



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**INFLUENCIA DE LA BIOESTIMULACIÓN (EFECTO MACHO)  
SOBRE EL INICIO DE LA ACTIVIDAD CÍCLICA  
EN VAQUILLONAS DE CARNE**

**María Carolina Fiol Lepera**

**TESIS DE MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**URUGUAY  
2010**





**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**



**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**INFLUENCIA DE LA BIOESTIMULACIÓN (EFECTO MACHO)  
SOBRE EL INICIO DE LA ACTIVIDAD CÍCLICA  
EN VAQUILLONAS DE CARNE**

**María Carolina Fiol Lepera**

**Rodolfo Ungerfeld  
Director de Tesis**

**Graciela Quintans  
Co-Director de Tesis**

**2010**



**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE**

**DEFENSA DE TESIS**

**Edgardo Rubianes; Msc, PhD  
Programa de Posgrados de la Facultad de Veterinaria  
y PEDECIBA  
Montevideo - Uruguay**

**Ricardo Alberio; MV, PhD  
Departamento de Producción Animal, INTA Balcarce  
Balcarce, Buenos Aires - Argentina**

**Georgette Banchero; DMTV, PhD  
INIA La Estanzuela  
Colonia - Uruguay**

*“¡Si uno conociera lo que tiene, con tanta claridad como conoce lo que le falta!”*

*M. Benedetti*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Unge, por la confianza que siempre demostró en mí, y por la dedicación y compromiso que presenta con todos y cada uno de sus tesisas,

A Graciela Quintans, por la colaboración y los aportes realizados durante la planificación y realización de esta Tesis, y a todo el personal de “Palo a Pique” e INIA Treinta y Tres, por la ayuda recibida durante la realización del Experimento I,

Al Tato López por facilitar la realización del Experimento II, y a Marcela Canaval, Florencia Laens, y todo el personal de “Bañado de Medina”, por la ayuda recibida durante la realización del mismo,

A Emilio Machado, Luciano Martínez y Walter Martínez por la ayuda recibida durante la realización del Experimento III, y a Diego Picardo por permitir la realización del mismo en su establecimiento,

A la CIDEC por la financiación del Experimento III, a la CSIC por la financiación de los diferentes congresos a los que asistí para presentar estos resultados, y al Quique Nogueira por la ayuda recibida durante la presentación a los diferentes programas,

A la ANII por otorgarme la beca de posgrado para finalizar esta Tesis,

A Raquel Correa por la colaboración final en el análisis estadístico,

A todos los integrantes del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción, en especial a Solana, Lorena y Matías; a Elsa Garófalo, Celia y Juan Pablo, por todos los aportes realizados para mejorar esta Tesis,

A Joselo por facilitar y fomentar mi desarrollo académico, y a todos los integrantes de los Departamentos de Bovinos y Nutrición: Cecilia, Alejandro, Álvaro, Nati, Coco, Ale y Analía, por el excelente ambiente que compartimos,

A mis amigas de toda la vida y a mis compañeros de Facultad, por todos los muy buenos momentos vividos,

A mis padres, Nenucha y Bernardo, por todo lo que me han dado, y porque junto con mis hermanos, Vero y Eduardo, han sido un apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida,

A todo el resto de mi familia, en especial a mis sobrinos: Mateo, Gonzalo, Vale y Gastón, por hacerme olvidar los problemas en un segundo,

A Martin, por estar siempre conmigo

**A TODOS ELLOS MUCHÍSIMAS GRACIAS**

# **ÍNDICE**

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS</b>	3
2.1 Pubertad en vaquillonas de carne	3
2.2 Bioestimulación en ganado de carne	7
2.2.1 Mecanismo de acción de la bioestimulación	7
2.2.2 Vías responsables del estímulo	8
2.2.3 Respuesta a la bioestimulación en ganado de cría	10
2.2.4 Factores que afectan la respuesta a la bioestimulación	12
<b>3. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS</b>	21
<b>4. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN</b>	22
<b>5. EXPERIMENTO I</b>	
5.1 Introducción	23
5.2 Materiales y Métodos	24
5.3 Resultados	26
5.4 Discusión	31
<b>6. EXPERIMENTO II</b>	
6.1 Introducción	35
6.2 Materiales y Métodos	36
6.3 Resultados	38
6.4 Discusión	40
<b>7. EXPERIMENTO III</b>	
7.1 Introducción	43
7.2 Materiales y Métodos	45
7.3 Resultados	46
7.4 Discusión	49
<b>8. DISCUSIÓN GENERAL</b>	53
<b>9. CONCLUSIONES</b>	55
<b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	56
<b>11. ANEXOS</b>	73

**Publicación I.** Response to biostimulation in peri-puberal beef heifers: influence of male-female proximity and heifer's initial body weight. *Theriogenology*, *en prensa*.

## RESUMEN

Los objetivos de la presente Tesis fueron evaluar el efecto de la exposición de vaquillonas de carne prepúberes a novillos androgenizados (NA) sobre el inicio de la actividad cíclica y la tasa de preñez, y determinar algunos de los factores involucrados en la respuesta. Para ello se realizó un primer trabajo (Experimento I; Publicación I), cuyos objetivos específicos fueron: a) determinar el efecto de la bioestimulación con NA por 35 días sobre el inicio de la ciclicidad en vaquillonas prepúberes, y b) determinar si la proximidad física macho-hembra, y el peso de las hembras al comenzar la exposición influían sobre la respuesta. La bioestimulación permitió adelantar el inicio de la pubertad, existiendo una asociación entre la proximidad física entre NA y vaquillona y la probabilidad de ciclicidad, y entre dicha proximidad y el peso corporal de las vaquillonas al inicio de la exposición. A partir de los resultados obtenidos en el Experimento I, se realizó el Experimento II con el objetivo de determinar si el comportamiento de los NA y de las vaquillonas variaba al encontrarse en forma simultánea un NA y 2 vaquillonas de diferente rango de peso vivo, y si las diferencias eran inherentes a las características de atractividad sexual de las hembras, o eran consecuencia de la competencia entre las mismas. En las situaciones de competencia existió una mayor actividad de cortejo por parte de los NA hacia las vaquillonas de mayores pesos vivos, a la vez que las hembras más pesadas tendieron a mostrar una mayor proceptividad hacia los machos que las más livianas. Sin embargo no hubo diferencias en las interacciones entre NA y vaquillonas de ambos rangos de peso en situaciones de no competencia. Por lo tanto, las diferencias reportadas en el Experimento I se vincularían a elementos de competencia entre las hembras de los diferentes rangos de peso vivo. Finalmente, en el Experimento III se determinaron los efectos de la exposición de vaquillonas en anestro a NA en forma previa al inicio de un protocolo de sincronización de celos (PSC) e inseminación artificial (IA) en vaquillonas de dos años. La pre-estimulación con NA determinó un adelanto en el inicio de la ciclicidad, pero no en los porcentajes de vaquillonas cíclicas al comenzar la IA, ni en los porcentajes de celos en respuesta al PSC ni en las tasas de preñez a la IA. En síntesis, a partir de los resultados obtenidos en los 3 experimentos se concluyó que la exposición a NA permite estimular el inicio de la ciclicidad en vaquillonas en anestro manejadas en condiciones pastoriles extensivas. La respuesta positiva está vinculada con el peso vivo de las vaquillonas al inicio de la exposición, el que se relaciona positivamente con el estímulo de los machos hacia las hembras. La exposición de vaquillonas a NA previo a un PSC no determinó una mayor tasa de preñez al no incrementar la cantidad de vaquillonas ciclando al inicio del PSC.

## **SUMMARY**

The objectives of the present Thesis were to evaluate the effects of the exposure of anoestrus beef heifers to androgenized steers (AS) on the onset of cyclic activity and pregnancy rates, and to determine some of the factors that influence the response. In Experiment I (Publication I) the objectives were to: 1) determine the effects of biostimulation with AS on the onset of puberty in peri-puberal beef heifers, and 2) determine if male-female proximity and heifer's initial body weight influences the response. The exposure of peri-puberal beef heifers to AS was effective to reduce age at puberty, while a positive link was found between male-female proximity and heifer's initial body weight and the response to biostimulation. Based on the results of Experiment I, in Experiment II the aim was to evaluate sexual behavior of AS and heifers of different body weight ranges in competitive situations, and to determine if differences were due to factors associated to body weight or to female competition. In competitive situations, heavier heifers received a greater stimulus from the AS and were more proceptive to them, while no differences were found on AS' stimulus in non-competitive situations. Therefore, differences in males' stimulus may be due to factors associated to competition between females of different body weights ranges. Finally, the objectives of the third experiment (Experiment III) were to determine the effects of the exposure to AS before an estrous synchronization protocol (ESP) and artificial insemination (AI), on cyclic activity, proportion of estrous heifers, and pregnancy rates in anoestrus beef heifers. Biostimulation was effective to advance the onset of cyclic activity, but had no effects on the proportion of cyclic females at the beginning of the ESP, neither on proportion of estrous females and pregnancy rates. We concluded that exposure of beef heifers managed under grazing conditions to AS is an effective alternative to reduce periods of anoestrus. The response is related to heifers' initial body weight, which is positively associated with male-female interactions. The exposure of anoestrus beef heifers to AS before an ESP did not affect pregnancy rates when no positive effects were found on cyclic activity at the beginning of the ESP.

## 1. INTRODUCCIÓN

El sector agroindustrial en el Uruguay representó durante el período 2000-2007 un 14,3% del producto bruto interno total del país, correspondiendo un 54,2% del mismo a la pecuaria, y un 58% de este sector pecuario a la actividad de bovinos de carne (Sáez, 2009). La producción de carne en Uruguay se realiza en un 79,7% del total de las explotaciones con actividades ganaderas, teniendo un 54% de las mismas a la cría como principal rubro (DIEA, 2009). Las existencias bovinas se han estabilizado en la última década en el entorno a los 11,5 millones de animales, de los que 4,2 millones corresponden a vacas de cría entoradas (DIEA, 2009). Los sistemas criadores se caracterizan por ser extensivos, desarrollados casi exclusivamente sobre campo natural, con una alta dependencia de los factores climáticos (Rovira, 1996; Pereira, 2003), lo que determina una gran variación en la calidad y cantidad del forraje ofrecido.

La tasa de extracción representa la cantidad de cabezas faenadas anualmente sobre el total de existencias bovinas y es utilizada como indicador de crecimiento del sector ganadero (Caputi y Murguía, 2003). Durante la última década, la tasa de extracción ha aumentado en forma sostenida, alcanzando un máximo de 22,9% en el año 2006, para luego disminuir a valores promedios del 19% en el año 2009 (Oyhantçabal et al. 2009). La producción de terneros representa el principal producto de la actividad criadora y el aumento de los mismos es una de las formas de mejorar dicha tasa. Sin embargo, el incremento generado en la tasa de extracción se ha basado fundamentalmente en la disminución de la edad de los novillos a la faena, y no ha sido acompañado por un progreso similar del sector criador (Caputi, 2005). A su vez, la baja eficiencia biológica que presenta la cría en comparación con otras actividades como la invernada, y la competencia con otros sistemas por el uso de la tierra, ha llevado a un desplazamiento del sector hacia las regiones de menor productividad, lo que empeora aún más la situación de dichos rodeos. Como consecuencia, la eficiencia productiva (kilos de terneros destetados por vaca entorada) del sector criador no ha evolucionado de la forma necesaria para continuar sustentando el aumento de la tasa de faena de los últimos años (Oyhantçabal et al. 2009).

La baja eficiencia reproductiva de los rodeos de cría es lo que explica en mayor medida esa baja eficiencia productiva. La eficiencia reproductiva se encuentra determinada fundamentalmente por el porcentaje de procreo o destete (cantidad de terneros destetados / 100 vacas entoradas), el peso de los terneros al destete y la edad al primer entore ó servicio de las vaquillonas. En Uruguay, la tasa de destete ha presentado valores promedios de 63%, y respecto a la edad al primer servicio, 50% de los vaquillonas son entoradas por primera vez entre los 2 y 3 años de edad (Pereira, 2003). A nivel país, esto se encuentra representado por unas 500.000 vaquillonas que se mantienen improductivas hasta los 2 a 3 años de edad (DIEA, 2009). En contraste, datos internacionales plantean que para lograr una máxima eficiencia biológica del sistema, la edad al primer entore

se debería situar entre los 12 y 14 meses (Gasser et al. 2006a). A su vez, para estimar correctamente la eficiencia de la cría, se sugiere que el porcentaje de procreos se debería realizar sobre el total de las hembras potencialmente fértiles, o sea incluyendo también a aquellas vaquillonas que no fueron entoradas a pesar de que por su edad se encuentren aptas para serlo. En función de todo ello la edad al primer entore de las vaquillonas cobra aún mayor importancia.

Las posibilidades de mejorar los indicadores de eficiencia reproductiva de los rodeos de cría se han basado, fundamentalmente, en el estudio de las alternativas que disminuyan la duración del anestro posparto (Short et al. 1990). Existe menor información generada en relación tanto a los factores que influyen en la edad al primer entore de las vaquillonas, como a las posibles alternativas para disminuirla.

El principal factor que influye en la edad al primer servicio de la hembra es la edad a la pubertad (al inicio de la actividad cíclica). El inicio temprano de la pubertad se vuelve esencial para lograr una menor edad al primer entore y primera concepción, y por lo tanto una óptima productividad del sistema (Lesmeister et al. 1973). A su vez, existe una relación positiva entre la cantidad de celos previos al inicio del entore, y el desempeño reproductivo posterior de las vaquillonas: a mayor cantidad de celos previos al inicio del servicio, mayor será la fertilidad (Byerley et al. 1987). Por todo ello, la disminución de la edad a la pubertad es de gran importancia económica, ya que implica disminuir las categorías improductivas del predio y aumentar el número de terneros producidos en la vida del animal (Lesmeister et al. 1973).

Existen múltiples estrategias disponibles para lograr disminuir la edad de las vaquillonas a la pubertad, siendo los manejos nutricionales y hormonales los de mayor difusión. El uso de los estímulos socio-sexuales, como la bioestimulación, aparece como una alternativa complementaria para optimizar la recría, especialmente por su facilidad de aplicación, bajos costos y ausencia de efectos adversos. A continuación se presentan las características principales de la pubertad en vaquillonas de carne y los factores que influyen sobre la misma, con especial énfasis en la bioestimulación por tratarse de la principal temática de la presente tesis.

## **2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS**

### **2.1 Pubertad en vaquillonas de carne**

Se entiende como pubertad la culminación de una serie de eventos que finalizan en la ovulación, acompañada del celo y función luteal normal (Day y Anderson, 1998). En vacas y ovejas, la pubertad se encuentra muchas veces precedida por ciclos irregulares, de corta duración, que pueden o no estar acompañados por celo u ovulación (Evans et al. 1994b). Los mecanismos fisiológicos vinculados al inicio de la pubertad están determinados por la maduración del hipotálamo y la consiguiente disminución de la retroalimentación negativa del estradiol sobre la pulsatilidad de LH, lo que determina el pico preovulatorio de LH y la ovulación (Day et al. 1984, 1986; Dodson et al. 1988; Evans et al. 1994a). Entre las 6 y 24 semanas de edad se produce un incremento pasajero en la secreción de LH, para luego comenzar a aumentar en forma progresiva durante los 40-80 días previos a la primera ovulación (Rawlings et al. 2003). Este incremento determina el crecimiento de los folículos antrales mayores, los que aumentan la secreción de estradiol (Rawlings et al. 2003). El aumento de la secreción de estradiol, junto a la disminución del número de receptores de dicha hormona a nivel hipotalámico, serían los principales determinantes de la disminución de la retroalimentación negativa del estradiol sobre la secreción de LH (Day et al. 1987; Rawlings et al. 2003).

Los principales factores que determinan el momento de la pubertad son la edad y el peso corporal (peso vivo “estático”) de las vaquillonas (Arije y Wiltbank, 1971, 1974; Short y Bellows, 1971). En términos generales, las vaquillonas comienzan la actividad cíclica al alcanzar un determinado estado de madurez, el que correspondería al 60-65% de su peso corporal adulto (Patterson et al. 1992). Otros autores evaluaron la eficiencia reproductiva en vaquillonas entoradas al llegar a un 50-53% de su peso corporal adulto en comparación a un 55-58%, como una alternativa posible para disminuir los costos de la recría, no encontrando diferencias en las tasas de preñez de vaquillonas entoradas al llegar a un 50-53% de su peso corporal adulto (Funston y Deutscher, 2004; Martin et al. 2008). Por lo tanto, si bien es necesario que las hembras alcancen un mínimo de desarrollo para comenzar a ciclar, muchos otros factores influyen en el desempeño reproductivo de la vaquillona.

#### ***Manejos nutricionales***

Las variaciones del estatus nutricional (peso vivo “dinámico”) y de la composición de la dieta en las distintas etapas del desarrollo prepuberal influyen en gran medida sobre el inicio de la ciclicidad en vaquillonas (Clanton et al. 1983; Schillo et al. 1992; Lalman et al. 1993; Ciccioli et al. 2005; Cooke et al. 2008). El peso vivo al destete y la tasa de crecimiento posterior al mismo, se encuentran inversamente relacionadas con la edad a la pubertad de las vaquillonas (Ferrel, 1982; Granger et al. 1990). Cuando las ganancias de peso luego del destete son elevadas, el inicio de la actividad cíclica se encuentra más relacionado a la edad que al peso vivo

alcanzado por las vaquillonas (Greer et al. 1983; Yelich et al. 1995). Por lo tanto, cuanto mayor sea el peso al destete y la ganancia de peso posterior, la pubertad se logrará a menor edad y mayor peso vivo (Greer et al. 1983). En condiciones pastoriles, las bajas ganancias de peso durante el primer invierno posterior al destete determinan un retraso en el inicio de la pubertad en comparación a las vaquillonas con mayores ganancias diarias, independientemente del peso vivo “estático” alcanzado al momento del entore (Quintans et al. 2004; Barreto y Negrín, 2005; Straumann, 2006; Costa et al. 2007; Quintans et al. 2007).

La suplementación de las vaquillonas con dietas forrajeras que contengan concentrados energéticos durante la etapa prepuberal tiene efectos positivos sobre la edad de inicio de la pubertad. El uso de concentrados con alto contenido de almidón (73% MS maíz) durante 60 o más días antes del entore disminuyó la edad a la pubertad, en relación a las vaquillonas que recibieron el concentrado por 30 días (Ciccioli et al. 2005) ó a aquellas suplementadas con un concentrado no almidonáceo (Marston et al. 1995). La suplementación con lípidos también tiene efectos positivos sobre la edad de inicio de la pubertad. El uso de aceite de soja al 3% durante los 90 días previos al entore determinó un adelanto de la pubertad y un aumento de la tasa de preñez al primer servicio en comparación a la suplementación al 6% y a las vaquillonas no suplementadas (Whitney et al. 2000).

A su vez, la frecuencia de alimentación influye sobre la respuesta de las vaquillonas al concentrado. La suplementación diaria con un concentrado energético fibroso a partir de los 9 meses de edad determinó un incremento en el estatus metabólico y nutricional de las vaquillonas, reduciendo la edad de inicio de la actividad cíclica, comparado con las vaquillonas suplementadas 3 veces por semana (Cooke et al. 2008). En síntesis, al suplementar en forma previa al entore con el objetivo de adelantar el inicio de la pubertad se debe considerar tanto el tipo de suplemento a utilizar como el tiempo y la forma de administración. A su vez, los efectos positivos de la suplementación fueron mayores en aquellas hembras con menores pesos vivos al destete (Ciccioli et al. 2005), lo que remarca la importancia del peso vivo al destete en el manejo de la recría, especialmente en condiciones pastoriles.

### ***Mecanismos de acción de la nutrición***

Los mecanismos fisiológicos y endócrinos vinculados al efecto de la nutrición sobre el inicio de la pubertad, aún no han sido totalmente dilucidados (ver revisión: Hess et al. 2005). Las mayores ganancias de peso posdestete se encuentran asociadas a la disminución temprana de la retroalimentación negativa del estradiol, y al aumento de la pulsatilidad de LH y del diámetro folicular (Bergfeld et al. 1994; Yelich et al. 1996; Gasser et al. 2006a, b, c). Sin embargo, la señal responsable de la modulación de los efectos nutricionales, aún es desconocida.

Las hormonas metabólicas han sido los factores más estudiados, y entre ellas la leptina, el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1), la

hormona de crecimiento (GH) y la insulina han concentrado la mayor atención (Hess et al. 2005). La leptina, péptido responsable de la señalización del estatus nutricional al eje reproductivo, presentaría únicamente un rol permisivo en el inicio de la pubertad (Maciel et al. 2004; Zieba et al. 2004). El IGF-1 ejercería un efecto positivo sobre el inicio de la ciclicidad actuando tanto a nivel central como periférico, sobre el desarrollo folicular (Webb et al. 2004). La inhibición de la síntesis de IGF-1 a nivel ovárico, inducida mediante una restricción alimenticia determinó un retraso en la edad a la pubertad (Schoppee et al. 1996), mientras que los niveles de IGF-1 estuvieron correlacionados positivamente con las ganancias de peso de las vaquillonas y con el inicio de la pubertad (Cooke et al. 2007). La GH también se encuentra relacionada al desarrollo folicular y a la edad a la pubertad en vaquillonas (Simpson et al. 1991; Flores et al. 2008). En situaciones normales, existe una correlación positiva entre los niveles de IGF-1 y de GH, pero en animales con restricciones alimenticias se ha reportado un desacople entre ambas hormonas, reportándose incrementos de las concentraciones de GH y disminuciones de las de IGF-1 (Yelich et al. 1995; Bossis et al. 1999; Flores et al. 2008). Sin embargo, en vaquillonas con altas ganancias de peso (1,36 kg/día) durante el periodo prepuberal, en las que se registró una menor edad y mayor peso vivo a la pubertad que aquellas con menores ganancias (0,68 kg/día), el incremento de las concentraciones de IGF-1 también estuvo acompañado por disminuciones de la producción de GH (Yelich et al. 1995). Otros autores no encontraron efectos de la GH sobre la edad a la pubertad (McShane et al. 1989; Hall et al. 1994), y plantearon que las concentraciones normales de dicha hormona aseguran un crecimiento y metabolismo adecuado para la función reproductiva (Hall et al. 1994).

Por su parte, el incremento de la secreción de insulina actuaría en forma directa, ó indirectamente a través de la captación de glucosa por las células, alterando diferentes procesos involucrados en el inicio de la ciclicidad (Marston et al. 1995; Ciccioioli et al. 2005). Los concentrados energéticos ricos en almidón durante la etapa prepuberal no solo ejercerían su efecto a través de las mayores ganancias de peso, sino también mediante la disminución de la relación acetato:propionato a nivel ruminal, la que determinaría un aumento de la concentración de insulina y glucosa en plasma (Ciccioioli et al. 2005). Por lo tanto, existen muchos factores involucrados en los efectos de la nutrición sobre la reproducción, por lo que probablemente no exista una sola señal responsable.

### **Raza**

La edad a la pubertad también difiere de acuerdo a las razas ó biotipos (Dow et al. 1982). En general, las vaquillonas *Bos taurus* y sus cruza alcanzan la pubertad a menor edad y mayor peso vivo que el *Bos indicus* (Jones et al. 1991; Rodrigues et al. 2002). A su vez, dentro de las *Bos taurus*, las razas de origen británico (Hereford, Aberdeen Angus) y sus cruza en líneas generales resultan más precoces a la pubertad que las europeas continentales (Shorthorn, Simmental, Limousine) (Gregory et al. 1979). La precocidad de los diferentes biotipos y razas han sido mayormente atribuidas

a diferencias en el desarrollo prepuberal, en relación a la deposición de tejidos y a las ganancias de peso (Hopper et al. 1993), y a la mayor adaptabilidad de las *Bos taurus* y sus cruza a las regiones templadas. Sin embargo, la eficiencia reproductiva de ambos genotipos en regiones tropicales presentó una tendencia similar a la esperada, siendo las cruza *Bos taurus* más jóvenes, pero más livianas a la pubertad (Gregory et al. 1979; Rodrigues et al. 2002). Por lo tanto, las diferencias durante el desarrollo prepuberal serían los principales determinantes de la precocidad de las cruza *Bos taurus* en relación a las cruza *Bos indicus* (Patterson et al. 1991).

### ***Tratamientos hormonales***

La utilización de hormonas exógenas ha sido uno de los métodos más efectivos para lograr adelantar el inicio de la pubertad (Diskin et al. 2002; Thatcher et al. 2002; Patterson et al. 2003). La mayor parte de los protocolos utilizados incluyen a la progesterona (Anderson et al. 1996; Imwalle et al. 1998), y análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Madgwick et al. 2005), y de la prostaglandina F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α), administradas solas ó combinadas (Day y Grum, 2005). De todas ellas, los análogos sintéticos de PGF<sub>2</sub>α, solos o en combinación con progestágenos sintéticos son los tratamientos más utilizados para adelantar el inicio de la ciclicidad en vaquillonas (Holm et al. 2008). Si bien el principal uso de la PGF<sub>2</sub>α es como agente luteolítico en combinación con progestágenos, la utilización de la misma con ó sin la administración previa de progestágenos, puede incrementar la proporción de vaquillonas ovulando en el entorno de la pubertad (Pfeifer et al. 2009).

### ***Condiciones medio-ambientales***

Las condiciones medio-ambientales interactúan con el sistema endógeno, tanto estimulando como inhibiendo los mecanismos fisiológicos, muchos de los que se encuentran vinculados al eje reproductivo (Ungerfeld, 2007). La época de nacimiento influye sobre el inicio de la pubertad: hembras nacidas en otoño alcanzan la pubertad en forma más temprana que las nacidas en primavera (Schillo et al. 1992). Si bien dichas diferencias podrían estar vinculadas con los cambios estacionales en la disponibilidad de alimento, el fotoperíodo representa el principal factor por medio del que la época de nacimiento influiría sobre el inicio de la actividad cíclica en vaquillonas, a pesar de tratarse de una especie de reproducción no estacional (Hansen et al. 1983). El fotoperíodo extendido (mayor cantidad de horas luz) en las etapas posteriores al destete tiene efectos positivos sobre el inicio de la pubertad, tanto en vaquillonas de carne (Hansen et al. 1983; Small et al. 2003) como de leche (Petitclerc et al. 1983; Ringuet et al. 1994). El patrón de secreción de melatonina sería el responsable de mediar los efectos del fotoperíodo sobre otras hormonas, las que influirían sobre procesos reproductivos como el inicio de la pubertad (Dahl, 2008). En este sentido, la prolactina ha sido una de las más estudiadas, mostrando incrementos en vaquillonas prepúberes que respondieron positivamente al fotoperíodo extendido (Petitclerc et al. 1983; Small et al. 2003).

Los estímulos socio-sexuales, entre ellos la bioestimulación o efecto toro o macho, representan otra de las influencias ambientales que estimulan el inicio de la pubertad en vaquillonas de carne. A continuación se revisarán los antecedentes de la bioestimulación en ganado de carne.

## **2.2 Bioestimulación en ganado de cría**

La mayor parte de la información científica sobre el uso de los factores socio-sexuales para estimular la actividad reproductiva en rumiantes domésticos, ha sido obtenida en ovinos y caprinos (ver revisiones: Martin, 1986; Ungerfeld, 2007; Delgadillo et al. 2009). La bioestimulación (o efecto macho, o efecto toro) se define como el estímulo provocado por la presencia de los machos, induciendo el estro y la ovulación mediante estímulos genitales, feromonas, u otras señales externas (Chenoweth, 1983). Heape propuso en 1901 que la presencia de los machos adelanta la pubertad en varias especies de mamíferos (citado por Izard, 1983). En bovinos, Neresjan en 1959 reportó que la exposición de vacas a toros vasectomizados durante el posparto determina un adelanto del reinicio de la ciclicidad, aunque en ese trabajo los resultados podrían estar confundidos por una mayor eficiencia en la detección de celos. Posteriormente se ha documentado ampliamente la eficacia de la bioestimulación sobre el adelanto del reinicio de la actividad cíclica en vacas posparto (Zalesky et al. 1984; Alberio et al. 1987; Landaeta-Hernández et al. 2004, 2006; Berardinelli y Joshi, 2005a; Tauck et al. 2010). Sin embargo, los estudios sobre la eficacia de la bioestimulación en el adelanto del inicio de la pubertad en vaquillonas son más escasos, y en muchos casos contradictorios.

### **2.2.1 Mecanismo de acción de la bioestimulación**

En ovinos y caprinos, los cambios en los patrones de secreción de LH representan la primera respuesta a la introducción de los machos, detectándose un aumento de la frecuencia de los pulsos de LH a los pocos minutos del inicio de la exposición (ver revisiones: Martin et al. 1986; Walkden-Brown et al. 1999; Ungerfeld, 2007). El incremento en la pulsatilidad de LH fue observado también en ovejas ovariectomizadas, por lo que se puede afirmar que la acción no es mediada únicamente por esteroides (Martin et al. 1983). La primera ovulación ocurre alrededor de 48 horas luego del inicio de la exposición y, en general, la misma no es acompañada de celo (Signoret, 1991) y puede encontrarse asociada o no a un cuerpo lúteo de corta duración (Ungerfeld, 2003).

En bovinos, los mecanismos fisiológicos involucrados en la respuesta a la bioestimulación no están bien dilucidados, habiendo sido desarrollada la mayor parte de los estudios en vacas adultas durante el anestro posparto. Custer et al. (1990) no encontraron efecto de la exposición de vacas primíparas durante el posparto a toros sobre los patrones de secreción de LH, a pesar de que la exposición a los machos fue eficaz para disminuir los días al primer celo posparto. Contrariamente, Fernandez et al. (1996) reportaron aumentos de la concentración media y frecuencia de pulsos de

LH en la misma categoría de vacas durante la exposición en forma continua e intermitente a toros epididictomizados desde los 30 días posparto. En vacas lecheras, Roelofs et al. (2007) encontraron un incremento de la concentración media y basal de LH, así como una mayor frecuencia de pulsos de LH durante la exposición únicamente por 8 horas alambrado por medio de los machos. En forma similar, el tratamiento oronasal durante 7 días con orina de toros determinó un aumento de las concentraciones de LH en vacas lecheras durante el posparto (Baruah y Kanchev, 1993). Se debe considerar que en el experimento de Custer et al. (1990) el muestro sanguíneo para la determinación de LH se realizó a partir de los 10 días de iniciada la exposición y a intervalos semanales, mientras que en los otros casos fue iniciado al comienzo de la exposición (Baruah y Kanchev, 1993; Fernandez et al. 1996; Roelofs et al. 2007), y en el caso de Fernandez et al. (1996) fue repetida cada 3 días. Estas variaciones en el régimen de muestreo realizado sería una de las posibles explicaciones de los diferentes resultados reportados (Fernandez et al. 1996). Por lo tanto, todo indicaría que los efectos positivos de la bioestimulación en bovinos también estarían mediados por una activación del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, pero los tiempos de la respuesta podrían diferir de lo reportado en pequeños ruminantes, lo que dificultaría su caracterización.

La respuesta generada a nivel ovárico luego de la exposición a los machos, se encuentra bien documentada en ovinos (Atkinson y Williamson, 1985; Martin et al. 1986; Ungerfeld et al. 2002), pero en bovinos representa la variable menos estudiada. Bastidas et al. (1997) registrando la actividad ovárica semanal en vaquillonas prepúberes expuestas o aisladas de machos no encontraron diferencias en el inicio de la actividad cíclica, pero reportaron que las hembras expuestas presentaron mayor cantidad de folículos pequeños y grandes durante el periodo de exposición que aquellas que se mantuvieron aisladas de los machos. Por su parte, Berardinelli et al. (2009) registraron la dinámica folicular diaria de vacas durante el posparto expuestas a toros en forma continua o cada 6 ó 12 horas durante 45 días y encontraron un menor intervalo entre ondas y un mayor diámetro del folículo dominante en las hembras expuestas. Coincidiendo con dichos resultados, en un trabajo reciente en el que se evaluó la dinámica folicular diaria en vaquillonas en anestro expuestas a novillos androgenizados durante 30 días, las hembras expuestas presentaron un incremento del diámetro folicular en los días 15 y 25 del periodo de exposición, en comparación a las hembras que se mantuvieron aisladas de los machos (Fiol et al. 2010). Por lo tanto, si bien la información es escasa, todo indicaría que un componente del estímulo de los machos involucraría el estímulo al desarrollo folicular.

### **2.2.2 Vías responsables del estímulo**

El término feromonas refiere a sustancias químicas que se transmiten vía aérea, secretadas externamente por el animal a través de la orina, heces ó glándulas cutáneas, y que causan una reacción comportamental y/ó endócrina específica al ser percibidas por el individuo receptor de la misma especie (Izard, 1983; Rekwot et al. 2000a). Estas sustancias son moduladoras del comportamiento en la mayor parte de los mamíferos,

afectando el comportamiento reproductivo y maternal, así como las respuestas de alarma y agresión (Swaney y Keverne, 2009).

En varias especies se ha documentado la influencia de señales de los machos sobre el inicio de la pubertad de hembras prepúberes (ratones: “efecto Vandenberg”: Vandenberg, 1983; ovejas: O’Riordan y Hanrahan, 1989; cabras: Thompson y Savage, 1978). A su vez, el rol de las feromonas como mediadores del efecto macho se encuentra claramente determinado en ovejas, cabras y cerdos (Rekwot et al. 2001).

En bovinos, la orina es la única vía estudiada como posible medio por el que se vehiculizarían y excretarían las feromonas masculinas (Izard, 1983). Por su parte, los productos excretorios de hembras y mucus cervical de hembras en estro, también estimulan la función ovárica, tanto de vacas en el periodo después del parto (Berardinelli y Joshi, 2005a; Wright et al. 1994) como de vaquillonas pospuberales (Izard y Vandenberg, 1982b). Esto demuestra la existencia de feromonas a nivel de los fluidos corporales de las hembras, capaces de ejercer un efecto hembra-hembra. Sin embargo, aún se desconoce si el estímulo generado por la exposición a los productos de hembras en estro actúa de forma similar a la exposición a los machos (Wright et al. 1994).

El sistema olfatorio principal (SOP), y el sistema olfatorio accesorio (SOA) son las dos vías por las que las feromonas serían detectadas por los individuos. Recientemente, se ha desarrollado la hipótesis de que el SOP estaría vinculado a la detección de señales ambientales, mientras que el SOA recibiría señales especie-específicas, como lo son las feromonas (Grus y Zhang, 2008). Sin embargo, la ablación del epitelio olfatorio accesorio en ovejas no influye en la respuesta a la exposición a los machos, lo que indica que en ovinos las señales químicas responsables del efecto macho actuarían principalmente a través del SOP y no del SOA (ver revisión: Gelez y Fabre-Nys, 2006). A su vez, las vías nerviosas del SOA son las que se activan en mayor medida durante la respuesta al efecto macho en ovejas (Gelez y Fabre-Nys, 2004).

Berardinelli y Joshi (2005a) evaluaron el reinicio de la actividad cíclica durante el posparto en vacas de cría primíparas expuestas a machos ó a productos excretorios de machos. Para ello introdujeron a las vacas durante 12 horas diarias por 70 días en corrales donde el resto del tiempo se encontraban los machos. No encontraron diferencias en la duración del anestro posparto entre las vacas expuestas a los toros ó a sus productos excretorios. Sin embargo, la exposición continua (24 h/día) de vacas primíparas a la orina de toros mediante un sistema dispensador durante 64 días, no afectó el reinicio de la ciclicidad, comparado con las vacas que fueron expuestas a orina de novillos (Tauck y Berardinelli, 2005; Tauck et al. 2006). Por lo tanto, los mencionados autores concluyeron que la orina no sería el agente biológico por el que se vehiculizarían las feromonas, ó que la exposición continua a la misma determinaría un “sobrestímulo” de las hembras que habría afectado la respuesta en comparación a la exposición alternada a productos excretorios de los machos. Como ya se mencionó, la

orina representa solo una de las posibles vías de excreción de las feromonas masculinas en mamíferos (Izard, 1983), pero en bovinos ha sido la única evaluada como posible mediador del efecto macho. Si bien el tratamiento oronasal con orina de toros durante 7 días logró incrementar la concentración de LH en vacas posparto (Baruah y Kanchev, 1993), en dicho experimento no hubo determinaciones de reinicio de ciclicidad. Por lo tanto, la primera explicación planteada por Tauck et al. (2006) no pueda ser descartada. Sin embargo, considerando la bibliografía consultada, no se ha encontrado información previa en bovinos ni en otras especies que mencione la existencia de un estímulo “excesivo” que repercuta negativamente en la respuesta. A su vez, las condiciones de manejo en ambos tipos de experimentos fueron diferentes: mientras que en el primero las vacas amamantaban dos veces por día (amamantamiento restringido), sin contacto visual ni olfativo con sus terneros entre ambas ocasiones (Berardinelli y Joshi, 2005a), en los experimentos en los que se evaluó la orina de toros y novillos, las hembras amamantaban *ad libitum* (Tauck y Berardinelli, 2005; Tauck et al. 2006). Por lo tanto, es posible que el efecto asociativo y negativo derivado del libre amamantamiento de los terneros, sumado a la posibilidad de que la orina no sea el principal medio de liberación de las feromonas, hayan sido los principales determinantes de la falta de respuesta a la exposición a la orina de los toros.

El tratamiento oronasal semanal con orina de toros durante 7 semanas determinó 35% de aumento en la proporción de vaquillonas púberes en relación a las vaquillonas tratadas con agua (Izard y Vandenberg, 1982a). Por lo tanto, si bien el rol positivo de la bioestimulación en vacas durante el posparto y en vaquillonas prepúberes estaría al menos parcialmente mediado por un mecanismo feromonal que involucraría a los productos excretorios de los machos, la intensidad de ese estímulo y otras vías de comunicación también influirían en la respuesta de las hembras.

### **2.2.3 Respuesta a la bioestimulación**

Los mecanismos involucrados en la respuesta al estímulo de las feromonas durante la bioestimulación, responsables de desencadenar los eventos que determinarán la activación del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, aún no están establecidos. El estrés y las hormonas vinculadas al mismo, en especial el cortisol, se han visto generalmente asociadas con efectos negativos sobre la reproducción. Las altas concentraciones plasmáticas de cortisol alteran la secreción de LH mediante la disminución de la respuesta a la GnRH (Breen y Karsch, 2004), y/o mediante el incremento de la retroalimentación negativa del estradiol (Oakley et al. 2009). En ovejas expuestas a diferentes tipos de estrés en el día del inicio de la exposición a los machos y en el día previo y posterior a la misma, las mayores concentraciones de cortisol estuvieron asociadas a una menor respuesta al efecto macho en comparación a las hembras que no fueron estresadas (Chanvallon et al. 2010). Sin embargo, otros estudios en diferentes especies no solo no han podido demostrar efectos negativos de distintos tipos de estrés sobre la reproducción, sino que también reportan algunos efectos positivos (Tilbrook et al. 2000; Tauck, 2008). A su vez, en ratas existe evidencia de que la activación adrenal se

encuentra vinculada a la respuesta de las hembras al estímulo feromonal de los machos (Mora y Sanchez-Criado, 2004).

Tauck et al. (2007) evaluaron los efectos de la exposición física directa de vacas primíparas durante el posparto, a machos durante 30 días y a orina de toros o de novillos durante 57 días, sobre el reinicio de la actividad cíclica y las concentraciones plasmáticas de cortisol. El reinicio de la actividad cíclica fue anterior en las vacas expuestas a los machos en comparación a las aisladas, sin diferencias entre aquellas expuestas a orina de toros o de novillos. Las concentraciones de cortisol aumentaron y se mantuvieron elevadas durante toda la exposición en las vacas expuestas en forma directa a los machos, mientras que en las hembras no expuestas disminuyeron y se mantuvieron bajas. No existieron diferencias entre las hembras expuestas a la orina de toros o de novillos: en ambos grupos la concentración de cortisol disminuyó progresivamente a lo largo del experimento (Tauck et al. 2007). Sin embargo, en experimentos posteriores Tauck (2008) no encontró diferencias en las concentraciones medias de cortisol en vacas posparto expuestas de forma aguda (5 horas por día durante 9 días) o en forma continua y crónica (24 horas por día durante 40 días) a los machos y aquellas aisladas, pero reportó que las vacas expuestas tuvieron mayor duración de pulsos de cortisol y menor frecuencia de los mismos. En ambos casos (exposición aguda y crónica), las vacas expuestas presentaron mayor frecuencia de pulsos de LH, lo que coincide con anteriores resultados (Fernández et al. 1996). A su vez, la concentración de cortisol en el grupo expuesto se correlacionó negativamente con la de LH: al ir disminuyendo la frecuencia de pulsos de cortisol, hubo un incremento de la frecuencia de pulsos de LH, lo que también coincide con lo reportado en otras especies (Breen y Karsch, 2004). Por lo tanto, un componente de la vía de transmisión del estímulo de los machos implicaría la alteración del patrón de secreción de cortisol, lo que determinaría la activación del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (Tauck, 2008). Si bien dicha afirmación es válida a partir de los diferentes resultados obtenidos, aún resta por determinar si el vínculo observado entre concentraciones de cortisol y de LH es causal.

Recientemente, también se estudió si la leptina actúa como mediador de los efectos de la bioestimulación. La exposición de vacas primíparas posparto a machos durante 40 días determinó una mayor proporción de hembras que reiniciaron la ciclicidad en relación a las aisladas, pero no se encontraron diferencias en el patrón temporal de secreción de leptina entre ambos grupos (Olsen et al. 2009). Sin embargo, existió una interacción entre tratamiento y día para las concentraciones de la hormona en las hembras que comenzaron a ciclar en ambos grupos. Si bien en ambos grupos las concentraciones de leptina en las hembras que comenzaron a ciclar aumentaron a los 15-18 días luego del inicio de la exposición y nuevamente al día 27, en el grupo expuesto se mantuvieron estables durante dicho periodo mientras que en aislado disminuyeron al día 21. Por otra parte, tanto en el grupo expuesto como aislado, las concentraciones de leptina fueron aumentando a medida que los días al reinicio de la ciclicidad disminuían, lo que coincide con resultados anteriores que plantean el papel permisivo de la leptina sobre el inicio de la pubertad (Maciel et al. 2004). Los autores

concluyeron que la bioestimulación únicamente tendría un efecto indirecto sobre los patrones de secreción de leptina, alterando su secreción como resultado de la disminución del anestro posparto (Olsen et al. 2009).

En ovinos y caprinos, el tipo de señal emitido por los machos, a diferencia de los roedores, no se ajustaría estrictamente a la definición de feromona, a la vez que en estas especies las señales no-olfatorias jugarían un papel esencial en la respuesta (Delgadillo et al. 2009). Si bien estas consideraciones fueron establecidas para ovinos y caprinos, las características de la respuesta en bovinos hacen pensar que también podrían extrapolarse a esta especie. Por lo tanto, a continuación se presentarán los factores que afectan la respuesta a la bioestimulación en ganado de cría, clasificándolos como aquellos relacionados a las características y manejo de la estimulación (tipo, intensidad, características y manejo de los machos, y duración del estímulo) y los relacionados con la receptividad de las hembras (raza, edad y categoría, estado fisiológico al momento de la exposición, época del año, grado de desarrollo y estatus nutricional). En todos los casos, la mayor parte de la información ha sido desarrollada en vacas durante el posparto.

## **2.2.4 Factores que afectan la respuesta a la bioestimulación**

### **Factores relacionados al estímulo**

#### ***Animales bioestimuladores***

El efecto positivo de la bioestimulación sobre la actividad cíclica en bovinos ha sido demostrado tanto con la exposición a toros epididictomizados (Fernandez et al. 1993; Berardinelli y Tauck, 2007) como a novillos (Ungerfeld, 2009) o vacas androgenizadas (Burns y Spitzer, 1992). Burns y Spitzer (1992) observaron que el intervalo al primer celo posparto se veía reducido en vacas expuestas a toros o a otras hembras androgenizadas en magnitud similar. Por su parte, Ungerfeld (2009) reportó el efecto positivo de la exposición a novillos androgenizados previo a un entore sobre la tasa de preñez de vaquillonas. De todas formas, algunos autores observaron que el resultado obtenido con vacas androgenizadas es menor que el obtenido con toros (De Souza, 2002), no existiendo información que compare novillos androgenizados y toros. Por tanto, al menos parte de las señales bioestimuladoras sobre la actividad cíclica de las hembras son andrógeno-dependientes.

#### ***Intensidad ó proximidad del estímulo***

La intensidad del estímulo que ejercen los machos, repercute en la respuesta de las hembras. La exposición a los machos alambrado por medio (estímulo visual, químico y auditivo) determinó un adelanto del reinicio de la actividad cíclica en vacas primíparas durante el posparto (Fike et al. 1996). En dicho experimento no fue evaluada la exposición física directa, por lo que no es posible establecer diferencias entre ambas. Por su parte, Berardinelli y Tauck (2007) reportaron que la exposición de vacas primíparas a toros

alambrado por medio, aumentó la proporción de hembras cíclicas a los 14, 21 y 28 días de exposición, pero no hubo diferencias en la cantidad final de vacas cíclicas en relación a las no expuestas. Estos autores también compararon el resultado con la exposición física directa (en el mismo corral, por lo que hay contacto directo), obteniendo una mayor proporción final de hembras cíclicas que las que estaban alambrado por medio. En la misma dirección, Sato et al. (1994) obtuvieron mejores resultados cuando las vacas estaban en contacto con los machos comparado con cuando solamente pudieron ver, oler y escuchar a los toros. Esto significa que las señales transmitidas en el cortejo (táctiles y mayor intensidad que en las otras vías por menor distancia física) tienen importancia y que el estímulo no dependería solamente de las señales químicas.

En vacas lecheras, la respuesta parecería diferir. Shipka y Ellis (1999) no encontraron efecto de la exposición a machos alambrado por medio 2 veces por día, ni del contacto físico directo durante 120 días, sobre el reinicio de la ciclicidad en vacas lecheras multíparas de alta producción. Sin embargo, en dicho experimento la duración del anestro posparto fue menor en las vacas no expuestas a los machos, resultado que no es explicado por los autores (Roelofs et al. 2007). A su vez, la exposición de vacas lecheras durante el posparto a machos alambrado por medio tampoco afectó la expresión comportamental del estro (Shipka y Ellis, 1998; Roelofs et al. 2008). Por su parte, Roelofs et al. (2007) encontraron efectos positivos de la exposición a los machos alambrado por medio sobre la concentración de LH en vacas lecheras posparto, pero en dicho experimento no fue evaluado el reinicio de la ciclicidad ovárica. Es probable que la gran magnitud del balance energético negativo que transcurre en la vaca lechera durante el posparto temprano sea uno de los determinantes de las diferencias halladas en la respuesta a la bioestimulación (Shipka y Ellis, 1998; Roelofs et al. 2007).

A diferencia de la información generada en vacas durante el posparto, en vaquillonas prepúberes no se han evaluado otras posibles vías de transmisión del estímulo (productos excretorios, alambrado por medio). Por lo tanto, tal como se mencionara anteriormente, el resultado final de la exposición a los machos estaría vinculado a la sumatoria de vías por las que las hembras reciben los estímulos, y no sería posible simplificar los mecanismos únicamente a la vía olfativa.

### ***Características y manejo de los machos***

El comportamiento sexual de los machos y el efecto “novedad” influyen en la respuesta al efecto macho en ovinos (Perkins y Fitzgerald, 1994) y caprinos (Delgadillo et al. 2006). La exposición alternada a diferentes machos determina una mayor respuesta en las hembras, como resultado de la intensificación del estímulo que significa el ingreso de los nuevos machos (Cushwa et al. 1992; Hawken y Beard, 2009). En este sentido, Berardinelli et al. (2005) no encontraron diferencias en el reinicio de la actividad cíclica entre vacas expuestas a los mismos machos durante 95 días o aquellas en que se cambiaban los machos a los 35 días posparto. Sin embargo, Miller y Ungerfeld (2008) reportaron que la rotación semanal de los toros durante el

periodo de servicios de vacas posparto determinó una mayor proporción de hembras que reiniciaron la actividad cíclica a partir de las 4 semanas de exposición y una mayor tasa de preñez temprana, en comparación a aquellas vacas que se mantuvieron con los mismos toros durante todo el período. Los diferentes resultados encontrados en ambos experimentos podrían explicarse por el hecho de que en el primero (Berardinelli et al. 2005) los machos fueron rotados una única vez, mientras que en el segundo se realizó una rotación semanal (Miller y Ungerfeld, 2008), lo que permitió intensificar el estímulo en mayor medida.

En ovinos y suinos, la exposición a machos adultos determina que un mayor porcentaje de hembras responda al estímulo que cuando se utilizan machos jóvenes (ovinos: Ungerfeld et al. 2008; suinos: Kirkwood y Hughes, 1981). En ovejas, no se encontraron diferencias en las concentraciones de testosterona (Ungerfeld, 2003) ni en el comportamiento sexual entre carneros adultos y jóvenes (Ungerfeld et al. 2008), por lo que la mayor respuesta a la exposición a los machos adultos se vincularía a otros componentes del estímulo. A diferencia de lo observado en pequeños rumiantes, Cupp et al. (1993) estimularon vacas multíparas y primíparas durante el posparto con toros adultos o jóvenes, obteniendo en ambos casos un adelanto de la ciclicidad respecto a las vacas no expuestas a los machos, pero sin diferencias entre ambos grupos estimulados. Por lo tanto, si bien en bovinos el estímulo sería en parte andrógeno-dependiente, la edad de los machos –al menos en los rangos evaluados- parecería no influir en la respuesta de las hembras.

### ***Duración del estímulo***

La duración de la exposición a los machos es otro de los factores que influyen en la respuesta de las hembras al efecto macho en ovinos (Hawken y Beard, 2009) y caprinos (Rivas-Muñoz et al. 2007). La exposición a los machos en forma intermitente (2 horas cada 3 días, durante 18 días) a partir de los 30 días del parto no tuvo efectos sobre el reinicio de la ciclicidad en relación a las hembras no expuestas (Fernandez et al. 1996). A su vez, en ambos casos la duración del anestro posparto fue mayor que en las vacas expuestas en forma continua a los machos desde el posparto temprano o a partir de los 30 días. Por su parte, Berardinelli y Joshi (2005a) obtuvieron una disminución de la duración del anestro posparto en vacas expuestas a productos excretorios de los machos por 12 horas diarias a partir de los 30 días posparto, en relación a las no expuestas.

Recientemente, Tauck et al. (2010) evaluaron el reinicio de la actividad cíclica en vacas posparto expuestas a machos por 6 ó 12 horas diarias, o no expuestas durante 45 días. Encontraron que la exposición por 6 ó 12 horas redujo la duración del anestro posparto en comparación a las hembras no estimuladas, aunque la proporción acumulada de hembras ciclando a intervalos de 10 días fue mayor en las vacas expuestas por 12 horas que en las expuestas por 6 horas. Por lo tanto, para lograr una respuesta positiva sobre la ciclicidad sería necesario el estímulo diario y continuo de los machos, y existiría una relación negativa entre la duración del estímulo y los

días al reinicio de la ciclicidad. Sin embargo, como ya se mencionara, la exposición diaria durante 24 horas a la orina de toros mediante un sistema dispensador, no tuvo efectos sobre la ciclicidad (Tauck y Berardinelli, 2005; Tauck et al. 2006). Según Tauck et al. (2010) esto implicaría que para obtener una respuesta positiva se deberían alternar periodos de “estimulación” y de “relajación”, como sucedería normalmente al encontrarse hembras y machos juntos. Si bien no es posible descartar dicha hipótesis, como ya se mencionara, es probable que las diferencias en el manejo entre ambos tipos de experimentos (amamantamiento restringido vs libre amamantamiento) y la posibilidad de que la orina no sea el único vehículo por el que son transportadas las feromonas, sean los determinantes principales de la falta de respuesta a la exposición continua a la orina de toros.

En vaquillonas, si bien la mayor parte de los autores reportaron efectos positivos de la bioestimulación sobre el inicio de la ciclicidad ovárica con periodos de exposición más largos (175 días, Roberson et al. 1991; 450 días, Rekwot et al. 2000b; 180 días, Lima et al. 2008; 210 días, Oliveira et al. 2009) que los utilizados en vacas posparto, otros encontraron efectos con tiempos bastante menores de exposición (75 días, Assis et al. 2000; 50 días, Quadros y Lobato, 2004; 15 días, Ungerfeld, 2009). A su vez, en todos los casos la exposición a los machos fue realizada en forma continua, no existiendo de acuerdo a nuestro conocimiento estudios que evalúen la respuesta a la exposición intermitente en vaquillonas prepúberes. De todas formas, existen otros trabajos en los que la bioestimulación tanto por periodos cortos (21 días, Macmillan et al. 1979; 30 días, Berardinelli et al. 1978) como largos (152 días, Roberson et al. 1987) no tuvo efectos sobre el inicio de la actividad cíclica en vaquillonas prepúberes. La inconsistencia de los resultados reportados en vaquillonas, en relación tanto a los efectos de la bioestimulación como a la duración necesaria del estímulo podría estar determinada por la gran influencia que presenta en esta categoría el grado de desarrollo y la nutrición al inicio de la exposición a los machos, factores que serán desarrollados en la siguiente sección.

## **Factores relacionados a la receptividad**

### ***Raza***

Los efectos positivos de la exposición a machos sobre la actividad cíclica han sido reportados tanto en *Bos taurus* como en *Bos indicus*, tanto en vacas durante el posparto (Rekwot et al. 2000a) como en vaquillonas prepúberes (Rekwot et al. 2000b). Resultados positivos de la exposición a machos han sido observados tanto en vacas cebú (Soto Belloso et al. 1997; Bolaños et al. 1998; Rekwot et al. 2000a, 2000b) como en bubalinas (Zicarelli et al. 1997; Ingawale y Dhoble, 2004).

### ***Edad y categoría***

En ovinos, la edad y categoría de las hembras al inicio de la exposición influye en la respuesta al efecto macho, como consecuencia de la

inexperiencia de las ovejas jóvenes y de la necesidad de cierto “aprendizaje” al efecto estimulador de los machos (Chanvallon et al. 2010). Los efectos en vacas durante el posparto han sido principalmente estudiados en vacas primíparas, ya que estas generalmente presentan menores tasas de preñez como consecuencia de los largos intervalos de anestro posparto (Short et al. 1990). En algunos trabajos la duración del intervalo de anestro posparto se redujo como resultado de la exposición a los machos en vacas primíparas, pero no así en multíparas (Gifford et al. 1989; Fike et al. 1996), mientras que otros encontraron respuesta en ambas categorías (Soto-Belloso et al. 1997). Gran parte de estas diferencias serían explicadas por la mayor duración del anestro posparto de las vacas primíparas en relación a las vacas multíparas (Short et al. 1990). Esto determinaría que las vacas de primer parto respondieran más fácilmente al estímulo de los machos, mientras que en las multíparas, que de por sí ya presentarían menos días al reinicio de la ciclicidad, la exposición a los machos no presentaría ningún efecto visible (Gifford et al. 1989; Fike et al. 1996). Por su parte, Macmillan et al. (1979) reportaron efectos positivos de la bioestimulación durante 20 días sobre la actividad cíclica en vacas posparto, pero no en vaquillonas prepúberes. En ovejas, la mayor sensibilidad al estrés cuando hembras jóvenes son enfrentadas a los machos por primera vez influye negativamente en la respuesta (Chanvallon, 2009). En vacas, el agrupamiento de animales extraños es desencadenante de estrés (Veissier et al. 2001), lo que también podría ocurrir cuando las vaquillonas son expuestas por primera vez a machos. Por tanto, la situación de estrés que significaría para las vaquillonas la exposición a los machos, sumado a la influencia del grado de desarrollo al momento de la exposición sobre la respuesta podrían ser las principales causas de las diferencias encontradas en relación a las vacas durante el posparto.

### ***Estado fisiológico al momento de la exposición***

El momento fisiológico en que las hembras son estimuladas determina una mayor o menor capacidad de respuesta a la bioestimulación. A su vez, en bovinos la gran variación en el estado fisiológico entre individuos de un rodeo al momento de introducir los machos, ha sido propuesta como una de las posibles causas por las que existe una importante variabilidad en la respuesta reproductiva (Miller y Ungerfeld, 2008; Ungerfeld, 2007). La exposición de vacas multíparas a toros durante el posparto temprano (desde el día 3 al 85) logró disminuir los días al reinicio de la actividad cíclica en comparación a aquellas que fueron expuestas a partir del día 53 posparto (Zalesky et al. 1984). Sin embargo, Gifford et al. (1989) trabajando con la misma categoría no encontraron diferencias en la exposición temprana (desde el día 3 posparto al día 85) o tardía (55 a 85 días posparto) sobre la duración del anestro posparto. Las diferencias entre ambos experimentos podrían atribuirse a la duración del anestro posparto de las vacas expuestas tardíamente en ambos experimentos, 62 vs 31 días en los experimentos de Zalesky et al. (1984) y Gifford et al. (1989), respectivamente. Esto indicaría que la respuesta positiva a la exposición temprana a los machos se observaría únicamente cuando el periodo de anestro posparto es prolongado –o al menos- mayor a 50 días. En la misma dirección, la exposición de vacas

múltiparas a partir de la primera semana posparto y durante 90 días logró disminuir la duración del anestro posparto en relación a las hembras aisladas (Landaeta-Hernández et al. 2008), pero la exposición a partir de los 33 días posparto no tuvo efectos sobre el reinicio de la ciclicidad (Bonavera et al. 1990).

En vacas primíparas la respuesta positiva a la bioestimulación a lo largo del anestro posparto es más uniforme. Si bien con la exposición temprana los días al reinicio de la ciclicidad disminuyeron en comparación a aquellas expuestas tardíamente (Gifford et al. 1989), Fernandez et al. (1993) no reportaron diferencias en la duración del anestro posparto entre vacas expuestas continuamente a los machos, expuestas durante los primeros 30 o a partir de los 30 días posparto. A su vez, en los 3 grupos resultó menor al de las vacas que nunca tuvieron contacto con los machos. En forma similar, Berardinelli y Joshi (2005b) tampoco encontraron diferencias en la duración del anestro posparto entre vacas primíparas expuestas a los machos a partir del día 15, 35 ó 55 posparto. Si bien el intervalo desde el comienzo de la exposición hasta el reinicio de la actividad cíclica fue menor para las vacas expuestas a partir del día 55 que para aquellas expuestas a partir del día 15, el intervalo final entre el parto y el inicio de la ciclicidad resultó similar. Por tanto, en vacas primíparas la respuesta positiva a la bioestimulación sería más rápida a medida que aumenta el tiempo posparto, lo que indica que de alguna manera las hembras se volverían progresivamente más sensibles al estímulo de los machos.

La explicación de la variabilidad de resultados podría estar dada por uno o varios de los eventos fisiológicos ligados al reinicio de la ciclicidad ovárica en la vaca durante el posparto: disminución de la retroalimentación negativa del estradiol sobre el hipotálamo, atenuación del efecto negativo del vínculo materno-filial y/o alguna otra vía neuroendócrina (Rekwot et al. 2001; Berardinelli y Joshi, 2005b). Durante el posparto temprano, el metabolismo de la hembra transcurre por un periodo de balance energético negativo (BEN), determinado porque los altos requerimientos nutricionales (fundamentalmente para la producción de leche) no son acompañados por un aumento similar del consumo de alimento (Short et al. 1990; Montiel y Ahuja, 2005). En estas condiciones la reproducción es una de las funciones que más se ve afectada, lo que lleva a que la duración del anestro posparto se encuentre relacionado a la continuación y severidad del BEN (Short et al. 1990). A su vez, las características del BEN estarán determinadas fundamentalmente por las reservas energéticas con las que la vaca llegue al parto, por el amamantamiento y por la categoría animal (Short y Adams, 1988). En general, cuando el primer parto se produce a los 2 años de edad, la severidad y duración del BEN en estas vacas primíparas es mayor que en las múltiparas, ya que a los requerimientos para la producción de leche se le suman aquellos necesarios para finalizar su crecimiento (Rovira, 1996). Al analizar la información presentada, se observa que las vacas primíparas potencialmente responderían a la bioestimulación durante todo el posparto, mientras que en las múltiparas los resultados positivos se obtendrían en un periodo de tiempo más acotado y variable según las características individuales. Por tanto, en las vacas múltiparas que presentan largos

periodos de anestro posparto (mayores a 50 días) la exposición temprana tendrá efectos positivos (Zalesky et al. 1984; Landaeta-Hernandez et al. 2008), pero la exposición tardía ó en animales con cortos periodos de anestro, no determinará diferencias ya que en esas situaciones la cantidad de animales ciclando en forma espontánea enmascararía una posible respuesta al estímulo (Gifford et al. 1989; Bonavera et al. 1990). En el caso de las vacas primíparas, que de por sí presentan un reinicio de la ciclicidad más tardío que las multíparas, la respuesta positiva a la exposición a los machos es más uniforme independientemente del momento de la exposición, pero como se mencionara anteriormente, la respuesta será más rápida a medida que transcurre el periodo después del parto.

### ***Época del año***

Otro factor que parece influir sobre la respuesta es el momento del año en que los animales son estimulados. MacMillan et al. (1979) encontraron efectos positivos de la exposición de vacas posparto a toros durante la primavera pero no en el invierno. En forma similar, la duración del anestro posparto disminuyó con la exposición de vacas multíparas a toros durante la primavera-verano, pero no en invierno (Alberio et al. 1987; Agabriel et al. 2004). Los resultados fueron atribuidos a las diferencias en la disponibilidad de alimento (Agabriel et al. 2004), que determinaron ganancias de peso en las vacas expuestas durante la primavera y pérdidas de peso en aquellas expuestas en el invierno, lo que habría afectado la respuesta a la bioestimulación en estas últimas (Alberio et al. 1987). A su vez, la exposición a los machos durante la primavera fue realizada a partir de los 60 días posparto, mientras que en el invierno se comenzó a los 10 días del parto (Alberio et al. 1987). Según los autores, esta diferencia habría sido el factor decisivo que determinó la falta de efectos durante el invierno, ya que la exposición tan temprana podría haber afectado la respuesta a la bioestimulación por encontrarse el eje neuroendócrino aún inhibido y por la falta de aislamiento previo de los machos. Se debe considerar que durante el invierno, a pesar de las pérdidas de peso registradas, las vacas presentaron intervalos parto-ovulación cortos (53,2 vs 36,6 días en las vacas expuestas y no expuestas a los machos, respectivamente; Alberio et al. 1987). Por tanto, como fuera discutido anteriormente, otra de las posibles causas de la falta de respuesta a la bioestimulación durante el posparto temprano en invierno pudo haber sido el corto intervalo de anestro que presentaron los animales, y que por tanto no fuera posible acortarlo aún más con estímulos externos.

### ***Grado de desarrollo y estatus nutricional***

Como ya se mencionó, el grado de desarrollo, el estatus nutricional, y las tasas de ganancia, tienen una relación directa con la edad a la pubertad en vaquillonas de carne (Wiltbank et al. 1969; Short y Bellows, 1971; Quintans et al. 2004), y las tres parecerían estar relacionadas con la respuesta a la bioestimulación. El tiempo de exposición necesario para obtener una respuesta positiva estaría relacionado al grado de desarrollo de las hembras al inicio de la exposición. Una mayor cantidad de vaquillonas de 25,5 meses que de 23,5 meses comenzó a ciclar tras ser expuestas a toros durante 50

días (Quadros y Lobato, 2004). Más aún, en vaquillonas de menor edad al inicio de la exposición, fue necesaria una exposición a machos más prolongada para lograr efectos positivos sobre la ciclicidad (Roberson et al. 1991; Oliveira et al. 2009). Rekwot et al. (2000b) encontraron que vaquillonas criadas en grupos mixtos, alcanzaron la pubertad a menores edades y menores pesos vivos que aquellas que se mantuvieron aisladas de los machos. Por su parte, Roberson et al. (1991) reportaron que las vaquillonas que exhibieron altas tasas de ganancias durante la exposición a los machos iniciaron antes la actividad cíclica, que aquellas que tuvieron tasas de ganancias medias. Por su parte, Oliveira et al. (2009) obtuvieron un efecto positivo de una larga exposición (210 días) a los machos sobre el inicio de la actividad cíclica en vaquillonas prepúberes de 12 meses, pero no de la suplementación diferencial. Sin embargo, las vaquillonas bioestimuladas presentaron un mayor peso vivo final, y este se correlacionó positivamente con la edad a la pubertad.

En vacas posparto, el estatus nutricional influye sobre el reinicio de la actividad cíclica (Orcasberro, 1991; Montiel y Ahuja, 2005) y sobre la respuesta a la bioestimulación. Monje et al. (1992) evaluaron los efectos de suplementar con dos niveles energéticos a partir de los 12 días posparto (30% más y 30% menos de los requerimientos energéticos) y de la exposición a los machos durante 80 días desde el día 30 posparto, encontrando una relación positiva entre el nivel nutricional de vacas multíparas y la respuesta a la exposición a los machos. Las vacas con alto nivel nutricional expuestas a los machos presentaron una mayor concentración en la ovulación y una menor variabilidad en el inicio de la ciclicidad en relación a las vacas expuestas pero sometidas a una restricción alimenticia y a aquellas con alto y bajo nivel nutricional no expuestas a los machos. A su vez, entre ambos grupos de vacas sometidas a restricción alimenticia, las hembras no expuestas a los machos presentaron menores días al reinicio de la ciclicidad que aquellas expuestas. Los autores atribuyeron dicha diferencia al hecho de que las vacas no expuestas y restringidas, al momento de juntarse todos los grupos (110 días posparto) mejoraron su estado nutricional y respondieron positivamente a la exposición a los machos que también se realizó al juntar los animales. En forma opuesta, las vacas restringidas y expuestas a los machos desde el día 30 posparto se habrían acostumbrado a la presencia de los machos, lo que llevó a que no hubiera respuesta a pesar de que también mejoraron su estado nutricional desde el momento de juntarse ambos grupos (Monje et al. 1992).

En la misma dirección, cuando se evaluó el efecto de la suplementación energética posparto sobre la respuesta a la bioestimulación en vacas cebú multíparas durante 180 días, se observó un efecto sinérgico positivo de la suplementación y la exposición a machos sobre la duración del anestro posparto (Rekwot et al. 2004). Por su parte, Stumpf et al. (1992) evaluaron los efectos de la condición corporal (CC) de vacas multíparas al parto sobre la respuesta a la exposición de los machos durante el posparto, y encontraron que las vacas con CC moderada (4,9 puntos o unidades en escala de 1 a 10) al parto fueron más sensibles al estímulo que aquellas con

una CC alta (5,9 unidades). En forma similar, Madrigal et al. (2001) encontraron una interacción significativa entre la CC y la bioestimulación sobre el reinicio de la ciclicidad y la tasa de preñez en vacas posparto, que resultó más marcada en los animales de menor CC al parto. Por su parte, Landaeta-Hernández et al. (2008) encontraron que vacas multíparas con CC alta (4,8 unidades) expuestas a toros desde la primera semana posparto presentaron menores días al reinicio de la ciclicidad ovárica que las no expuestas (38 vs 51 días, respectivamente). Sin embargo, se debe considerar que la CC de las vacas en este último experimento fue similar al que presentaban las vacas de menor CC en los estudios mencionados anteriormente (Stumpf et al. 1992; Madrigal et al. 2001).

Considerando todo lo anteriormente planteado, la nutrición y el grado de desarrollo serían dos de los principales factores que influirían sobre la respuesta a la bioestimulación en vacas y vaquillonas de carne. En vaquillonas prepúberes, el grado de desarrollo al inicio de la exposición y las tasas de ganancias posteriores tendrían una relación directa con la respuesta al estímulo (Roberson et al. 1991; Rekwot et al. 2000b; Quadros y Lobato, 2004), si bien en otros casos no hubo relación entre ambos (Oliveira et al. 2009). En vacas posparto, como ya fuera mencionado, si el estatus nutricional al inicio de la exposición es muy bueno los animales ya despliegan su máxima potencialidad reproductiva, por lo que la duración del anestro posparto será corta independientemente o no de la exposición a los machos (Stumpf et al. 1992; Madrigal et al. 2001). En el otro extremo, en las vacas con CC muy baja tampoco se encontrarán efectos debido al muy bajo estatus nutricional (Monje et al. 1992). Por tanto, parece necesario que las hembras presenten un estatus nutricional moderado para lograr una respuesta positiva a la bioestimulación. A su vez, en condiciones pastoriles extensivas, debido a la gran variación del estatus nutricional entre individuos, estos factores adquieren aún mayor relevancia.

### 3. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

La edad a la pubertad representa uno de los principales factores que afectan la eficiencia reproductiva de las hembras, especialmente en sistemas de cría estacionales (Ferrel, 1982). En Uruguay, vaquillonas cruzas británicas (Hereford x Aberdeen Angus) manejadas en condiciones pastoriles extensivas, alcanzan la pubertad entre los 15 y 17 meses de edad si los pesos vivos se encuentran entre los 278 y 295 kg (Quintans et al. 2004; Quintans et al. 2007). Como consecuencia, la elevada edad al primer entore de las vaquillonas representa uno de los factores principales que determinan la baja eficiencia de los rodeos de cría en Uruguay. A su vez, si bien ha existido un incremento paulatino, históricamente el sector criador se caracteriza por una baja aplicación por parte de los productores de las estrategias destinadas a la mejora de la eficiencia reproductiva (Pereira, 2003).

Dentro de estas estrategias, los manejos hormonales representan la tecnología de mayor difusión y de resultados más consistentes para disminuir la edad a la pubertad, y por lo tanto aumentar la productividad del sistema. Sin embargo, la creciente preocupación a nivel mundial por una producción “limpia, verde y ética” (“clean, green and ethical”; Martin et al. 2004, 2009), determina la importancia de generar información para el desarrollo de alternativas que permitan incrementar el resultado reproductivo sin la administración de hormonas exógenas. En este sentido es importante considerar que tanto la Unión Europea, como los Estados Unidos y Australia no autorizan la aplicación de esteroides en los manejos reproductivos. Por lo tanto, la utilización de estrategias de manejo reproductivo libres de hormonas potencialmente permitirá acceder a mercados que en el futuro realicen pagos diferenciales, o que directamente no importen productos de países en que los animales hubieran recibido tratamientos con dichas hormonas.

En este marco, los estímulos socio-sexuales, como la bioestimulación, aparecen como una alternativa de creciente interés por su facilidad de aplicación, bajos costos y ausencia de efectos adversos. Las respuestas positivas de la bioestimulación sobre el inicio de la pubertad han sido documentadas en una variedad de especies, por lo que en la presente tesis se plantea como objetivos principales evaluar los efectos de la exposición de vaquillonas en anestro a novillos androgenizados (NA) sobre el inicio de la actividad cíclica, en condiciones pastoriles extensivas, y determinar algunos de los factores involucrados en la respuesta.

## **4. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN**

### **Procedimientos experimentales**

Para cumplir con los objetivos mencionados, se plantearon tres experimentos. En el Experimento I se estudió el efecto de la exposición de vaquillonas prepúberes a NA sobre el momento de inicio de la pubertad, y la variación de la respuesta según la proximidad física entre macho-hembra y el peso corporal inicial de las hembras. A partir de los resultados obtenidos en el primer experimento, en el Experimento II se estudió el comportamiento de machos y hembras al encontrarse en forma simultánea un NA con 2 vaquillonas de diferente rango de peso vivo, y si las diferencias eran debidas a las características de las hembras o a la competencia entre hembras de ambos rangos de pesos. Finalmente, en el Experimento III se evaluaron los efectos de una estimulación con NA en forma previa a la aplicación de un protocolo de sincronización de celos (PSC) e inseminación artificial (IA), sobre el inicio de la ciclicidad, el porcentaje de celos y la tasa de preñez en vaquillonas en anestro.

### **Definiciones**

*Pubertad*: inicio del primer ciclo estral en vaquillonas.

*Anestro*: ausencia de ciclo estral en animales pospuberales.

*Inicio de la actividad cíclica*: inicio de ciclo estral, tanto en la pubertad como al finalizar un periodo de anestro.

## 5. EXPERIMENTO I (Publicación I)

### 5.1 INTRODUCCIÓN

El efecto positivo de la bioestimulación sobre la actividad cíclica en vaquillonas prepúberes en condiciones de manejo extensivo ha sido demostrado con la utilización de toros vasectomizados (Quadros y Lobato, 2004; Oliveira et al. 2009). Por su parte, Ungerfeld (2009) reportó el efecto positivo de la exposición a NA durante 15 días previo a un entore sobre la tasa de preñez de vaquillonas pospuberales. Sin embargo, hasta el momento no existen estudios que evalúen los efectos de la bioestimulación con NA en vaquillonas de carne prepúberes.

La intensidad del estímulo que ejercen los machos ha mostrado influir en la respuesta de las hembras a la bioestimulación. La exposición alambrado por medio a toros determinó un menor intervalo al reinicio de la actividad cíclica en vacas de carne durante el posparto en comparación a las hembras que se mantuvieron aisladas de los machos (Fike et al. 1996; Berardinelli y Tauck, 2007), pero sus efectos positivos fueron menores que los observados con la exposición física directa a los machos (Sato et al. 1994; Berardinelli y Tauck, 2007). A su vez, el grado de contacto físico entre machos y hembras, evaluado en forma individual podría influir en la respuesta a la bioestimulación. En este sentido, Alvarez et al. (2003) observaron una relación negativa entre la proximidad física entre machos y hembras y el intervalo a la primera ovulación y a la concepción, en cabras expuestas a machos cabríos durante 30 días. Los autores atribuyeron dicho efecto al hecho de que las cabras que tuvieron mayor contacto con los machos fueron más estimuladas, lo que habría determinado la respuesta más rápida de las mismas a la bioestimulación. En un estudio complementario Alvarez et al. (2007) reportaron que el porcentaje de cabras que ovula como respuesta al efecto macho está directamente vinculado a la distancia a los machos. En vacas no existe información de los posibles efectos de la proximidad entre individuos de ambos sexos y la respuesta a la bioestimulación.

Como fuera discutido anteriormente, el grado de desarrollo, las tasas de ganancia diarias y el estatus nutricional, tienen una relación directa con la edad a la pubertad en vaquillonas de carne (Wiltbank et al. 1969; Short y Bellows, 1971; Quintans et al. 2004), y las tres han mostrado influir en la respuesta a la bioestimulación tanto en vaquillonas (Roberson et al. 1991; Oliveira et al. 2009) como en vacas durante el posparto (Monje et al. 1992; Stumpf et al. 1992; Madrugal et al. 2001; Rekwot et al. 2004). Las vaquillonas expuestas a los machos y con mayores ganancias diarias de peso durante la exposición presentaron una menor edad a la pubertad que aquellas hembras con menores ganancias de peso (Roberson et al. 1991). A su vez, vaquillonas expuestas a machos presentaron mayores pesos vivos finales que aquellas que se mantuvieron aisladas, y dicho peso vivo final se correlacionó positivamente con la edad a la pubertad (Oliveira et al. 2009). Por otra parte, tanto en ovejas (Wright et al. 1990) como en cabras (Véliz et al. 2006) se ha reportado una relación positiva entre el peso corporal de las hembras y la respuesta a la exposición a los machos, pero no existe

información de la relación existente entre el peso inicial de las vaquillonas y la respuesta a la bioestimulación.

Las hipótesis planteadas en el presente experimento fueron: 1) la exposición de vaquillonas prepúberes a NA determina un adelanto en el inicio de la ciclicidad en relación a las vaquillonas que se mantienen aisladas de los machos y 2) la proximidad física entre machos y hembras y el peso vivo de las vaquillonas al inicio de la exposición influyen en la respuesta a la bioestimulación. Por lo tanto, el objetivo principal del presente experimento fue determinar si la exposición de vaquillonas prepúberes de 12 meses de edad a NA por 35 días permite disminuir la edad al inicio de la actividad cíclica. En forma complementaria se planteó determinar si: 1) la proximidad física entre machos y hembras influye en la respuesta a la bioestimulación y 2) si existe una relación entre el peso vivo de las vaquillonas al inicio de la exposición y la respuesta a la bioestimulación.

## **5.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### *Localización, animales y manejo*

El experimento fue realizado de Octubre a Diciembre del 2007 en la Unidad Experimental "Palo a Pique" de INIA Treinta y Tres, con 131 vaquillonas cruza Aberdeen Angus X Hereford de  $12,1 \pm 3,4$  meses de edad (rango: 11,0 a 14,2 meses) y  $226,0 \pm 28,2$  kg (rango: 168,5 a 300,0 kg) (media  $\pm$  DE), y 8 NA. Las vaquillonas no tuvieron contacto con machos desde el destete, el cual fue realizado a los 5 meses de edad. El Día 0 (ingreso de los NA al grupo expuesto) las vaquillonas fueron asignadas a dos tratamientos homogéneos, bloqueados de acuerdo al peso vivo y edad: 1) Expuestas: expuestas a NA por 35 días (GE, n = 66), y 2) Control: aisladas de los machos (GC, n = 65). Ambos grupos de hembras pastorearon en 2 potreros de campo natural, separados por una distancia mínima de 1000 m, de manera que las vaquillonas del grupo GC no podían ver ni oler a los novillos. El Día 35 se retiraron los NA y ambos grupos de vaquillonas pasaron a manejarse en conjunto por una semana (Día 35 a Día 42). El manejo conjunto fue realizado en el potrero donde inicialmente se encontraban las hembras del GC, de manera de evitar un posible efecto de la pastura.

La androgenización de los novillos se realizó mediante la administración semanal de propionato de testosterona (800 mg im, Testosterona Ultra Fuerte, Dispert, Montevideo, Uruguay). Al Día -7 se comenzó el tratamiento de los primeros 4 novillos, los cuales fueron mantenidos con las hembras hasta el Día 14, momento en que se retiraron y fueron reemplazados por otros 4 novillos igualmente tratados desde el Día 7. Durante el transcurso del período de exposición, los 8 NA utilizados demostraron comportamiento sexual masculino.

### *Edad-respuesta a la bioestimulación*

Para el análisis de los datos, en forma posterior las vaquillonas fueron estratificadas según la edad al inicio del ensayo en 3 categorías: jóvenes,

aquellas que se encontraban entre 336 y 388 días (GE-J, n = 19; GC-J, n = 22), medianas, entre 389 y 402 días (GE-m, n = 22; GC-m, n = 19), y mayores las que se encontraban entre 402 y 433 días de edad (GE-M, n = 21; GC-M, n = 19).

#### *Peso vivo-respuesta a la bioestimulación*

Las vaquillonas fueron pesadas semanalmente desde el Día 0 al Día 42. Para el análisis de los datos, las hembras se categorizaron de acuerdo a su peso vivo inicial en terciles: peso bajo (PB) las hembras que pesaban entre 168 y 211 kg (GE-PB, n = 22; GC-PB, n = 22), peso medio (PM) entre 212 y 236 kg (GE-PM, n = 24; GC-PM, n = 22) y peso alto (PA) desde 237 a 302 kg (GE-PA, n = 20; GC-PA, n = 21).

#### *Determinación de la actividad cíclica*

La detección de celos fue realizada en ambos grupos 2 veces por día durante 40 minutos por 2 observadores, a lo largo de los 42 días del experimento. Se realizó ultrasonografía ovárica semanal en todas las vaquillonas para determinar la presencia de cuerpo lúteo (CL) desde el Día -14 al Día 42, utilizando un ecógrafo Aloka 500 (Aloka, Tokyo, Japón) equipado con una sonda lineal de 5,0 MHz. Se consideró que una hembra había comenzado su actividad cíclica el día de la detección de celo y posterior visualización de un CL, o el día de la primera de 2 ecografías sucesivas en que un CL era observado en el mismo ovario.

#### *Índice de Asociación (IAS)*

El índice de asociación (IAS) (Martin y Bateson, 1993) entre cada vaquillona expuesta con los NA fue calculado para determinar la relación entre la proximidad macho-hembra con el hecho que las vaquillonas comenzaran ó no su actividad cíclica. Para ello, se registró la distancia de las hembras a cada uno de los NA cada 10 minutos, durante 4 horas (9:00 a 11:00, y 16:00 a 18:00), 3 veces por semana desde el Día 0 al Día 35. Un IAS de 1 correspondió a vaquillonas que se encontraban a < 1 cuerpo de distancia de los novillos, 0,33 si se encontraban entre 1 y 3 cuerpos de distancia, y 0 cuando se encontraban más allá de 3 cuerpos de distancia. El IAS diario de cada vaquillona fue calculado como el promedio de sus registros, mientras que el IAS total fue determinado como el IAS medio considerando únicamente los registros previos al inicio de la ciclicidad de cada vaquillona.

#### *Análisis estadístico*

La proporción acumulada de vaquillonas ciclando, para cada rango de peso y de edad inicial, fue determinada a intervalos de 7 días y comparada mediante test de chi-cuadrado. La edad a la pubertad fue comparada mediante test t de Student. Los pesos iniciales, finales y las ganancias de peso diarias fueron comparadas mediante ANOVA de 2 vías (3 x 2), considerando como efectos principales el grupo (GE vs GC) y los 3 rangos de pesos inicial (PB, PM y PA). Los IAS fueron analizados por ANOVA, en

forma posterior a la aplicación de la transformación de Bliss ( $\text{Arcoseno}\sqrt{x}$ ). El análisis pos hoc fue realizado mediante LSD (mínima diferencia significativa).

### 5.3 RESULTADOS

#### *Inicio de la actividad cíclica*

Ninguna de las vaquillonas utilizadas presentó un CL al inicio del experimento (Día 0). La proporción acumulada de hembras que comenzaron a ciclar fue mayor para el GE que para el GC a partir del Día 21 (10/66 vs 2/65, GE y GC, respectivamente) del periodo de exposición (Figura 1). Al final del periodo de exposición, mayor cantidad de vaquillonas GE que GC alcanzaron la pubertad (16/66 vs 2/65;  $P < 0,001$ ). El intervalo desde el inicio de la exposición y el comienzo de la ciclicidad, en las vaquillonas que alcanzaron la pubertad a lo largo de los 42 días del experimento, fue de  $23 \pm 14$  y  $34 \pm 13,2$  días en GE y GC, respectivamente ( $P = 0,02$ )

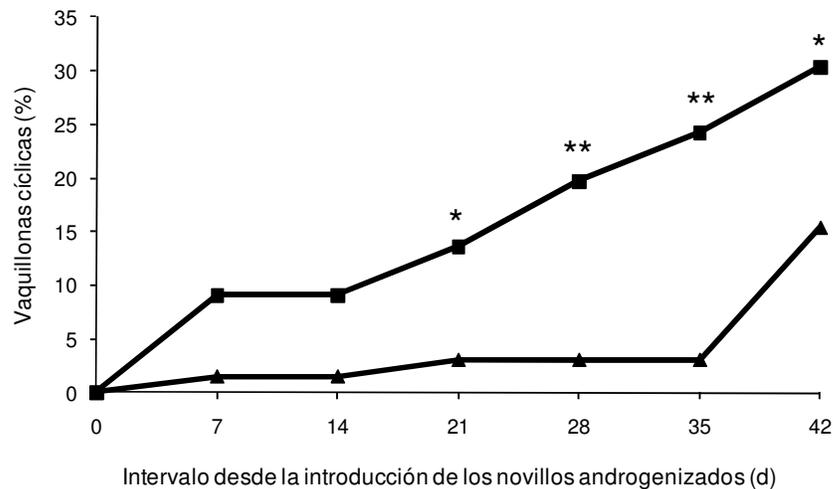


Figura 1. Proporción acumulada de vaquillonas cíclicas a intervalos de 7 días durante el período experimental. Grupo Expuesto (-■-): vaquillonas expuestas a novillos androgenizados desde el Día 0 al Día 35; Grupo Control (-▲-): vaquillonas aisladas de machos durante todo el período experimental. El Día 35 se retiraron los novillos androgenizados y todas las vaquillonas se manejaron en forma conjunta por una semana.

\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ .

La edad a la pubertad de aquellas vaquillonas que comenzaron la actividad cíclica al final del experimento (D42; 19/66 vs 9/65, GE y GC, respectivamente) tendió a ser menor en el GE que en el GC ( $428,4 \pm 21,5$  vs  $441,1 \pm 16,6$ ;  $P = 0,06$ ).

El peso vivo inicial (PI), ganancia diaria de peso (GDP), y peso vivo final (PF) en ambos tratamientos y según el rango de PI, se presentan en la Tabla I. Se encontró un efecto significativo del grupo sobre la GDP, pero únicamente en el rango de pesos medios, en el que las vaquillonas GE-PM presentaron mayores GDP ( $P < 0,05$ ) durante el período experimental que el GC-PM.

Tabla I. Peso inicial (PI), Ganancia diaria de peso (GDP) y Peso final (PF) (media  $\pm$  DE) entre las vaquillonas Expuestas (GE) y Aisladas (GC) de los novillos androgenizados, para los 3 rangos de peso inicial. PB: Peso Bajo (168-211 kg; n = 44); PM: Peso Medio (212-236 kg; n = 46); PA: Peso Alto (237-302 kg; n = 41).

	Grupo (n)	PI (kg)	GDP (kg/d)	PF (kg)
PB	GE (22)	196,7 $\pm$ 12,2	0,91 $\pm$ 0,15	241,3 $\pm$ 17,0
	GC (22)	199,0 $\pm$ 10,2	0,86 $\pm$ 0,17	241,3 $\pm$ 13,4
PM	GE (24)	223,2 $\pm$ 8,1	0,95 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	270,0 $\pm$ 9,0
	GC (22)	223,2 $\pm$ 7,4	0,87 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	266,0 $\pm$ 9,2
PA	GE (20)	260,0 $\pm$ 19,5	0,95 $\pm$ 0,19	306,3 $\pm$ 19,2
	GC (21)	259,0 $\pm$ 19,0	0,89 $\pm$ 0,20	302,5 $\pm$ 23,5

*a vs b:  $P < 0,05$  en cada rango de peso inicial*

La proporción acumulada de vaquillonas cíclicas para los 3 rangos de peso vivo se presentan en la Figura 2. Dentro del grupo PA, una mayor proporción de vaquillonas GE que GC alcanzaron la pubertad ( $P = 0,002$ ; 11/20 vs 2/21). Una mayor proporción de vaquillonas GE-PA que GC-PA comenzaron a ciclar en los Días 21 (8/20 vs 2/21), 28 (10/20 vs 2/21), 35 (11/20 vs 2/21) y 42 (14/20 vs 7/21) ( $P < 0,05$ ; Figura 2A). No hubo diferencias en la proporción de vaquillonas GE y GC, de los rangos medios y bajos de PI, que alcanzaron la pubertad durante el experimento (Figuras 2B y 2C).

Ninguna de las vaquillonas del grupo GC-J comenzó a ciclar al final del experimento (Figura 3A). Una mayor proporción de vaquillonas GE-J en comparación a GC-J comenzaron su actividad cíclica a partir del Día 28 hasta el final del experimento ( $P < 0,05$ ; Figura 3A). En el grupo de vaquillonas medianas, mayor proporción de GE-m tendieron a iniciar la ciclicidad al final de la exposición (Día 35) en relación a las GC-m ( $P = 0,05$ ; Figura 3B). A su vez, las vaquillonas GE-M tendieron a comenzar a ciclar antes que las GC-M en los Días 7 y 14 ( $P = 0,087$ ; Figura 3C).

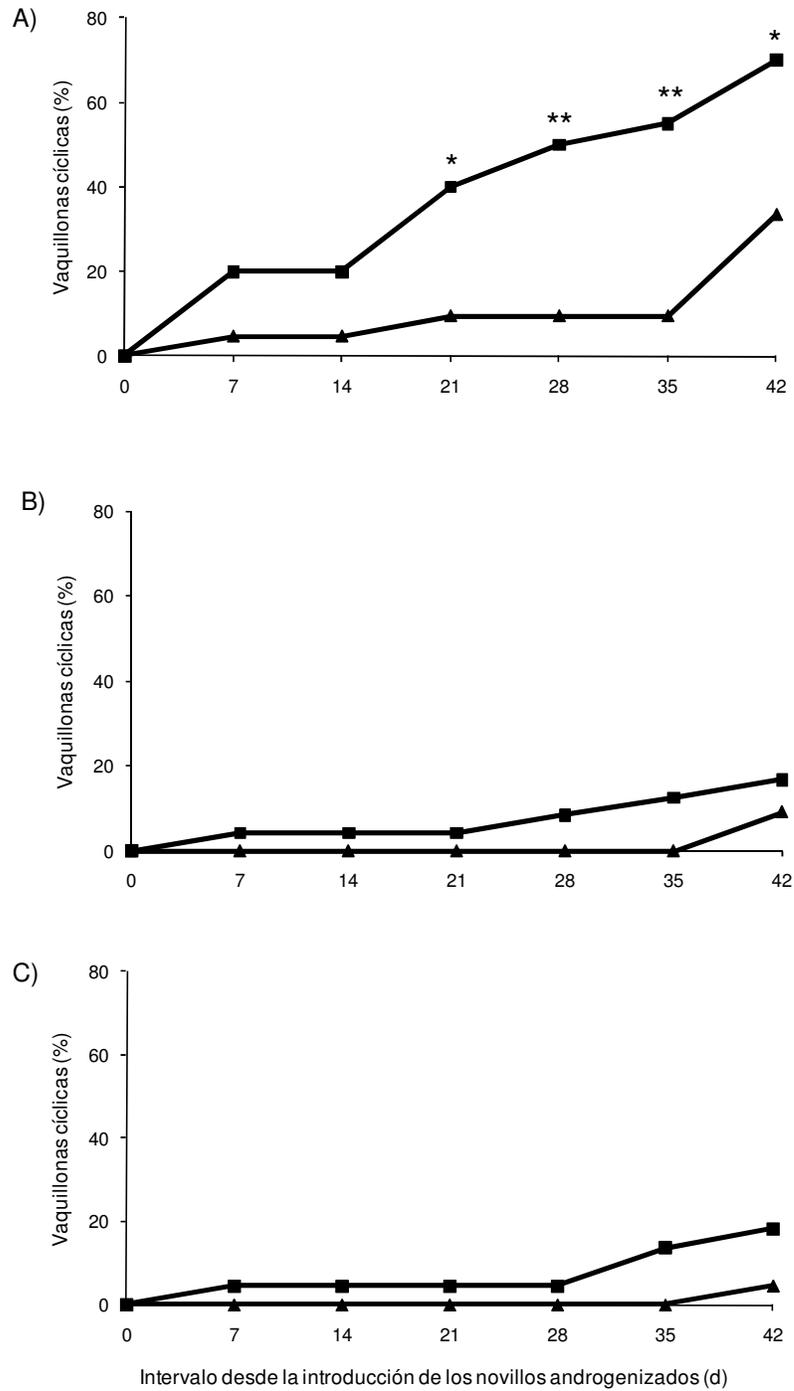


Figura 2. Proporción acumulada de vaquillonas cíclicas a intervalos de 7 días en los 3 rangos de pesos iniciales: A) 237-302 kg; B) 212-236 kg; C) 168-211 kg. Grupo Expuesto (-■-): vaquillonas expuestas a novillos androgenizados desde el Día 0 a Día 35; Grupo Control (-▲-): vaquillonas aisladas de machos durante todo el período experimental. El Día 35 se retiraron los novillos androgenizados y todas las vaquillonas se manejaron en forma conjunta por una semana.

\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ .

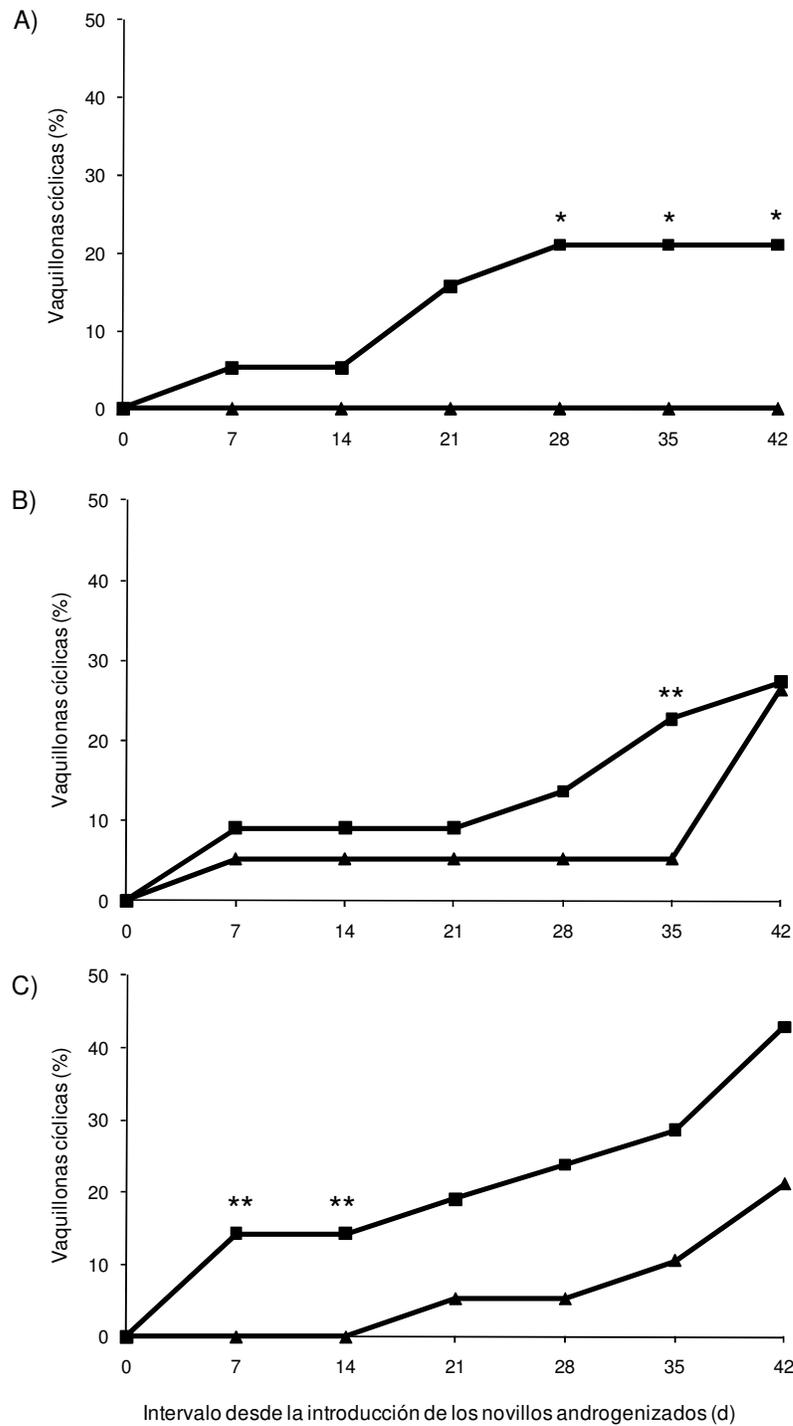


Figura 3. Proporción acumulada de vaquillonas cíclicas a intervalos de 7 días según la edad al inicio del experimento: A) 336-388 d; B) 389-402 d; C) 402-433 d. Grupo Expuesto (-■-): vaquillonas expuestas a novillos androgenizados desde el Día 0 a Día 35; Grupo Control (-▲-): vaquillonas aisladas de machos durante todo el período experimental. El Día 35 se retiraron los novillos androgenizados y todas las vaquillonas se manejan en forma conjunta por una semana.

\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $0,05 < P < 0,09$

### Índice de Asociación

Los IAS para los 3 rangos de peso vivo inicial y entre las vaquillonas GE que alcanzaron la pubertad y aquellas que se mantuvieron en anestro, se presentan en la Tabla II. Existió un efecto significativo del rango de PI sobre el IAS: las vaquillonas de PA presentaron mayores IAS que las PM y que las PB ( $P < 0,05$ ), sin diferencias entre PM y PB. Las vaquillonas que iniciaron la actividad cíclica durante la exposición presentaron mayor IAS que aquellas que no lo hicieron ( $P < 0,05$ ). A su vez, al comparar dentro de cada rango de pesos, se encontraron diferencias significativas entre vaquillonas que alcanzaron la pubertad y aquellas que no lo hicieron en PM ( $P < 0,01$ ), mientras que se observó una tendencia en el grupo PA ( $P = 0,09$ ). No hubo diferencias en el IAS de las vaquillonas que comenzaron a ciclar, para ninguno de los rangos de PI.

Tabla II. Índice de asociación (IAS) (media  $\pm$  DE) en las vaquillonas expuestas a los machos que iniciaron (SI) ó no (NO) la actividad cíclica a lo largo del período experimental para los 3 rangos de peso inicial (Rango PI), e IAS Total para cada rango de peso y grupo de ciclicidad (IAS Total). PB: Peso Bajo (168-211 kg; n = 44); PM: Peso Medio (212-236 kg; n = 46); PA: Peso Alto (237-302 kg; n = 41).

Rango PI (kg) <sup>1</sup>	Actividad cíclica <sup>1</sup>		IAS Total <sup>3</sup>
	SI	NO	
PB (22)	0,06 $\pm$ 0,04 (4) <sup>x</sup>	0,06 $\pm$ 0,03 (18) <sup>x</sup>	0,06 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
PM (24)	0,09 $\pm$ 0,05 (7) <sup>x</sup>	0,05 $\pm$ 0,02 (17) <sup>y</sup>	0,06 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
PA (20)	0,12 $\pm$ 0,10 (15) <sup>x</sup>	0,06 $\pm$ 0,02 (5) <sup>z</sup>	0,10 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>
IAS Total	0,10 $\pm$ 0,09 (26) <sup>x</sup>	0,06 $\pm$ 0,02 (40) <sup>y</sup>	

<sup>1</sup> Números entre paréntesis indican las vaquillonas en cada categoría

<sup>2</sup> Diferentes letras en la misma fila representan: x vs y:  $P < 0,05$ ; x vs z:  $P = 0,09$

<sup>3</sup> Diferentes letras en la misma columna representan diferencias significativas; a vs b:  $P < 0,05$

## 5.4 DISCUSIÓN

El grupo de vaquillonas expuestas a los NA presentó menos días al inicio de la ciclicidad y una mayor proporción de animales ciclando al final del período de exposición, en comparación a las hembras que se mantuvieron aisladas de los machos. Estos resultados coinciden con los reportados por otros autores que trabajaron con toros vasectomizados y vaquillonas de diferentes pesos iniciales, edades y bajo otras condiciones de manejos (Roberson et al. 1991; Izard y Vandenberg, 1982a; Quadros y Lobato, 2004). En el presente experimento ambos grupos de hembras se mantuvieron pastoreando campo natural durante todo el experimento, fueron más jóvenes que las utilizadas por Quadros y Lobato (2004), y mayores que las de Izard y Vandenberg (1982a) y Roberson et al. (1991). A su vez, presentaban menores pesos vivos iniciales que en los tres estudios mencionados. Por lo tanto, la bioestimulación resultaría eficaz para lograr el adelanto de la pubertad en vaquillonas de distintas características y bajo diferentes condiciones de manejo.

Las diferencias halladas en el inicio de la actividad cíclica entre las vaquillonas GE y GC comenzaron a observarse a las 3 semanas de iniciado el periodo de exposición. En contraposición, otros autores no encontraron efecto de la bioestimulación en el inicio de la pubertad de vaquillonas de carne, tanto con periodos cortos (21 días, Macmillan et al. 1979; 30 días, Berardinelli et al. 1978) así como largos (152 días, Roberson et al. 1987) de exposición. Nuestros resultados confirman la hipótesis de que, en vaquillonas, se necesitarían periodos de tiempo más prolongados para obtener una respuesta positiva que los observados en ovejas y cabras (ver revisiones: Walkden-Brown et al. 1999; Ungerfeld, 2007). A pesar de ello, en el presente experimento la respuesta positiva a la bioestimulación se obtuvo en forma más rápida que la reportada en otros estudios (Roberson et al. 1991; Oliveira et al. 2009). Las diferencias mencionadas podrían deberse a que al comienzo del experimento las vaquillonas que respondieron positivamente a la bioestimulación estarían más próximas al inicio espontáneo de la pubertad, lo cual reduciría el tiempo necesario para obtener una respuesta. En efecto, existió una respuesta diferencial según la edad de las vaquillonas al inicio del experimento: vaquillonas de mayor edad expuestas tendieron a iniciar la actividad cíclica en forma más temprana que las aisladas durante las primeras semanas de iniciada la exposición (Días 7 y 14). En el caso de las vaquillonas más jóvenes al inicio de la exposición, las diferencias a favor de las hembras expuestas se manifestaron más tardíamente. En forma similar, fue necesario un mayor tiempo de exposición a los machos para lograr efectos positivos sobre la ciclicidad en vaquillonas de menor edad (9 meses) al inicio de la exposición (Roberson et al. 1991), a la vez que en hembras más viejas (24 meses) la respuesta comenzó a observarse a las 2 semanas del ingreso de los machos (Quadros y Lobato, 2004). Sin embargo, en condiciones pastoriles, Oliveira et al. (2009) reportaron que vaquillonas cebú de similar edad a las utilizadas en el presente ensayo pero con menores pesos vivos al inicio de la exposición (180 kg) necesitaron una mayor duración del estímulo para lograr una respuesta positiva a la bioestimulación. Se debe considerar que las

diferencias entre ambos experimentos también podrían estar determinadas por un efecto de la raza, ya que las hembras *Bos indicus* necesitarían una mayor edad y un mayor peso vivo para alcanzar la pubertad en comparación a las cruza *Bos taurus* como las utilizadas en nuestro experimento (Rodrigues et al. 2002).

Durante el posparto trabajando con vacas en anestro, Berardinelli y Joshi (2005b) reportaron que las hembras expuestas a toros durante el postparto tardío reiniciaron la actividad cíclica en respuesta a la bioestimulación en forma más temprana que las expuestas en los primeros días posparto. Esto indicaría que a medida que transcurre el posparto las hembras se vuelven más sensibles al efecto de la bioestimulación, lo que estaría determinado por los eventos fisiológicos ligados al reinicio de la ciclicidad (Rekwot et al. 2001; Berardinelli y Joshi, 2005b). Es probable que dichas diferencias también se observen durante el periodo que antecede a la pubertad, lo que determinaría que las vaquillonas se volvieran progresivamente más sensibles al estímulo de los machos. Por tanto, el tiempo de exposición necesario para lograr una respuesta positiva dependerá del grado de desarrollo de las vaquillonas al inicio de la exposición, entendiéndose como tal a la relación existente entre edad y peso vivo.

Coincidiendo con anteriores experimentos (Quadros y Lobato, 2004), la respuesta positiva a la bioestimulación se observó únicamente en las vaquillonas de mayores pesos vivos, lo que sugiere la existencia de un peso vivo mínimo necesario para responder al estímulo. En condiciones pastoriles, el estado nutricional durante el periodo prepuberal y el peso vivo de las vaquillonas aparecen como los factores determinantes del inicio de la pubertad (Quintans et al. 2007). Por esta razón, la respuesta a la bioestimulación seguramente también se encuentre relacionada a dichos factores; los pesos vivos mínimos necesarios para obtener una respuesta positiva a la exposición a los machos se relacionarían a los necesarios para el inicio espontáneo de la pubertad (Short y Bellows, 1971; Arije y Wiltbank, 1971). Oliveira et al. (2009) evaluaron el efecto de una larga exposición a los machos (210 días) y de la suplementación de vaquillonas de 12 meses de edad sobre el inicio de la ciclicidad y la preñez posterior en un entore de 45 días. Encontraron una mayor proporción de hembras púberes y mayores tasas de preñez en las vaquillonas expuestas en comparación a las aisladas, pero la suplementación diferencial no afectó los resultados. Sin embargo, las vaquillonas bioestimuladas presentaron un mayor peso vivo final, y este se correlacionó positivamente con la edad a la pubertad. En vacas multíparas durante el posparto, se encontró una relación positiva entre el porcentaje de hembras que respondieron a la bioestimulación y el nivel nutricional (Monje et al. 1992). Otros autores reportaron que vacas posparto con CC moderada respondieron en mayor grado a la exposición a los machos que aquellas vacas de mayor CC (Stumpf et al. 1992; Madrigal et al. 2001). Por otra parte, si bien en nuestro estudio las vacas de menor PI tuvieron altas tasas de GDP (Tabla 1), éstas no fueron suficientes para desencadenar los mecanismos involucrados en la respuesta. Las diferencias con lo reportado por Roberson et al. (1991), quienes observaron un mayor efecto de la exposición a los machos en vaquillonas con altas tasas de GDP que en

aquellas con medianas tasas de GDP, podrían estar dadas por el menor peso vivo de nuestras vaquillonas al inicio del ensayo (248 kg vs 226 kg). En conclusión, el peso vivo al inicio de la exposición parecería ser un factor crítico en la respuesta a la presencia de los machos, independientemente de las tasas de GDP (ó tasas de ganancias diarias). A su vez, es probable que como fuera descrito en vacas durante el posparto, la exposición a los machos en vaquillonas con muy buen estado nutricional ó con alto grado de desarrollo, no sea eficaz en adelantar el inicio de la pubertad ya que la alta proporción de animales que espontáneamente comenzarían a ciclar no permitiría detectar ningún beneficio.

La unión de ambos grupos determinó un aumento significativo del porcentaje de vaquillonas aisladas que iniciaron la actividad cíclica. Dicho resultado podría tener dos posibles causas: 1) la unión de los grupos se realizó cuando las vaquillonas no expuestas en anestro estarían por comenzar espontáneamente la pubertad, y/o 2) un posible efecto estimulador hembra-hembra. Durante el posparto, la exposición de vacas en anestro a mucus cervical de vacas cíclicas (Wright et al. 1994) y a los productos excretorios de vacas (Berardinelli y Joshi, 2005a), disminuyó el intervalo al reinicio de la actividad cíclica. En vacas lecheras pospuberales, el tratamiento oronasal con mucus cervical de hembras en estro mejoró la sincronía del celo, comparada con aquellas vacas que fueron tratadas con agua (Izard y Vandenberg, 1982b). Por lo tanto, en el presente experimento sería posible que haya sucedido un efecto estimulador similar entre las hembras al momento de la unión de ambos grupos.

La respuesta a la bioestimulación en vacas durante el anestro posparto, se encuentra ligada directamente a la intensidad del estímulo (Fike et al. 1996). El contacto a través de un alambrado por medio en forma intermitente, aceleró el reinicio de la ciclicidad (Fike et al. 1996; Fernandez et al. 1996), pero fue menos eficaz que el contacto físico directo y continuo con los machos (Berardinelli y Tauck, 2007; Fernandez et al. 1996). En el presente estudio, el IAS de las vaquillonas que comenzaron su actividad cíclica a lo largo del experimento fue mayor que el de aquellas que se mantuvieron en anestro, pero dicha diferencia fue significativa únicamente en los rangos de pesos medios y altos. Esto confirma resultados anteriores reportados en cabras por Alvarez et al. (2003), quienes observaron que existía una relación negativa entre el IAS y el tiempo desde la introducción de los machos a la ovulación: las hembras que tuvieron un mayor grado de contacto con los machos presentaron un menor intervalo desde el inicio de la exposición a la ovulación. Por lo tanto, coincidiendo con lo reportado en vacas durante el posparto y en cabras, a partir de nuestros resultados se podría afirmar que en vaquillonas el contacto físico entre hembras y machos es un determinante de la intensidad del estímulo, y por lo tanto de la cantidad de hembras que responderán a la bioestimulación. A su vez, las hembras de mayores pesos vivos iniciales fueron más estimuladas que las de menores pesos. Sin embargo, no es posible distinguir si ese mayor estímulo fue debido a una preferencia de los machos por las hembras más pesadas, lo que llevaría a una mayor proceptividad de las mismas hacia los machos.

En conclusión, la exposición de vaquillonas prepúberes a NA por 35 días determinó un adelanto del inicio de la pubertad. La edad al inicio de la exposición determinó diferencias en la velocidad de respuesta a la bioestimulación entre las vaquillonas. A su vez, nuestros resultados confirman la hipótesis de que la proximidad física macho-hembra influye positivamente en la respuesta, y de que el peso corporal de las hembras al inicio de la exposición se encontraría relacionado directamente con la respuesta.

## 6. EXPERIMENTO II

### 6.1 INTRODUCCIÓN

La mayoría de los estudios en los que se evaluaron los factores que influyen en la preferencia sexual en mamíferos se basan en la preferencia de las hembras, existiendo menor información acerca de las preferencias de los machos (Price, 1985). La preferencia por una determinada pareja es un aspecto adaptativo y componente esencial del comportamiento sexual, que ayudaría a asegurar la unión exitosa entre dos individuos (Margiasso et al. 2010). A su vez, según Katz (2008) la preferencia por una determinada pareja serviría como una medida de la motivación sexual del individuo.

En roedores, las diferencias existentes en la inversión parental (IP) de ambos sexos ha sido la principal causa por la que el estudio de la elección de la pareja ha sido focalizado en las hembras. La IP fue definida por Burley en 1977 como “la inversión que se realiza sobre una cría que en forma simultánea aumenta las posibilidades de supervivencia y reproducción de dicha cría y disminuye la habilidad paterna para invertir en otra cría”. Los individuos del sexo de menor IP (los machos) competirían por el acceso a los individuos que presentan mayor IP (las hembras), ya que los primeros se verían más comprometidos como consecuencia de una mala elección de su pareja. Por lo tanto, los machos competirían por el acceso a las hembras y no discriminarían entre ellas (Trivers, 1972, citado por Costello et al. 2009).

Sin embargo, en los sistemas de apareamiento polígamos como lo de los ruminantes domésticos, en los que generalmente se encuentra un macho con varias hembras (poliginia), la elección de los machos cobra mayor importancia. En este sentido, Tilbrook y Lindsay (1987) plantearon que la preferencia de los carneros por determinadas ovejas indica que dichas hembras varían en su “atractividad” hacia los machos. A su vez, dicha “atractividad” estaría determinada por características propias de esas hembras, ya que diferentes machos demostraron preferencias similares entre las hembras (Tilbrook y Lindsay, 1987). En toros, los estudios han estado focalizados en el momento del ciclo estral, vinculado a los estudios de capacidad de servicio, y en el factor “novedad” de las hembras. Algunos autores no encontraron preferencia de los toros hacia hembras en estro ó en fase luteal cuando fueron sometidos a pruebas de capacidad de servicio en las que las hembras se encontraban inmóviles (vacas: Wallach y Price, 1988; vaquillonas: Geary et al. 1991). Sin embargo, Bailey et al. (2005) trabajando con vacas no sujetas como forma de asemejar un servicio natural, reportaron que toros expuestos a hembras en estro desplegaron un mayor comportamiento sexual que cuando se encontraban frente a hembras en diestro. A su vez, la exposición secuencial a hembras “nuevas” también incrementa la actividad sexual de los machos en comparación a la exposición a la misma hembra (“efecto coolidge”) (Bailey et al. 2005).

En otras especies de mamíferos, el peso vivo de las hembras ha sido otros de los factores evaluados en relación a la preferencia de los machos. En este sentido, los factores relacionados a la proceptividad, definida por Beach

(1976) como las actividades desarrolladas por las hembras hacia ciertos machos promoviendo las actividades de cortejo y monta, serían posibles determinantes de la preferencia de los machos por hembras de distintos pesos vivos. En ratones, las hembras de menor peso vivo presentaron una disminución del comportamiento sexual frente a los machos en relación a las hembras más pesadas (Pierce et al. 2005), pero no existieron diferencias en la preferencia de los ratones machos por hembras de diferente estatus nutricional en situaciones de no competencia (Costello et al. 2009). Como fuera desarrollado anteriormente, los efectos positivos de la bioestimulación se encuentran relacionados con el estado nutricional de las hembras (Roberson et al. 1991; Monje et al. 1992), pero hasta el momento no existe información en bovinos que evalúe el efecto del peso vivo de las hembras sobre la posible preferencia de los machos. Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos en el Experimento I, en que las hembras de mayor peso vivo tuvieron una mayor cercanía física con los machos y ovularon en mayor proporción que las de menor peso, se plantearon las siguientes hipótesis: 1) los NA interactúan más con las hembras de mayores pesos vivos, lo que determina una mayor proximidad física entre los machos y las hembras más pesadas en comparación a las más livianas, y 2) el mayor peso vivo es un determinante de la proximidad entre machos y hembras. Para testar dichas hipótesis se plantearon dos objetivos: 1) Determinar el comportamiento de los NA y de las vaquillonas al encontrarse en forma simultánea un NA con 2 vaquillonas de diferente rango de peso vivo, y 2) Determinar si el menor tiempo dedicado al cortejo hacia las vaquillonas de menores pesos vivos era inherente a las características de atractividad sexual de las hembras, o consecuencia de la competencia entre las mismas. Para cumplir con dichos objetivos fueron realizados 2 ensayos simultáneos.

## **6.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### *Localización, animales y manejo*

El experimento fue realizado en Marzo de 2009 en la Estación Experimental Prof. Bernardo Rosengurt de la Facultad de Agronomía, localizada en “Bañado de Medina”, Departamento de Cerro Largo. Antes del inicio del ensayo, se realizaron 2 ecografías ováricas transrectales separadas 7 días a un lote de 40 vaquillonas de 12 a 24 meses de edad, para determinar la presencia de CL, por lo que se descartaron del ensayo 14 vaquillonas que tenían CL en alguna de las dos ecografías. Del lote restante de animales en anestro, se seleccionaron 16 vaquillonas que fueron categorizadas de acuerdo a su peso vivo en 2 grupos, considerando rangos de peso similares a los utilizados en el Experimento I: 1) vaquillonas de alto peso (grupo ALTA, n = 8), aquellas cuyos pesos vivos se encontraban entre 260 y 290 kg ( $273,0 \pm 2,8$  kg), y 2) vaquillonas de bajo peso (grupo BAJA, n = 8), aquellas con pesos vivos entre 220 y 250 kg ( $241,0 \pm 2,2$  kg) (media  $\pm$  EE). La edad de las vaquillonas al inicio del experimento fue similar:  $18,1 \pm 0,6$  y  $18,3 \pm 0,5$  vs meses, ALTA y BAJA, respectivamente.

El protocolo de androgenización de los novillos (n = 8) consistió en la administración de dos dosis de testosterona intramuscular (500 mg,

ciclopentilpropionato de testosterona, Testosterona Ultralenta, Dispert, Uruguay), con intervalo de 1 semana en forma previa al inicio del experimento (Día 0).

El Día 0 los animales fueron agrupados en 8 tríos (1 NA con 1 vaquillona ALTA y 1 vaquillona BAJA), homogéneos de acuerdo a la diferencia de peso vivo entre las hembras ALTA y BAJA ( $30,3 \pm 2,2$  kg de diferencia de peso entre grupo ALTA y BAJA).

### *Ensayo 1*

Para determinar el comportamiento de los NA frente a las dos hembras en forma simultánea, se realizaron tests en los que cada NA estaba en contacto directo con dos vaquillonas: una ALTA y una BAJA (ALTA Doble, AD y BAJA Doble, BD). Estos tests fueron registrados mediante una filmadora digital, analizándose posteriormente los datos a partir de las filmaciones.

### *Ensayo 2*

Para determinar el comportamiento de los NA con cada hembra en forma aislada, se realizaron dos tests con cada novillo, uno con la vaquillona ALTA (ALTA Sola, AS), y otro con la vaquillona BAJA (BAJA Sola, BS). Ambos tests se registraron en planillas por 2 observadores en forma simultánea: uno de los observadores registraba la duración de cada comportamiento, mientras que el otro únicamente la cantidad de veces en que se realizaba cada comportamiento.

En ambos ensayos la duración de cada test fue de 30 minutos, realizándose 8 repeticiones de cada uno. Los tests fueron realizados en un corral lindero a las mangas, de aproximadamente 300 m<sup>2</sup> de superficie. En forma previa al inicio de los tests, todos los animales fueron acostumbrados al pasaje por las instalaciones, siempre en forma separada el grupo de hembras y el de los NA. La secuencia de los tests fue definida de forma tal de evitar que en el mismo día pudiera repetirse alguno de los tríos, y ordenados para bloquear el efecto aprendizaje de los tests. Cada test fue ejecutado de la misma manera: en primera instancia ingresaron al corral la/s hembra/s correspondientes, y en forma posterior el NA. Las hembras se mantuvieron sueltas en el corral, por lo que no fue controlada la distancia de cada una en relación al lugar de salida del NA. Durante el tiempo que transcurrió entre los distintos tests, los NA y las hembras se mantuvieron separados, pastoreando en potreros de campo natural separados también del corral donde se realizaban los tests.

Las variables registradas en ambos ensayos fueron:

- 1) Acercamiento inicial (AI, segundos): tiempo transcurrido desde la entrada del NA al corral y el primer contacto a menos de 1 cuerpo con la hembra.

- 2) Tiempo total (acumulado) de permanencia a menos de 1 cuerpo (< 1 c) de distancia entre el NA y la hembra durante todo el test.
- 3) Tiempo de seguimiento: del NA a las hembras y de las hembras al NA acumulado durante todo el test. Se consideró seguimiento cuando uno de los animales (el NA o alguna de las hembras) comenzaba a caminar y uno de los restantes le seguía. Si se encontraban caminando no se contabilizaba como permanencia a < 1 c.
- 4) Cantidad de veces en que se encontraban a < de 1 c de distancia.
- 5) Cantidad de instancias de seguimientos: tanto de las hembras a los NA como de los NA a las hembras.
- 6) Cantidad de vocalizaciones: tanto de los NA como de las hembras. Para el análisis del Ensayo 2, únicamente fue comparada la cantidad de veces que vocalizaron ambas hembras.
- 7) Cantidad de cabeceos: tanto de los NA hacia las hembras como de las hembras hacia los NA.
- 8) Cantidad de olfateos: tanto de los NA hacia las hembras como de las hembras hacia los NA.
- 9) Cantidad de intentos de montas y de montas.

#### *Análisis estadístico*

Se utilizó el test t de Student pareado para el análisis de tiempos, los que son presentados como media  $\pm$  EE. El test no paramétrico para datos pareados de Wilcoxon fue utilizado para el análisis de la cantidad de veces que se realizaron los diferentes comportamientos, las que también se presentan como media  $\pm$  EE a pesar de tratarse de datos que no presentan distribución normal, debido a que permite visualizar más fácilmente los datos.

### **6.3 RESULTADOS**

En ninguno de los ensayos se observaron montas o intentos de montas de los NA ni entre hembras. Por registrarse muy pocos cabeceos y olfateos de las vaquillonas hacia los NA en ambos ensayos, únicamente se presenta la comparación de la cantidad de veces que los machos realizaron dichos comportamientos hacia las hembras.

#### *Ensayo 1*

El tiempo de AI no difirió entre AD y BD ( $70,6 \pm 49,0$  vs  $20,3 \pm 8,3$  s, AD y BD, respectivamente;  $P = 0,4$ ). Las vaquillonas AD se encontraron mayor cantidad de veces a < 1 c de los NA ( $P < 0,05$ ), y tendieron a encontrarse por más tiempo a < 1 c de los NA ( $P = 0,1$ ) (Tabla III). Tanto el tiempo de

seguimiento como la cantidad de veces en que las vaquillonas siguieron a los NA, tendió a ser mayor en las AD en relación a las BD ( $P = 0,1$ ), a la vez que las AD también tendieron a recibir mayor cantidad de olfateos que las BD ( $P = 0,1$ ) (Tabla III). No existieron diferencias en el tiempo ( $38,0 \pm 15,0$  s;  $P = 0,6$ ) ni en la cantidad de veces ( $2,0 \pm 0,3$  veces;  $P = 0,2$ ) que los NA realizaron seguimientos a las vaquillonas, ni en la cantidad de vocalizaciones de las vaquillonas ( $3,2 \pm 1,5$  veces;  $P = 0,6$ ) o cabeceos de los NA ( $1,6 \pm 0,3$  veces;  $P = 0,6$ ) entre AD y BD.

## Ensayo 2

No hubo diferencia significativa en ninguna de las variables registradas en el Ensayo (Tabla III). El tiempo de AI para BS y AS fue  $262,0 \pm 220,0$  y  $78,2 \pm 25,0$  s, respectivamente ( $P = 0,4$ ). Tampoco se encontraron diferencias significativas en el tiempo ( $6,1 \pm 3,0$  s;  $P = 0,4$ ) ni en la cantidad ( $2,1 \pm 1,0$  veces;  $P = 0,5$ ) de seguimientos de los NA a las vaquillonas, ni en la cantidad de vocalizaciones de los NA ( $19,0 \pm 5,0$  veces;  $P = 0,3$ ) y de las vaquillonas ( $22,0 \pm 6,1$  veces;  $P = 0,6$ ), ni en la cantidad de cabeceos de los NA ( $2,3 \pm 1,0$  veces;  $P = 0,3$ ) entre AS y BS.

Tabla III. Variables registradas (media  $\pm$  EE) al encontrarse una vaquillona de alto peso vivo (grupo ALTA, A; 260-290 kg;  $n = 8$ ) y otra de bajo peso vivo (grupo BAJA, B; 220-250 kg;  $n = 8$ ) en forma simultánea con un novillo androgenizado (NA) (A doble, AD; B doble, BD; Ensayo 1) o en forma aislada cada vaquillona con el NA (A sola, AS; B sola, BS; Ensayo 2). Tiempo total de duración (segundos, s) de cada comportamiento y Cantidad de veces (veces) en que se realizó cada comportamiento.

	AD	BD	P <sup>6</sup>	AS	BS	P <sup>7</sup>
< 1 c (s) <sup>1</sup>	159,1 $\pm$ 87	19 $\pm$ 9,1	0,1	212,3 $\pm$ 68	146 $\pm$ 55,5	Ns
< 1 c (veces) <sup>2</sup>	4,2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 0,5	0,01	9,6 $\pm$ 2	9,3 $\pm$ 1,6	Ns
S Vq-NA (s) <sup>3</sup>	41,2 $\pm$ 17	18 $\pm$ 6,2	0,1	52,5 $\pm$ 24,2	32 $\pm$ 17	Ns
S Vq-NA (veces) <sup>4</sup>	2,7 $\pm$ 1	1,4 $\pm$ 0,4	0,1	4,5 $\pm$ 1,2	5 $\pm$ 1,7	Ns
Olf NA (veces) <sup>5</sup>	1,6 $\pm$ 0,5	0,5 $\pm$ 0,3	0,1	1,8 $\pm$ 1	1 $\pm$ 0,4	Ns

<sup>1</sup> Tiempo total en que los NA y vaquillonas permanecieron a menos de 1 cuerpo de distancia del NA (< 1 c)

<sup>2</sup> Cantidad de veces en que los NA y vaquillonas se encontraron a menos de 1 cuerpo de distancia (< 1 c)

<sup>3</sup> Tiempo total de seguimiento de las vaquillonas a los NA (S Vq-NA)

<sup>4</sup> Cantidad de veces en las que las vaquillonas siguieron a los NA (S Vq-NA)

<sup>5</sup> Cantidad de olfateos realizados por los NA hacia las vaquillonas (Olf NA)

<sup>6</sup> Diferencia entre AD vs BD

<sup>7</sup> Diferencia entre AS y BS

ns = diferencia estadísticamente no significativa

## 6.4 DISCUSIÓN

Cuando las vaquillonas de distinto rango de peso vivo fueron expuestas en forma simultánea a un NA (Ensayo 1) se registró una mayor interacción entre los NA y las ALTAS que con las BAJAS. Estos resultados confirman nuestra hipótesis inicial en relación a la mayor proximidad entre machos y hembras más pesadas, y coinciden con lo observado en el Experimento I, en el que también se observó una mayor proximidad física entre las vaquillonas más pesadas y los NA. Debido al diseño utilizado en el presente ensayo no es posible discernir si la mayor proximidad física fue resultado de la preferencia de los machos por las hembras más pesadas, de una mayor proceptividad por parte de dichas hembras, o de ambos factores. Cuando las hembras estaban compitiendo entre sí existió una mayor proximidad física entre los NA y las vaquillonas más pesadas, lo que en última instancia habría generado el mayor estímulo recibido por estas hembras en comparación a las más livianas observado en el Experimento I. A su vez, en las situaciones de competencia las vaquillonas ALTAS tendieron a seguir más veces y durante más tiempo a los NA que las BAJAS, lo que podría relacionarse con una mayor proceptividad hacia los machos de las hembras más pesadas. Las vaquillonas ALTAS tendieron a recibir mayor cantidad de olfateos por parte de los NA que las BAJAS, lo que sumado a la mayor cantidad de veces en que se encontraron a  $< 1$  c, comprueba que el mayor interés demostrado hacia los NA repercutió positivamente en un mayor estímulo de los machos.

En contraste con los resultados obtenidos en el Ensayo 1, no existieron diferencias en ninguna de las variables evaluadas al encontrarse los NA en forma individual con una vaquillona de alto o bajo rango de peso vivo, o sea en las situaciones en que ambas hembras no competían (Ensayo 2). Esto indicaría que el estímulo potencial que el macho es capaz de realizar hacia las hembras es independiente de su peso vivo, o al menos no se vería afectado si es dirigido hacia hembras de pesos similares entre sí, considerando los rangos de pesos estudiados. La información sobre preferencias sexuales hacia hembras bovinas es casi inexistente, pero en la misma dirección de nuestro trabajo Costello et al. (2009) no encontraron diferencias en la preferencia de ratones machos por hembras con distintos estatus nutricionales, al someter a dichos machos a pruebas de preferencia en las que ambas hembras se encontraban separadas. Por su parte, Pierce et al. (2005) reportaron que ratonas con restricciones alimenticias que determinaron pérdidas de peso vivo presentaron una reducción del comportamiento sexual hacia los machos en relación tanto a la atractividad, como a la proceptividad y receptividad, en comparación con las hembras sin restricciones. Posteriormente dichos autores comprobaron que la re-alimentación resultó eficaz para que las hembras retomaran su actividad sexual normal, pero el peso vivo original fue alcanzado mucho después de que se observara el comportamiento sexual normal (Pierce y Ferkin, 2005). Los autores concluyeron que la capacidad de desplegar un comportamiento sexual normal no se encontraría determinada por el peso vivo de la hembra

sino por el estado de balance energético positivo (ganancia de peso). Si bien las observaciones de los citados trabajos no serían totalmente extrapolables a los bovinos, los resultados del presente experimento también indicarían que el menor peso vivo de las vaquillonas por sí mismo no tendría efectos sobre la elección de los machos ni sobre el comportamiento sexual de las hembras. Por su parte, Alvarez et al. (2003) trabajando con cabras, reportaron que las hembras de mayor rango social tenían una mayor proximidad física con los machos, siendo conocido que en las cabras existe un vínculo entre rango social y peso (Ungerfeld y Correa, 2007). Considerando dichos resultados, es probable que en el presente experimento la dominancia ejercida por las vaquillonas de mayores pesos frente a las hembras más livianas al encontrarse en situaciones de competencia, haya sido una determinante de la mayor proximidad física con los machos. Por lo tanto, el menor tiempo dedicado al cortejo hacia las vaquillonas más livianas sería parcialmente explicado por la competencia entre las hembras.

El peso corporal de las hembras es uno de los factores que influiría en la elección de los machos, pero de acuerdo a la bibliografía consultada, no existen estudios que evalúen sus efectos en bovinos. El proceso reproductivo es altamente demandante de energía, por lo que las reservas energéticas insuficientes afectan tanto la fisiología reproductiva como el comportamiento sexual de las hembras (Costello et al. 2009). A su vez, como fuera discutido ampliamente, el peso corporal en vaquillonas de carne es uno de los factores determinantes de la pubertad (Short y Bellows, 1971; Schillo et al. 1992). En el presente experimento, todas las vaquillonas utilizadas eran prepúberes ó se encontraban en anestro al inicio del mismo, de forma de evitar posibles interferencias del estro en la elección de los machos. Sin embargo, es altamente probable que de acuerdo a sus pesos vivos las vaquillonas más pesadas se encontraran más cercanas al inicio espontáneo de la ciclicidad (Quintans et al. 2007). Por otra parte, nuestros resultados indicarían que el peso vivo por sí mismo no influye en la preferencia de los machos, o sea que el estímulo del macho no variaría solamente en función del peso vivo de las hembras, al menos en los rangos de pesos estudiados. Sin embargo, dicho resultado no descarta la posibilidad de que la mayor proximidad al inicio espontáneo de la ciclicidad de las vaquillonas más pesadas fuera de alguna manera percibida por los machos al encontrarse en forma simultánea con hembras más livianas, y por lo tanto más alejadas de la pubertad. En dichas situaciones de competencia, como fuera observado en el Experimento I y confirmado en el presente Experimento, existe una mayor proximidad física entre el macho y las hembras de mayores pesos vivos. A su vez, las vaquillonas más pesadas parecerían mostrar una mayor proceptividad hacia los machos. Por lo tanto, es probable que las causas por las que las hembras más pesadas reciben un mayor estímulo de los machos en relación a las más livianas estén vinculadas a una sumatoria de factores relacionados fundamentalmente a la mayor proximidad al inicio espontáneo de la pubertad.

Considerando los resultados obtenidos, sería interesante evaluar la respuesta a la bioestimulación en vaquillonas BAJAS al encontrarse en

forma aislada con los machos ó en situaciones de competencia con las de ALTA. Es de esperar que el estímulo se maximice cuando las vaquillonas más livianas se encuentran en forma aislada con los machos. A su vez, al momento de analizar los resultados de los diferentes estudios que evaluaron la eficiencia reproductiva y la bioestimulación en vacas y vaquillonas, en la mayor parte de los mismos el efecto de la competencia entre las hembras de los distintos rangos de pesos vivos no es considerado. Por lo tanto, probablemente muchos de dichos resultados puedan ser en parte reinterpretados si consideramos los diferentes rangos de pesos vivos de las hembras.

En conclusión, los NA mostraron preferencia por las vaquillonas de mayores pesos vivos al encontrarse en situaciones de competencia con las de menores pesos vivos, pero no hubo diferencias en la preferencia de los machos al encontrarse con hembras de ambos rangos de pesos en situaciones de no competencia. Por lo tanto, los factores vinculados a la competencia entre las hembras de los diferentes rangos de peso vivo y no los factores inherentes a la atractividad sexual de las hembras, son parcialmente determinantes del mayor estímulo recibido por las hembras más pesadas.

## 7. EXPERIMENTO III

### 7.1 INTRODUCCIÓN

El estímulo positivo de la bioestimulación sobre la ciclicidad determinaría que una mayor proporción de hembras se encuentre ciclando al inicio de la estación reproductiva, lo que podría incrementar la tasa de preñez final del rodeo, tanto en sistemas con monta natural o IA (Short et al. 1990). La exposición a NA (Ungerfeld, 2009) y a toros (Oliveira et al. 2009) en forma previa al inicio de un servicio natural incrementó las tasas de preñez en vaquillonas en comparación a aquellas no expuestas. De manera similar, se han reportado efectos positivos sobre la tasa de concepción en respuesta a la exposición a machos en forma previa a la IA, tanto en vaquillonas prepúberes (Roberson et al. 1991; Quadros y Lobatos, 2004), como en vacas durante el posparto (Fernandez et al. 1993). En todos los casos en que se evaluó la actividad cíclica al inicio del entore o IA, el grupo de hembras expuestas presentó una mayor proporción de animales ciclando que el grupo sin machos, lo que seguramente sea la causa de las mayores tasas de preñez y concepción finales ya que la bioestimulación por sí sola no parece afectar la fertilidad (Ungerfeld, 2010). A su vez, existió un efecto de la edad y del peso corporal inicial de las vaquillonas sobre las tasas de preñez: los efectos positivos de la bioestimulación se limitaron a las vaquillonas más viejas (25,5 meses, Quadros y Lobato, 2004) al inicio de la exposición y a las más pesadas en situaciones de pérdida de peso (310 a 360 kg, Ungerfeld, 2009), lo que reafirma la influencia de la edad y del estatus nutricional sobre la respuesta de las hembras.

En la misma dirección, se han obtenido diferentes resultados luego de la exposición a los machos en forma previa ó durante la implementación de un PSC, en relación al inicio de la ciclicidad y las tasas de concepción y preñez, en vacas durante el posparto y vaquillonas. Los PSC son utilizados como forma de reducir los costos asociados a la IA, fundamentalmente por la concentración del trabajo en un periodo de tiempo corto, y por la posibilidad de realizar la IA a tiempo fijo (IATF), o sea sin la detección previa del celo (Holm et al. 2008). La exposición de vacas durante el posparto a machos en forma previa a la implementación de un PSC, determinó un aumento de la tasa de preñez a la IATF (Anderson et al. 2002; Berardinelli y Tauck, 2005; Berardinelli et al. 2007) pero no en la IA realizada a las 12 horas de detectado el celo. Berardinelli et al. (2007) concluyeron que esa diferencia pudo haberse debido a: 1) la mayor proporción de hembras expuestas que se encontraban ciclando al inicio del PSC, lo que habría determinado que mayor cantidad de dichas hembras respondieran al PSC y resultaran preñadas a la IATF, ó 2) mayor mortalidad embrionaria en las vacas no expuestas que en las expuestas en forma posterior a la IATF. Si bien no es posible descartar esta segunda posibilidad, hasta el momento no existen estudios que evalúen los efectos de la bioestimulación sobre el desarrollo embrionario, por lo que la primera alternativa parecería más probable. En vaquillonas prepúberes nacidas en primavera e invierno, Small et al. (2000) evaluaron la respuesta reproductiva a la exposición a machos durante el periodo comprendido entre el destete y la aplicación de un PSC basado en

una doble dosis de un análogo de PGF2 $\alpha$  a los 14 meses de edad. Las vaquillonas nacidas en invierno y expuestas a los machos presentaron un 30% de incremento en las tasas de concepción en comparación a aquellas no expuestas. En todos los experimentos mencionados, la exposición a los machos había determinado que hubiera un mayor porcentaje de vacas (Anderson et al. 2002; Berardinelli y Tauck, 2005; Berardinelli et al. 2007) y vaquillonas (Small et al. 2000) ciclando antes de la IATF.

Por otra parte, la exposición a orina de toros mediante un sistema dispensador en forma previa a un PSC, determinó un incremento de las tasas de concepción en relación a aquellas expuestas a orina de novillos (Tauck y Berardinelli, 2005; Tauck y Berardinelli, 2007), sin haber afectado previamente la ciclicidad. A partir de estos resultados, Tauck y Berardinelli (2007) plantearon la hipótesis de la existencia de dos tipos de señales químicas diferentes generadas por los toros durante la bioestimulación: unas ligadas al estímulo de la ovulación, y otras asociadas al incremento de la fertilidad. Según estos autores, la feromona que estimularía la fertilidad solo sería efectiva cuando las hembras se encuentran muy próximas a la orina de los machos. Como ya fuera mencionado, se deben considerar las diferencias en el manejo entre ambos tipos de experimentos (amamantamiento restringido vs *ad libitum*) y la posibilidad de que la orina no sea el único vehículo por el que las feromonas son vehiculizadas. A su vez, la exposición de vacas a los machos durante el posparto determinó un incremento de las concentraciones de progesterona en el primer ciclo estral, lo que podría implicar una mayor fertilidad en el primer celo de dichos animales en comparación a las hembras no expuestas (Monje et al. 1992). Por tanto, si bien a partir del muestreo realizado en los experimentos que evaluaron la orina de toros vs novillos no se determinaron cambios en las concentraciones de progesterona, es posible especular que la orina de toros pudo haber actuado positivamente sobre la secreción de dicha hormona, lo que podría explicar la mayor fertilidad final en estas vacas.

En contraposición, otros autores no encontraron efectos sobre las tasas de concepción ni de preñez al exponer vacas posparto y vaquillonas durante 20 (Ungerfeld, 2010) ó 60 días (Berardinelli et al. 2001) previos a la aplicación de un PSC. Por lo tanto, analizando toda la información presentada, la respuesta positiva a la exposición de los machos en términos de fertilidad parecería bastante más errática que la observada sobre la ciclicidad. La hipótesis planteada en el presente experimento fue que la exposición de vaquillonas a NA en forma previa a la aplicación de un PSC e IA permite aumentar la proporción de animales en celo y las tasas de preñez finales. Por lo tanto, el objetivo de este experimento fue determinar si la respuesta a una sincronización de celos en base a un análogo de la PGF2 $\alpha$  e IA en vaquillonas en anestro es mejorada, en términos de porcentaje de celos y preñeces, con una pre-estimulación con NA.

## 7.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### *Localización, animales y manejo*

El experimento fue realizado en un establecimiento comercial localizado en Cebollatí, Departamento de Rocha, entre los meses de octubre de 2008 a febrero de 2009. Se utilizaron 106 vaquillonas cruza Hereford x Bradford de 22 meses de edad y un peso corporal de  $282,5 \pm 25,3$  kg (media  $\pm$  DE) (rango = 235,5-371,5 kg) al inicio del experimento, y 6 NA.

Los Días -14 y -7 (Día 0= ingreso de los NA al grupo expuesto) se realizaron dos ultrasonografías ováricas para detectar la presencia de CL. El Día 0 las vaquillonas fueron adjudicadas homogéneamente de acuerdo al peso corporal y a la presencia de CL a 2 tratamientos: 1) Expuestas (grupo GE, n = 53), expuestas a NA por 30 días antes del inicio de un PSC, y 2) Control (grupo GC, n = 53), no expuestas a NA ni a ningún macho durante todo el período. La proporción de animales que presentaban CL al inicio del experimento fue de 20,6 (11/53) y 24,5% (13/53), para GE y GC, respectivamente. Durante los 30 días de separación ambos grupos pastorearon en potreros de campo natural, a una distancia mínima de 600 m, de forma de evitar todo posible contacto de las hembras del GC con los NA y cualquier otro macho. Se realizaron ecografías ováricas transrectales en todas las vaquillonas para determinar la presencia de CL a la mitad (Día 15) y final (Día 30) del período de exposición, momento en que también fue registrado el peso vivo de todas las hembras.

El protocolo de androgenización de los novillos consistió en la administración de testosterona intramuscular (500 mg, ciclopentilpropionato de testosterona, Testosterona Ultralenta, Dispert, Uruguay), desde 1 semana antes de la introducción, y a intervalos semanales durante toda la exposición. Los 6 NA fueron mantenidos en el GE durante los 30 días de duración de la exposición.

### *Protocolo de sincronización de celos e inseminación artificial*

Finalizados los 30 días de separación se retiraron los NA del GE, pero ambos grupos de vaquillonas se mantuvieron separados durante la realización del PSC. Este consistió en la administración de una doble dosis de un análogo de PGF2 $\alpha$  (8  $\mu$ g Delprostenate, Glandinex, Universal Lab, Montevideo, Uruguay) aplicada con un intervalo de 11 días. Se realizó la detección de celos dos veces por día durante 40 min, a partir de las 48 h posteriores a la última dosis de PGF2 $\alpha$  y por 6 días. La IA fue realizada en forma intracervical a las 12 h de detectado el celo, por el mismo operador en todas las ocasiones. Se utilizó semen congelado previamente evaluado. Luego de la IA las vaquillonas se mantuvieron con toros durante 2 meses. Se determinó la tasa de concepción a la IA y la preñez total mediante ultrasonografía transrectal a los 70 días de iniciada la IA.

### *Análisis estadístico*

La proporción de vaquillonas ciclando al inicio (Día 0), mitad (Día 15) y final (Día 30) del periodo de exposición, y la proporción acumulada de animales en celo fueron comparadas mediante test de chi cuadrado. La tasa de preñez y concepción, y la cantidad de hembras preñadas/hembras que ciclaron también se compararon por test de chi cuadrado. Los pesos corporales fueron comparados mediante test t de Student.

### 7.3 RESULTADOS

Las vaquillonas de ambos grupos presentaron incrementos del peso corporal a lo largo del período experimental. Los pesos vivos el Día 15 fueron de  $323,6 \pm 25,2$  y  $328,1 \pm 27,9$  kg para GE y GC, respectivamente ( $P = 0,2$ ). Al final del período de separación (Día 30), las vaquillonas del GC presentaron mayores pesos vivos que las del GE ( $349,8 \pm 23,9$  vs  $340,2 \pm 26,2$  kg,  $P < 0,05$ , GC y GE, respectivamente). El día del diagnóstico de gestación (70 d posteriores al inicio de la IA) los pesos corporales fueron de  $361,8 \pm 26,2$  y  $360,3 \pm 26,4$  kg para GE y GC, respectivamente ( $P = 0,4$ ).

La proporción de vaquillonas ciclando el Día 15 fue mayor en el GE (29/53) que en el GC (17/53) ( $P = 0,02$ ). No se registraron diferencias en la proporción de hembras ciclando al Día 30 (39/53 vs 38/53,  $P = 0,8$ , GE y GC, respectivamente) (Figura 4).

La proporción acumulada de hembras en celo durante los distintos días luego de la segunda dosis de PGF2 $\alpha$  (Figura 5), fue similar entre ambos grupos. La proporción final de hembras que manifestaron celo fue de 66,0 (35/53) y 67,9% (36/53) para GE y GC, respectivamente ( $P = 0,8$ ). Tampoco se registraron diferencias en las tasas de concepción a la IA, ni en las tasas de preñez final entre ambos grupos (Tabla IV).

Cuando la proporción de hembras que manifestaron celos y las tasas de preñez se compararon en relación a las hembras en que se observó CL en alguna de las ecografías o que no se observó CL en ninguna (ciclando ó en anestro al inicio del PSC), tampoco se registraron diferencias entre GE y GC (Tabla V).

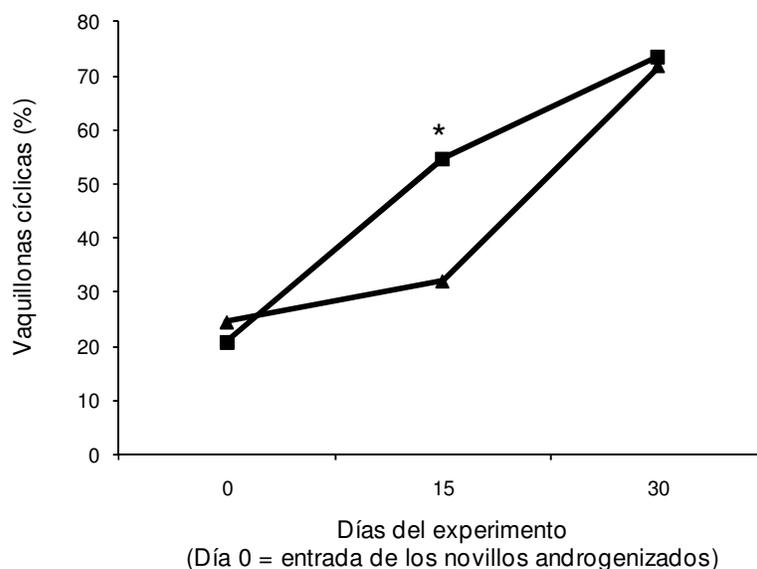


Figura 4. Proporción acumulada de vaquillonas ciclando durante el período experimental. Grupo Expuesto (-■-): vaquillonas expuestas a novillos androgenizados durante 30 días; Grupo Control (-▲-): vaquillonas aisladas de los machos durante todo el período experimental.

\*P < 0,05

Tabla IV. Tasa de concepción a la inseminación artificial (IA) y de preñez total en vaquillonas expuestas (grupo expuesto, GE) y no expuestas (grupo Control, GC) a novillos androgenizados durante 30 días previos a un protocolo de sincronización de celos e IA.

	GE (%)	GC (%)	P
Concepción IA <sup>1</sup>	29/35 (83)	33/36 (92)	0,3
Preñez Total <sup>2</sup>	43/52 (83)*	45/52 (86,5)*	0,6

<sup>1</sup> Cantidad de vaquillonas preñadas sobre el total de inseminadas.

<sup>2</sup> Cantidad de vaquillonas preñadas sobre el total de vaquillonas servidas (IA + repaso con toros)

\*No se realizó el diagnóstico de gestación en un animal.

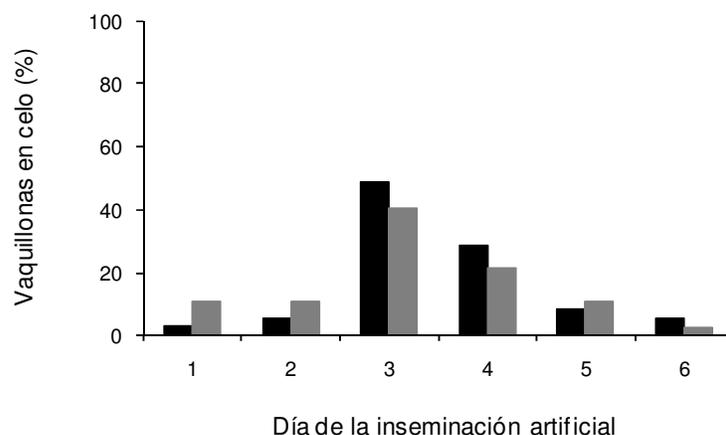


Figura 5. Efecto de una preestimulación con novillos androgenizados sobre la distribución de celos durante los 6 días del período de inseminación artificial. Barras negras: vaquillonas expuestas a novillos androgenizados durante 30 días previos al inicio del protocolo de sincronización de celos e inseminación artificial; Barras grises: vaquillonas aisladas de los machos durante todo el periodo.

Tabla V. Proporción de celos y tasas de concepción y de preñez total en vaquillonas que se encontraban ciclando ó en anestro al inicio del la aplicación de un protocolo de sincronización de celos e IA. Grupo expuesto (GE): vaquillonas que se mantuvieron con novillos androgenizados durante 30 días previos a la aplicación del protocolo de sincronización de celos e IA; Grupo control (GC): vaquillonas aisladas de los machos durante todo el periodo.

	Ciclando			Anestro		
	GE (%)	GC (%)	P	GE (%)	GC (%)	P
Celos	30/39 (77)	30/38 (79)	0,8	6/14 (36)	6/15 (40)	0,9
Concepción IA <sup>1</sup>	24/30 (80)	27/30 (90)	0,3	6/6 (100)	6/6 (100)	1
Preñez Total <sup>2</sup>	30/39 (77)	33/38 (87)	0,3	13/14 (93)	11/14 (78,5)*	0,5

<sup>1</sup> Cantidad de vaquillonas preñadas sobre el total de inseminadas

<sup>2</sup> Cantidad de vaquillonas preñadas sobre el total de vaquillonas servidas (IA + repaso con toros)

\* No se realizó el diagnóstico de gestación en un animal

## 7.4 DISCUSIÓN

La proporción de vaquillonas cíclicas durante los primeros 15 días de exposición a NA aumentó en relación a aquellas que se mantuvieron aisladas. Esto concuerda con resultados anteriores, que reportaron la eficacia de la bioestimulación para lograr disminuir el tiempo al inicio de la actividad cíclica en vaquillonas en anestro, tanto con periodos cortos (Izard y Vandenberg, 1982a; Quadros y Lobato, 2004; Experimento I) como largos (Roberson et al. 1991; Rekwot et al. 2000; Small et al. 2000; Oliveira et al. 2009) de exposición. Sin embargo, la proporción acumulada de vaquillonas cíclicas durante los 30 días del periodo de exposición fue similar entre ambos grupos. Esta respuesta positiva de la exposición a los machos sobre el inicio de la ciclicidad, pero de muy corta duración, no coincide con lo reportado por otros autores que encontraron diferencias en la actividad cíclica a favor de las hembras expuestas que se mantuvieron durante mayor cantidad de días e incluso meses (Small et al. 2000; Quadros y Lobato, 2004; Oliveira et al. 2009). En condiciones pastoriles similares, la exposición de vaquillonas de 24,5 meses a toros durante 50 días previos al inicio de la IA, también determinó un adelanto en el inicio de la pubertad a partir de la segunda semana de exposición en comparación a las hembras no expuestas, pero dicha diferencia se mantuvo a lo largo de las restantes semanas (Quadros y Lobato, 2004). El tipo de respuesta observado en el presente experimento podría estar causado por un mejor estado nutricional de las vaquillonas del GC durante la segunda mitad del periodo de exposición, lo que fue evidenciado por los mayores pesos vivos de las vaquillonas GC al final del periodo de exposición, pudiendo haber estimulado la ciclicidad en un mayor número de dichas hembras durante los últimos 15 días de separación. Sin embargo, Quadros y Lobato (2004) también encontraron menores ganancias de peso en las vaquillonas expuestas que en las aisladas, pero dicha diferencia no afectó los resultados positivos de la bioestimulación sobre la ciclicidad del grupo expuesto. En el presente experimento, la mayor proporción de vaquillonas GE ciclando durante los primeros 15 días de exposición, pudo haber sido el factor determinante de la menor ganancia de peso vivo en comparación a las vaquillonas del GC, debido a la mayor actividad física que presentan las hembras en celo en relación a las hembras en anestro (Kiddy, 1977; Senger, 1994). A su vez, si consideramos los resultados obtenidos en el Experimento I, la edad al inicio de la exposición probablemente hubiera influido sobre la respuesta: dentro del rango de hembras más viejas (con edades más cercanas a las utilizadas en el presente experimento), las diferencias a favor del GE en la proporción de hembras ciclando fueron evidenciadas únicamente en los primeros 14 días del periodo de exposición. Por lo tanto, podría especularse que la ausencia de efectos positivos más prolongados de la bioestimulación sobre la ciclicidad en el presente experimento podría deberse a que el estímulo comenzó muy cerca del momento en que la ciclicidad se inició espontáneamente. Como consecuencia de esto, las diferencias a favor del grupo estimulado solo se manifestaron durante la primera etapa de la exposición, ya que luego la alta proporción de hembras no estimuladas que comenzaron a ciclar espontáneamente determinó una proporción similar de animales ciclando al finalizar la exposición.

En el presente experimento, la exposición previa a los machos no afectó la frecuencia de los celos ni la proporción final de celos entre ambos grupos luego de la aplicación de un PSC. Esto coincide con resultados anteriores que también evaluaron la preestimulación con machos en forma previa a la aplicación de un PSC (Anderson et al. 2002; Berardinelli y Tauck, 2005; Berardinelli et al. 2007; Tauck y Berardinelli, 2007) ó a un servicio natural (Assis et al. 2000). Por su parte, Berardinelli et al. (2001) evaluaron la exposición de vacas primíparas en el posparto a toros durante 60 días previos al inicio de un protocolo Ovsynch, y encontraron que una mayor proporción de hembras expuestas mostraron un incremento en la concentración de progesterona en respuesta a la primera administración de GnRH, en comparación a las que se mantuvieron aisladas de los machos. Según los autores, las diferencias estarían explicadas porque una mayor cantidad de vacas expuestas se encontrarían en fase luteal o tendrían un folículo dominante al momento de la administración de la GnRH, lo que habría determinado una mayor respuesta a dicha hormona (Berardinelli et al. 2001). A su vez, en dicho estudio una mayor proporción de vacas expuestas se encontraba ciclando al inicio del PSC. En nuestro experimento, la proporción de vaquillonas ciclando en ambos grupos no difirió al inicio de la aplicación de un PSC, lo que probablemente haya determinado una similar distribución y proporción de los celos entre GE y GC en respuesta a la administración de PGF2 $\alpha$ .

En el presente experimento, las tasas de concepción y de preñez finales resultaron altas, sin diferencias entre ambos grupos, lo que coincide con resultados anteriores (Ungerfeld, 2010). Ungerfeld (2010) utilizando NA como estímulo en vaquillonas y vacas durante el posparto y por 20 días previos a la aplicación de un PSC basado en progestágenos e IATF, tampoco encontró diferencias en la tasa de concepción entre las hembras aisladas y expuestas. Si bien en dicho estudio no fue evaluada la ciclicidad al final de la exposición, la falta de diferencias en las tasas de concepción ni de preñez final en el presente experimento podría atribuirse a que no existieron diferencias en la proporción de hembras ciclando al inicio del PSC, o a que la bioestimulación no es capaz de afectar la fertilidad como variable independiente. A su vez, dentro de los grupos de vaquillonas que se encontraban ciclando o en anestro al inicio del PSC, tampoco existieron diferencias entre GE y GC en las tasas de concepción y preñez. La falta de diferencias en las tasas de concepción y preñez de las hembras que ya estaban ciclando reafirma la falta de efecto de la bioestimulación sobre la fertilidad. En otros estudios tampoco se encontraron efectos sobre las tasas de preñez entre hembras que habían sido expuestas a machos en forma previa a un PSC (Berardinelli et al. 2001) o tratadas con orina de machos previo a un servicio natural (Izard y Vandenberg, 1982a), a pesar de que la proporción de hembras ciclando al inicio del PSC o servicio en ambos casos fue mayor en los grupos de hembras expuestas. En forma inversa, la exposición de vacas primíparas durante el posparto a orina de toros vs orina de novillos o un control con agua mediante un sistema dispensador, en forma previa a la aplicación de un PSC basado en progestágenos, tampoco tuvo efectos sobre el inicio de la ciclicidad (Berardinelli y Tauck, 2005; Tauck

y Berardinelli, 2007) pero se incrementaron las tasas de concepción a la IATF (Tauck y Berardinelli, 2005) y la tasa de preñez total (Tauck y Berardinelli, 2007).

En la mayoría de los estudios se observó que cuando la preestimulación con machos logra incrementar la proporción de hembras ciclando al inicio del PSC o entore, dichas diferencias también se observan en las tasas de preñez. La exposición de vacas primíparas durante el posparto a toros o a productos excretorios de toros previo a un PSC en base a GnRH y PGF2 $\alpha$  determinó un aumento en la proporción de hembras ciclando al inicio del PSC y mayores tasas de preñez a la IATF en las vacas expuestas que en aquellas que se mantuvieron aisladas (Anderson et al. 2002; Berardinelli y Tauck, 2005; Berardinelli et al. 2007; Tauck y Berardinelli, 2007). En vaquillonas prepúberes nacidas en primavera, la exposición a toros en forma previa a la aplicación de un PSC en base a PGF2 $\alpha$  e IATF, determinó un adelanto en el inicio de la ciclicidad y mayores tasas de preñez en las hembras expuestas en comparación a las aisladas (Small et al. 2000). En la misma dirección, en condiciones de celo natural, las tasas de concepción fueron mayores en vaquillonas prepúberes que habían sido expuestas a toros vasectomizados durante 50 (Quadros y Lobato, 2004) y 175 (Roberson et al. 1991) días previos a la IA, que en aquellas que se mantuvieron aisladas. En vaquillonas puberales, también se reportaron mayores tasas de preñez en las hembras expuestas a machos por periodos de tiempos mayores a los utilizados en el presente experimento (210 días, Oliveira et al. 2009). En todos los casos en que fue evaluada la ciclicidad al inicio del entore, la proporción de hembras ciclando fue mayor para las hembras expuestas en comparación a las aisladas (Roberson et al. 1991; Quadros y Lobato, 2004; Oliveira et al. 2009). Sin embargo, Assis et al. (2000) trabajando con vaquillonas en condiciones similares a las del presente experimento expuestas a toros durante 75 días, también reportaron una mayor cantidad de hembras ciclando al inicio de la IA, pero no encontraron diferencias en las tasas de preñez. Por lo tanto, si bien no es posible descartar efectos directos de la bioestimulación sobre la fertilidad, contrastando los resultados de los diferentes experimentos es posible especular que la principal determinante de la ausencia de efectos sobre las tasas de concepción y preñez en el presente experimento probablemente haya sido la similar proporción de vaquillonas ciclando al inicio del PSC.

Tauck y Berardinelli (2007) plantearon la hipótesis de la existencia de dos feromonas diferentes asociadas al efecto bioestimulador de los machos: una que actuaría sobre el inicio de la actividad cíclica, y otra que se asociaría exclusivamente a aspectos ligados a la fertilidad. A su vez, los autores plantearon que el efecto sobre la fertilidad estaría determinado únicamente por la exposición directa a la orina de los machos. Sin embargo, como ya fuera mencionado, se deben considerar las diferencias en el manejo entre ambos tipos de experimentos (amamantamiento restringido vs *ad libitum*) y la posibilidad de que la orina no sea el único medio por el que son vehiculizadas las feromonas, como otros posibles determinantes de la falta de respuesta a la exposición continua a la orina de toros. Por lo tanto, y en acuerdo con los resultados del presente experimento, los efectos

positivos de una preestimulación sobre las tasas de concepción y preñez posterior a la aplicación de PSC estarían principalmente determinados por la mayor proporción de hembras ciclando al inicio del PSC.

En síntesis, a partir de los resultados obtenidos en el presente experimento se confirman los efectos positivos de la bioestimulación con NA sobre la actividad cíclica de vaquillonas en anestro. A su vez, no se encontraron efectos positivos de la exposición a los machos sobre las tasas de concepción ni de preñez total, lo que reafirma la alta variabilidad de los resultados reportados en relación a la bioestimulación y sus efectos sobre las tasas de concepción y preñez.

## 8. DISCUSIÓN GENERAL

La exposición de vaquillonas de carne en anestro a NA, en condiciones de manejo extensivo adelantó el inicio de la actividad cíclica, lo que concuerda con resultados anteriores (Roberson et al. 1991; Rekwot et al, 2000; Assis et al. 2001; Oliveira et al. 2009). La eficacia del uso de NA como estímulo de la actividad cíclica también concuerda con resultados anteriores (Ungerfeld, 2009), lo que confirma que la señal enviada es en parte andrógeno dependiente. A su vez, resta por evaluar si la respuesta a la bioestimulación difiere entre toros y NA. La exposición a NA durante 30 a 35 días resultó eficaz para estimular la actividad cíclica tanto en vaquillonas de 1 año (Experimento I) como en vaquillonas próximas a los 2 años de edad (Experimento III). La duración de la exposición fue menor a la utilizada en estudios anteriores que también evaluaron la bioestimulación en vaquillonas prepúberes (Roberson et al. 1991; Oliveira et al. 2009), lo que puede ser atribuido a la cercanía con el inicio espontáneo de la pubertad de las vaquillonas utilizadas en nuestro estudio. A su vez, coincidiendo con anteriores experimentos (Quadros y Lobato, 2004), el efecto positivo sobre la ciclicidad a lo largo del periodo de exposición estuvo relacionado con la edad de las vaquillonas al inicio de la exposición: aquellas hembras de mayor edad, y por tanto más próximas al inicio espontáneo de la ciclicidad, mostraron una respuesta positiva rápida pero de corta duración a la bioestimulación (Experimento I y III). En forma inversa, dentro del rango de vaquillonas más jóvenes, la diferencia en el inicio de la ciclicidad a favor de las hembras expuestas fue de mayor duración, pero se manifestó en forma más tardía en relación a las hembras más viejas (Experimento I). Por lo tanto, la duración de la exposición necesaria para lograr una respuesta positiva a la exposición a los machos, se asociaría negativamente con el grado de desarrollo de las hembras al inicio de la exposición.

El estatus nutricional representa uno de los principales factores que influyen en el inicio de la pubertad en vaquillonas (Schillo et al. 1992). En el presente estudio, el mayor peso vivo de las vaquillonas al inicio de la exposición se asoció positivamente con la respuesta a la bioestimulación (Experimento I; Publicación I). Dicho resultado coincidió con experimentos anteriores que reportaron la influencia de la nutrición sobre la respuesta a la exposición a los machos, tanto en vaquillonas (Roberson et al. 1991; Rekwot et al. 2000b; Quadros y Lobato, 2004) como en vacas de carne durante el posparto (Monje et al. 1992; Stumpf et al. 1992). A su vez, el peso vivo de las vaquillonas al inicio de la exposición se relacionó positivamente con el grado de interacción entre machos y hembras: las vaquillonas de mayores pesos vivos presentaron una mayor proximidad física con los machos y mayor proceptividad hacia los NA al encontrarse en situaciones de competencia con hembras más livianas (Experimento I y II). Por lo tanto, la mayor interacción se asociaría a un mayor estímulo de los machos hacia las vaquillonas más pesadas, el que sería el determinante de la mayor respuesta a la bioestimulación (Experimento I). Sin embargo, cuando las hembras de ambos rangos de pesos vivos se encontraron en forma aislada con el NA, el grado de interacción entre el macho y las vaquillonas fue similar entre ambos rangos de hembras (Experimento II). Esto implica que el

estímulo varía de acuerdo al peso vivo de las hembras solamente cuando las mismas están en ambientes competitivos, o sea que el estado fisiológico asociado a los diferentes rangos de peso vivo no sería el único determinante de la magnitud del estímulo recibido. Por lo tanto, en situaciones de manejo grupal, la separación del lote de hembras de acuerdo a rangos de peso vivo podría ser una estrategia interesante para maximizar la respuesta de las vaquillonas a la exposición a los machos.

A su vez, en las condiciones mencionadas, la exposición de vaquillonas a NA en forma previa a un PSC e IA no afectó las tasas de concepción ni de preñez en relación a aquellas vaquillonas que se mantuvieron aisladas. La mayor parte de los experimentos que reportaron incrementos de las tasas de concepción y/o de preñez en respuesta a una preestimulación con machos, también encontraron un efecto positivo de la bioestimulación sobre la actividad cíclica al inicio del PSC (Anderson et al. 2002; Berardinelli y Tauck, 2005; Berardinelli et al. 2007; Tauck y Berardinelli, 2007). En el presente estudio la proporción de hembras ciclando al inicio del PSC e IA fue similar entre ambos grupos (Experimento III). A su vez, hasta el momento no existe evidencia que permita confirmar o descartar un efecto directo de la bioestimulación sobre la fertilidad en sí misma. Por lo tanto, contrastando nuestro resultado con anteriores experimentos, posiblemente el efecto positivo de la exposición a los machos sobre las tasas de concepción y preñez se encuentre asociado a la mayor proporción de hembras expuestas ciclando al inicio del PSC e IA.

## 9. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en la presente Tesis se concluyó:

- La exposición de vaquillonas de carne en anestro a NA en condiciones de manejo pastoril extensivo, resultó una estrategia eficaz para disminuir el tiempo al inicio de la ciclicidad.
- En situaciones de competencia, el mayor estímulo recibido por parte de las hembras más pesadas repercutió en una mayor respuesta a la bioestimulación, en comparación a las hembras de menores pesos vivos.
- En las condiciones estudiadas, la bioestimulación no tuvo efectos positivos sobre las tasas de concepción ni de preñez tras un PSC e IA no habiendo incrementado el porcentaje de vaquillonas cíclicas al momento de comenzar el PSC.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agabriel J, Blanc F, Egal D, Dhour P. (2004). Combined effects of male and calving period on post partum anoestrus duration of Charolais cows. *Renc Rech Ruminants* 11: 398.
2. Alberio RH, Schiersmann G, Carou N, Mestre J. (1987). Effect of teaser bull on ovarian and behavioural activity of suckling beef cows. *Anim Reprod Sci* 14: 263-272.
3. Alvarez L, Martin GB, Galindo F, Zarco LA. (2003). Social dominance of female goats affect their response to the male effect. *Appl Anim Behav Sci* 84: 119-126.
4. Alvarez L, Zarco L, Galindo F, Blache D, Martin GB. (2007). Social rank and response to the "male effect" in the Australian Cashmere goat. *Anim Reprod Sci* 102: 258-266.
5. Anderson LH, McDowell CM, Day ML. (1996). Progestin-induced puberty and secretion of luteinizing hormone in heifers. *Biol Reprod* 54: 1025-1031.
6. Anderson KA, Berardinelli JG, Joshi PS, Robinson B. (2002). Effects of exposure to bull or excretory products of bulls on the breeding performance of first-calf restricted suckled beef cows using a modified Co-Synch protocol. *Proc West Soc Amer Soc Anim Sci* 53: 457-460.
7. Arije GF, Wiltbank JN. (1971). Age and weight at puberty in Hereford heifers. *J Anim Sci* 33; 401-406.
8. Arije GF, Wiltbank JN. (1974). Prediction of age and weight at puberty in beef heifers. *J Anim Sci* 38; 803-810.
9. Assis RR, Pimentel MA, Jardim PO, Osorio JC, Machado JP. (2000). Influência da bioestimulação com machos vasectomizados na eficiência reproductiva de novilhas Aberdeen Angus. *Rev Bras de Agrociência* 6 (3): 226-231.
10. Atkinson S, Williamson P. (1985). Ram-induced growth of ovarian follicles and gonadotrophin inhibition in anoestrous ewes. *J Reprod Fert* 73: 185-189.
11. Bailey JD, Anderson LH, Schillo KK. (2005). Effects of novel females and stage of the estrous cycle on sexual behavior in mature beef bulls. *J Anim Sci* 83: 613-624.
12. Baruah KK, Kanchev LN. (1993). Hormonal responses to olfactory stimulation with bull urine in postpartum dairy cows. *Proc.VII World Conf. Anim. Prod.* 3:356–359.

13. Barreto SN, Negrín DM. (2005). Efecto del manejo nutricional en el primer invierno sobre la aparición de la pubertad en terneras de raza carnífera. Tesis de grado, Facultad de Agronomía, UdelaR, Montevideo, Uruguay. Disponible en: [www.biblioteca.fagro.edu.uy](http://www.biblioteca.fagro.edu.uy)
14. Bastidas P, Ruiz J, Manzo M, Silva O, Guerrero N, Trocóniz J. (1997). Effect of bull exposure on corpus luteum function and ovarian activity in prepuberal Brahman heifers. *Arch Latinoam Prod Anim* 5 (1): 390-392.
15. Beach FA. (1976). Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. *Horm Behav* 7: 105-138.
16. Berardinelli JG, Fogwell RL, Inskeep EK. (1978). Effect of electrical stimulation or presence of a bull on puberty in beef heifers. *Theriogenology* 9: 133-138.
17. Berardinelli JG, Anderson K, Robinson B, Adair R. (2001). Effect of presence of bulls and restricted suckling on breeding performance of first-calf suckled beef cows using the Ovsynch protocol. *Proc West Sec, Amer Soc Anim Sci* 52.
18. Berardinelli JG, Joshi PS. (2005a). Initiation of postpartum luteal function in primiparous restricted-suckled beef cows exposed to a bull or excretory products of bulls or cows. *J Anim Sci* 83: 2495-2500.
19. Berardinelli JG, Joshi PS. (2005b). Introduction of bulls at different days postpartum on resumption of ovarian cycling activity in primiparous beef cows. *J Anim Sci* 83: 2106-2110.
20. Berardinelli JG, Tauck SA. (2005). Use of bull exposure in a gonadotropin-releasing hormone-based estrous synchronization protocol that included fixed-time artificial insemination in first-calf suckled beef cows. *Proc. from Nutrition Conference, Montana State University*.
21. Berardinelli JG, Joshi PS, Tauck SA. (2005). Postpartum resumption of ovarian cycling activity in first-calf suckled beef cows exposed to familiar or unfamiliar bulls. *Anim Reprod Sci* 90: 201-209.
22. Berardinelli JG, Joshi PS, Tauck SA. (2007). Conception rates to artificial insemination in primiparous, suckled cows exposed to the biostimulatory effect of bulls before and during a gonadotropin-releasing hormone-based estrus synchronization protocol. *J Anim Sci* 85: 848-852.
23. Berardinelli JG, Tauck SA. (2007). Intensity of the biostimulatory effect of bulls on resumption of ovulatory activity in primiparous, suckled, beef cows. *Anim Reprod Sci* 99: 24-33.

24. Berardinelli JG, Wilkinson JRC, Tauck SA, Olsen JR, Wedlake RJ. (2009). Duration of daily bull exposure on follicular wave dynamics of postpartum, anovular, suckled cows. *Biol Reprod* 81: 544.
25. Bergfeld EGM, Kojima FN, Cupp AS, Wehrman ME, Peters KE, Garcia-Winder M, Kinder JE. (1994). Ovarian follicular development in prepubertal heifers is influenced by level of dietary energy intake. *Biol Reprod* 51: 1051-1057.
26. Bolaños JM, Forsberg M, Kindahl H, Rodriguez-Martinez H. (1998). Biostimulatory effects of estrous cows and bulls on resumption of ovarian activity in postpartum anestrous zebu (*Bos Indicus*) cows in the humid tropics. *Theriogenology* 49: 629-636.
27. Bonavera JJ, Schiersmann GCS, Alberio RH, Mestre J. (1990). A note on the effects of 72-hour calf removal and/or bull exposure upon postpartum reproductive performance of Angus cows. *Anim Prod* 50: 202-206.
28. Bossis I, Wettemann RP, Welty SD, Vizcarra JA, Spicer LJ, Diskin MG. (1999). Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function preceding cessation of ovulation. *J Anim Sci* 77: 1536-1546.
29. Breen KM, Karsch FJ. (2004). Does cortisol inhibit pulsatile luteinizing hormone secretion at the hypothalamic or pituitary level? *Endocrinology* 145: 692-698.
30. Burley N. (1977). Parental investment, mate choice, and mate quality. *Proc. Natl. Acad Sc* 74: 3476-3479.
31. Burns PD, Spitzer JC. (1992). Influence of biostimulation on reproduction in postpartum beef cows. *J Anim Sci* 70: 358-362.
32. Byerley DJ, Staigmiller RB, Berardinelli JG, Short RE. (1987). Pregnancy rates of beef heifers bred either on puberal or third estrus. *J Anim Sci* 65: 645-650.
33. Caputi P, Murguía JM. (2003). Análisis del crecimiento ganadero a través de un modelo de equilibrio. *Agrociencia VII (2)*: 79-90.
34. Caputi P. (2005). Evolución del sector agropecuario uruguayo 1984-2004: balance y perspectivas. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, IICA. Disponible en: [www.iica.int](http://www.iica.int)
35. Chanvallon A. (2009). Origine de la variabilité de réponse à l'effect mâle. Tesis de Doctorado (PhD), Universidad Française-Rabelais de Tours, Nouzilly, Francia.

36. Chanvallon A, Scaramuzzi RJ, Fabre-Nys C. (2010). Early sexual experience and stressful conditions affect the response of young ewes to the male. *Phys Behav*, en prensa.
37. Chenoweth PJ. (1983). Reproductive management procedures in control of breeding. *Anim Prod Australia* 15: 28-31.
38. Ciccioli NH, Charles-Edwards SL, Floyd C, Wettemann RP, Purvis HT, Lusby KS, Horn GW, Lalman DL. (2005). Incidence of puberty in beef heifers fed high- or low-starch diets for different periods before breeding. *J Anim Sci* 83: 2653-2662.
39. Clanton DC, Jones LE, England ME. (1983). Effect of rate and time of gain after weaning on the development of replacement beef heifers. *J Anim Sci* 56: 280-285.
40. Cooke RF, Arthington JD, Staples CR, Thatcher WW; Lamb GC. (2007). Effects of supplement type on performance, reproductive, and physiological responses of Brahman-crossbred females. *J Anim Sci* 85: 2564-2574.
41. Cooke RF, Arthington JD, Araujo DB, Lamb GC, Ealy AD. (2008). Effects of supplementation frequency on performance, reproductive, and metabolic responses of Brahman-crossbred females. *J Anim Sci* 86: 2296-2309.
42. Costa AJ, Moreira RB, Scarsi MA. (2007). Efecto del manejo nutricional en el primer invierno sobre la aparición de la pubertad en terneras de raza carnífera. Tercer año de evaluación. Tesis de grado, Facultad de Agronomía, UdelaR, Montevideo, Uruguay. Disponible en: [www.biblioteca.fagro.edu.uy](http://www.biblioteca.fagro.edu.uy)
43. Costello AK, Pultorak JD, Meikle DB. (2009). Do male house mice (*Mus musculus*) discriminate between females that differ in nutritional status? *Behavioural Processes* 82: 119-125.
44. Cupp AS, Roberson MS, Stumpf TT, Wolfe MW, Werth LA, Kojima N, Kittok RJ, Kinder JE. (1993). Yearling bulls shorten the duration of postpartum anestrus in beef cows to the same extent as do mature bulls. *J Anim Sci* 71: 306-309.
45. Cushwa WT, Bradford GE, Stabenfeldt GH, Berger YM, Dally MR. (1992). Ram influence on ovarian and sexual activity in anestrus ewes: effects of isolation of ewes from rams before joining and date of ram introduction. *J Anim Sci* 70: 1195-2000.
46. Custer EE, Berardinelli JG, Short RE, Wehrman M, Adair R. (1990). Postpartum interval to estrus and patterns of LH and progesterone in first-calf suckled beef cows exposed to mature bulls. *J Anim Sci* 68: 1370-1377.

47. Dahl GE. (2008). Effects of short day photoperiod on prolactin signaling in dry cows: A common mechanism among tissues and environments? *J Anim Sci* 86: 10-14.
48. Day ML, Imakawa K, Garcia-Winder M, Zalesky DD, Schanbacher BD, Kittok RJ, Kinder JE. (1984). Endocrine mechanisms of puberty in heifers: Estradiol negative feedback regulation of luteinizing hormone secretion. *Biol Reprod* 31: 332-341.
49. Day ML, Imakawa K, Zalesky DD, Kittok RJ, Kinder JE. (1986). Effects of restriction of dietary energy intake during the prepubertal period on secretion of luteinizing hormone and responsiveness of the pituitary to luteinizing hormone-releasing hormone in heifers. *J Anim Sci* 62: 1641-1648.
50. Day ML, Imakawa K, Wolfe PL, Kittok RJ, Kinder JE. (1987). Endocrine mechanisms of puberty in heifers: Role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. *Biol Reprod* 37: 1054-1065.
51. Day ML, Anderson LH. (1998). Current concepts on the control of puberty in cattle. *J Anim Sci* 76: 1-15.
52. Day ML, Grum DE. (2005). Breeding strategies to optimize reproductive efficiency in beef herds. *Vet Clin Food Anim* 21: 367-381.
53. De Souza FG. (2002). Efeito da presença de rufiões sobre a primeira temporada reprodutiva de novilhas de corte. *Acta Sci Vet* 30: 72-73.
54. Delgadillo JA, Flores JA, Véliz FG, Duarte G, Vielma J, Hernandez H, Fernandez IG. (2006). Importance of the signals provided by the buck for the success of the male effect in goats. *Reprod Nutr Dev* 46: 391-400.
55. Delgadillo JA, Gelez H, Ungerfeld R, Hawken PAR, Martin GB. (2009). The 'male effect' in sheep and goats-Revisiting the dogmas. *Behav Brain Res* 200: 304-314.
56. DIEA. División de Estadísticas Agropecuarias. (2009). Anuario Estadístico Agropecuario, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Uruguay. Disponible en: [www.mgap.gub.uy](http://www.mgap.gub.uy)
57. Diskin MG, Austin EJ, Roche JF. (2002). Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Dom Anim End* 23: 211-228.
58. Dodson SE, McLeod BJ, Haresign W, Peters AR, Lamming GE. (1988). Endocrine changes from birth to puberty in the heifer. *J Reprod Fert* 82: 527-538.

59. Dow JS, Moore JD, Bailey CM, Foote WD. (1982). Onset of puberty in heifers of diverse beef breeds and crosses. *J Anim Sci* 55: 1041-1047.
60. Evans ACO, Adams GP, Rawlings NG. (1994a). Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. *J Reprod Fertil* 102: 463-470.
61. Evans ACO, Adams GP, Rawlings NG. (1994b). Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. *J Reprod Fertil* 100: 187-194.
62. Ferrell CL. (1982). Effects of postweaning rate of gain on onset of puberty and productive performance of heifers of different breeds. *J Anim Sci* 55: 1272-1283.
63. Fike KE, Bergfeld EG, Cupp AS, Kojima FN, Mariscal V, Sanchez TS, Wehrman JE, Kinder JE. (1996). Influence of fenceline bull exposure on duration of postpartum anoestrous and pregnancy rate in beef cows. *Anim Reprod Sci* 41: 161-167.
64. Fernandez D, Berardinelli JG, Short RE, Adair R. (1993). The time required for the presence of bulls to alter the interval from parturition to resumption of ovarian activity and reproductive performance in first-calf suckled beef cows. *Theriogenology* 39: 411-419.
65. Fernandez DL, Berardinelli JG, Short RE, Adair R. (1996). Acute and chronic changes in luteinizing hormone secretion and postpartum interval to estrus in first-calf suckled beef cows exposed continuously or intermittently to mature bulls. *J Anim Sci* 74: 1098-1103.
66. Fiol C, Curbelo N, Larraz G, Ungerfeld R. (2010). Ovarian response in anestrus beef heifers exposed to androgenised steers. 8<sup>th</sup> International Ruminant Reproduction Symposium, 3-7, September, Anchorage, Alaska, aceptado.
67. Flores R, Looper ML, Rorie RW, Hallford DM, Rosenkrans CF. (2008). Endocrine factors and ovarian follicles are influenced by body condition and somatotropin in postpartum beef cows. *J Anim Sci* 86: 1335-1344.
68. Funston RN, Deutscher GH. (2004). Comparison of target breeding weight and breeding date for replacement beef heifers and effects on subsequent reproduction and calf performance. *J Anim Sci* 82: 3084-3099.
69. Gasser CL, Grum DE, Mussard ML, Fluharty FL, Kinder JE, Day ML (2006a). Induction of precocious puberty in heifers I: Enhanced secretion of luteinizing hormone. *J Anim Sci* 84: 2035-2041.

70. Gasser CL, Burke CR, Mussard ML, Behlke EJ, Grum DE, Kinder JE, Day ML. (2006b). Induction of precocious puberty in heifers II: Advanced ovarian follicular development. *J Anim Sci* 84: 2042-2049.
71. Gasser CL, Bridges GA, Mussard ML, Grum DE, Kinder JE, Day ML. (2006c). Induction of precocious puberty in heifers III: Hastened reduction of estradiol negative feedback on secretion of luteinizing hormone. *J Anim Sci* 84: 2050-2056.
72. Geary TW, deAvila DM, Westberg HH, Senger PL, Reeves IJ. (1991). Bulls show no preference for a heifers in estrus in preference tests. *J Anim Sci* 69: 3999-4006.
73. Gelez H, Fabre-Nyz. (2004). The "male effect" in sheep and goats: a review of the respective roles of the two olfactory systems. *Hormones & Behaviour* 46: 257-271.
74. Gelez H, Fabre-Nyz. (2006). Role of the olfactory systems and importance of learning in the ewes' response to rams or their odors. *Reprod Nutr Dev* 46: 401-415.
75. Gifford DR, D'Occhio MJ, Sharpe PH, Weatherly T, Pittar RY, Reeve DV. (1989). Return to cyclic ovarian activity following parturition in mature cows and first-calf beef heifers exposed to bulls. *Anim Reprod Sci* 19: 209-216.
76. Granger AL, Wyatt WE, Hembry FG, Craig WM, Thompson DL. (1990). Effects of breed and wintering diet on heifer postweaning growth and development. *J Anim Sci* 68: 304-316.
77. Greer RC, Whitman RW, Staigmiller RB, Anderson DC. (1983). Estimating the impact of management decisions on the occurrence of puberty in beef heifers. *J Anim Sci* 56: 30-39.
78. Gregory KE, Laster DB, Cundiff LV, Smith GM, Koch RM. (1979). Characterization of biological types of cattle-cycle III: II. Growth rate and puberty in females. *J Anim Sci* 49: 461-471.
79. Grus WE, Zhang J. (2008). Distinct evolutionary patterns between chemoreceptors of 2 vertebrate olfactory systems and the differential tuning hypothesis. *Mol Biol Evol* 25 (8): 1593-1601.
80. Hall JB, Schillo KK, Fitzgerald BP, Bradley NW. (1994). Effects of recombinant bovine somatotropin and dietary energy intake on growth, secretion of luteinizing hormone, follicular development, and onset of puberty in beef heifers. *J Anim Sci* 72: 709-718.
81. Hansen P. J, Kamwanja LA, Hauser ER. (1983). Photoperiod influences age at puberty in heifers. *J Anim Sci* 57: 985-992.

82. Hawken PAR, Beard AP. (2009). Ram novelty and the duration of ram exposure affects the distribution of mating in ewes exposed to rams during the transition into the breeding season. *Anim Reprod Sci* 111: 249-260.
83. Hess BW, Lake SL, Scholljegerdes EJ, Weston TR, Nayigihugu V, Molle JDC, Moss GE. (2005). Nutritional controls of beef cow reproduction. *J Anim Sci* 83 (E. Suppl.): E90-E106.
84. Holm DE, Thompson PN, Irons PC. (2008). The economic effects of an estrus synchronization protocol using prostaglandin in beef heifers. *Theriogenology* 70: 1507-1515.
85. Hopper HW, Williams SE, Byerley DJ, Rollosson MM, Ahmed PO, Kiser TE. (1993). Effect of prepubertal body weight gain and breed on carcass composition at puberty in beef heifers. *J Anim Sci* 71: 1104-1111.
86. Imwalle DB, Patterson DJ, Schillo KK. (1998) Effects of melengestrol acetate on onset of puberty, follicular growth, and patterns of luteinizing hormone secretion in beef heifers. *Biol Reprod* 58: 1432-1436.
87. Ingawale MV, Dhoble RL. (2004). Buffalo reproduction in India: an overview. *Buffalo Bulletin* 23 (1): 4-9.
88. Izard MK, Vandenberg JG. (1982a). The effects of bull urine on puberty and calving date in crossbred beef heifers. *J Anim Sci* 55: 1160-1168.
89. Izard MK, Vandenberg JG. (1982b). Priming pheromones from oestrous cows increase synchronization of oestrus in dairy heifers after PGF-2 $\alpha$  injection. *J Reprod Fertil* 66: 189-196
90. Izard MK. (1983). Pheromones and reproduction in domestic animals. En: *Pheromones and Reproduction in Mammals*, Vandenberg JG (Ed.). New York Academic Press, pp. 253-285.
91. Jones EJ, Armstrong JD, Harvey RW. (1991). Changes in metabolites, metabolic hormones, and luteinizing hormone before puberty in Angus, Braford, Charolais, and Simmental heifers. *J Anim Sci* 69: 1607-1615.
92. Katz LS. (2008). Variation in male sexual behavior. *Anim Reprod Sci* 105: 64-71.
93. Kiddy CA. (1977). Variation in physical activity as an indication of estrus in dairy cows. *J Dairy Sci* 60: 235-243.
94. Kirkwood RN, Hughes PE. (1981). A note on the influence of boar age on its ability to advance puberty in gilts. *Anim Prod* 31: 211.

95. Lalman DL, Petersen MK, Ansotegui RP, Tess MW, Clark CK, Wiley JS. (1993). The effects of ruminally undegradable protein, propionic acid, and monensin on puberty and pregnancy in beef heifers. *J Anim Sci* 71: 2843-2852.
96. Landaeta-Hernández AJ, Giangreco M, Meléndez P, Bartolomé J, Bennet F, Rae DO, Hernández J, Archbald LF. (2004). Effect of biostimulation on uterine involution, early ovarian activity and first postpartum estrous cycle in beef cows. *Theriogenology* 61: 1521-1532.
97. Landaeta-Hernández AJ, Meléndez P, Bartolomé J, Rae DO, Archbald LF. (2006). Effect of biostimulation on the expression of estrus in postpartum Angus cows. *Theriogenology* 66: 710-716.
98. Landaeta-Hernández AJ, Meléndez P, Bartolomé J, Rae O, Archbald LF. (2008). The effect of bull exposure on the early postpartum reproductive performance of suckling Angus cows. *Revista científica FCV-LUZ XVIII*, 682-691.
99. Lesmeister JL, Burfening PJ, Blackwell RL. (1973). Date of first calving in beef cows and subsequent calf production. *J Anim Sci* 36: 1-6.
100. Lima CS, Gambarini ML, Viu MAO, Filho BDO, Santos FC, Caixeta LS. (2008). Effect of biostimulation, monensin and recombinant bovine somatotropin on the daily weight gain and onset of puberty of Girolando heifers raised in pastures. *Arch Vet Sci* 13: 93-97.
101. Maciel MN, Zieba DA, Amstalden M, Keisler DH, Neves JP, Williams GL. (2004). Chronic administration of recombinant ovine leptin in growing beef heifers: Effects on secretion of LH, metabolic hormones, and timing of puberty. *J Anim Sci* 82: 2930-2936.
102. Macmillan KL, Allison AJ, Struthers GA. (1979). Some effects of running bulls with suckling cows or heifers during the pre-mating period. *N Z J Exp Agric* 7: 121-124.
103. McShane TM, Schillo KK, Boling JA, Bradley NW, Hall JB. (1989). Effects of recombinant DNA-derived somatotropin and dietary energy intake on development of beef heifers: I. Growth and puberty. *J Anim Sci* 67: 2230-2236.
104. Madgwick S, Evans ACO, Beard AP. (2005). Treating heifers with GnRH from 4 to 8 weeks of age advanced growth and the age at puberty. *Theriogenology* 63: 2323-2333.
105. Madrigal MA, Colin J, Hallford DM. (2001). Influencia de la condición corporal y la bioestimulación sobre la eficiencia reproductiva en vacas de raza Simmental en agostadero. *Vet Méx* 32 (2): 87-92.

106. Margiasso ME, Longpre KM, Katz LS. (2010). Partner preference: Assesing the role of the female goat. *Physiology & Behavior*, en prensa.
107. Marston TT, Lusby KS, Wettemann RP. (1995). Effects of postweaning diet on age and weight at puberty and milk production of heifers. *J Anim Sci* 73: 63-68.
108. Martin GB, Scaramuzzi RJ, Lindsay DR. (1983). Effect of the introduction of rams during the anoestrous season on the pulsatile secretion of LH in ovariectomized ewes. *J Reprod Fertil* 67: 47-55.
109. Martin GB, Oldham CM, Cognié Y, Pearce DT. (1986). The physiological responses of anovulatory ewes to the introduction of rams- A review. *Livestock Prod Sci* 15: 219-247.
110. Martin GB, Milton JTB, Davidson RH, Banchero Hunzicker GE, Lindsay DR, Blache D. (2004). Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Anim Reprod Sci* 82-83: 231-245.
111. Martin GB. (2009). El concepto de “Limpio, Verde y Ético (LVE)” en producción animal. Seminario Producción Animal Limpia, Verde y Ética, INIA Tacuarembó, Tacuarembó, Uruguay, 12 de noviembre.
112. Martin JL, Creighton KW, Musgrave JA, Klopfenstein TJ, Clark RT, Adams DC, Funston RN. (2008). Effect of prebreeding body weight or progestin exposure before breeding on beef heifer performance through the second breeding season. *J Anim Sci* 86: 451-459.
113. Martin P, Bateson P. (1993). Measures of behaviour. En: *Measuring behaviour: An introductory guide*, 2nd Edition, Cambridge University Press, pp. 78.
114. Miller V, Ungerfeld R. (2008). Weekly bull exchange shortens postpartum anestrus in suckled beef cows. *Theriogenology* 69: 913-917.
115. Monje AR, Alberio R, Schiersmann G, Chedrese J, Carou N, Callejas SS. (1992). Male effect on the post-partum sexual activity of cows maintained on two nutritional levels. *Anim Reprod Sci* 29: 145-156.
116. 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.
117. Mora OA, Sánchez-Criado JE. (2004). Involvement of the corticoadrenal hormones in the pheromonal restoration of reproductive activity in aging rats. *Life Sci* 74: 3285-3290.

118. Oakley AE, Breen KM, Tilbrook AJ, Wagenmaker ER, Karsch FJ. (2009). Role of estradiol in cortisol-induced reduction of luteinizing hormone pulse frequency. *Endocrinology* 150: 2775-2782.
119. Oliveira CMG, Oliveira Filho BD, Gambarini ML, Viu MAO, Lopes DT, Sousa APF. (2009). Effect of biostimulation and nutritional supplementation on pubertal age and pregnancy rates of Nelore heifers (*Bos indicus*) in a tropical environment. *Anim Reprod Sci* 113: 38-43.
120. Olsen JR, Tauck SA, Wilkinson JRC, Keisler DH, Berardinelli JG. (2009). Biostimulatory effect of bulls on temporal patterns of leptin concentrations and resumption of luteal activity in primiparous, postpartum, anestrous, beef cows. *Biol Reprod* 81: 261.
121. Orcasberro R. (1991). Estado corporal, control del amamantamiento y performance reproductiva de rodeos de cría. Serie Técnica INIA 13: 158-169.
122. O'Riordan EG, Hanrahan JP. (1989). Advancing first estrus in ewe lambs. *Farm and Food Research* 20 (6): 25-27.
123. Oyhantçabal W, Mila F, Frugoni G. (2009). Comportamiento del sector carne vacuna en 2009 y perspectivas para 2010. En: Anuario OPYPA 2009. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Disponible en: [www.mgap.gub.uy](http://www.mgap.gub.uy)
124. Patterson DJ, Corah LR, Brethour JR, Spire MF, Higgins JJ, Kiracofe GH, Stevenson JS, Simms DD. (1991). Evaluation of reproductive traits in *Bos taurus* and *Bos indicus* crossbred heifers: effects of postweaning energy manipulation. *J Anim Sci* 69: 2349-2361.
125. Patterson DJ, Perry RC, Kiracofe GH, Bellows RA, Staigmiller RB, Corah LR. (1992). Management considerations in heifer development and puberty. *J Anim Sci* 70: 4018-4035.
126. Patterson DJ, Kojima FN, Smith MF. (2003). A review of methods to synchronize estrus in replacement beef heifers and postpartum cows. *J Anim Sci* 81: E166-177.
127. Pereira G. (2003). La ganadería en Uruguay. Contribución a su conocimiento. División Estadísticas Agropecuarias (DIEA), Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Uruguay. Disponible en: [www.mgap.gub.uy](http://www.mgap.gub.uy)
128. Perkins A, Fitzgerald JA. (1994). The behavioral component of the ram effect: the influence of ram sexual behavior on the induction of estrus in anovulatory ewes. *J Anim Sci* 72: 51-55.

129. Petitclerc D, Chapin LT, Emery RS, Tucker HA. (1983). Body growth, growth hormone, prolactin and puberty response to photoperiod and plane of nutrition in Holstein heifers. *J Anim Sci* 57: 892-898.
130. Pfeifer LFM, Siqueira LG, Mapletoft RJ, Kastelic JP, Adams GP, Colazo MG, Singh J. (2009). Effects of exogenous progesterone and cloprostenol on ovarian follicular development and first ovulation in prepubertal heifers. *Theriogenology* 72: 1054-1064.
131. Pierce AA, Ferkin MH, Williams TK. (2005). Food-deprivation-induced changes in sexual behaviour of meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*. *Anim Behav* 70: 339-348.
132. Pierce AA, Ferkin MH. (2005). Re-feeding and the restoration of odor attractivity, odor preference, and sexual receptivity in food-deprived female meadow voles. *Physiology & Behavior* 84: 553-561.
133. Price EO. (1985). Sexual behavior of large domestic farm animals: an overview. *J Anim Sci* 61: 62-74.
134. Quadros SAF, Lobato JFP. (2004). Biostimulation and reproductive performance of beef heifers. *Rev Bras Zoot* 33: 679-683.
135. Quintans G, Straumann JM, Ayala W, Vázquez A. (2004). Effect of winter management on the onset of puberty in beef heifers under grazing conditions. 15<sup>th</sup> International Congress of Animal Reproduction, 8-12 August, Porto Seguro, Brazil, Abstract No. 22.
136. Quintans G, Barreto S, Negrín D, Ayala W. (2007). Efecto de la tasa de ganancia invernal en el inicio de la pubertad de terneras de biotipos carniceros en pastoreo. XXX Reunión anual de la Asociación Peruana de Producción Animal, Cuzco, Perú, (PB044), pp. 447.
137. Rawlings NC, Evans ACO, Honaramooz A, Bartlewski PM. (2003). Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. *Anim Reprod Sci* 78: 259-270.
138. Rekwot PI, Ogwy D, Oyedipe E. (2000a). Influence of bull stimulation, season and parity on resumption of ovarian activity of zebu (*Bos indicus*) cattle following parturition. *Anim Reprod Sci* 63: 1-11.
139. Rekwot PI, Ogwy D, Oyedipe E, Sekoni V. (2000b). Effects of bull exposure and body growth on onset of puberty in Bunajii and Friesian x Bunajii heifers. *Reprod Nutr Dev* 40: 359-367.
140. Rekwot PI, Ogwy D, Oyedipe E, Sekoni V. (2001). The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction. *Anim Reprod Sci* 65: 157-170.

141. Rekwot PI, Akinpelumi OP, Sekoni V, Eduvie LO, Oyedipe E. (2004). Effects of nutritional supplementation and exposure to bulls on resumption of post-partum ovarian activity in Bunaji (*Bos indicus*) cattle. *The Veterinary Journal* 167: 67-71.
142. Ringuet H, Pelletier G, Brazead P, Gaudreau P, Guilbault LA, Morisset J, Couture Y, Petitclerc D. (1994). Long-term effects of human growth hormone-releasing hormone and photoperiod on hormone release and puberty in dairy heifers. *J Anim Sci* 72: 2709-2717.
143. Rivas-Muñoz R, Fitz-Rodríguez G, Poindron P, Malpaux B, Delgadillo JA. (2007). Stimulation of estrous behavior in grazing female goats by continuous or discontinuous exposure to males. *J Anim Sci* 85: 1257-1263.
144. Roberson MS, Ansotegui RP, Berardinelli JG, Whitman RW, McInerney MJ. (1987). Influence of biostimulation by mature bulls on occurrence of puberty in beef heifers. *J Anim Sci* 64: 1601-1605.
145. Roberson MS, Wolfe MW, Stumpf TT, Werth LA, Cupp AS, Kojima N, Wolfe PL, Kittok PJ. (1991). Influence of growth rate and exposure to bulls on age at puberty in beef heifers. *J Anim Sci* 69: 2092-2098.
146. Rodrigues HD, Kinder JE, Fitzpatrick LA. (2002). Estradiol regulation of luteinizing hormone secretion in heifers of two breed types that reach puberty at different ages. *Biol Reprod* 66: 603-609.
147. Roelofs JB, Soede NM, Dieleman SJ, Voskamp-Harkema W, Kemp B. (2007). The acute effect of bull presence on plasma profiles of luteinizing hormone in postpartum, anoestrous dairy cows. *Theriogenology* 68: 902-907.
148. Roelofs JB, Soede NM, Voskamp-Harkema W, Kemp B. (2008). The effect of fenceline bull exposure on expression of oestrus in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 108: 226-235.
149. Rovira J. (1996). Manejo nutritivo de los rodeos de cría. Editorial Hemisferio Sur.
150. Sáez RR. (2009). Desempeño del sector agropecuario y agroindustrial de Uruguay en el periodo 2000-2008. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, IICA. [http:// www.iica.int](http://www.iica.int)
151. Sato S, Honda Y, Ohta M. (1994). Behavioural interactions of a bull with cows and the resumption of estrous. *Anim Sci Technol (Jpn)*. 65: 538-546.
152. Schillo KK, Hall JB, Hileman SM. (1992). Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer. *J Anim Sci* 70: 3994-4005.

153. Senger PL. (1994). The estrus detection problem: new concepts, technologies, and possibilities. *J Dairy Sci* 77: 2745-2753.
154. Shipka MP, Ellis LC. (1998). No effects of bull exposure on expression of estrous behavior in high-producing dairy cows. *Appl Anim Behav Sci* 57: 1-7.
155. Shipka MP, Ellis LC. (1999). Effects of bull exposure on postpartum ovarian activity of dairy cows. *Anim Reprod Sci* 54: 237-244.
156. Shoppee PD, Armstrong JD, Harvey RW, Whitacre MD, Felix A, Campbell RM. (1996). Immunization against growth hormone releasing factor or chronic feed restriction initiated at 3.5 months of age reduces ovarian response to pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone at 6 months of age and delays onset of puberty in heifers. *Biol Reprod* 55: 87-98.
157. Short RE, Bellows RA. (1971). Relationships among weight gains, age at puberty and reproductive performance in heifers. *J Anim Sci* 32: 127-131.
158. Short RE, Adams DC. (1988). Nutritional and hormonal interrelationships in beef cattle reproduction. *Can J Anim Sci* 68: 29-39.
159. Short RE, Bellows RA, Staigmiller RE, Berardinelli JG, Custer EE. (1990). Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. *J Anim Sci* 68:799-816.
160. Signoret JP. (1991). Sexual pheromones in the domestic sheep: importance and limits in the regulation of reproductive physiology. *J Steroid Biochem Molec Biol* 39: 639-645.
161. Simpson RB, Armstrong JD, Harvey RW, Miller DC, Heimer EP, Campbell RM. (1991). Effect of active immunization against growth hormone-releasing factor on growth and onset of puberty in beef heifers. *J Anim Sci* 69: 4914-4924.
162. Small JA, Del Vecchio RP, McCaughey WP, Ward DR, Sutherland WP. (2000). The effects of bull exposure and lasalocid on the development of replacement beef heifers. *Can J Anim Sci* 80: 615-624.
163. Small JA, Glover ND, Kennedy AD, McCaughey WP, Ward DR. (2003). Photoperiod effects on the development of beef heifers. *Can J Anim Sci* 83: 721-730.
164. Soto Belloso E, Ramírez Iglesia E, Guevara L, Soto Castillo G. (1997). Bull effect on the reproductive performance of mature and first calf-suckled zebu cows in the tropics. *Theriogenology* 48: 1185-1190.

165. Stumpf TT, Wolfe MW, Wolfe PL, Day ML, Kittok RJ, Kinder JE. (1992). Weight changes prepartum and presence of bulls postpartum interact to affect duration of postpartum anestrus in cows. *J Anim Sci* 70: 3133-3137.
166. Straumann JM. (2006). Efecto del manejo nutricional en el primer invierno sobre la aparición de la pubertad en terneras de raza carnicera. Primer año de evaluación. Tesis de grado, Facultad de Agronomía, UdelaR, Montevideo, Uruguay. Disponible en: [www.biblioteca.fagro.edu.uy](http://www.biblioteca.fagro.edu.uy)
167. Swaney WT, Keverne EB. (2009). The evolution of pheromonal communication. *Behav Brain Res* 200: 239-247.
168. Tauck SA, Berardinelli JG. (2005). Effect of bull urine exposure on postpartum anestrus and breeding performance of first-calf suckled beef cows. Proc Nutrition Conference, Montana State University.
169. Tauck SA, Berardinelli JG, Geary TW, Johnson NJ. (2006). Resumption of postpartum luteal function of primiparous, suckled beef cows exposed continuously to bull urine. *J Anim Sci* 84: 2708-2713.
170. Tauck SA, Berardinelli JG. (2007). Putative urinary pheromone of bulls involved with breeding performance of primiparous beef cows in a pregestin-based estrous synchronization protocol. *J Anim Sci* 85: 1669-1674.
171. Tauck SA, Olsen JR, Berardinelli JG. (2007). Adrenal involvement in the biostimulatory effect of bulls. *Reprod Biol End* 5: 33-39.
172. Tauck SA. (2008). The biostimulatory effect of bulls on the hypothalamic-pituitary-adrenal and-ovarian axes and on temporal aspects of resumption of ovarian cycling activity in primiparous, postpartum, anestrus, suckled, beef cows. Tesis de Doctorado (PhD), Montana State University, Bozeman, Montana, EUA.
173. Tauck SA, Olsen JR, Wilkinson JRC, Berardinelli JG. (2010). Duration of daily bull exposure on resumption of ovulatory activity in postpartum, primiparous, suckled, beef cows. *Anim Reprod Sci* 118: 13-18.
174. Thatcher W, Moreira F, Pancarci SM, Bartolome JA, Santos JEP. (2002). Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. *Dom Anim End* 23: 243-254.
175. Thompson LH, Savage JS. (1978). Age at puberty and ovulation rate in gilts in confinement as influenced by exposure to a boar. *J Anim Sci* 47: 1141-1144.

176. Tilbrook AJ, Lindsay DR. (1987). Differences in the sexual “attractiveness” of oestrous ewes to rams. *Appl Anim Behav Sci* 17: 129-138.
177. Tilbrook AJ, Turner AI, Clarke IJ. (2000). Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. *Reviews of reproduction* 5: 105-113.
178. Ungerfeld R, Pinczak A, Forsberg M, Rubianes E. (2002). Ovarian and endocrine responses of Corriedale ewes to “ram effect” in the non-breeding season. *Can J Anim Sci* 82: 599-602.
179. Ungerfeld R. (2003). The reproductive response of anestrus ewes to the introduction of rams. Tesis de Doctorado (PhD), Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Suecia. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. Veterinaria* 163, pp 66.
180. Ungerfeld R. (2007). Socio-sexual signalling and gonadal function: Opportunities for reproductive management in domestic ruminants. En: *Reproduction in Domestic Ruminants VI*, Juengel JI, Murray JF, Smith MF (Eds.), Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp, 207-221.
181. Ungerfeld R, Correa O. (2007). Social dominance of female dairy goats influences the dynamics of gastrointestinal parasite eggs. *Appl Anim Behav Sci* 105: 249-253.
182. Ungerfeld R, Ramos MA, González-Pensado SP. (2008). Ram effect: Adults rams induce a greater reproductive response in anoestrous ewes than yearling rams. *Anim Reprod Sci* 103: 271-277.
183. Ungerfeld R. (2009). Short-term exposure of high body weight heifers to testosterone-treated steers increases pregnancy rate during early winter bull breeding. *Anim Reprod* 6 (3): 446-449.
184. Ungerfeld R. (2010). Exposure to androgenized steers did not improve the fertility obtained in progesterone-based fixed-timed artificial insemination programs in extensively managed cows and heifers. *Anim Prod Sci* 50: 68-71.
185. Vandenberg JG. (1983). Pheromonal regulation of puberty. En: Vandenberg JG (Ed.). *Pheromones and reproduction in mammals*. New York Academic Press, pp. 95-112.
186. Veissier I, Boissy A, dePassille AM, Rushen J, vanReenen CG, Roussel S, Andanson S, Pradel P. (2001). Calves’ responses to repeated social regrouping and relocation. *J Anim Sci* 79: 2580-2593.
187. Véliz FG, Poindron P, Malpoux B, Delgadillo JA. (2006). Positive correlation between the body weight of anestrus goats and their

- response to the male effect with sexually active bucks. *Reprod Nutr Dev* 46: 657-661.
188. Wallach SJR, Price EO. (1988). Bulls fail to show preference for estrous females in serving capacity tests. *J Anim Sci* 66: 1174-1178.
189. Walkden-Brown SW, Martin GB, Restall BJ. (1999). Role of male-female interaction in regulating reproduction in sheep and goats. *J Reprod Fertil (Suppl)* 54: 243-257.
190. Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG. (2004). Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci* 82: E63-E74.
191. Wiltbank JN, Kasson CW, Ingalls JE. (1969). Puberty in crossbred and straightbred beef heifers on two levels of feed. *J Anim Sci* 29: 602-605.
192. Whitney MB, Hess BW, Burgwald-Balstad LA, Sayer JL, Tsopito CM, Talbott CT, Hallford DM. (2000). Effects of supplemental soybean oil level on in vitro digestion and performance of prepubertal beef heifers. *J Anim Sci* 78: 504-514.
193. Wright PJ, Geytenbeek PE, Clarke IJ. (1990). The influence of nutrient status of post-partum ewes on ovarian cyclicity and on the oestrous and ovulatory responses to ram introduction. *Anim Reprod Sic* 23: 293-303.
194. Wright IA, Rhind SM, Smith AJ, Whyte TK. (1994). Female-female influences in the duration of the post-partum anoestrous period in beef heifers. *Anim Prod* 59: 49-53.
195. Yelich JV, Wettemann RP, Dolezal HG, Lusby KS, Bishop DK, Spicer LJ. (1995). Effects of growth rate on carcass composition and lipid partitioning at puberty and growth hormone, insulin-like growth factor I, insulin, and metabolites before puberty in beef heifers. *J Anim Sci* 73: 2390-2405.
196. Yelich JV, Wettemann RP, Marston TT, Spicer LJ. (1996). Luteinizing hormone, growth hormone, insulin-like growth factor-I, insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. *Dom Anim End* 13: 325-338.
197. Zalesky DD, Day ML, Garcia Winder M, Imakawa K, Kittok RJ, D'Occhio MJ, Kinder JE. (1984). Influence of exposure to bulls on resumption of estrous cycles following parturition in beef cows. *J Anim Sci* 59: 1135-1139.
198. Zicarelli L, Espósito L, Campanile G, Di Palo R, Armstrong DT. (1997). Effects of using vasectomized bulls in artificial insemination practice on the reproductive efficiency of Italian buffalo cows. *Anim Reprod Sci* 47: 171-180.

199. Zieba DA, Amstalden M, Morton S, Maciel MN, Keisler DH, Williams GL (2004). Regulatory roles of leptin at the hypothalamic-hypophyseal axis before and after sexual maturation in cattle. *Biol Reprod* 71: 804-812.

## **11. ANEXOS**

### **Publicación I.**

