintos protocolos de sincronización, estudios realizados demostraron que en vaquillonas cruza Bos Índicus, el aplicar la eCG el día 5 de inicio de un protocolo de 8 días, o sea tres días antes del tradicional momento que en el retiro del dispositivo intravaginal con P4, aumenta la cantidad de CL y de P4 en sangre y obtuvieron una tendencia a aumentar los porcentajes de retención embrionaria (Nasser et al., 2004).

Estudios recientes en vacas con 40 a 60 días posparto con protocolos de IATF basados en el uso de 8 días de DIV con P4 y E2, propusieron comparar los efectos de administrar la eCG el día 8 de retiro del dispositivo, el día 6 o no aplicarla. Los resultados fueron que administrarla el día 6 aumenta el diámetro del folículo preovulatorio dando un CL de mayor volumen y más concentración de P4 en sangre en el día 10 postovulación comparada con darla el día del retiro del DIV, a pesar de esta diferencia en este estudio no hubo cambios entre dar eCG el día del retiro del DIV o no darla (grupo control) en diámetro folicular, área de CL ni tasa de preñez (Tortorella et al., 2013), no concordando con trabajos anteriormente mencionados para esta categoría de vacas (Cutaia et al., 2003; Baruselli et al., 2004; Bo et al., 2016) .

Tanto las dosis como el momento en el que se debe aplicar la eCG en protocolos de IATF en ganado de carne es motivo de estudio en distintas categorías, nuestro equipo demostró que en vacas con ternero al pie, en un protocolo de IATF de 7 días, a base de progestágeno y BE, dar la eCG el día 5 del inicio, o sea dos días antes del retiro del progestágeno aumentó el porcentaje de vacas que ovulan y el diámetro del folículo preovulatorio en vacas con ternero al pie entre 60 y 90 días de paridas (Cavestany et al., 2012).

3. Hipótesis

La administración de eCG en vacas de carne con ternero al pie, 2 días antes del retiro del progestágeno vs. el mismo día promueve un folículo preovulatorio de mayor diámetro, genera un cuerpo lúteo de más volumen que produce más progesterona aumentando la retención embrionaria y por ende la fertilidad del tratamiento de IATF.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar, en vacas de carne en anestro con cría al pie, la respuesta a la administración de eCG en dos momentos utilizando un protocolo de IATF con P4 y BE al inicio del tratamiento e inducción de la ovulación con GnRH.

4.2. Objetivos específicos

Determinar si la aplicación de eCG en distintos momentos de un protocolo convencional de IATF produce diferencias en:

1. El crecimiento folicular, diámetro de los folículos preovulatorios, tasa y dispersión ovulatoria y volumen de CL.
2. La concentración de E2 en sangre en fase folicular y P4 en fase luteal.
3. El porcentaje de preñez y de detección de celos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Diseño experimental

Para cumplir con los objetivos planteados se realizaron dos experimentos. El Experimento 1 consistió en un ensayo controlado realizado en una estación experimental donde se tomaron muestras de sangre para la determinación de la concentración de E2 y P4, se estudió la dinámica folicular, la evolución de volumen del CL y se realizó detección de celos dos veces por día durante una hora en la tarde y una hora en la mañana 24 horas luego del retiro del DIV. En el Experimento 2 se comparó la tasa de concepción obtenida con los mismos protocolos utilizando un mayor número de animales de dos establecimientos comerciales.

5.2. Experimento 1

Animales y Manejo

El trabajo se realizó en el campo experimental “La Magnolia” de INIA Tacuarembó. Se utilizaron 22 vacas Braford con terneros al pie de 60 a 90 días de edad, la condición corporal (CC) de las madres al momento del inicio del tratamiento fue de $3,46 \pm 0,43$ en una escala del 1 al 8, siendo el 1 un animal en estado de emaciación y 8 un estado de obesidad (Méndez et al., 1988). Las vacas se encontraban en anestro superficial posparto diagnosticado por medio de dos ecografías de ovarios vía rectal (ESAOTE MyLab, Dietrich; Holanda, con un transductor de 10 MHz en modo B) con intervalo de 10 días. Se consideró en anestro superficial a las vacas que no presentaron CL en ninguno de los ovarios en ambas oportunidades con folículos ≥ 6 mm. Los grupos (n=11 para cada tratamiento) se formaron considerando los días posparto y la CC. Diariamente al comenzar con el muestreo, a los terneros se les colocó tablilla nasal y fue removida el último día de la toma de muestras. Ambos grupos eran llevados a las mangas por las mañanas y poco antes de comenzar con el muestreo se separaban los terneros llevándolos a un corral a parte donde se iban soltando a las madres luego de trabajar con cada una.

Grupo T5 experimental:

Día 0: Se administró 2mg vía intramuscular de benzoato de estradiol (BE, Benzoato de estradiol zoovet, Zoovet, Santa Fe, Argentina) y se colocó un dispositivo intravaginal (DIV) impregnado con 750 mg de progesterona (Pro-ciclar p4 Zoovet, Santa Fe, Argentina).

Día 5: Se administró 400 UI intramuscular de gonadotrofina coriónica equina (eCG, Biogón Plus, Biogénesis Bagó, Buenos Aires, Argentina).

Día 7: Se retiró el DIV y se administró 0,150 mg vía intramuscular un análogo de PGF, D-Cloprostenol (PG, Ciclar Zoovet, Santa Fe, Argentina).

Día 9: Se administró 8 µg intramuscular de un análogo sintético de GnRH, Acetato de Buserelina (GnRH, Progerelin, Nanokem, Montevideo, Uruguay).

Grupo T7 testigo:

Día 0: Igual que el grupo T5 experimental

Día 7: Se retiró el DIV y se administró eCG y PG con las mismas dosis, vías y origen de drogas que en grupo T5.

Día 9: Se administró 8 µg intramuscular de un análogo sintético de GnRH, Acetato de Buserelina (GnRH, Progerelin, Nanokem, Montevideo, Uruguay).

5.3. Experimento 2:

Éste experimento consistió en el estudio de la tasa de concepción y se realizó con 676 vacas cruce Braford en dos establecimientos comerciales, Santa Ema (km 178 Ruta 26, Salto, Uruguay) y Sarandy (km 395 Ruta 26, Cerro Largo, Uruguay). El número de animales asignados a cada tratamiento 263 413 para T5 y T7 respectivamente. En Santa Ema se trabajó con 175 animales (T5=68 y T7=107), en Sarandy se trabajó con 501 animales (T5=195 y T7=306), se realizaron los mismos tratamientos y con las mismas dosis que en el experimento 1, con la diferencia que en este experimento se llevó a cabo la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) 16 horas luego de la administración de GnRH como se muestra en las figuras 1 y 2. La inseminación fue realizada por el mismo inseminador de cada establecimiento, con semen de los 5 mismos toros en cada establecimiento de fertilidad probada. El diagnóstico de gestación se realizó 30 días después del día de la inseminación por medio de una ultrasonografía transrectal.

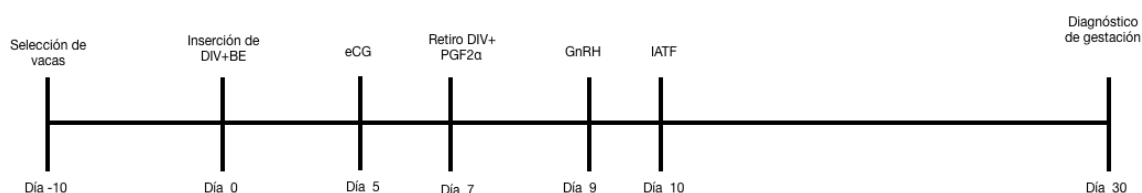


Figura 1: Línea de tiempo y cronograma de tratamientos y actividades para grupo T5

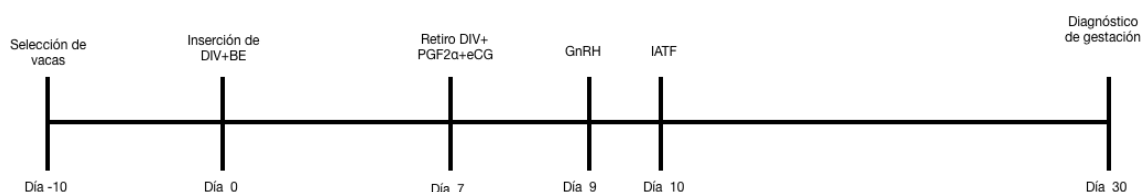


Figura 2: Línea de tiempo y cronograma de tratamientos y actividades para grupo T7

5.4. Ultrasonografía:

Para la ultrasonografía en el experimento 1 se utilizó un equipo con alta resolución ESAOTE MyLab con un transductor de 10 MHz en modo B. El examen fue realizado vía transrectal y las vacas fueron inmovilizadas en un cepo. Diez días antes de comenzar los tratamientos se seleccionaron vacas que no presentaban ninguna anomalía del tracto reproductivo y sin presencia de CL en sus ovarios. El día de comenzar el tratamiento se realizó una segunda ecografía con el fin de descartar a las vacas que presentaran CL. Desde el día 5 de colocados los DIV, para ambos grupos comenzaron los estudios de dinámica folicular; para esto se midieron todos los folículos mayores de 4 mm de diámetro en ambos ovarios cada 24 hs. Los registros se llevaban en planillas individuales por vaca, con un dibujo de los ovarios para luego reconocer la posición de las estructuras medidas en ambos, luego de detectar el folículo dominante se lo siguió hasta la ovulación, la que fue definida por la desaparición del folículo preovulatorio.

Luego del diagnóstico de la ovulación se siguió realizando los estudios ecográficos de la fase luteal cada 24 h hasta el día 14 postovulación. Se tomaron las medidas del diámetro mayor y diámetro menor del CL, con estas dos medidas se realiza un promedio para luego poder calcular el volumen del mismo. Los CL cavitarios fueron medidos de la misma forma, se midió el volumen de la cavidad para luego restarle el mismo al volumen total medido anteriormente y obtener el volumen del tejido luteal. La fórmula utilizada fue: $\frac{4}{3} \pi r^3$ (Sartori et al., 2002).

Para el experimento 2 se utilizó los mismos criterios que para el experimento 1. Las vacas fueron seleccionadas 10 días antes de empezar los tratamientos por ecografía del tracto reproductivo y luego se realizó una segunda ecografía al día 0 del protocolo de sincronización. A los 30 días luego de la IATF se hizo una última ecografía para el diagnóstico de preñez. El mismo fue realizado con un equipo Aloka 500 con una sonda lineal de 5MHz. El diagnóstico positivo a la preñez fue realizado por la detección de una vesícula embrionaria en el útero.

5.5. Determinación hormonal:

Las muestras de sangre fueron obtenidas de la vena yugular con el sistema de Vacutainer (PrecisionGlide, Becton Dickinson, NJ, Estados Unidos) con agujas 21G. Las muestras de sangre fueron tomadas cada 24 hs en el mismo momento en el cual se realizaba el examen de ultrasonografía con los animales en el cepo. Inmediatamente luego de haber sido tomadas las muestras de sangre las mismas fueron centrifugadas a 3000 RPM durante 20 minutos con el fin de extraer el suero para luego congelarlo a -20°C. La medición de hormonas fue realizada por radioinmunoanálisis (RIA) en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República.

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

El estradiol fue analizado con un Kit comercial (MP Biomedicals, LLC Diagnostics Division, OH, Estados Unidos). La sensibilidad del ensayo fue de 4,24 pg/mL. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. El coeficiente de variación para el control utilizado (10,0 pg/mL) fue de 19,8%.

64%

5.6. Análisis estadístico:

Para las variables continuas, crecimiento y diámetro folicular, volumen de CL, concentración de P4 y E2 se utilizó el método de Modelos Mixtos del SAS (Statistical Analysis System Institute Inc., Cary, NC, USA, 2008).

Para los resultados de preñez fueron analizados por medio de regresión logística, considerando efecto de tratamiento el establecimiento y su interacción.

La tasa y dispersión ovulatoria se analizó con el test exacto de Fisher tomando en cuenta la ovulación hasta las 16 y luego de las 16 horas (Prism 5.00, GraphPad Software, Inc., 2007).

Los resultados se expresan como medias \pm el correspondiente error estándar y las variables categóricas en porcentaje (%). Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de $P < 0,05$, cuando el valor $P > 0,05$ y $P < 0,1$ se consideró que existió una tendencia.

6. RESULTADOS

6.1. Experimento 1:

OVULACIÓN y CELOS

Todas las vacas de este experimento ovularon y ninguna presentó ovulaciones múltiples. Todas (100%) las vacas del grupo T5 ovularon el mismo día, antes de que se cumplieran las 16 h. desde la aplicación de la GnRH. En el grupo T7, 7 (64%) ovularon antes de las 16 h. de la aplicación de la GnRH, 3 (27%) antes de las 24 h y 1 (9%) a las 48 h ($P= 0,09$), como se muestra en la figura 3. La distribución de la ovulación se muestra en la figura 4.

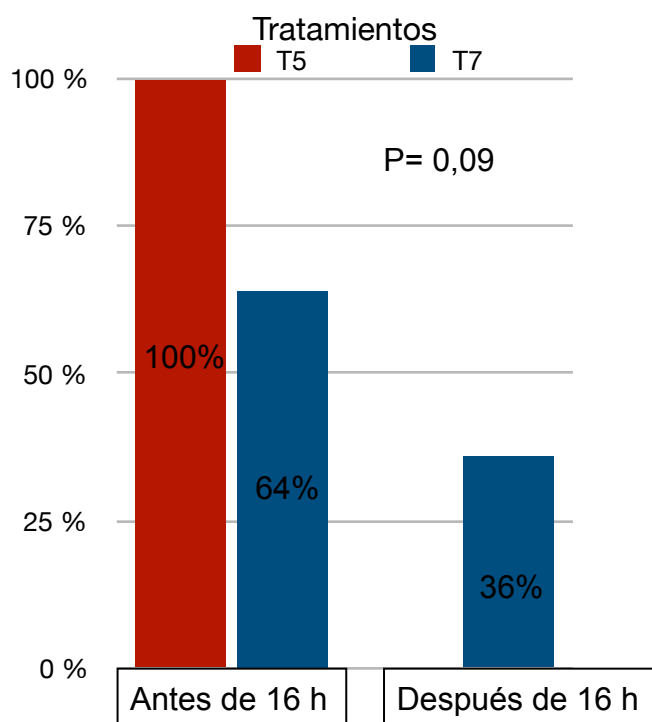


Figura 3: Porcentaje de vacas de carne en anestro superficial con ternero al pie que Ovularon antes y después de las 16 h de la aplicación de GnRH ($h=0$) para los grupos T5 y T7

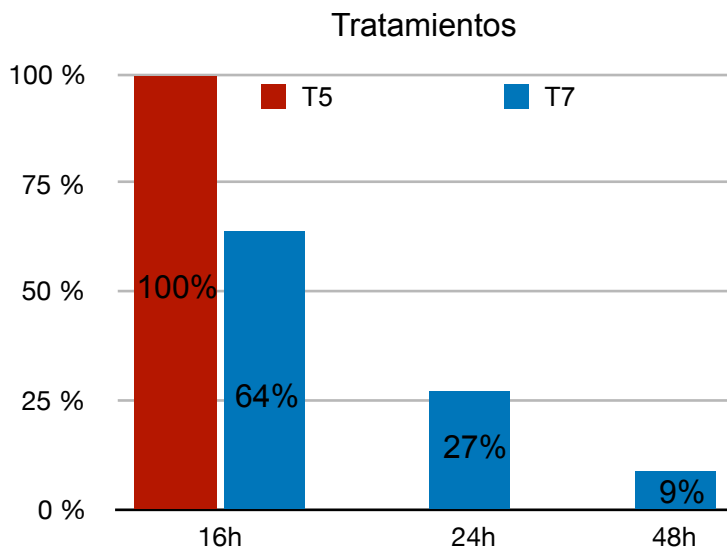


Figura 4: Distribución de la ovulación desde la aplicación de GnRH (h=0) en vacas de carne en anestro superficial con ternero al pie para los grupos T5 y T7

En el grupo T5 5 vacas mostraron celo y 6 no mostraron celo. El grupo T7 se comportó igual que el T5, 5 vacas mostraron celo y 6 no mostraron celo.

CRECIMIENTO FOLICULAR

El crecimiento folicular desde el día 5 hasta el día de diagnosticada la ovulación no presentó diferencias significativas entre ambos grupos. El desarrollo de los folículos dominantes de ambos grupos se muestra en la figura 5.

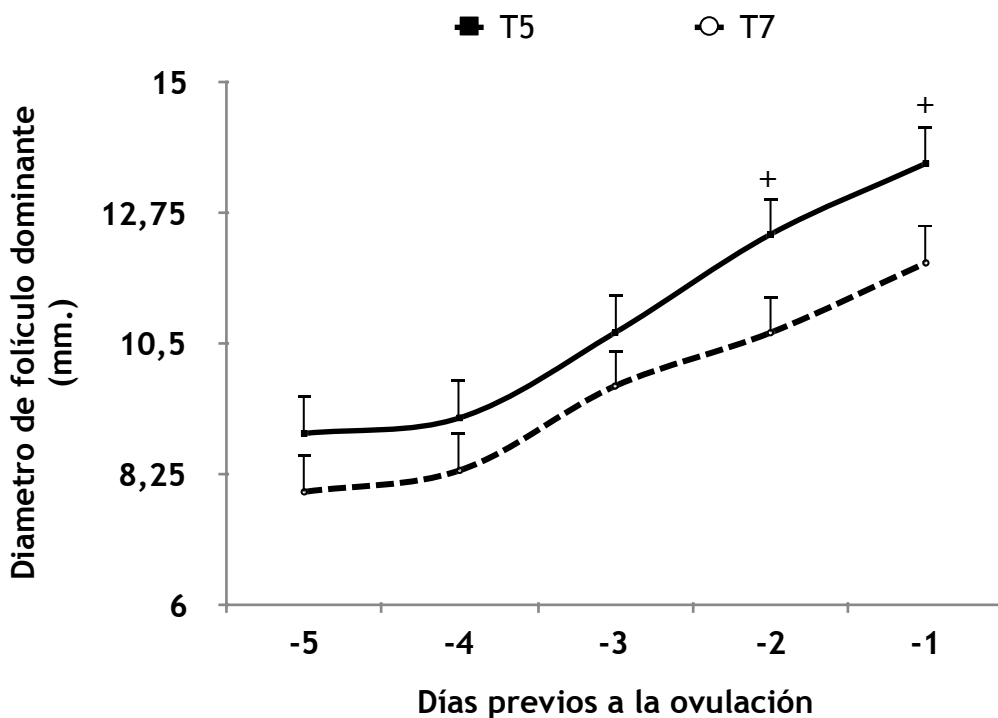


Figura 5: Diámetro folicular los 5 días previos a la ovulación en vacas de carne en anestro superficial con ternero al pie para los grupos T5 y T7, las cruces indican tendencia estadística (día -2 P=0,07 y -1 P=0,06).

DIÁMETRO DE FOLÍCULO PREEVULATORIO

El diámetro de folículo preovulatorio los días -2 y -1 del comienzo del tratamiento presentó una tendencia ($P=0,07$ y $P=0,06$ respectivamente) a ser mayor en el grupo T5 comparado con el grupo T7 ambos días. Los datos se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: Diámetro folicular los días -2 y -1 en vacas de carne en anestro superficial con ternero al pie para los grupos y T5 y T7

Diámetro	T5	T7	P
FD día -2	12,4±0,6mm	10,7±0,6mm	0,07
FD día -1	13,6±0,6mm	11,9±0,6mm	0,06

FD: Folículo Dominante

CONCENTRACIÓN DE ESTRÓGENOS EN SANGRE

Los niveles de estrógenos en sangre al día 8 del inicio del tratamiento no mostraron diferencias significativas entre grupos. Al día 9 de inicio del tratamiento los niveles de estrógenos en sangre mostraron una tendencia a ser menores para el grupo T5 comparado con el grupo T7, el detalle de los datos se resume en la tabla 2.

Tabla 2: Niveles de estradiol en sangre los días los días -2 y -1 en vacas de carne en anestro superficial con ternero al pie para los grupos T5 y T7

Parámetro	T5	T7	P
Estradiol día -2	8,1±0,7pg/ml	8,0±0,7pg/ml	0,89
Estradiol día -1	6,7±0,7pg/ml	8,7±0,7pg/ml	0,06

VOLUMEN DE CUERPO LÚTEO

El volumen de cuerpo lúteo no presentó diferencias significativas entre grupos desde la ovulación hasta el día 14; sin embargo, el día 7 luego de la ovulación mostró una tendencia a ser mayor en el grupo T5 comparado con el grupo T7 ($P=0,07$). La evolución del volumen de cuerpo lúteo desde el día de la ovulación hasta el día 14 se muestra en la figura 6.

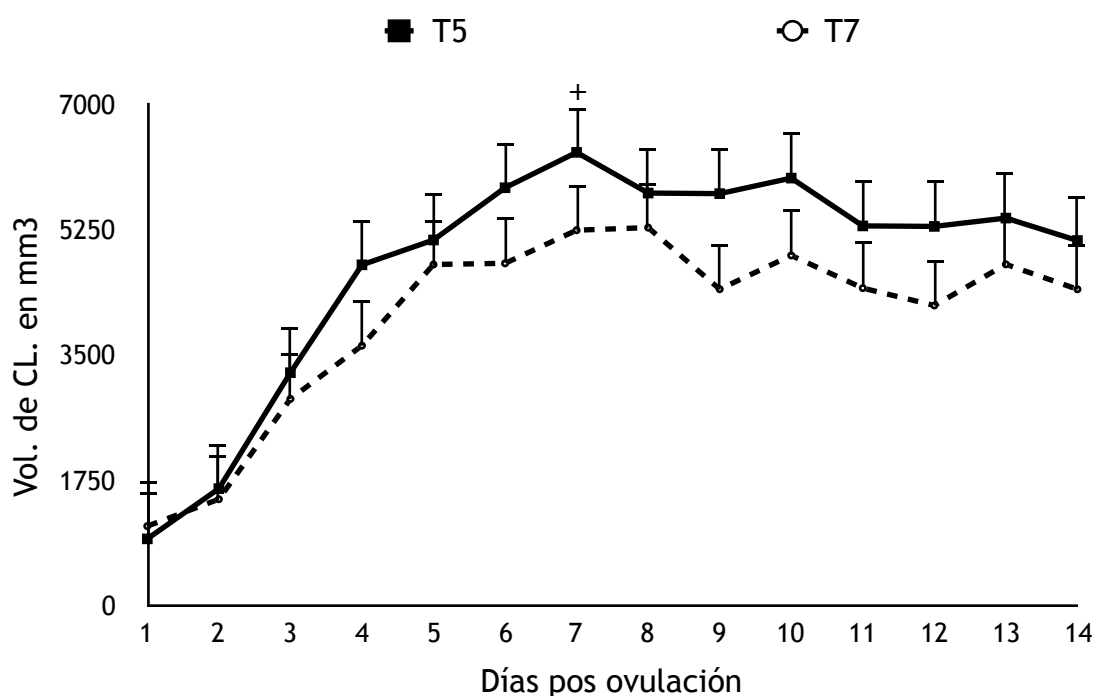


Figura 6: Volumen de cuerpo lúteo desde la ovulación hasta el día 14 postovulación en vacas de carne con ternero al pie para los grupos T5 y T7, la cruz indica tendencia estadística, ($P=0,07$).

CONCENTRACIÓN DE PROGESTERONA EN SANGRE EN FASE LUTEAL

Los niveles de progesterona en sangre se mantuvieron sin diferencias significativas hasta el día 8. En el día 9 luego de la ovulación, la progesterona del grupo T5 (3.59 ± 0.38 ng/mL) fue mayor que la del grupo T7 (2.53 ± 0.35 ng/mL) ($P=0,04$). La evolución de progesterona se muestra en la figura 7.

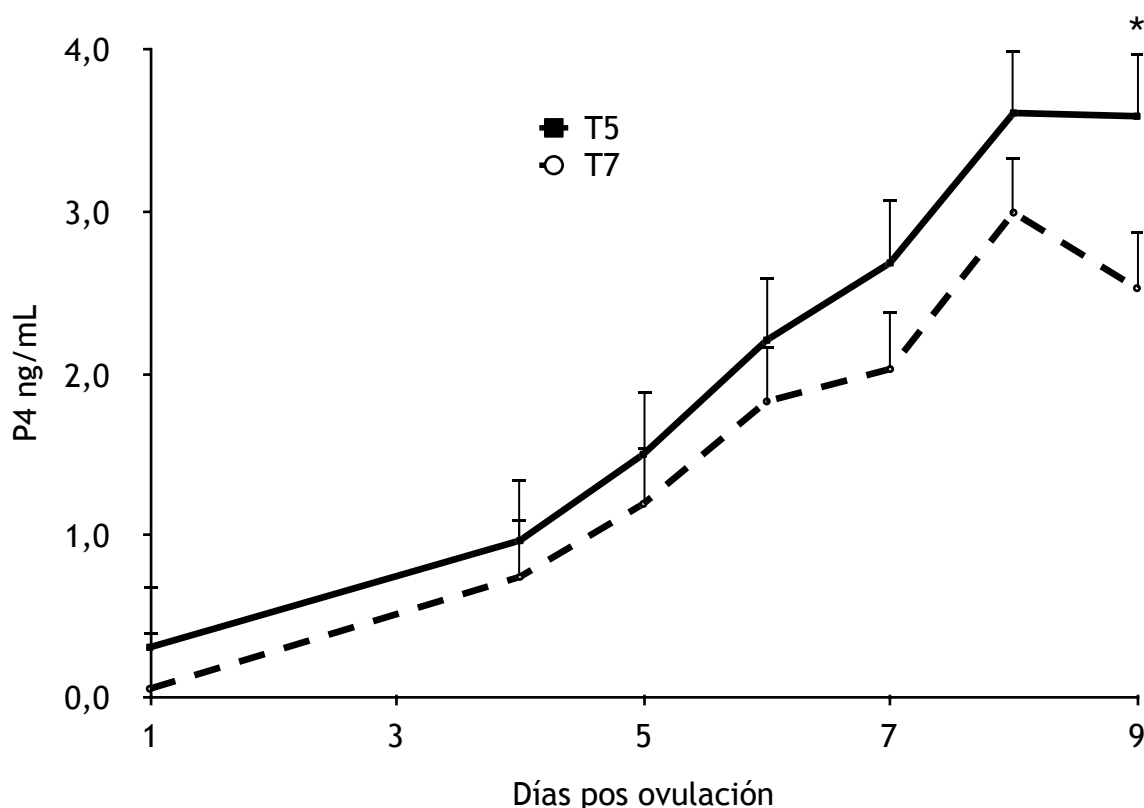


Figura 7: Niveles de P4 en sangre desde la ovulación hasta el día 9 postovulación en vacas de carne con ternero al pie para los grupos T5 y T7, el asterisco indica diferencia significativa ($P=0,04$).

6.2. Experimento 2:

A los 30 días pos IA 190 vacas de las 263 del grupo T5 fueron diagnosticadas preñadas y 73 vacías, lo que corresponde a un 72,2% de preñez. En el grupo T7 252 vacas de 413 del grupo fueron diagnosticadas preñadas y 161 vacías lo que corresponde a un 61,0% de preñez. La tasa de preñez del grupo T5 fue mayor que la del grupo T7 ($P=0,04$). El análisis de los tratamientos entre los predios no mostró interacción ($P=0,54$) por lo que se utilizó el número total de animal de ambos predios.

7. DISCUSIÓN:

7.1. Experimento 1:

Ovulación y celos

Todas las vacas del experimento 1 ovularon, lo que coincide con estudios anteriores (Cutaia et al., 2013) sobre la acción de la eCG en esta categoría de vacas sobre el desarrollo del folículo seleccionado. El rápido efecto de la GnRH produce un pico de LH más preciso en el tiempo que el benzoato de estradiol (Cavestany et al, 2002) con la característica necesaria de llegar a dar un pulso ascendente por hora para concretar la ovulación de un folículo dominante en fase de crecimiento o estática temprana (Crowe, 2008). Este resultado coincide con otros estudios en los que se compararon distintos protocolos con la aplicación de eCG en los que se logra el 100% de ovulaciones incluyendo vacas que se encuentren en anestro posparto (Duffy et al., 2004). Esto se debe al efecto de estímulo de crecimiento folicular, así como la efectividad de los tratamientos basados en el uso de progestágenos y BE el primer día del tratamiento para reinicio de la ciclicidad con desarrollo de CLs vida media normal para vacas ciclando (Fike et al., 1997).

Trabajos realizados por Gutiérrez-Añez et al. (2009) comparan tasa ovulatoria, momento de la ovulación, diámetro folicular y área luteal aplicando una dosis de eCG de 200UI o 400UI; no hubo diferencias entre dosis en el momento de la ovulación, diámetro folicular o área luteal. Por otro lado, con la dosis de 400UI obtuvieron más del 95% de ovulaciones mientras que con una dosis de 200UI no pasaron el 75%; estos datos se asemejan a los obtenidos en nuestro trabajo ya que la dosis utilizada fue de 400UI y todas las vacas ovularon.

En el presente ensayo, se observó un adelantamiento y mayor sincronía de la ovulación para las vacas del grupo T5 ya que las 11 ovularon antes de que se cumplieran las 16 horas de ser aplicada la GnRH, en el grupo T7 la sincronía tendió a ser menor ya que 7 vacas ovularon antes de las 16 h, 3 antes de las 24 h y una vaca antes de las 48 h, datos que ratifican los resultados obtenidos por nuestro equipo de trabajo en la misma categoría de vacas (Cavestany et al., 2012). Éste es un rango a tener en cuenta ya que el objetivo de la implantación de estos tratamientos es permitir la realización de una IATF y cuánto más sincronizada sea la ovulación con la hora de inseminar mejor serán las tasas de preñez. Pursley et al. (1995) reportaron que luego de la administración de GnRH en vacas Holando con presencia de un folículo dominante en crecimiento la ovulación se da entre 24 y 32 h y que a medida que atrasamos el momento de inseminar luego de la ovulación los índices de preñez disminuyen, por lo que con estos resultados podría considerarse el disminuir el período de tiempo entre la administración de GnRH y la IATF. Lussier et al. (2017) identificaron en vacas adultas ciclando 61 genes involucrados en la regulación de la

ovulación y luteinización de células de la teca interna y de la granulosa durante el período en el que el folículo dominante adquiere capacidad ovulatoria, y todos ellos aumentan su expresión en las células de la granulosa mediante el uso de hCG. La eCG podría estimular a el folículo luego del desvío folicular durante dos días más que en el grupo control, lo que podría adelantar su capacidad ovulatoria mejorando, la vascularización del folículo dominante necesaria para la maduración final del ovocito (Acosta, 2007), y la sensibilidad ante el estímulo de la LH a la ovulación. De hecho, la capacidad ovulatoria se consigue luego del aumento diferencial del diámetro folicular (Sartori et al., 2001), cuando se duplican los receptores de LH en células de la granulosa (Bao et al., 1997), los de la teca interna se cuatuplican (Xu et al., 1995) y la eCG podría tener un papel protagónico en esta instancia. El folículo necesita aumentar de diámetro rápidamente bajo la influencia de LH pero esta no es la única limitante para adquirir capacidad ovulatoria (Sartori et al., 2001).

No se registraron ovulaciones múltiples como en otros estudios en los que cambiando el día de aplicación o la dosis de eCG se logra obtener ovulaciones dobles con el fin de generar más tejido luteal con la consecuente mayor producción de progesterona para receptoras en programas de transferencia embrionaria o con el fin de producir mellizos (Duffy et al., 2004; Nasser et al., 2004; Kenyon et al., 2012; Martínez et al., 2014). En Nueva Zelanda en vacas de carne se está comenzando a promover el aumento de nacimientos de mellizos en IATF con ovulaciones dobles, intentando lograr el fenómeno de codominancia mediante el uso de eCG y no pasando de tres ovulaciones por los perjuicios que podría traer a la hora de parto y cría, por lo tanto, conocer la dosis y momento de aplicar la eCG es básico (Martínez et al., 2014). En 5 experimentos realizados por Martínez et al. (2014), utilizando en ganado de carne IATF y un protocolo Ovsynch modificado se compararon dosis de eCG que van desde 300UI a 1000UI y el momento de aplicar la PGF, a los dos y tres días de la primera GnRH agregando un progestágeno y reduciendo el protocolo a 6 días entre primera GnRH y PGF. Estos autores obtuvieron 30% de ovulaciones dobles y 20% de gestaciones dobles aplicando 800UI de eCG el día 3 luego de la primera GnRH con progestágenos para evitar que se adelanten las ovulaciones. El fin de dicha propuesta fue que la dosis de eCG es aplicada cuando la emergencia de la nueva onda folicular está bien definida pero antes de que se produzca el desvío folicular. De esta forma se genera el fenómeno de codominancia de los dos folículos de mayor tamaño y se prolonga el efecto adicional de FSH y LH estimulado por la larga vida media de la eCG. En el presente ensayo al aplicar 400 UI 5 días después de la inducción de la onda folicular ya tendríamos un folículo ejerciendo dominancia sobre el resto de los subordinados por lo que sería difícil generar el fenómeno de codominancia con la posterior preñez de mellizos.

Por otro lado, Kenyon et al. (2012) reportaron en ganado lechero en el que se mide tasa de preñez, volumen de tejido luteal y P4 aplicando 600UI u 800UI de eCG el día 2 del comienzo de un protocolo de transferencia embrionaria a tiempo fijo (Ovsynch) a receptoras, con el fin de obtener ovulaciones múltiples, los resultados no fueron favorables en cuanto a tasa de preñez, ovulaciones múltiples y P4. En este caso aumentaron los volúmenes de los CLs el día 7 luego de la inducción de la ovulación, los autores discuten si aplicar la eCG tan temprano del comienzo de algunos tratamientos no interferiría con el patrón de crecimiento folicular o afectara el efecto de la segunda GnRH para inducir la ovulación por la persistencia de dicha hormona en sangre. Sin embargo en otro ensayo realizado con los mismos fines que el anterior, pero en vaquillonas cruce bos-índicus, aplicaron la eCG el día 5 o el día 8, en un protocolo de 8 días y obtuvieron más cantidad de cuerpos lúteos, de P4 y una tendencia de aumento de preñez (Nasser et al., 2004). Los autores aseveran que el aumento de cuerpos lúteos se da por que las vaquillonas al día 5 fueron estimuladas con la eCG cuando aún la nueva onda folicular se encontraba en fase de crecimiento o en una etapa muy temprana de selección, la medición de todos los parámetros se realizó el día de la implantación de los embriones, las vaquillonas en este caso son seleccionadas por su condición corporal, ciclicidad, una buena salud reproductiva y las razas índicas presentan una población folicular y sensibilidad a tratamientos hormonales mayor que las taurinas. En nuestro ensayo la aplicación de eCG en el grupo experimental se realizó 5 días después del comienzo del tratamiento y en ese momento ya existía un folículo seleccionado que sería beneficiado por el prolongado estímulo FSH y LH antes que los del grupo control. Fue realizado en vacas que se encontraban en anestro superficial, esto condicionaría a un efecto más rápido del BE el día 0 para el desarrollo de una nueva onda folicular y la generación de un folículo dominante más rápido que en vacas que estuvieran ciclando normalmente ya que el efecto inhibitor del BE del día de la aplicación de los DIV (día 0) sería más efectivo y rápido. Por lo tanto, es más difícil llegar a un día 5 sin la obtención de un folículo generando dominancia y que se produzca el fenómeno de codominancia u ovulaciones múltiples (comunicación personal, Gnemi Giovani, 2018).

La demostración de celos fue la misma para ambos grupos, por lo que no hubo efecto del adelantamiento de aplicación de eCG sobre el celo. De las 11 vacas de cada grupo en el Experimento 1, 5 presentaron celo. La aplicación de eCG en el momento del retiro del DIV aumenta la tasa de demostración de celos en vacas en anestro con ternero al pie. Pessoa et al. (2016) comparó el porcentaje de celos en vacas con terneros de 40 a 70 días de edad, en categorías en anestro y ciclando, cuando se usa eCG a diferentes dosis y cuando no se se usa eCG. En ambas categorías resultó en que el uso de eCG aumentó la tasa de demostración celo sin presentar diferencias entre la aplicación de 300UI o 400UI. En el presente experimento se aplicó la eCG en ambos grupos y la vida media de esta hormona supera los 5 días (Schams et al., 1978), por lo tanto, el

resultado es esperable ya que el efecto de la misma seguía siendo el mismo durante el momento que se controló el celo. En vaquillonas sincronizadas con un progestágeno a las que se les administró 250UI de eCG 12 y 24h antes y al momento del retiro del progestágeno, demostraron una reducción del período desde el retiro del DIV hasta el comienzo del celo para los animales a los que se les aplicó 24 h antes la eCG (Albarrán et al., 2017), probablemente esto se deba a el tiempo en que demora la eCG en llegar al máximo su concentración en sangre que son 24 h (Schams et al., 1979). En nuestro trabajo el momento en que se hizo el control de celo los niveles de eCG en sangre de los grupos T5 y T7 seguramente hayan sido iguales y estuviesen actuando de la misma forma.

Siete días después del parto se detecta la emergencia de la primera onda foliular sin la generación de dominancia de ningún folículo. De 10 a 21 días después surge el primer folículo dominante; la falta de reservas de LH es la limitante para que la primera ovulación posparto ocurra siendo la misma sin demostración de celo (Yavas y Walton, 2000b). Este folículo preovulatorio podría producir suficiente E2 que en ausencia de P4 podría dar lugar al comportamiento de celo, pero esto no es lo único necesario, el efecto en el cerebro y el bloqueo que produce la P4 sobre el eje hipotálamo-hipofisario previo a la dominancia del folículo preovulatorio también condicionará la demostración de celo. No por haber más concentración de estradiol en sangre durante más tiempo, como se podría haber esperado en este ensayo, tiene por qué potenciarse el comportamiento de celo (Vailes et al., 1992; Allrich, 1994). De hecho en estudios en los que se compara expresión de celo con niveles de estradiol sanguíneos en vacas superovuladas y no superovuladas, las superovuladas llegan a niveles mayores que las no superovuladas, pero no hubo diferencias entre la tasa de demostración de celo ni en la intensidad de los mismos (Coe y Allrich, 1989).

Son muchos los factores que inciden en la demostración de celo. Existen factores individuales, el estado sanitario, elementos genómicos individuales y heredables, ya detectados en el hipotálamo y en cuatro regiones distintas del cerebro en vacas holando que condicionan el comportamiento e intensidad de celo (Woelders et al., 2014). Los factores climáticos y sociales como la temperatura, la humedad, el tamaño y composición del rodeo también influyen (Diskin y Sreenan, 2000). Factores que están relacionados con la prolongada exposición de niveles de cortisol en sangre, como en situaciones de stress, también afectan directamente a la expresión de celo (Cook et al., 1987; Vailes et al., 1992).

Crecimiento folicular, diámetro de folículo preovulatorio y estradiol en sangre

El patrón de crecimiento observado en la gráfica se mantuvo igual. A partir del día -3 a la ovulación se observa una aceleración en el crecimiento folicular para el grupo T5 que no se observa en el grupo T7, en el cual el crecimiento folicular se mantiene constante. Esto llevó a la obtención de un diámetro de folículo

preovulatorio en los dos días previos a la ovulación con tendencia estadística a ser mayor en el grupo T5 que en grupo T7. La eCG aplicada en rumiantes alcanza su pico máximo en sangre luego de las 24h. de inyectada vía intramuscular (Schams et al., 1979). Su efecto máximo entonces, puede comenzar a darse a partir de este momento y perdurar durante 5 días más (Schams et al., 1978) dependiendo de los receptores que tenga donde actuar, ratificando parte de la hipótesis planteada en esta tesis.

Con el fin de lograr un folículo preovulatorio de mayor diámetro también se ha comparado el uso de la eCG con la hCG, las que demostraron no tener diferencias entre sí en lo que respecta al crecimiento folicular. La diferencia que se obtuvo entre estos dos grupos es que en el grupo al que se le administró hCG hubo un 44% de ovulaciones prematuras, probablemente por la alta afinidad de hCG con los receptores de LH (Prata et al., 2018). En nuestro ensayo los datos fueron inversos, no hubo efecto sobre el crecimiento pero sí sobre el diámetro folicular a las 48 y 24 h. Prata et al. (2018) no obtuvieron diferencias entre diámetros de folículos preovulatorios en ninguno de los grupos; es muy probable que este resultado esté sujeto a la vida media en sangre de la hCG que no supera las 30 horas (Giordano et al., 2013) siendo menor que la vida media en sangre de la eCG y a la afinidad de esta última tanto a receptores para LH como de FSH. Por otro lado, Tortorella et al. (2013) en un protocolo de inducción de la ovulación de 8 días en vacas en anestro con 40 a 60 días de paridas no encontró diferencias entre diámetro de folículo preovulatorio ni crecimiento folicular entre el grupo control (no eCG) y el grupo en el que se aplicó eCG el día 8 (día de retiro de DIV) resultado no discutido por el autor que difiere de los anteriores trabajos citados, no obstante en el grupo al que se le había aplicado la eCG 2 días antes del retiro del dispositivo, observaron diferencias significativas en ambas variables comparado con los otros dos grupos. Nuestros resultados concuerdan con esta información. La posible explicación para estos hallazgos sería que la pregnenolona existente en las células de la teca es transformada en dihydroepiandrosterona por medio de la enzima citocromo P450 α 17 α hydroxylasa (P45017 α), luego de distintos procesos enzimáticos la androsterona pasa a través de la membrana basal a las células de la granulosa aromatizándose a estradiol por medio de la citocromo P450 α aromatasa. La eCG produciría un estímulo a nivel de la teca en folículos en crecimiento y preovulatorios aumentando los niveles de la enzima P45017 α que estimula la secreción de estradiol, efecto de mayor similitud a un efecto LH (Soumano et al., 1996). De hecho, se ha reportado una mayor concentración de estradiol y progesterona cuando se utiliza eCG que cuando se utiliza FSH (Soumano et al., 1996). Al aumentar la cantidad de estradiol, aumentaría el diámetro folicular, y al prolongarse el estímulo dos días más como en nuestro ensayo podría explicar la tendencia observada a tener folículos preovulatorios mayores encontrada.

Soumano et al. (1998) en un ensayo similar al anterior de superovulación, compararon eCG y FSH, midieron la cantidad de ARNm que codifican para receptores de LH y de FSH en folículos de distintos tamaños y para los receptores de LH en el CL antes y después de la aplicación de una dosis de PG, reportaron que tanto los receptores de LH como los de FSH disminuyeron en las vacas superestimuladas con eCG lo que podría interpretarse como una auto regulación negativa debido a la alta dosis utilizada (2500UI). En nuestro caso utilizamos una dosis 6 veces menor, por lo que este resultado podría haber sido inverso o sea una regulación de receptores de FSH y LH positiva, como el resultado obtenido en ratas inmaduras sometidas a un tratamiento con 10UI de eCG en las que los receptores de FSH a las 24h y 52h posteriores al tratamiento aumentaron (LaPolt et al, 1992).

Los niveles de estradiol en sangre el día -2 fueron iguales para ambos grupos y el día -1 hubo una tendencia a que fueran menor para el grupo T5. Según la hipótesis planteada y los resultados obtenidos sobre el diámetro del folículo preovulatorio (con tendencia a ser mayor para T5 vs. T7), se podría haber esperado un mayor nivel de estradiol en sangre para T5, lo que estaría en concordancia con ensayos anteriores en los que se determinó que a mayor diámetro folicular mayor es la concentración de estradiol en sangre (Noseir, 2003). Por otro lado, compararon animales super estimulados con eCG y con FSH y al aplicar eCG los niveles de estradiol resultaron ser mayores (Soumano et al., 1996). No obstante, el otro resultado obtenido en el presente ensayo fue que las vacas del grupo T5 ovularon con mayor sincronía y antes que las del grupo T7, esto concuerda con los resultados obtenidos por Komar, et al. (2001) en los que mide como el estradiol en sangre desciende al mínimo 8 a 10 horas antes del momento de la ovulación. Podría ser que la dosis utilizada (400UI) no sea tan alta como para dar diferencias significativas de estradiol en sangre, también puede haber sucedido que el que el máximo de estradiol para T5 se haya dado antes, para esto sería necesario realizar los mismos análisis realizados en este experimento desde el día de la aplicación de eCG para el grupo T5 y para el grupo control.

Volumen de CL y progesterona en sangre

Si bien en el presente trabajo no se observaron diferencias en el volumen de CL durante toda la fase luteal se observó una tendencia el día 5 a ser mayor para T5 que para T7. Este resultado pudo haber estado limitado por el número de animales ya que el uso de un número mayor de animales podría haber resultado en una diferencia estadística a partir del día 4 pos ovulación. De la Mata (2016) en un experimento de IATF en los que prolongan el proestro (J-Synch) con el fin de lograr folículos preovulatorios de mayor diámetro, obtiene este mismo resultado durante la fase luteal, una tendencia del CL 7 días luego de la ovulación a ser mayor para el grupo en el que folículo fue mayor lo que

coincidiría en parte con nuestro resultado. El volumen luteal está correlacionado en forma positiva con la cantidad de P4 producida por darlo mayoritariamente las células luteales grandes y en menor proporción las chicas, lo que se entiende como una mayor cantidad de células produciendo progesterona dando una mayor tasa de fertilidad (Vasconcelos et al., 2001), aunque esta no es una característica definitiva para predecir la calidad y funcionalidad del CL. Mann, (2009), en un experimento en el que se compara peso luteal con P4 en sangre en distintos momentos de la fase luteal llega a la conclusión de que el máximo tamaño luteal se consigue el día 8 luego de la ovulación manteniéndose constante hasta el día 16, en nuestro experimento este dato coincide con el grupo control pero no con el experimental en el que el máximo volumen de CL se consigue el día 7, día en el que también tiende a ser mayor para T5, esto quiere decir que desde la ovulación el grado de crecimiento del CL fue mayor para T5 que para T7. Según lo observado por Mann, 2009, hasta el día 5 es el período en el que la correlación de peso de CL con la producción de P4 es más fuerte y los mayores CL provinieron de mayores folículos preovulatorios, el interpreta que el volumen del CL está limitado por el espacio que deja libre el folículo preovulatorio para ser invadido por las células luteales, por esto podríamos interpretar que la tendencia de diámetro preovulatorio mayor obtenida en nuestro experimento dejó lugar a un espacio mayor a ser invadido por células luteales y por esto mismo que esta invasión sea de forma más rápida, estableciendo un CL algo mayor y desde el punto de vista metabólico más activo.

El volumen de los CLs no es la única variable que indica el grado de funcionalidad de un CL. Baruselli et al., (2003) reportaron que vacas sometidas a un protocolo de IATF que incluyó eCG presentaron mayores concentraciones de P4 en sangre que a las que no se les había aplicado eCG, sin embargo, no hubo diferencias en el área de los CLs. Existen diferencias histomórficas con diferentes niveles hormonales, las células luteales grandes y pequeñas cambian en proporción, tamaño y en su contenido lipídico desde el metaestro a la regresión del CL (Singh et al., 1997). Nuestro trabajo no incluyó otras variables, aunque podría ser interesante en trabajos futuros incluir estudios histomorfológicos del CL. También, durante el metaestro y diestro el tejido luteal está sujeto a cambios en la intensidad de pixeles en imágenes ecográficas correlacionadas con cambios de P4 plasmática descrito por Singh et al., (1997), la intensidad de pixeles es alta en el metaestro y diestro temprano debido a un alto desarrollo angiogénico, luego la intensidad baja por el aumento de número y tamaño de células luteales aumentando nuevamente al final del diestro por el aumento de tejido conectivo del CL en regresión. La medida de flujo sanguíneo mediante eco Doppler en ultrasonografía es una herramienta más específica que la determinación del tamaño del CL para estimar la funcionalidad del mismo (Herzog et al., 2010). La angiogénesis y flujo sanguíneo medido con eco Doppler está correlacionada en forma positiva desde el folículo dominante 84 horas previo a la ovulación hasta el desarrollo del CL, flujo sanguíneo del mismo y producción

de P4 (De Tarso et al., 2017). Por lo que sería, también interesante en futuros trabajos incluir estudios con eco Doppler.

La P4 en sangre fue mayor en T5 que en T7 el día 9. La producción de P4 está directamente relacionada con la calidad del CL generado (Mann, 2009). La eCG aumenta el número de células grandes luteales responsables de la mayor producción de P4 durante el diestro, aumenta la cantidad de mitocondrias esta y la densidad de mitocondrias esféricas en estas células, lo que da la capacidad del aumento de la estereoidogénesis (Rigoglio et al., 2013). Por otro lado, Souza et al. (2016), en un estudio que miden la expresión de genes relacionados con la función luteal, sugieren que el estímulo de la eCG en folículos dominantes es sobre la expresión génica de enzimas de la cadena estereoidogénica relacionadas con la síntesis lipídica lo que favorecería en el CL en formación la producción de P4. Es probable que este estímulo con 400UI se encuentre exacerbado en el grupo T5 ya que el mismo fue realizado durante dos días más que T7 promoviendo la maduración del ovocito, aumentando el número de células de la granulosa aportando más irrigación del folículo preovulatorio con el consecuente aumento de irrigación luteal y de número de grandes células luteales con un contenido de mitocondrias diferentes y con mayor sustrato lipídico para la síntesis de P4.

Al adelantar el momento de aplicación de eCG se podría estar adelantando el momento en el que las células del folículo dominante comienzan a invertir el número de receptores de FSH a LH. De esta forma podría adelantarse la maduración de un ovocito competente, la luteinización de células de la granulosa y el comienzo de producción de P4. El adelantar el aumento de la producción de P4 está directamente relacionado con mayores tasas de fertilidad (Diskin et al., 2006; Stronge et al., 2005; Mann y Lamming, 2001).

7.2 Experimento 2:

La mayor tasa de preñez observada en las vacas del grupo T5 en este experimento podría explicarse basándonos en el experimento 1. Es probable que las vacas del grupo T5 hayan obtenido folículos preovulatorios mayores, habiendo sido inseminadas más próximas a la ovulación y que los CL desarrollados hayan secretado más cantidad de P4, lo que mejora la retención embrionaria.

También la P4 de la fase luteal del ciclo anterior al de la ovulación va a influir en la calidad del ovocito al momento de la ovulación, niveles subluteales de P4 producen una maduración ovocitaria prematura lo que nos podría llevar a la obtención de un ovocito poco competente (Diskin et al., 2012). En el caso del presente experimento los niveles de P4 son bajos ya que los animales utilizados no son precedidos por una fase luteal debido a su categoría y estado fisiológico, por lo que las estrategias para mejorar la sincronía y calidad de la ovulación son de relevancia. Es probable que en el presente experimento la maduración

de los ovocitos del grupo T5 haya sido adelantada, por lo que la aplicación de GnRH después de 4 días del comienzo del estímulo de la eCG da lugar a ovocitos con características favorables para generar un embrión saludable y competitivo para llevar a cabo una preñez. Por otro lado el adelantar un día la aplicación de GnRH en un protocolo de 8 días, adelantando el momento de aplicar la eCG 48 horas como en nuestro experimento, resultó en un 27,3% de preñez adelantando la eCG y 16,0% de preñez aplicando la eCG el día del retiro del DIV, habiendo dado diferencia significativa entre el grupo eCG6 y eCG8 coincidiendo con nuestro resultado. Los autores (Tortorella et al., 2013) proponen que el bajo porcentaje de preñez de ambos grupos podría haberse dado por el estrés nutricional y la baja condición corporal (2,5 en escala de 1-5) por el cual pasaban los animales. Sin embargo según nuestros resultados, en los que trabajamos con una condición corporal de vacas similar, este bajo porcentaje de preñez podría haber sido causado por corto intervalo desde el retiro del DIV y el estímulo de la ovulación con GnRH.

La concentración de P4 está relacionada directamente con los niveles de INT y este es el responsable de prevenir la luteólisis por medio de la inhibición de receptores de oxitocina a nivel endometrial asegurando un reconocimiento materno para que se desarrolle la preñez. Basándonos en el experimento 1 podemos sugerir que las vacas del grupo T5 de este experimento pasaron por un aumento de P4 de forma más aguda que las del grupo T7, promoviendo el desarrollo de un embrión bajo la influencia de P4 desde pocos días pos fecundación mayor que las del grupo T7, esto prepara al embrión al momento de pasar a ser blastocisto eclosionado para secretar más cantidad de IFN y a la vez generar una mayor elongación del mismo entre el día 8 y 16, evento que se regula positivamente con la producción de P4 materna (Kerbler et al., 1997; Carter et al., 2008; Diskin et al., 2012) generando un aumento en la retención embrionaria con el consecuente resultado en el porcentaje de preñez. Carter et al., 2008 sugiere que el efecto del aumento de P4 durante las primeras instancias de clivaje embrionario produce la inducción de expresión de ciertos genes en el concepto que se manifestarán luego, al momento de la expansión, eclosión y elongación aumentando el tamaño del mismo, característica relacionada directamente con la cantidad de INT producida por las células del trofoblasto.

8. CONCLUSIONES

La administración de 400UI de eCG 48 h antes del retiro del progestágeno sincroniza de forma más eficiente la ovulación ya que los animales del grupo tratamiento ovularon en un rango de tiempo menor

La administración de eCG dos días antes del retiro del progestágeno aumenta la tasa de preñez y no produce ningún efecto sobre el comportamiento estral en vacas con cría al pie con una condición corporal media en anestro superficial. El aplicarla en este momento en un protocolo de inducción de la ovulación hace que la misma comience su efecto hormonal frente a los receptores tanto de FSH como de LH antes y el mismo perdure más allá de la ovulación debido a su larga vida media en sangre.

La aplicación de eCG 48 h antes del retiro del progestágeno produjo folículos preovulatorios con una tendencia a ser mayores que los folículos de vacas que la aplicó al momento del retiro del mismo.

El aplicar dos días antes la eCG no produjo cambios en el volumen del CI pero sí aumentó la producción de P4 el día 9 luego de la ovulación.

9. IMPLICANCIAS PRÁCTICAS

La vaca con cría al pie es la categoría que más limita al productor criador a llegar a los índices de preñez deseados. El uso de progestágenos en los programas de IATF es una herramienta necesaria para la inducción de la ciclicidad en esta categoría, sin embargo los resultados de preñez obtenidos en esa inseminación están alrededor del 50%. El adelantar el uso de eCG dos días en esta clase de protocolo resultó en el aumento de más del 10% preñez. Claro que desde el punto de vista práctico, podría ser una desventaja la necesidad de juntar el rodeo a inseminar una vez más y sería de relevancia el realizar estudios ecográficos previos a comenzar el protocolo de inseminación para asegurar el estado de anestro superficial de las vacas, estos detalles técnicos deben ser informados al productor para que el mismo lo tenga en cuenta.

Es necesario profundizar en la investigación, desde lo celular a lo molecular, de los factores que influyen en la capacidad ovulatoria, folículo preovulatorio y calidad de cuerpo lúteo en vacas de carne en anestro superficial con cría al pie con el fin de aumentar la eficiencia reproductiva en rodeos de cría en sistemas pastoriles.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta TJ. (2007). Studies of follicular vascularity associated with follicle selection and ovulation in cattle. *Reprod and Dev* 53: 39-44.
2. Adams GP., Singh J. (2015). Ovarian follicular and luteal dynamics in cattle. En: Hopper RM. *Bovine reproduction*. Ames, Wiley, p 219-244.
3. Albarrán B., Rojo R., Cedillo J., Lopez D., Hernández J., Esparza S., Vázquez JF. (2017). Momento de la administración de la gonadotropina coriónica equina en la sincronización del estro sobre la actividad reproductiva de vaquillonas para carne. 12° Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina p 361.
4. Allen WR., Hamilton DW., Moor RM. (1973). The origin of equine endometrial cups. II. Invasion of the endometrium by trophoblast. *The Anat Record* 177: 485-501.
5. Allrich RD. (1994). Endocrine and neural control of estrus in dairy cows. *J Dairy Sci* 77: 2738-2744.
6. Antczak FD., de Mestre AM., Wilsher S., Allen WR. (2012). The Equine Endometrial Cup Reaction: A Fetomaternal Signal of Significance. *Ann Rev Anim Biosci* 1: 419-442.
7. Bao B., Garverick HA., Smith GW., Smith MF., Salfen BE., Youngquist RS. (1997). Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biol Reprod* 56: 1158-1168.
8. Bartolomé JA., Melendez P., Kelbert D., Swift K., McHale J., Hernandez J., Silvestre F., Risco CA, Arteché ACM., Thatcher WW., Archbald LF. (2005). Strategic use of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) to increase pregnancy rate and reduce pregnancy loss in lactating dairy cows subjected to synchronization of ovulation and timed insemination. *Theriogenology* 63: 1026-1037.
9. Baruselli PS., Marques MO., Carvalho NAT., Berber RCA., Valentim R., Carvalho Filho AF., Costa Neto WP. (2003). Follicular dynamics and pregnancy rate in embryo recipient (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) treated with "Ovsynch" protocol for fixed-time embryo transfer. *Braz J Vet Res Anim Sci* 40: 96-106.
10. Baruselli, PS., Reis, EL., Marques, MO., Nasser, LF., & Bó, GA. (2004). The use of hormonal treatments to improve reproductive performance

- of anestrus beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci*, 83, 479-486.
11. Beg MA., Ginther OJ. (2006). Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reprod* 132: 365-77.
 12. Bellows RA., Short RE. (1972). Superovulation and multiple births in beef cattle. *J Anim Sci* 34: 67-69.
 13. Bergfelt DR., Kulick LJ., Kot K., Ginther OJ. (2000). Follicular and hormonal response to experimental suppression of FSH during follicle deviation in cattle. *Theriogenology* 54: 1191-206.
 14. Binelli M., Thatcher WW., Mattos R., Baruselli PS. (2001). Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology* 56: 1451-1463.
 15. Bo GA., Adams GP., Caccia M., Martinez M., Pierson RA., Mapletoft RJ. (1995). Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim Reprod Sci* 39: 193-204.
 16. Bo GA., de la Mata JJ., Baruselli PS., Menchaca A. (2016). Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology* xxx: 1-9.
 17. Bolt DJ., Scott V., Kiracofe GH. (1990). Plasma LH and FSH after estradiol, norgestomet and GnRH treatment in ovariectomized beef heifers. *Anim Reprod Sci* 23: 263-271.
 18. Bousfield GR., Butnev VY., Butnev VY. (2001). Identification of twelve O-Glycosylation sites in Equine Chorionic Gonadotropin β and Equine Luteinizing Hormone β by Solid-Phase Edman Degradation. *Biol Reprod* 64: 136-147.
 19. Bryan MA., Heuer C., Emslie FR. (2009). Use of equine chorionic gonadotrophin in synchronized AI of seasonal-breeding, pasture-based, anoestrous dairy cattle. *Reprod Fert Dev*, 22, 126–131.
 20. Carter F., Forde N., Duffy P., Wade M., Fair T., Crowe MA., Evans ACO., Kenny DA., Roche JF., Lonergan PA. (2008). Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reprod Fert Dev* 20: 368–375.
 21. Cavestany D., Aragunde R., Fila D. (2012). Addition of eCG on day 5 instead of day 7 of modified HeatSynch protocol might improve the ovarian follicular response of the anestrus suckled Hereford cows. *Reprod Dom Anim* 47: 471.

22. Cavestany D., Cibils J., Freire., Sastre A., Stevenson JS. (2003). Evaluation of two different oestrus-synchronisation methods with timed artificial insemination and resynchronization of returns to oestrus in lactating Holstein cows. *Anim Reprod Sci* 77: 141-155.
23. Cavestany D., Meikle A., Herrmann J., Forsberg M. (2002). Substitution of GnRH by Estradiol Benzoate (EB) in an Estrus Synchronization Protocol in Dairy Cows: Ovarian and Endocrine Responses. *Annual Meeting of the SFT and ACT. 7-11 Agosto, 2002. Colorado Springs. Colorado, USA.*
24. Cavestany, D. (2002). Sincronización y/o inducción de celo con o sin inseminación artificial a tiempo fijo en rodeos de Uruguay. Costos y variaciones en las respuestas. Primera parte: fundamentos teóricos. *XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú. Uruguay, pp. 143-163.*
25. Cerri RLA., Juchem SO., Chebel RC., Rutigliano HM., Bruno RGS., Galvão KN., Thatcher WW., Santos JEP. (2009). Effect of fat source differing in fatty acid profile on metabolic parameters, fertilization, and embryo quality in high producing dairy cows. *J Dairy Sci* 92: 1520–1531.
26. Coe BL., Allrich RD. (1989). Relationship between endogenous estradiol-17 β and estrous behavior in heifers. *J Anim Sci* 67: 1546-1551.
27. Colazo MG., Gordon MB., Rajamahendran R., Mapletoft RJ., Ambrose DJ. (2009). Pregnancy rates to timed artificial insemination in dairy cows treated with gonadotropin-releasing hormone or porcine luteinizing hormone. *Theriogenology* 72: 262-270.
28. Colazo MG., Kastelic JP., Mapletoft RJ. (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.
29. Colazo MG., Mapletoft RJ. (2014). A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle. *The Can Vet. J* 55: 772-780.
30. Cole HH. (1936). On the biological properties of mare gonadotrophic hormones. *J Anat* 59: 299-322.
31. Cole HH., Bigelow M., Finkel J., Rupp GR. (1967). Biological half-life of endogenous PMSG following hysterectomy and studies on losses in urine and milk. *Endocrinology* 81: 927-930.
32. Cook DL., Winters TA., Horstman LA., Allrich RD. (1987). Influence of cortisol and dexamethasone on estrous behavior of estradiol-treated ovariectomized cows and heifers. *J Dairy Sci* 70: 181.

33. Crowe MA. (2008). Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. *Reprod Dom Anim* 43: 20-28.
34. Crowe MA., Diskin MG., Williams EJ. (2014). Parturition to resumption of ovarian cyclicity: comparative aspects of beef and dairy cows. *Animal* 8: 40-53.
35. Crowe MA., Padmanabhan V., Mihm M., Beitins IZ., Roche JF. (1998). Resumption of follicular waves in beef cows is not associated with peri-parturient changes in follicle-stimulating hormone heterogeneity despite major changes in steroid and luteinizing hormone concentrations. *Biol of Reprod* 58: 1445-1450.
36. Cutaia L., Tribulo R., Moreno D., Bo GA. (2003). Pregnancy rate in lactating beef cows treated with progesterone-releasing devices, estradiol benzoate and equine chorionic gonadotropin (eCG). *Theriogenology* 59: 216.
37. Dahlen CR., Bird SL., Martel CA., Olson KC., Stevenson JS., Lamb GC. (2013). Administration of human chorionic gonadotropin 7 days after fixed-time artificial insemination of suckled beef cows. *J Anim Sci* 88: 2337-2345.
38. De Castro, Teresa (2006). Alternativas hormonales y de manejo del amamantamiento para incrementar la eficiencia reproductiva. Tesis de Maestría. Programa de Posgrados, Facultad de Veterinaria, UDELAR.
39. De la Mata, JJ (2016). Prolongación del proestro y reducción del período de inserción del dispositivo con progesterona en vaquillonas para carne inseminadas a tiempo fijo. Tesis de Maestría. Escuela de Graduados, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba.
40. De Nava G. (2011). Reproducción en los rodeos de cría pastoriles: el enfoque de un veterinario de campo. XXXIX Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay: 68-77.
41. De Nava G. (2016). Inseminación a Tiempo Fijo: particularidades y ventajas. *Diario El País*, sección Rurales del 16 de octubre del 2016: 14.
42. De Rensis F., Lopez-Gatius F. (2014). Use of Equine Gonadotropin to Control Reproduction of the Dairy Cow: A Review. *Reprod Dom Anim* 49: 177-182.
43. De Rensis F., Peters AR. (1999). The control of follicular dynamics by PGF₂ α , GnRH, hCG and estrus synchronization in cattle. Review article. *Reprod Dom Anim* 34: 49-59.

44. De Tarso SGS., Gastal GDA., Bashir ST., Gastal MO., Apgar GA., Gastal EL. (2017). Follicle vascularity coordinates corpus luteum blood flow and progesterone production. *Reprod Fertil Dev.* 29: 448-457.
45. DIEA-MGAP http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/diea-web_0.zip
Anuario 2016.
46. Diskin MG., Morris DG. (2008). Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod Dom Anim* 43: 261-268.
47. Diskin MG., Murphy JJ., Sreenan JM. (2006). Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Anim Reprod Sci* 96: 297-311.
48. Diskin MG., Parr MH., Morris DG. (2012). Embryo death in cattle: an update. *Reprod Fertil Dev* 24: 244-251.
49. Diskin MG., Sreenan JM. (2000). Expression and detection of oestrus in cattle. *Reprod Nutr Dev* 40: 481-491.
50. Duffy P., Crowe MA., Austin EJ., Mhim M., Boland MP., Roche JF. (2004). The effect of eCG or estradiol at or after norgestomet removal on follicular dynamics, estrus and ovulation in early post-partum beef cows nursing calves. *Theriogenology* 61: 725-734.
51. Dunne LD., Diskin MG., Sreenan JM. (2000). Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Anim Reprod Sci* 58: 39-44.
52. Evans ACO., Adams GP., Rawlings NC. (1994). Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first to the first ovulation in prepubertal heifers. *J Reprod Fertil* 100: 187-194.
53. Fanning MD., Lunt DK., Sprott LR., Forrest DW. (1995). Reproductive performance of synchronized beef cows as affected by inhibition of suckling with nose tags or temporary calf removal. *Theriogenology* 44: 715-723.
54. Ferreira RM., Ayres H., Sales JNS., Souza AH., Rodrigues CA., Baruselli PS. (2013). Effect of different doses of equine chorionic gonadotrophin on follicular and luteal dynamics and P/AI of high-producing Holstein cows. *Anim Reprod Sci* 140: 26-33.
55. Fike KE., Day ML., Inskip EK., Kinder JE., Lewis PE., Short RE., Hafs HD. (1997). Estrus and luteal function in suckled beef cows that were anestrous when treated with an intravaginal device containing progesterone with and without a subsequent injection of estradiol benzoate. *J Anim Sci* 75: 2009-2115.

56. Forde N., Beltman ME., Lonergan P., Diskin M., Roche JF., Crowe MA. (2011). Oestrus cycle in *Bos Taurus* cattle. *Anim Reprod Sci* 124: 163-169.
57. Fortune JE. (1994). Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 50:225.
58. Gibbons JR., Wiltbank MC., Ginther OJ. (1997). Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the FSH surge in heifers. *Biol Reprod* 57: 1066-1073.
59. Ginther OJ. (2016). The theory of follicle selection in cattle. *Dom Anim Endoc* 57: 85-99.
60. Ginther OJ., Knopf L., Kastelic JP. (1989). Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim Reprod Sci* 20: 187-200.
61. Giordano JO., Edwards JL., Di Croce FA., Roper D., Rohrbach NR., Saxton AM., Schuenemann GM., Prado TM., Schrick FN. (2013). Ovu-latory follicle dysfunction in lactating dairy cows after treatment with Folltropin-V at the onset of luteolysis. *Theriogenology* 79: 1210-1217.
62. Guillon F., Combarous Y. (1983). Purification of equine gonadotropins and comparative study of their acid-dissociation and receptor-binding specificity. *Biochim Biophys Acta* 755: 229-236.
63. Gutiérrez-Añez JC., Pirela-González Y., Urdaneta-Moyer A., Osorio-Meléndez C., Boscán-Ocando JC., Portillo-Martínez G. (2009). Efecto de la dosis de eCG sobre la dinámica folicular y fertilidad de novillas mestizas cebú sincronizadas con un progestágeno intravaginal. Disponible en: http://www.avpa.ula.ve/congresos/memorias_xivcongreso/pdf/fisio_reprod.pdf. Fecha de consulta: 20/09/2012.
64. Hansel W., Convey EM. (1983). Physiology of the estrous cycle. *J Anim Sci* 57: 404.
65. Haughian JM., Ginther OJ., Díaz FJ., Wiltbank MC. (2013). Gonadotropin releasing hormone, estradiol, and inhibin regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone surges: implications for follicle emergence and selection in heifers. *Biol Reprod* 88: 1-10.
66. Henricks DM., Dickey JF., Hill JR., Johnston WE. (1972). Plasma Estrogen and Progesterone Levels After Mating, and During Late Pregnancy and Postpartum in Cows. *Endocrinology* 90: 1336-1342.
67. Herzog K., Brockhan-Lüdemann M., Kaske M., Beindorff N., Paul V., Neimann H., Bollwein H. (2010). Luteal blood flow is a more appropriate

- indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. *Theriogenology* 73: 691-697.
68. Ireland J., Roche J. (1983). Growth and differentiation of large antral follicles after spontaneous luteolysis in heifers: changes in concentration of hormones in follicular fluid and specific binding of gonadotropins to follicles. *J Anim Sci* 57: 157-167.
 69. Kenyon AG., Gláucio Lopes Jr., Mendonça LGD., Lima JR., Bruno RGS., Denicol AC., Chebel RC. (2012). Ovarian responses and embryo survival in recipient lactating holstein cows treated with equine chorionic gonadotropin. *Theriogenology* 77: 400-411.
 70. Kerbler TL., Buhr MM., Jordan LT., Leslie KE., Walton JS. (1997). Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology* 47: 703-714.
 71. Lamb GC., Stevenson JS., Kesler DJ., Garverick HA., Brown DR., Salfen BE. (2001). Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F2alpha for ovulation control in postpartum suckled beef cows. *J Anim Sci* 79: 2253-2259.
 72. LaPolt PS., Tilly JL., Aihara T., Nishimori K., Hsueh AJ. (1992). Gonadotropin induced up and down regulation of ovarian follicle stimulating hormone (FSH) receptor gene expression in immature rats: effects of pregnant mare's serum gonadotropin, human chorionic gonadotropin, and recombinant FSH. *Endocrinology* 130: 1289-1295.
 73. Lauderdale JW. (1975). The use of prostaglandins in cattle. *Annales de Biologie Animale Biochimie biophysique* 15: 419-425.
 74. Lussier JG., Diouf MN., Lévesque V., Sirois J., Ndiaye K. (2017). Gene expression profiling of unregulated mRNAs in granulosa cells of bovine ovulatory follicles following stimulation with HCG. *Reprod Biol Endoc* 15: 1-16.
 75. Mackey DR., Sreenan JM., Roche JF., Diskin MG. (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.
 76. Macmillan KL., Burke CR. (1996). Effects of oestrus cycle control on reproductive efficiency. *Anim Reprod Sci* 42: 307-320.
 77. Macmillan KL., Thatcher WW. (1991). Effects of an agonist of Gonadotropin-Releasing Hormone on Ovarian Follicles in Cattle. *Biol Reprod* 45: 883-889.

78. Mann GE. (2009). Corpus luteum size and plasma progesterone concentration in cows. *Anim Reprod Sci* 115: 296-299.
79. Mann GE., Lamming GE. (2001). Relationship between the maternal endocrine environment, early embryo development and the inhibition of the luteolytic mechanism in the cow. *Reprod* 121: 175-180.
80. Mann GE., Lamming GE. (2000). The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrus cycle in the cow. *Anim Reprod Sci* 64:171-180.
81. Mann GE., Lamming GE., Robinson RS., Wathes DC. (1999). The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *J Reprod Fert* 54: 317-328.
82. Martinez MF., Adams GP., Bergfelt DR., Kastelic JP., Mapletoft RJ. (1999). Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. *Anim Reprod Sci* 57: 23-33.
83. Martinez MF., Kastelic JP., Adams GP., Cook B., Olson WO., Mapletoft RJ. (2002). The use of progestins in regimens for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Theriogenology* 57: 1049-1059.
84. Martinez MF., Kastelic JP., Adams GP., Mapletoft RJ. (2001). The use of GnRH or estradiol to facilitate fixed-time insemination in an MGA-based synchronization regimen in beef cattle. *Anim Reprod Sci* 67: 221-229.
85. Martinez MF., Tutt D., Quirke LD., Tattersfield G., Juengel JL. (2014). Development of a GnRH-PGF_{2α}-progesterone-based synchronization protocol with eCG for inducing single and double ovulations in beef cattle. *J Anim Sci*. 92: 4935-4948.
86. McNeill RE., Sreenan JM., Diskin MG., Cairns MT., Fitzpatrick R., Smith TJ., Morris DG. (2006). Effect of systemic progesterone concentration on the expression of progesterone-responsive genes in the bovine endometrium during the early luteal phase. *Reprod Fert Dev* 18: 573-583.
87. Menchaca A., Ibarra D., Jauregui F. (2006). El Uso de eCG y GnRH asociado a un tratamiento con progesterona incrementa la tasa de preñez con IATF en vaquillonas de 15 meses. XXXIV Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay.
88. Menchaca A., López G., Chifflet N., Alvarez M., Eugster M. (2005). El uso de eCG incrementa la tasa de preñez en vacas de cría inseminadas a tiempo fijo. XXXIII Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay.
89. Menchaca A., Núñez R., Wijma R., García Pintos C., Fabini F., de Castro T. (2013). Cómo mejorar la fertilidad de los tratamientos de IATF en

- Vacas. *Bos Taurus*. X Simposio Internacional de Reproducción Animal-IRAC: 103-133.
90. Méndez J., Vizcarra J., Orcasberro R. (1988). Condición y apreciación visual en vacas Hereford. *Rev Plan Agror* 44: 33-34.
 91. Menzer C., Schams D. (1979). Radioimmunoassay for PMSG and its application to in-vivo studies. *J Reprod Fert* 55: 339-345.
 92. Montiel F., Ahuja C. (2005). Body condition and suckling as factors influencing the duration of postpartum anestrus in cattle: a review. *Anim Reprod Sci* 85: 1-26.
 93. Moreira F., de la Sota RL., Díaz T., Thatcher WW. (2000). Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in fairy heifers. *J Anim Sci* 78: 1568-1576.
 94. Moreira F., Orlandi C., Risco CA., Mattos R., Lopes F., Thatcher WW. (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.
 95. Murphy BD. and Martinuk SD. (1991). Equine chorionic gonadotropin. *Endoc Rev* 12: 27-44.
 96. Nascimento AB., Souza AH., Guenther JN., Dalla Costa FP., Sartori R., Wiltbank MC. (2013). Effects of treatment with chorionic gonadotrophin or intravaginal progesterone-releasing device after AI on circulating progesterone concentrations in lactating dairy cows. *Reprod Fétil Dev* 25: 818-824.
 97. Nasser LF., Reis EL., Oliveira MA., Bó GA., Baruselli PS. (2004). Comparisson of four synchronization protocols for fixed-time bovine embryo transfer in *Bos indicus* X *Bos Taurus* recipients. *Theriogenology* 62: 1577-1584.
 98. Nett TM., Cermak D., Braden T., Manns J., Niswender GD. (1987). Pituitary receptors for GnRH and estradiol, and pituitary content of gonadotropins in beef cows. I Changes during the estrous cycle. *Dom Anim Endoc* 4: 123-132.
 99. Noseir WMB. (2003). Ovarian follicular activity end hormonal profile during estrous cycle in cows: the development of 2 versus 3 waves. *Reprod Biol Endoc* 1: 50.
 100. Núñez R., de Castro T., García-Pintos C., Bó G., Menchaca A. (2012). Serum progesterone concentrations, corpus luteum development and follicular dynamics after administration of equine chorionic gonadotrop-

hin (eCG) at the end of a synchronization protocol for fixed-time AI in anestrous beef cattle. XVII International Congress on Animal Reproduction, Vancouver, Canada.

101. Núñez R., de Castro T., García-Pintos C., Bó G., Piaggio J., Menchaca A. (2014). Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol based treatment in postpartum anestrous beef cattle. *Anim Reprod Sci.* 146: 111-116.
102. Parr MH., Crowe MA., Lonergan P., Evans ACO., Rizos D., Diskin MG. (2014). Effect of exogenous progesterone supplementation in the early luteal phase post-insemination on pregnancy per artificial insemination in Holstein-Friesian cows. *Anim Reprod Sci* 150:7-14.
103. Perry GA., Smith MF., Lucy MC., Green JA., Parks TE., MacNeil MD., Roberts AJ., Geary TW., Roberts RM. (2005). Relationship between Follicle Size at Insemination and Pregnancy Success. *Proc Nat Sci USA* 102: 5268-5273.
104. Perry GA., Smith MF., Roberts AJ., MacNeil MD., Geary TW. (2007). Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *Jour Anim Sci* 85: 684-689.
105. Pessoa GA., Martini AP., Carloto GW., Rodrigues MCC., Claro Júnior I., Baruselli PS., Brauner CC., Rubin MIB., Correa MN., Leivas FG., Sá Filho MF. (2016). Different doses of equine chorionic gonadotropin on ovarian follicular growth and pregnancy rate of suckled *Bos taurus* beef cows subjected to timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* 85: 792-799.
106. Picard-Hagen N., Lhermie G., Florentin S., Merle D., Frein P., Gayrard V. (2015). Effect of gonadorelin, lecirelina, and buserelina on LH surge, ovulation, and progesterone in cattle. *Theriogenology* 84: 177-183.
107. Pinheiro VG. (2009). Effects of temporary calf removal and eCG on pregnancy rates to timed-insemination in progesterone-treated postpartum Nellore cows. *Theriogenology* 71: 519-524.
108. Prata AB., Drum JN., Melo LF., Araujo ER., Sartori R. (2018). Effect of different chorionic gonadotropins on final growth of the dominant follicle in *Bos Indicus* cows. *Theriogenology* 111: 52-55.
109. Pursley JR., Mee MO., Wiltbank MC. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂ α and GnRH. *Theriogenology* 44: 915-923.

110. Rahe CH., Owens RE., Fleeger JL., Newton HJ., Harms PG. (1980). Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: upon the period of the cycle. *Endocrinology* 107: 498-503.
111. Randel RD. (1990). Nutrition and postpartum rebreeding in cattle. *J Anim Sci* 68: 853-862.
112. Rigoglio NN., Fátima LA., Hanassaka JY., Pinto GL., Machado ASD., Gimenes LU., Baruselli PS., Rennó FP., Moura CEB., Watanabe IS., Papa PC. (2013). Equine chorionic gonadotropin alters luteal cell morphologic features related to progesterone synthesis. *Theriogenology* 79: 673-679.
113. Roche JF., Bolandl MP., McGeedy TA. (1981). Reproductive wastage following artificial insemination of heifers. *The Vet Rea* 109: 401-404.
114. Sá Filho MF. (2010). Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore cows. *Theriogenology* 73: 651-658.
115. Sá Filho MF., Crespilho AM., Santos JEP., Perry GA., Baruselli PS. (2010). Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Anim Reprod Sci* 120: 23-30.
116. Sales JNS., Carvalho JBP., Crepaldi GA., Cipriano RS., Jacomini JO., Maio JRG., Souza JC., Nogueira GP., Baruselli PS. (2012). Effects of two estradiol esters (benzoate and cipionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* 78: 510-516.
117. Sartorelli ES., Carvalho LM., Bergfelt DR., Ginther OJ., Barros CM. (2005) Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos Indicus*) heifers and cows. *Theriogenology* 63: 2382-94.
118. Sartori R., Bastos MR., Wiltbank MC. (2010). Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single and super ovulated dairy cattle. *Reprod Fert Dev* 22: 151-158.
119. Sartori R., Fricke PM., Ferreira JCP., Günther OJ., Wiltbank MC. (2001). Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol Reprod* 65: 1403-1409.
120. Sartori R., Rosa GJM., Wiltbank MC. (2002). Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci* 85: 2813-2822.

121. Schams D., Menzer C., Schallenberger E., Hoffman B., Hahn R. (1978). Some studies on pregnant mare serum gonadotropin and on endocrine responses after application for superovulation in cattle. En: Martinus Nijhoff. Control of Reproduction in the Cow. Ed. JH. Sreenan, The Hague, pp. 122.
122. Sheffel CE., Pratt BR., Ferrell WL., Inskeep EK. (1982). Induced Corpora Lutea in the postpartum Beef Cow. II. Effects of treatment with Progesterone and Gonadotropins. *J Anim Sci* 54: 830-836.
123. Short RE., Bellows RA., Stanigmilller RB., Berdinelli JG., Custer EE. (1990). Physiological mechanisms controlling anoestrous and infertility in postpartum beef cattle. *J Anim Sci* 68: 799-816.
124. Singh J., Person RA., Adams GP. (1997). Ultrasound image attributes of the bovine corpus luteum: structural and functional correlates. *J Reprod Fert* 109: 35-44.
125. Soumano K., Lussier JG., Price CA. (1998). Levels of messenger RNA encoding ovarian receptors for FSH and LH in cattle during super ovulation with chorionic gonadotrophin versus FSH. *J Endoc* 156: 373-378.
126. Soumano K., Silversides DW., Doizé F., Price CA. (1996). Follicular 3β -Hydroxysteroid Dehydrogenase and Cytochromes P450 17α -Hydroxylase and Aromatase Messenger Ribonucleic Acids in Cattle Undergoing Superovulation. *Biol Reprod* 55: 1419-1426.
127. Souza AH., Viechnieski S., Lima FA., Silva FF., Araujo R., Bo GA., Wiltbank MC., Baruselli PS. (2009). Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology* 72: 10–21.
128. Souza LMMdC., Mendes GP., Campos DB., Baruselli PS., Papa PdC. (2016). Equine chorionic gonadotropin modulates the expression of genes related to the structure and function of the bovine corpus luteum. *PLoS ONE* 11: e0164089.
129. Stevenson JS., Portaluppi MA., Tenhouse DE., Lloyd A., Eborn DR., Tacuba S., DeJarnette JM. (2007). Interventions After Artificial Insemination: Conception Rates, Pregnancy Survival, and Ovarian Responses to Gonadotropin-Releasing Hormone, Human Chorionic Gonadotropin, and Progesterone. *J Dairy Sci* 90: 331-340.
130. Stevenson JS., Tiffany SM., Inskeep EK. (2008). Maintenance of Pregnancy in Dairy Cattle After Treatment with Human Chorionic Gonadotropin or Gonadotropin-Releasing Hormone. *J Dairy Sci* 91: 3092-3101.

131. Stewart F., Allen WR. (1981). Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophin. *J Reprod Fert* 62: 527-536.
132. Stronge AJH., Sreenan JM., Diskin MG., Mee JF., Kenny DA., Morris DG. (2005). Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology* 64:1212-1224.
133. Thatcher WW., Meyer MD., Danet-Desnoyers G. (1995). Maternal recognition of pregnancy. *J Reprod Fertil* 49: 15.
134. Thundathil J., Kastelic JP., Olson WO., Cook RB., Mapletoft RJ. (1999). Melengestrol acetate, estradiol-17 β and GnRH for synchronizaion of estrus and ovulation in beef cows. *Can J Anim Sci* 79: 39-43.
135. Tortorella RD., Ferreira R., Tonello dos Santos J., Silveira de Andrade Neto O., Barreta MH., Oliveira JF., Gonçalves PB., Pereira Neves J. (2013). The effect of chorionic gonadotropin on follicular size, luteal volume, circulating progesterone concentrations, and pregnancy in anestrus beef cows treated with a novel fixed-time artificial insemination protocol. *Theriogenology* 79: 1204-1209.
136. Urwin VE., Allen WR. (1982). Pituitary and chorionic gonadotrophic control of ovarian function during early pregnancy in equids. *J Reprod Fertil* 32: 371-381.
137. Vailes LD., Washburn SP., Britt JH. (1992). Effects of various steroid milieus or physiological states on sexual behavior of holstein cows. *J Anim Sci* 70: 2094-2103.
138. Vasconcelos JLM., Sartori R., Oliveira HN., Guenther JG., Wiltbank MC. (2001). Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 56: 307-314.
139. Vasconcelos JLM., Silcox RW., Rosa GJM., Pursley JR., Wiltbank MC. (1999). Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 52: 1067-1078.
140. Viñoles C., Quintans G., Paiva N., Cavestany D. (1999). Tratamiento del anestro posparto en vacas de carne con acetato de medroxi-progesterona (MAP) asociado a benzoato de estradiol o eCG. XXI Buiatrics Congress. P. del E., Uruguay.
141. Williams GL. (1990). Suckling as a regulator of postpartum rebreeding in cattle: A review. *J Anim Sci* 68: 831-852.
142. Williams GL., Petersen BJ., Tilton JE. (1982). Pituitary and ovarian responses of postpartum dairy cows to progesterone priming and single

- or double injections of gonadotropin-releasing hormone. *Theriogenology* 18: 561-572.
143. Wiltbank MC., Gümen A., Sartori R. (2002). Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* 57: 21-52.
 144. Woelders H., van der Lende T., Kommadath A., te Pas MFW., Smits MA., Kaal LMTE. (2014). Central genomic regulation of the expression of oestrous behavior in dairy cows: a review. *Animal* 8: 754-764.
 145. Xu ZZ., Garverick HA., Smith GW., Smith MF., Hamilton SA., Youngquist RS. (1995). Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol Reprod* 53: 951-957.
 146. Yavas Y., Walton JS. (2000a). Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: A Review. *Theriogenology* 54: 1-23.
 147. Yavas Y., Walton JS. (2000b). Postpartum acyclicity in suckled beef cows. A Review: *Theriogenology* 54: 25-55.