



INSTITUTO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL CÓRDOBA



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias (UNC)
Escuela para Graduados

USO DE GONADOTROFINA CORIÓICA EQUINA EN LA SINCRONIZACIÓN DE LA OVULACIÓN Y EL MANTENIMIENTO DE LA GESTACIÓN EN VACAS DE CARNE

Richard Núñez Olivera

Tesis

Para Obtener el Grado Académico de
Magíster en Reproducción Bovina

Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela para Graduados

Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC)

Córdoba, 2014

**USO DE GONADOTROFINA CORIÓNICA EQUINA EN LA SINCRONIZACIÓN
DE LA OVULACIÓN Y EL MANTENIMIENTO DE LA GESTACIÓN EN VACAS
DE CARNE**

Richard Núñez Olivera

Comisión Asesora de Tesis

Director: DMTV (M.Sc., Ph.D.) Alejo Menchaca

Asesores: DMTV, (M.Sc.) Teresa de Castro (Co-directora)

Med. Vet. (M.V.Sc., Ph.D.) Gabriel A Bó

Tribunal Examinador de Tesis

Med. Vet. (M.Sc., Ph.D.) María Belén Rabaglino

Med. Vet. (M.Sc.) Pablo M. Chesta

Med. Vet. (M.V.Sc., Ph.D.) Gabriel A Bó

Presentación formal académica

29 de Abril de 2014

Instituto de Reproducción Animal Córdoba

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela para Graduados

Universidad Nacional de Córdoba

If I have seen further, it is by standing on the shoulders of giants,

Isaac Newton

AGRADECIMIENTOS

Los trabajos de esta tesis fueron realizados en establecimientos comerciales ubicados en diferentes departamentos de Uruguay. La financiación para los mismos provino, por una parte, del Proyecto de investigación en el marco del convenio entre el Laboratorio Syntex Uruguay, el Instituto de Reproducción Animal Uruguay (Fundación IRAUy) y la Fundación para el Desarrollo de las Ciencias Básicas (FUNDACIBA). Y por otra parte, del Proyecto de investigación PR_FMV_2009_1_3111 aprobado por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII).

Mis agradecimientos van dirigidos a:

Alejo Menchaca, por su dirección, compartir sus conocimientos, su colaboración e incentivo para la realización de esta Tesis.

Teresa de Castro, por su supervisión, compartir sus conocimientos, su colaboración de manera desinteresada y su entusiasmo durante los trabajos de esta Tesis.

Gabriel Bó, por su ayuda en distintos momentos de la realización de esta Tesis.

Mis compañeros del IRAUy, Marcela Vilariño, Camila García Pintos, Andrea Pinczak, María Fátima Rodríguez, Natalibeth Barrera, Pedro Claudino dos Santos Neto, Robert Wijma y Federico Cuadro que de una forma u otra colaboraron y ayudaron en los trabajos.

José Piaggio, por su paciente e invaluable colaboración con los análisis estadísticos.

Diego Rubio por apoyar, promover y facilitar desde Syntex Uruguay la ejecución del proyecto.

Federico Rubio propietario de Syntex Uruguay, "Loma Azul" y "San Sebastián" por facilitar los animales, las instalaciones, el personal de campo y principalmente por su buena disposición para apoyar y promover este proyecto.

Ignacio Videla Dorna y Lucas Cutaia por el apoyo brindado desde Syntex Argentina.

Reynaldo Bonino y Andrés Peñagaricano responsables de los establecimientos "Loma Azul" y "San Sebastián". Gonzalo Valdés propietario del establecimiento "La Ganadera". Guzmán López propietario del establecimiento "La Rosada". Pablo Bonasso propietario del establecimiento "Santa Clara". A todos ellos por colaborar y participar en los trabajos de campo realizados.

Antonio Ortíz y su familia Sandra, Ana y Marcos, personal del establecimiento "San Sebastián" por brindar la calidez en las largas estadías durante los experimentos.

Mi familia y amigos por estar siempre presentes y por su apoyo incondicional que me animan a seguir adelante.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mis padres, Ramón y Gloria, por ser mi ejemplo de constancia y humildad. A mis hermanos Raúl, Nancy y Lorena y mis sobrinos Ana Clara, Celeste, Gonzalo, Santiago, Ignacio, Esmeralda, Mateo y Juan Bautista por formar una casi perfecta gran familia. Pilar fundamental en la vida de muchos seres humanos.

También quiero dedicar esta tesis a mi esposa, Ana Cecilia, por ser mi compañera inseparable durante estos años y por su incansable apoyo moral y académico. Quien por su manera de encarar las cosas, te hace sentir a que des un poco más de lo común. Sin ella, esta formación académica no sería lo mismo.

RESUMEN

Esta tesis tuvo como objetivo evaluar el efecto de la administración de eCG sobre la función ovárica y la fertilidad en vacas con cría y anestro posparto. Para cumplir estos objetivos se realizaron 4 experimentos, donde se determinó el efecto a nivel ovárico de la eCG sobre el desarrollo folicular y luteal, así como su posible efecto sobre el mantenimiento de la gestación. Se realizaron diferentes experimentos utilizando una dosis de 400 UI de eCG antes de la ovulación y durante la gestación temprana. Los resultados en vacas en anestro posparto mostraron que la administración de eCG al finalizar un tratamiento de sincronización de la ovulación con progesterona y estradiol, permite una mayor proporción de vacas que alcanzan la ovulación, un mayor desarrollo del folículo ovulatorio, un mayor tamaño del cuerpo lúteo subsiguiente así como mayores concentraciones de progesterona en sangre durante las primeras semanas de gestación. Como consecuencia, la tasa de preñez con este tratamiento luego de la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) aumentó de manera significativa en vacas en anestro posparto. Sumado a esto, se evaluó la respuesta a una dosis administrada previo al período crítico de la gestación, a los 14 días luego de la IATF. Este tratamiento aumentó el tamaño del cuerpo lúteo y las concentraciones séricas de progesterona hasta el día 22 de la gestación. En un siguiente experimento se demostró que este aumento en las concentraciones de progesterona se reflejó en un aumento en la tasa de preñez en vacas con cría y en anestro posparto. Los resultados obtenidos soportan la hipótesis que la administración de eCG al finalizar un tratamiento para IATF y/o 14 días luego de ésta, favorece la actividad luteal durante el período crítico de la gestación. Además, la administración de eCG en los diferentes tratamientos permitió aumentar la tasa de preñez sugiriendo así la disminución en las pérdidas embrionarias. Esto nos permite alcanzar las siguientes conclusiones: cuando la eCG es administrada al final de un tratamiento para IATF incrementa el desarrollo del folículo ovulatorio y la proporción de hembras en anestro que alcanzan la ovulación, incrementa el desarrollo del cuerpo lúteo subsiguiente, aumenta las concentraciones séricas de progesterona durante la gestación temprana y aumenta la tasa de preñez en hembras con cría en anestro posparto. Por otro lado, cuando la eCG es administrada a los 14 días luego de la IATF: aumenta el tamaño del cuerpo lúteo y las concentraciones séricas de progesterona y favorece el reconocimiento materno de la gestación y el mantenimiento de la misma durante los primeros 30 días en el período temprano de la gestación.

Palabras clave: *Ovulación, Cuerpo lúteo, Progesterona, Reconocimiento materno, Gestación temprana, Bovinos.*

ABSTRACT

This thesis work aimed to evaluate the effect of eCG administration on ovarian function and fertility in suckled postpartum anestrus cows. Four experiments were carried out to accomplish these objectives, which determined the effect of eCG on follicular and luteal development and its possible effect on the maintenance of pregnancy. Different experiments were performed using a dose of 400 IU before ovulation and during the first days of early gestation. Results in postpartum anestrus cows showed that eCG administration at the end of ovulation synchronization with progesterone and estradiol-based treatment, allowed a greater proportion of cows that reached ovulation, greater development of the ovulatory follicle, increased subsequent corpus luteum area and higher serum progesterone concentrations during the first weeks of gestation. As a result, pregnancy rate with this treatment after fixed-time artificial insemination (FTAI) increased significantly in postpartum anestrus cows. In addition, we evaluated the ovarian response to a dose of eCG administered after ovulation and before the critical period of gestation (i.e. 14 days after FTAI). This treatment increased the diameter of the corpus luteum and serum progesterone concentrations until Day 22 of gestation. A subsequent experiment showed that this increase in serum progesterone concentrations was reflected in increased pregnancy rate in suckled postpartum anestrus cows. These results support the hypothesis that eCG administration at the end of FTAI treatment and/or 14 days later favors luteal activity during the critical period of gestation. Furthermore, the addition of different eCG treatments increased pregnancy rate, suggesting a decrease in early embryonic losses. These observations allow us to achieve the following conclusions: when eCG is administered at the end of FTAI treatment, stimulates development of the dominant follicle, increases the proportion of anestrus females reaching ovulation, increases the development of the corpus luteum and serum progesterone concentrations during of the ensuing luteal phase, and increases pregnancy rate in suckled postpartum anestrus cows. On the other hand, when eCG is administered 14 days after FTAI: increases the size of the corpus luteum and serum progesterone concentrations, promotes maternal recognition of pregnancy and its maintenance for the first 30 days in the early period of pregnancy.

Keywords: *Ovulation, Corpus luteum, Progesterone, Maternal recognition, Early pregnancy, Cattle.*

TABLA DE CONTENIDO

Índice.....	Página
Capítulo 1.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
Gonadotrofina coriónica equina.....	7
Reconocimiento materno de la gestación.....	10
PROBLEMÁTICA ESPECÍFICA.....	13
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVOS.....	14
OBJETIVO GENERAL.....	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
Capítulo 2.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
METODOLOGÍA GENERAL.....	15
Animales e instalaciones.....	15
Ultrasonografía.....	15
Determinación de la condición corporal.....	16
Obtención de muestras sanguíneas y determinaciones hormonales.....	17
Análisis estadístico.....	18
ESTRATÉGIA DE INVESTIGACIÓN.....	19
Experimento I.....	20
Experimento II.....	21
Experimento III.....	23
Experimento IV.....	24

Capítulo 3.....	26
RESULTADOS.....	26
Efecto de la administración de eCG sobre la actividad ovárica como inductor de la ovulación y como soporte luteotrófico en vacas de cría en anestro posparto.....	26
Experimento I.....	26
Efecto de la administración de eCG 14 días luego de la inseminación sobre la actividad luteal en vacas de cría en anestro posparto.....	29
Experimento II.....	29
Tasa de preñez y mantenimiento de la gestación en vacas con cría.....	35
Experimento III.....	35
Tasa de preñez y mantenimiento de la gestación en vaquillonas.....	37
Experimento IV.....	37
 Capítulo 4.....	 39
DISCUSIÓN.....	39
 CONCLUSIONES.....	 46
IMPLICANCIAS PRÁCTICAS.....	47
 BIBLIOGRAFÍA.....	 48

LISTA DE TABLAS

TABLA.....	Página
3.1. Respuesta ovárica a la administración de eCG (400 UI) luego de un tratamiento para IATF en vacas en anestro y con cría al pie (media±SEM).....	27
3.2. Tasa de preñez a los 60 días y pérdidas embrionarias/fetales tempranas, luego de la administración de eCG al retiro del dispositivo intravaginal de progesterona y/o 14 días luego de la inseminación en vacas de carne en anestro.....	36
3.3. Tasa de preñez a los 60 días y pérdidas embrionarias/fetales tempranas, luego de la administración de eCG al retiro del dispositivo intravaginal de progesterona y/o 14 días luego de la inseminación en vaquillonas en anestro.....	38

LISTA DE FIGURAS

FIGURA.....	Página
2.1. Diseño experimental para el Experimento I. eCG: Gonadotrofina Coriónica Equina, UI: Unidades Internacionales, BE: Benzoato de Estradiol, PGF2 α : Prostaglandina F2 α , CE: Cipionato de Estradiol, IATF: Inseminación Artificial a Tiempo Fijo, h: Horas, P4: Progesterona.....	21
2.2. Diseño experimental para el Experimento II. eCG: Gonadotrofina Coriónica Equina, UI: Unidades Internacionales, BE: Benzoato de Estradiol, PGF2 α : Prostaglandina F2 α , CE: Cipionato de Estradiol, IATF: Inseminación Artificial a Tiempo Fijo, h: Horas, P4: Progesterona, E2: Estradiol17 β	22
2.3. Diseño experimental para el Experimento III. eCG: Gonadotrofina Coriónica Equina, UI: Unidades Internacionales, BE: Benzoato de Estradiol, PGF2 α : Prostaglandina F2 α , CE: Cipionato de Estradiol, IATF: Inseminación Artificial a Tiempo Fijo, h: Horas.....	24
2.4. Diseño experimental para el Experimento IV. eCG: Gonadotrofina Coriónica Equina, UI: Unidades Internacionales, BE: Benzoato de Estradiol, PGF2 α : Prostaglandina F2 α , CE: Cipionato de Estradiol, IATF: Inseminación Artificial a Tiempo Fijo, h: Horas.....	25
3.1. Área del CL en vacas preñadas (A) y concentración sérica de progesterona en vacas que ovularon (B) en respuesta a la administración de 400 UI de eCG al retiro del dispositivo en vacas en anestro y con cría al pie (media \pm SEM).....	27
3.2. Concentración sérica de progesterona en respuesta a la administración de 400 UI de eCG (A) o no (B) al retiro del dispositivo, durante 14 días luego de la inseminación en vacas en anestro y con cría al pie (media \pm SEM).....	28
3.3. Área del CL (A) y concentración sérica de progesterona (B) desde el día 14 hasta el día 22, en respuesta a la administración de 400 UI de eCG al día 14 luego de la inseminación en vacas en anestro y con cría al pie.....	30

3.4. Área del CL (A) y concentración sérica de progesterona (B) desde el día 14 hasta el día 22, efecto principal considerando la administración o no de 400 UI de eCG al día 14 luego de la inseminación en vacas en anestro y con cría al pie.....	31
3.5. Desarrollo del folículo de mayor diámetro para vacas preñadas con patrones de 3 ondas (A) y con patrones de 2 ondas (B) desde el día 14 hasta el día 22. Considerándose muestra el efecto de la administración de 400 UI de eCG al día 14 luego de la inseminación en vacas en anestro y con cría al pie.....	32
3.6. Concentración sérica de estradiol _{17β} desde el día 14 hasta el día 18 (A) y efecto principal considerando la administración o no de 400 UI de eCG al día 14 luego de la inseminación (B), en vacas en anestro y con cría al pie.....	33
3.7. Concentración sérica de estradiol _{17β} para vacas preñadas con patrones de 3 ondas (A) y con patrones de 2 ondas (B) desde el día 14 hasta el día 18, en respuesta a la administración de 400 UI de eCG al día 14 luego de la inseminación en vacas en anestro y con cría al pie.....	34
3.8. Concentración sérica de estradiol _{17β} para vacas preñadas con patrones de 3 ondas (A) y con patrones de 2 ondas (B) desde el día 14 hasta el día 18, efecto principal considerando la administración o no de 400 UI de eCG al día 14 luego de la inseminación en vacas en anestro y con cría al pie.....	34
3.9. Tasa de preñez luego de la administración de 400 UI de eCG al retiro del dispositivo intravaginal de progesterona y/o 14 días luego de la inseminación en vacas de carne en anestro.....	35
3.10. Tasa de preñez luego de la administración de 400 UI de eCG al retiro del dispositivo intravaginal de progesterona y/o 14 días luego de la inseminación en vaquillonas en anestro.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

BE.....	Benzoato de Estradiol
CC.....	Condición corporal
CL.....	Cuerpo lúteo
CV.....	Coefficiente de variación
DIB.....	Dispositivo intravaginal bovino
E2.....	Estradiol17 β
eCG.....	Gonadotrofina coriónica equina
FSH.....	Hormona folículo estimulante
GnRH.....	Hormona liberadora de gonadotrofinas
h.....	Horas
hCG.....	Gonadotrofina coriónica humana
IATF.....	Inseminación artificial a tiempo fijo
IFN- τ	Interferón-tau
kDa.....	kiloDálton
IM.....	Intramuscular
L.....	Litro
LH.....	Hormona luteinizante
LS.....	Latitud Sur
μ g.....	Microgramos
mg.....	Miligramos
mL.....	Mililitros
mRNA.....	Ácido ribonucleico mensajero
ng.....	Nanogramos
pmol.....	Picomoles
P4.....	Progesterona
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
PRL.....	Prolactina
RIA.....	Radioinmunoanálisis
UI.....	Unidades internacionales

INTRODUCCIÓN

Las pérdidas embrionarias durante la gestación temprana representan una importante merma productiva y económica en los sistemas de producción bovina (Diskin y Morris, 2008). La eficiencia reproductiva de los rodeos de cría está determinada principalmente por la tasa de procreo. Esta tasa reproductiva en los países de Sudamérica es considerablemente baja con valores entre 60% y 70% (Anualpec, 2012; Senasa, 2012). En el caso de Uruguay, los sistemas de cría bovina no escapan a esta realidad y están caracterizados por una baja eficiencia reproductiva que se manifiesta en la baja tasa de procreo. Entre otros factores, es de destacar la situación crítica de la actividad ovárica, no superando el 30% de vacas cíclicas al inicio de la época de servicios (Menchaca *et al.*, 2005). De acuerdo a la información oficial recopilada de los últimos veinte años, la tasa de procreo promedio no supera el 63% de crías producidas en las hembras que se colocan en servicio cada año (DIEA, 2012). Para hacer frente a esta situación, varias alternativas han sido propuestas, casi todas dirigidas a mejorar la tasa de concepción o preñez. Sin embargo son casi ignoradas las pérdidas que ocurren luego del servicio durante la gestación temprana. Es sabido que la mortalidad embrionaria y/o fetal temprana reducen la eficiencia reproductiva. Estas pérdidas se clasifican en mortalidad embrionaria temprana cuando ocurre entre la fertilización y el día 24 de gestación, mortalidad embrionaria tardía cuando sucede entre el día 25 y el día 45 de gestación, o mortalidad fetal o abortos cuando se producen a partir del día 46 de gestación hasta el parto (Comité sobre Nomenclatura Reproductiva Bovina, 1972).

Está demostrado que la tasa de fecundación luego de una inseminación en bovinos es cercana al 90% (Sartori *et al.*, 2010), mientras que la tasa de preñez a los 60 días por lo general no supera el 60–65%, (Diskin y Morris, 2008). En base a varios estudios, se estimó

que la falla en la fertilización y pérdidas embrionarias tempranas estaba en el rango de 20% y 45%, las pérdidas embrionarias tardías y fetales entre 8% y 17,5%, mientras que los abortos variaron entre 1% y 4% (Humblot, 2001). Esto indica que la mayoría de las pérdidas por mortalidad embrionaria se producen dentro de las primeras tres semanas de gestación similar a lo reportado por otros autores (Inskeep y Dailey, 2005; Diskin y Morris, 2008). Sin embargo, el momento de la pérdida embrionaria temprana no es consistente en todos los estudios. Algunos autores indican que las mayores pérdidas embrionarias se producen dentro de la primer semana posterior a la concepción (Sartori *et al.*, 2002), mientras que otros reportes sugieren que se producen dentro de la segunda semana después de la concepción (Diskin *et al.*, 2006). Por esta razón, se ha optado por considerar la mortalidad embrionaria en tres períodos: mortalidad embrionaria muy temprana cuando ocurre desde la fertilización hasta el día 7 de gestación, la mortalidad embrionaria temprana sucede desde el día 7 hasta el día 24 de gestación y la mortalidad embrionaria tardía se produce desde el día 25 hasta el día 45 de gestación (Walsh *et al.*, 2011). Más allá de los matices en la clasificación de dichas pérdidas, existe amplio consenso de que se producen importantes pérdidas durante el período embrionario de la gestación.

Luego de la fecundación se inicia el desarrollo embrionario, el cigoto comienza su división celular mientras desciende por el oviducto hasta el útero en 3 o 4 días. La mórula llega al útero siendo una masa esférica de células, esta comienza a acumular líquido entre sus células y la cavidad que se forma es el blastocele, para transformarse en blastocisto. Debido a la polarización celular, un grupo de células pequeñas se ubican en un extremo formando la masa celular embrionaria dando origen al embrión, mientras que las células de mayor tamaño rodean al blastocele formando el trofoblasto, dando origen a las membranas extraembrionarias. El blastocisto amplía gradualmente su cavidad y crece presionando sobre la zona pelúcida hasta su ruptura, una vez eclosionado, que hasta este momento es esférico y mide solo 160-180 μ , se alarga y crece rápidamente adquiriendo una forma oblonga o tubular de 1,5 a 3 mm de diámetro en el día 12 a 13. En los días 14 a 15 pasa a la forma filamentosa midiendo 1,4 x 10 mm y en el día 18 mide 1,4 x 160 mm, ya en el día 17 a 18 el *conceptus* bovino ocupa dos tercios del cuerno uterino y todo el cuerno hacia el día 20. La implantación del embrión suele ocurrir durante la fase de elongación del

blastocisto, entre los días 18 a 22 luego de la fertilización. A diferencia de otras especies, en el bovino no hay una verdadera implantación, solamente se menciona una fase de adhesión o de unión (Peippo *et al.*, 2011). La vesícula blastodérmica o *conceptus*, rodeada en este momento por el trofoectodermo (trofoblasto, ectodermo y mesodermo) toma una posición central en el útero contactando las células epiteliales del trofoectodermo con las de la pared uterina. Hay adhesión, pero no invasión ni erosión permanente de la mucosa uterina (Peippo *et al.*, 2011). El endometrio desarrolla tejido caruncular, que junto con el tejido intercaruncular están involucrados en el proceso de unión. Hacia el día 15 se ponen en contacto las microvellosidades de la superficie del epitelio endometrial con las suaves membranas plasmáticas de las células que rodean el embrión (Thatcher *et al.* 2001). La unión entre el trofoectodermo y el epitelio caruncular ocurre el día 16 aproximadamente, y el día 18 a 19 se adhiere también pero en forma muy tenue al epitelio uterino.

Desde las primeras divisiones celulares luego de la concepción, el embrión es responsable de garantizar su supervivencia. A partir de entonces o es expulsado por mecanismos inmunológicos como un tejido extraño o sobrevive en el ambiente uterino en la medida que logre informar a su madre que está presente para transformarse así en prioridad absoluta. Es por eso que, el reconocimiento materno de la presencia del embrión debe ocurrir antes de la luteólisis para que se establezca así la gestación. La acción antiluteolítica del embrión se ejerce por medio de varias proteínas que pueden bloquear la síntesis de prostaglandina F2 alfa (PGF2 α) de la mucosa uterina. En rumiantes esto sucede por la acción de una proteína compuesta por 172 aminoácidos, sintetizada por las células trofoblásticas del blastocisto denominada interferón-tau (IFN- τ), la que es producida antes de iniciarse el período de unión con el endometrio. EL IFN- τ tiene una acción reguladora sobre la actividad de genes específicos, activando su transcripción y la síntesis de proteínas que actuarían bloqueando específicamente uno o más pasos en la síntesis de PGF2 α . Su función entonces es informar la presencia del embrión y rescatar el cuerpo lúteo (CL) de la luteólisis para que este continúe su actividad durante la gestación. En bovinos esto ocurre entre el día 15 y el día 17 de gestación y es considerado como el "período crítico" (Binelli *et al.*, 2001).

Por otra parte, diferentes autores asocian las bajas concentraciones de progesterona en el primer mes de gestación a una mayor incidencia de pérdidas embrionarias tempranas (Garrett, 1988; Perry, 2007; Mann, 2006). Estas bajas concentraciones de progesterona resultan en una mayor pulsatilidad de la hormona luteinizante (LH) durante el diestro que podrían estimular el crecimiento folicular. Como consecuencia del excesivo crecimiento folicular se producen altas concentraciones de estradiol 17β durante la fase luteal que pueden ser perjudiciales para la sobrevivencia del embrión (Bridges *et al.*, 2000; Inskip, 2004). La actividad del embrión durante el día 16 del ciclo inhibe la síntesis y liberación de PGF 2α por el endometrio (Mann *et al.*, 1999; Thatcher *et al.*, 2001; Okuda *et al.*, 2002), lo que impide la luteólisis y la consiguiente disminución en la producción de progesterona. Las concentraciones plasmáticas de progesterona se correlacionan positivamente con la producción de IFN- τ por el *conceptus*, lo cual sugiere que altas concentraciones de progesterona proveen un medio más adecuado para el desarrollo del embrión (Kerbler *et al.*, 1997). Por el contrario, concentraciones subóptimas de progesterona producirán un desarrollo más lento del embrión (Mann y Lamming, 1999), una señal de reconocimiento materno de gestación más débil (Walsh *et al.*, 2011) y un mayor porcentaje de pérdidas embrionarias (Bridges *et al.*, 2000; Humblot, 2001; Diskin *et al.*, 2012)

En base a lo antes expuesto, una estrategia para disminuir la mortalidad embrionaria sería a través de la estimulación de la producción de progesterona, previo al período crítico de la gestación. Por este motivo aquellas estrategias que incrementen las concentraciones de progesterona por períodos prolongados pueden contribuir a aumentar la supervivencia del embrión. Algunos tratamientos podrían actuar generando CL accesorios o incrementando la actividad del CL ya existente. Teniendo en cuenta que el patrón de ondas foliculares continúa durante la gestación temprana (Guilbault *et al.*, 1986; Thatcher *et al.*, 1991) se podría inducir ovulación de esos folículos y generar CL accesorios que incrementen la concentración de progesterona (Thatcher *et al.*, 2002). Los tratamientos que han sido utilizados para prevenir pérdidas de gestación basados en el aumento de la concentración de progesterona incluyen la suplementación directa de la misma, ya sea como inyectables o mediante dispositivos intravaginales de liberación controlada. Estudios realizados sobre suplementación con progesterona después de la inseminación reportaron

un moderado incrementó en el porcentaje de concepción (5,2%) y cuando el tratamiento se iniciaba el día 6 luego de la inseminación hubo un incrementó significativo en la concepción del 10% (Mann y Lamming, 1999). Por otra parte, inducir CL accesorios y/o estimular el CL de la preñez luego de la concepción se puede conseguir, por ejemplo, a través de la administración de hormonas que induzcan la ovulación o tengan efecto luteotrófico como la LH, la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) o la gonadotrofina coriónica humana (hCG).

La utilización de hCG para inducir la formación de CL accesorios y/o aumentar la concentración de progesterona en bovinos ha sido demostrada por varios autores. Esta hormona interactúa con los receptores de LH del blastocisto y promueve el mantenimiento del CL en la gestación temprana. Debido a su similitud con la LH, también puede ser utilizada para inducir la ovulación. Cuando la hCG fue utilizada luego de la inseminación en vacas lecheras y administrada entre el día 5 y el día 7 luego de la inseminación, se obtuvo una tasa de preñez superior frente a los animales no tratados (Nascimento *et al.*, 2013). En vacas de carne sin cría, el tratamiento con hCG fue capaz de inducir CL en el período fetal temprano, luego de la estimulación del crecimiento folicular con la hormona folículo estimulante (FSH) (Bridges *et al.*, 2000). Además del efecto de la hCG sobre la progesterona, se observó un aumento en el volumen y diámetro del CL cuando se administró al día 5-7 luego de la inseminación, lo cual indicaría que causa hiperplasia y/o hipertrofia de las células luteales (Stevenson *et al.*, 2007). Pero cuando se administró luego del día 7 posterior a la inseminación para reducir pérdidas embrionarias no se obtuvieron los resultados esperados, ya que no se modificó la tasa de preñez evaluada a los 30 días de la inseminación (Stevenson *et al.*, 2008). En un trabajo reciente donde se utilizó 2500 UI de hCG 29 días luego de la inseminación, los autores lograron aumentar el número de CL al día 35 y tendió a aumentar las concentraciones de progesterona, pero también aumentaron las pérdidas embrionarias, atribuyéndose estos resultados a un exceso abrupto de progesterona que provocaría una desregulación de la función luteal, o por una inducción en la síntesis de PGF2 α (Perez Wallace, 2013). De manera similar, el uso de GnRH luego de la inseminación para reducir pérdidas embrionarias también ha sido reportado por varios autores. Sin embargo, en una evaluación de varios trabajos donde se administró GnRH

entre el día 11 y el día 14 luego de la inseminación solo se obtuvo un incremento de la fertilidad en 5 de 19 estudios (Peters *et al.*, 2000). Posteriores trabajos donde se administró GnRH al día 5, 7, 11 o 15 o una combinación de éstos, tampoco obtuvieron resultados favorables con respecto al porcentaje de preñez (Bartolomé *et al.*, 2005; Howard *et al.*, 2006). Estas estrategias no han tenido el éxito esperado, ya que no lograron ser eficaces en brindar un soporte luteotrófico sostenido y por ende reducir las pérdidas embrionarias de manera repetible entre los trabajos (Bartolomé *et al.*, 2009).

Por otra parte, la actividad del CL podría estar influenciada por las características del folículo ovulatorio durante su desarrollo previo (Vasconcelos *et al.*, 2001; Crowe, 2008). Por este motivo, es de interés el diseño de tratamientos de sincronización de la ovulación que aseguren un buen control de la dinámica folicular. La estimulación y sincronización del crecimiento folicular conjuntamente con la ovulación de folículos de mayor diámetro y formación de cuerpos lúteos saludables podría ser una buena alternativa para reducir las pérdidas durante la gestación temprana. En este sentido, la administración de Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG) a los tratamientos actuales para IATF podría favorecer el desarrollo folicular final previo a la ovulación y obtener así una mejor actividad luteal. Por otra parte, esta hormona podría ser utilizada de nuevo, previo al período crítico como un soporte luteal adicional. Sin embargo, el efecto de ésta hormona sobre el desarrollo folicular ovulatorio, el desarrollo luteal y las concentraciones séricas de progesterona no ha sido evaluado aún en vacas de cría *Bos taurus*.

Gonadotrofina coriónica equina

Esta hormona fue descrita hace más de 80 años como un factor que se encuentra en la sangre circulante de la yegua preñada durante el primer tercio de la gestación. Es una variante de la LH glicosilada por las células trofoblásticas equinas. Tiene la particularidad de provocar un efecto similar tanto al de FSH como al de LH en especies diferentes a los equinos. Las bases biológicas para esta doble actividad estarían dadas por la particularidad de los receptores de FSH en mamíferos, impartiendo la capacidad de responder a la LH equina como hormona. En la yegua induce la formación de cuerpos lúteos accesorios para ayudar a soportar mejor la gestación temprana. Los efectos de esta hormona determinan que existan numerosas aplicaciones para la eCG en especies domésticas, incluyendo la inducción de la pubertad, la reducción del anestro posparto, superovulación y más recientemente la mejora de la fertilidad (Revisado por Murphy, 2012).

La administración del suero de yeguas preñadas en ratas prepúberes fue reportada en la década del 30 por los autores Cole y Hart, quienes observaron que éste producía madurez sexual y estimulaba el crecimiento del ovario (Revisado por Murphy, 2012). El componente bioactivo de este suero fue nombrado Gonadotrofina del Suero de la Yegua Preñada (*Pregnant Mare Serum Gonadotrophin: PMSG*), al ser evidenciado en la circulación sanguínea entre el segundo y quinto mes de gestación. Años más tarde se localizó la sustancia responsable de esta estimulación ovárica en el útero de las yeguas, sugiriendo que era de procedencia fetal. Luego los trabajos se extendieron a cerdos y rumiantes en los cuales se observaba, maduración folicular acompañada de estro, ovulación y formación de cuerpos lúteos normales (Revisado por Murphy, 2012). Estudios realizados en la década del 70 confirmaron que la fuente de hormona proviene de las células coriónicas fetales que invaden el epitelio uterino para formar las copas endometriales, siendo las responsables de secretar esta hormona (Allen y Moor, 1972). Este descubrimiento llevó a cambiar el nombre de la hormona a su nomenclatura actual, Gonadotrofina Coriónica Equina (*equine Chorionic Gonadotropin: eCG*).

La eCG es una glicoproteína que contiene 45% de carbohidratos y un peso molecular de 68 kDa (Humphrey *et al.*, 1979). Posee una vida media en sangre bastante prolongada, 45,6 h (Schams *et al.*, 1978), la que es debida al 10% de ácido siálico que presenta (Christakos y Bahl, 1979; Martinuk *et al.*, 1991) y al elevado peso molecular que dificulta su filtración glomerular en el riñón, persistiendo por más de 10 días en la circulación sanguínea (Murphy y Martinuk, 1991). Está constituida por dos subunidades, las que son sintetizadas y secretadas como cadenas heterodímeras $\alpha\beta$, con pesos moleculares de 44 y 17 kDa, respectivamente (Moore y Ward, 1980a). La secuenciación de aminoácidos reveló que la estructura primaria de la eCG β es idéntica a la LH β equina (e-LH β) (Sugino *et al.*, 1987; Bousfield *et al.*, 1987) estando ambas codificadas por un mismo gen (Humphrey *et al.*, 1979; Sherman *et al.*, 1992). Esto explica los efectos biológicos similares obtenidos con eCG y e-LH (Moudgal y Papkoff, 1982), la diferencia está en el grado de glicosilación (Hoppen *et al.*, 1994). En tejidos de especies diferentes a los equinos puede unirse a receptores tanto de FSH como de LH, esta doble actividad es producida por una sola molécula (Moore y Ward, 1980b). La particularidad de unión al receptor, en especial con el receptor de FSH, es la base para esta doble actividad de la eCG, ya que su estructura primaria permite su interacción con este receptor. Este efecto se ve reforzado por su larga vida media. Es ampliamente usada por su actividad FSH en la inducción del estro en cerdas inmaduras (Bartlett *et al.*, 2009). Con menos frecuencia ha sido reportado su uso para inducir la pubertad en rumiantes, a pesar de que ha sido utilizada con éxito en ovejas (Evans y Robinson, 1980). En esta especie así como en caprinos se utiliza luego de una exposición a progesterona para inducir la ovulación durante el anestro estacional (Revisado por Menchaca y Rubianes, 2004).

En bovinos, trabajos publicados hace un par de décadas, mencionan que la eCG administrada al finalizar un tratamiento de 7-12 días con progesterona puede mejorar la tasa de preñez en vacas de carne con cría al pie y con mala condición corporal (Roche *et al.*, 1992). Trabajos más recientes realizados en nuestra región han mostrado su efecto favorable cuando es administrada al momento de finalizar un tratamiento de sincronización de la ovulación con progesterona y estradiol para IATF (Bó *et al.*, 2003; Cutaia *et al.*, 2003; Menchaca *et al.*, 2013). En vacas de razas índicas este efecto estuvo asociado al

aumento del tamaño del CL, incrementando las concentraciones plasmáticas de progesterona luego de la ovulación y mejorando así el desarrollo embrionario y el mantenimiento de la gestación (Baruselli *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha reportado que varios genes relacionados al desarrollo del CL han sido identificados como objetivos directos de la prolactina (Stocco, 2012). Un estudio reciente comparó la expresión génica y proteica de los receptores de prolactina (PRLR) en cuerpos lúteos de animales tratados con 400 UI de eCG al finalizar un tratamiento de sincronización de la ovulación, mostrando una participación de la eCG en la regulación de la expresión los PRLR que contribuyen al desarrollo del CL y al aumento de la síntesis de progesterona (Fátima *et al.*, 2012). Esto daría sustento a la hipótesis planteada en la que una dosis de eCG al finalizar un tratamiento con progesterona y estradiol podría favorecer el desarrollo luteal, la producción de progesterona y el mantenimiento de la gestación en vacas de cría.

Reconocimiento materno de la gestación

Como fue mencionado, el reconocimiento materno de la gestación en rumiantes ocurre mediante la acción de una proteína compuesta por 172 aminoácidos, sintetizada por las células trofoblásticas del blastocisto, denominada IFN- τ . El IFN- τ representa una de las cinco familias de interferón de tipo I, clasificados como IFN- α , IFN- β , IFN- δ , IFN- ω e IFN- τ (Giassetti *et al.*, 2008). Anteriormente a la identificación del IFN- τ , ya existían indicios de acción de proteínas blastocísticas en el proceso de reconocimiento de la gestación en rumiantes. Investigaciones realizadas en la década del 60 señalaban la ocurrencia de inhibición de la luteólisis a partir de la liberación de sustancias blastocísticas antes del período de unión (Moor y Rowson, 1966). Posteriormente, por haber sido aisladas de las células trofoblásticas, esa sustancia fue denominada trofoblastina o proteína trofoblástica (Martal *et al.*, 1979). Luego de su purificación, realizada en la especie ovina, por presentar grandes semejanzas estructurales con algunas clases de interferones pasó a ser llamada IFN- τ (Imakawa *et al.*, 1987). Subsecuentemente, fue caracterizada en el *conceptus* bovino, entre el día 16 y el día 24 de gestación. El IFN- τ bovino es una proteína con peso molecular entre 22 y 24 kDa, con diferentes isoformas, diferenciándose de su análogo de las especies ovina y caprina por algunas alteraciones en su estructura bioquímica.

El proceso de luteólisis a partir de la secreción de PGF $_{2\alpha}$ necesita de la síntesis y secreción lútea de la oxitocina, así como de la interacción de la oxitocina circulante con sus receptores, que se localizan principalmente en las células del epitelio endometrial. Los efectos antiluteolíticos del IFN- τ son traducidos a partir de su acción inhibitoria sobre la expresión de los genes que codifican para los receptores endometriales de oxitocina y de estrógenos, que actúan sobre las células del endometrio estimulando la síntesis de PGF $_{2\alpha}$. De esta forma, el IFN- τ regula la producción de PGF $_{2\alpha}$ por medio de la inhibición de su expresión en el endometrio. El IFN- τ no es observado en la circulación periférica de las hembras gestantes, siendo su acción localizada apenas en el útero (Demmers *et al.*, 2001). Un claro aumento en la expresión del gen de IFN- τ ocurre desde el día 10 hasta el día 25,

con su pico de producción entre el día 14 y el día 16, coincidiendo con la fase de transición morfológica del blastocisto, que en ese período pasa de la forma esférica a la forma filamentosa (Thomas y Fuller, 2004). Esto hace pensar que la producción de IFN- τ parece ser más dependiente del desarrollo blastocístico que del día de la gestación. En el momento del pico de producción, su ARN mensajero (mRNA) está presente en el blastocisto en niveles más elevados que cualquier otro mRNA (Imakawa *et al.*, 1987). Aunque la expresión de este gen parezca estar genéticamente programada e independiente del ambiente uterino, considerando que su expresión ocurre también *in vitro*, ese proceso es en gran parte afectado por las concentraciones plasmáticas de progesterona (Imakawa *et al.*, 1987). La suplementación de progesterona en el inicio de la gestación, ayuda al desarrollo del blastocisto, aumentando los niveles de IFN- τ en el útero y disminuyendo los índices de pérdida de gestación en el transcurrir de ese período (Mann y Lamming, 1999). Por otra parte, la disminución en la expresión del IFN- τ parece ser dependiente del proceso de unión, ocurriendo disminución en la medida que determinadas regiones del trofoblasto comienzan a establecer contacto con el epitelio uterino (Thatcher *et al.* 1997; Spencer *et al.*, 2004).

Como se describió anteriormente la eCG muestra tanto actividad FSH como LH, y en mamíferos ambas hormonas son necesarias para la maduración del folículo pre-ovulatorio. Muchos estudios han demostrado que la administración de eCG al tratamiento de sincronización con progesterona aumenta la frecuencia de ovulaciones múltiples y luego resulta en una elevada concentración de progesterona circulante, pero en algunos estudios este aumento en la concentración de progesterona no se correlaciona con el aumento en la tasa de preñez (Nogueira *et al.*, 2004). En otros trabajos la administración de 400 UI de eCG favorece las concentraciones sanguíneas de progesterona con la consecuente mejora en la tasa de preñez (Baruselli *et al.*, 2004). La implementación de una estrategia de este tipo con este mecanismo de acción, se podría lograr a través de la administración de una dosis de eCG en un momento determinado previo al período crítico de la gestación, donde los eventos reproductivos estén sincronizados en todo el rodeo. Esto aún es posible en programas de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), donde los eventos están sincronizados de manera muy precisa y la tasa de preñez promedio no supera el 50%. Estos

tratamientos logran un alto grado de sincronización de la ovulación con una buena tasa de fertilización, lo que sugiere que las mayores pérdidas en estos programas también se producen durante la gestación temprana (Sartori *et al.*, 2006). No obstante, el mecanismo responsable del efecto producido por la administración de eCG no está completamente dilucidado en vacas de razas británicas en anestro posparto y manejadas en condiciones de producción sobre base pastoril. Para avanzar en esta línea es necesario conocer el efecto de la eCG sobre la tasa de preñez, así como sobre la actividad ovárica y particularmente sobre la función del CL, cuando se administra previo al reconocimiento materno de la gestación. Por lo tanto, si bien hay antecedentes muy alentadores en relación a la administración de eCG tanto al finalizar un tratamiento de sincronización como luego de la inseminación, la información es sumamente escasa y de acuerdo a nuestro conocimiento, no existen estudios que hayan determinado el mecanismo involucrado en vacas de cría *Bos taurus*.

PROBLEMÁTICA ESPECÍFICA

Las pérdidas embrionarias durante la gestación temprana tienen un impacto negativo sobre la eficiencia reproductiva y económica afectando la rentabilidad de los sistemas productivos. Estas pérdidas están relacionadas a bajas concentraciones de progesterona durante las primeras semanas luego de la ovulación que afectan el desarrollo embrionario y el reconocimiento materno de la gestación. En base a esto, la propuesta de este trabajo consiste en intervenir sobre esta limitante mediante la implementación de una estrategia simple, de fácil aplicación y bajo costo como lo es la administración de una dosis de eCG al día del retiro del dispositivo en un programa de sincronización de la ovulación y/o 14 días luego de la inseminación previo al período crítico de la gestación. El desarrollo de esta alternativa podría dar lugar a la resolución de un problema técnico concreto vinculado a la eficiencia reproductiva, beneficiando así al sector criador y en consecuencia, en la medida que se mejore la productividad del mismo, se verá beneficiada toda la cadena cárnica exportadora.

HIPÓTESIS

La administración de eCG al finalizar un tratamiento para IATF y 14 días luego de ésta, favorece la actividad luteal durante el período crítico, incrementa la tasa de preñez y/o disminuye las pérdidas embrionarias en vacas de cría en anestro.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del tratamiento con eCG sobre la eficiencia reproductiva en vacas de carne con cría en anestro posparto y vaquillonas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Evaluar el efecto de la administración de eCG al retiro del dispositivo sobre la dinámica folicular, el desarrollo del CL y las concentraciones séricas de progesterona durante la fase luteal.

2) Determinar el efecto de la administración de eCG 14 días luego de la inseminación sobre la dinámica folicular, el desarrollo del CL y las concentraciones séricas de progesterona y estradiol 17β durante el período crítico de la gestación.

3) Determinar la tasa de preñez y pérdidas embrionarias a los 30 y 60 días de gestación, luego de la administración de 400 UI de eCG al finalizar un tratamiento con progesterona y estradiol y/o 14 días luego de la inseminación en vacas con cría y en vaquillonas.

MATERIALES Y MÉTODOS

METODOLOGÍA GENERAL

Animales e instalaciones

Para este trabajo se utilizaron vacas de razas británicas multíparas con un período posparto de 60 a 90 días y con cría al pie (Experimentos I, II y III) y vaquillonas nulíparas (Experimento IV) en condiciones de pastoreo en campo natural o campo natural mejorado. Las instalaciones fueron las adecuadas para el manejo con los animales (corrales, huevo, tubo, cepo). Todos los procedimientos, incluyendo los inyectables, aplicación de dispositivos intravaginales, extracción de sangre y ecografía útero-ovárica, fueron aprobados por el Comité de Ética, Cuidado y Manejo de Animales para Experimentación de la Fundación IRAUy avalada por la Comisión Nacional de Experimentación Animal.

Ultrasonografía

Para la visualización de las estructuras ováricas se utilizó un equipo WED-9618V (Well.D, Shenzhen, China) provisto de un transductor lineal de 7,5 MHz en modo B. Las vacas fueron inmovilizadas en el cepo donde se les efectuó la ecografía transrectal para

registrar todas las estructuras ováricas (folículos mayores a 3 mm y CL). Se realizó un monitoreo y registro diario de estas estructuras construyéndose un mapeo individual de acuerdo a su ubicación relativa en el ovario para posterior análisis de la dinámica folicular. La ovulación fue definida cuando desapareció el folículo de mayor diámetro que estaba presente. El área del CL fue calculada utilizando el diámetro mayor y menor de acuerdo a lo reportado por Kastelic *et al.* (1990). El examen por ultrasonografía se realizó diariamente durante 12 días previos al inicio del Experimento I como etapa de entrenamiento y para permitir la adaptación de los animales a dicho manejo, y luego durante 40 días a partir del inicio de dicho experimento. En el Experimento II, las ecografías transrectales se realizaron desde el día 14 y hasta el día 22 luego de la inseminación, mientras que en los Experimentos III y IV se verificó la ausencia de CL y el tono uterino al momento de iniciar el tratamiento con progesterona y estradiol. El diagnóstico de gestación se realizó mediante ecografía a los 30 días y se reconfirmó a los 60 días luego de la inseminación.

Determinación de la condición corporal

Para evaluar la condición corporal (CC) se utilizó la escala de 1 a 8, donde 1 corresponde a vacas emaciadas y 8 a vacas obesas (Vizcarra *et al.*, 1986). Se valoró semanalmente durante todo el período del Experimento I, al inicio y al final del Experimento II y al comienzo de cada réplica en los demás experimentos.

Obtención de muestras sanguíneas y determinaciones hormonales

Para las determinaciones hormonales se tomaron muestras de 10 mL de sangre de la vena coccígea. Las muestras fueron conservadas a 4°C durante 4-6 horas y fueron centrifugadas a 3000 RPM durante 20 minutos para separar el suero que se congeló a -20°C hasta su posterior análisis (de Castro *et al.*, 2004). Todas las muestras fueron tomadas al amanecer de cada día de acuerdo al siguiente diseño. En el Experimento I se obtuvieron el día en que se inició el tratamiento con progesterona y estradiol, el día del retiro del dispositivo con progesterona, el día de la inseminación y durante los 30 días sucesivos a ésta. En el Experimento II, desde el día 14 hasta el día 22 luego de la inseminación. Las concentraciones séricas de progesterona y estradiol17 β fueron determinadas mediante la técnica de radioinmunoanálisis (RIA) (Sirois y Fortune, 1990) en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria de Montevideo, Uruguay. Tanto las concentraciones séricas de progesterona como las concentraciones séricas de estradiol17 β , fueron determinadas por duplicado mediante RIA en fase sólida y líquida respectivamente, utilizando kits de DPC específicos (Diagnostic Products Corporation, Los Ángeles, CA, USA).

En el Experimento I se determinó la concentración sérica de progesterona, siendo la concentración mínima detectable 0,11 ng/mL. El coeficiente de variación (CV) intra-ensayo para los controles bajo (0,5 ng/mL), medio (2,0 ng/mL) y alto (10,0 ng/mL) fue 9,0%, 7,4% y 7,1%, respectivamente. El CV inter-ensayo para los mismos controles fue 9,4%, 9,1% y 7,9%, respectivamente.

En el Experimento II se determinaron las concentraciones séricas de progesterona y estradiol17 β , la concentración mínima detectable para progesterona fue 0,11 ng/mL. Los controles fueron los usados en el Experimento I y el CV intra-ensayo fue 8,5%, 7,2% y 6,0%, respectivamente, y el CV inter-ensayo fue 9,9%, 9,5% y 9,2%, respectivamente. La concentración mínima detectable para estradiol17 β fue 2,02 pmol/L. El CV intra-ensayo

para los controles bajo (5,6 pmol/L) y alto (86,8 pmol/L) fue 7,6% y 8,6%, respectivamente. Así como el CV inter-ensayo para los mismos controles fue 8,3% y 8,7%, respectivamente.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante Modelos Mixtos, tests de comparación de medias o de frecuencias, o sus análogos no paramétricos (Snedecor y Cochran, 1980). En los Experimentos I y II, los análisis del desarrollo folicular, área del CL y concentraciones séricas de progesterona y estradiol 17β se realizaron mediante Modelos Mixtos en el que se incluyó a la identificación animal como componente aleatorio y al tratamiento con eCG, gestación y día como componentes fijos. En el modelo también se incluyó la interacción día X tratamiento. La tasa de ovulación (vacas con ovulación/vacas tratadas) fue analizada mediante el test exacto de Fisher. En los Experimentos III y IV para evaluar porcentajes de preñez se utilizó el test de regresión logística incluyendo en el modelo los efectos de la CC, categoría/paridad y raza. Todos los análisis fueron realizados utilizando el software InfoStat (2008) y/o STATA (2011). Los resultados son presentados como $media \pm SEM$ y las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0,05$.

ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

Se realizaron cuatro experimentos sobre hembras en ausencia de CL, en los que se comparó la respuesta a la administración de eCG. Previo a cada experimento se definió el estado fisiológico del ovario (presencia o ausencia de CL y diámetro folicular) mediante ecografía transrectal en modo B al momento de iniciar el tratamiento para la IATF. En este momento se registró la condición corporal individual que fue considerada para el diseño balanceado de los grupos experimentales. Todas las hembras recibieron un tratamiento para IATF utilizando un dispositivo intravaginal con 0,5 g de progesterona (DIB[®] 0,5, Syntex, Buenos Aires, Argentina) durante 8 días asociado a una dosis de 2 mg de benzoato de estradiol (Benzoato de Estradiol[®], Syntex, Buenos Aires, Argentina) al momento de colocar el dispositivo intravaginal. Al retirar el dispositivo se administró una dosis de 526 µg de cloprostenol sódico (Ciclase[®] DL, Syntex, Buenos Aires, Argentina) y 0,5 mg de cipionato de estradiol (Cipiosyn[®], Syntex, Buenos Aires, Argentina). Los fármacos inyectables fueron administrados por vía intramuscular (IM). La inseminación artificial se realizó entre las 52 y 56 h luego del retiro del dispositivo. En vacas con cría al pie, los terneros recibieron una tablilla nasal para impedir el amamantamiento desde el día en que se colocó el dispositivo a sus madres hasta la inseminación. En todos los casos se utilizaron partidas de semen que resultaron aptas al examen de calidad seminal determinado por una motilidad individual mínima de 40%, menos del 30% de anomalías totales con menos de 10% de anomalías de cabeza y cuello, concentración mínima de 8 millones de espermatozoides viables y que al menos 30% superara el test de termo resistencia entre 35 y 37°C durante 2 h. En todos los experimentos el día de la inseminación fue considerado como día 0.

Experimento I

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de la administración de eCG al finalizar un tratamiento con progesterona y estradiol para IATF sobre la ovulación y la actividad del CL en vacas de carne en anestro posparto. Este experimento se realizó en las instalaciones del Establecimiento "San Sebastián" (34°LS, Florida, Uruguay). Se utilizaron vacas multíparas de la raza Hereford ($n=46$) con 60 a 75 días posparto y una CC de $3,5\pm 0,1$ (escala 1 a 8). Todas las vacas se encontraban en anestro con ausencia de CL determinado por ecografía durante 12 días previos al inicio del tratamiento. El diámetro folicular, el peso corporal y la CC fueron considerados para el diseño balanceado de los grupos experimentales. Todas las hembras recibieron un tratamiento con progesterona y estradiol como el descrito en el párrafo anterior. Al retiro del dispositivo un grupo experimental recibió una dosis IM de 400 UI de eCG ($n=23$; Novormon[®] 5000, Syntex, Buenos Aires, Argentina) mientras que otro grupo no recibió eCG ($n=23$). La inseminación se realizó entre las 52 y 56 h luego del retiro del dispositivo. Los terneros recibieron una tablilla nasal para impedir el amamantamiento desde el día en que se colocó el dispositivo a sus madres hasta la inseminación. La dinámica folicular, el desarrollo ovulatorio y el tamaño del CL fueron monitoreados diariamente mediante ultrasonografía transrectal desde el retiro del dispositivo hasta 14 días luego de la inseminación. Durante el mismo período se extrajeron muestras sanguíneas para la determinación de las concentraciones séricas de progesterona. La tasa de ovulación (proporción de vacas que ovularon sobre vacas que recibieron tratamiento) y la proporción de vacas con CL 14 días luego de la ovulación fue analizada mediante el test exacto de Fisher, mientras que las demás variables continuas mediante Modelos Mixtos (efecto aleatorio: identificación del animal). En la Figura 2.1 se presenta el esquema del diseño experimental.

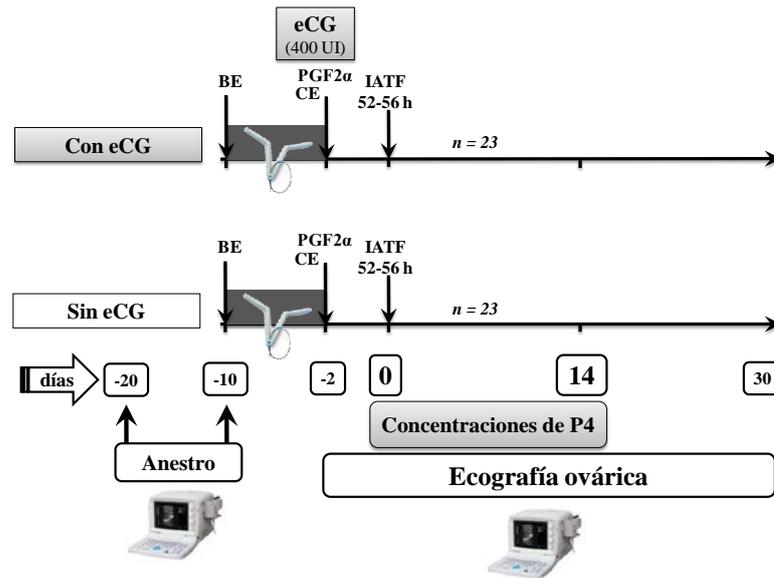


Figura 2.1. Diseño experimental para el Experimento I. eCG: Gonadotropina Coriónica Equina, UI: Unidades Internacionales, BE: Benzoato de Estradiol, PGF2 α : Prostaglandina F2 α , CE: Cipionato de Estradiol, IATF: Inseminación Artificial a Tiempo Fijo, h: Horas, P4: Progesterona.

Experimento II

Con el objetivo de promover un mejor soporte luteotrófico durante el período crítico del reconocimiento materno de la gestación (15 a 17 días luego de la ovulación) se evaluó el efecto de la administración de eCG al día 14 luego de la inseminación. Este experimento se realizó en las instalaciones del Establecimiento "San Sebastián" (34°LS, Florida, Uruguay). Se utilizaron 60 vacas multíparas de la raza Hereford en anestro determinado por ultrasonografía con 60 a 75 días posparto y una CC de $3,5 \pm 0,1$ (escala 1 a 8). Todas las hembras recibieron un tratamiento para IATF como el descrito anteriormente. Los animales fueron divididos en 4 grupos experimentales en un arreglo 2x2 factorial para recibir o no una dosis IM de 400 UI de eCG (Novormon[®] 5000, Syntex, Buenos Aires, Argentina) al retiro del dispositivo, con o sin una dosis de 400 UI de eCG a los 14 días luego de la inseminación. La inseminación se realizó entre las 52 y 56 h luego del retiro del dispositivo. Los terneros recibieron una tablilla nasal el día que se colocó el

dispositivo hasta el día de la inseminación. Se tomaron muestras sanguíneas diariamente desde el día 14 hasta el día 22 posteriores a la inseminación para determinar las concentraciones séricas de progesterona y estradiol17 β . Las muestras fueron analizadas por duplicado mediante RIA en fase sólida para progesterona y en fase líquida para estradiol17 β , ambas utilizando kits DPC. Las variables continuas se analizaron mediante Modelos Mixtos (efecto aleatorio: identificación del animal). En la Figura 2.2 se presenta el esquema del diseño experimental.

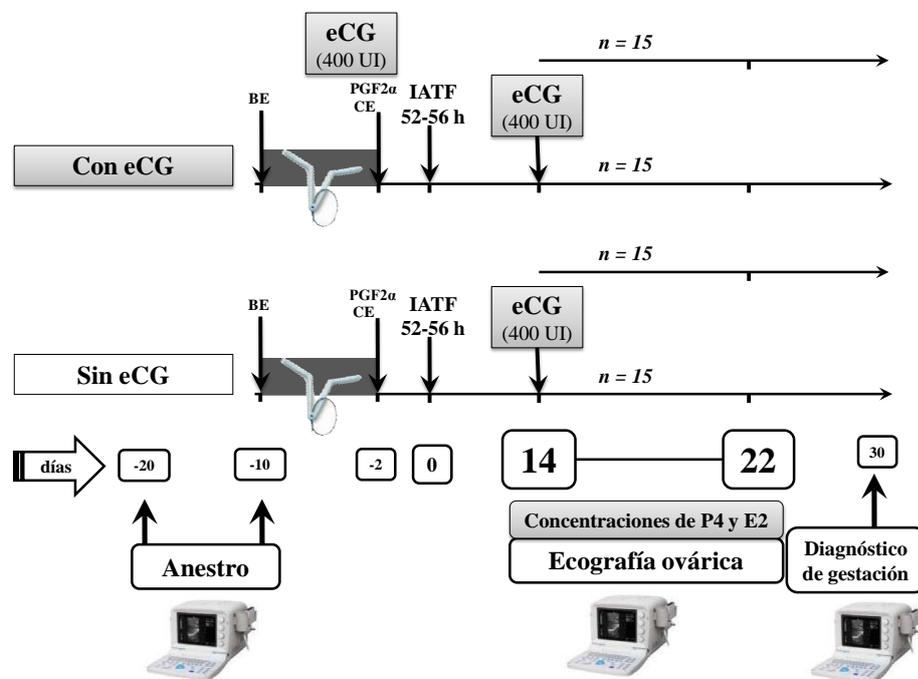


Figura 2.2. Diseño experimental para el Experimento II. eCG: Gonadotrofina Coriónica Equina, UI: Unidades Internacionales, BE: Benzoato de Estradiol, PGF2 α : Prostaglandina F2 α , CE: Cipionato de Estradiol, IATF: Inseminación Artificial a Tiempo Fijo, h: Horas, P4: Progesterona, E2: Estradiol17 β .

Experimento III

El objetivo fue evaluar el efecto de la administración de eCG previo a la ovulación y/o 14 días luego de la inseminación sobre la tasa de preñez y las pérdidas embrionarias en vacas con cría. Este experimento se realizó en seis réplicas en las instalaciones de los Establecimientos "Loma Azul" (34°LS, Florida, Uruguay), "San Sebastián" (34°LS, Florida, Uruguay) y "La Ganadera" (34°LS, San José, Uruguay). Para ello se utilizaron 497 vacas multíparas seleccionadas por su condición de anestro de un total de 562 vacas. El anestro en todos los casos fue determinado por la ausencia de CL mediante ultrasonografía y ausencia de tono uterino o indicadores secundarios de estro al iniciar el tratamiento. Las vacas estaban con 60 a 90 días posparto y una CC $3,5 \pm 0,1$ (escala 1–8). Todas las hembras recibieron un tratamiento para IATF como el descrito anteriormente. Al retirar el dispositivo los animales fueron asignados a 4 grupos experimentales en un arreglo factorial 2x2, recibiendo o no una dosis IM de 400 UI de eCG (Novormon[®] 5000, Syntex, Buenos Aires, Argentina) al retiro del dispositivo, con o sin una dosis de 400 UI de eCG a los 14 días luego de la inseminación, los que fueron balanceados por bloques al azar considerando la actividad ovárica y la CC al inicio del tratamiento. La inseminación se realizó entre las 52 y 56 h luego del retiro del dispositivo. Los terneros recibieron una tablilla nasal el día que se colocó el dispositivo hasta el día de la inseminación. El diagnóstico de gestación se realizó mediante ecografía a los 30 días y se reconfirmó a los 60 días luego de la inseminación, determinando así la tasa de preñez y las pérdidas embrionarias y/o fetales durante los primeros 30 y 60 días de gestación. La tasa de preñez fue evaluada mediante regresión logística. En la Figura 2.3 se presenta el esquema del diseño experimental.

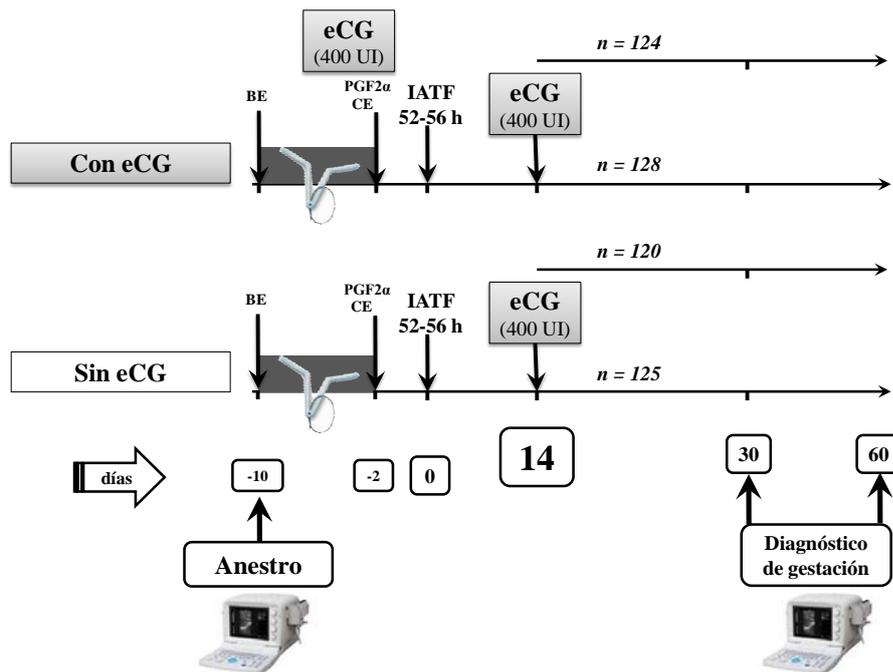


Figura 2.3. Diseño experimental para el Experimento III. eCG: Gonadotrofina Coriónica Equina, UI: Unidades Internacionales, BE: Benzoato de Estradiol, PGF2 α : Prostaglandina F2 α , CE: Cipionato de Estradiol, IATF: Inseminación Artificial a Tiempo Fijo, h: Horas.

Experimento IV

El objetivo fue determinar la tasa de preñez y pérdidas embrionarias luego de la administración de 400 UI de eCG en vaquillonas. Este experimento se realizó en tres réplicas en las instalaciones de los Establecimientos "Loma Azul" (34°LS, Florida, Uruguay), "La Rosada" (32°LS, Tacuarembó, Uruguay) y "Santa Clara" (33°LS, Florida, Uruguay). Para ello se utilizaron hembras en anestro determinado mediante ecografía comparándose la respuesta a la administración de eCG. Se utilizaron 689 vaquillonas, las que representaban el 79,7% (689/864) de anestro del total de hembras ofrecidas para todas las réplicas, nulíparas de razas carniceras y con una CC de 4 a 5 (escala 1 a 8). La metodología utilizada fue igual a la descrita para el Experimento III, realizándose el diagnóstico de gestación mediante ultrasonografía al día 30 y reconfirmándose al día 60 luego de la inseminación. Determinando así la tasa de preñez y las pérdidas embrionarias

y/o fetales durante los primeros 30 y 60 días de gestación. El análisis estadístico se comparó mediante regresión logística. En la Figura 2.4 se presenta el esquema del diseño experimental.

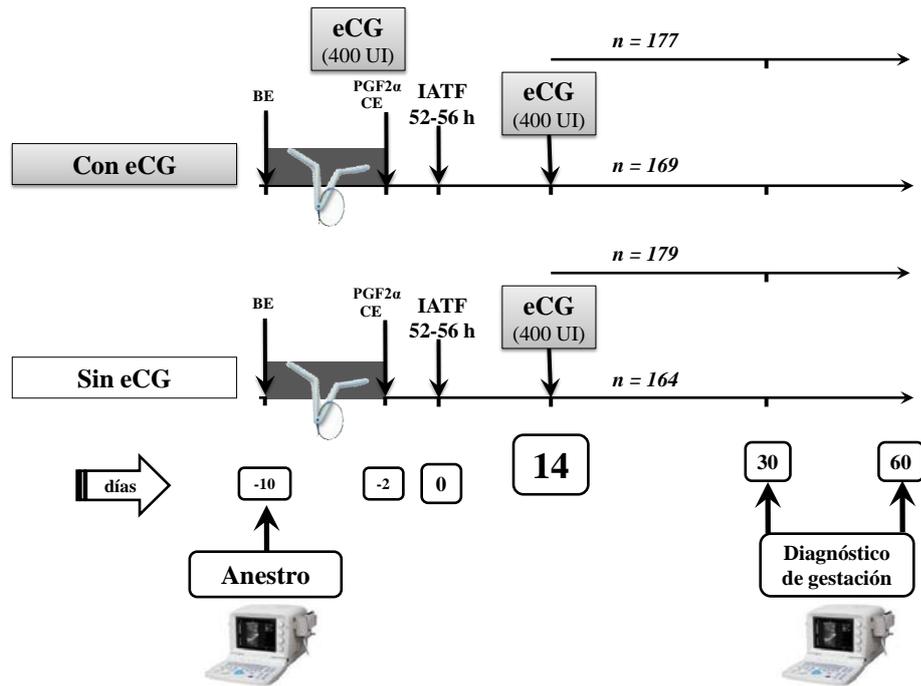


Figura 2.4. Diseño experimental para el Experimento IV. eCG: Gonadotropina Coriónica Equina, UI: Unidades Internacionales, BE: Benzoato de Estradiol, PGF2α: Prostaglandina F2α, CE: Cipionato de Estradiol, IATF: Inseminación Artificial a Tiempo Fijo, h: Horas.

RESULTADOS

Efecto de la administración de eCG sobre la actividad ovárica como inductor de la ovulación y como soporte luteotrófico en vacas de cría en anestro posparto

Experimento I

Los resultados sobre desarrollo folicular ovulatorio, ovulación, formación del CL y producción de progesterona se resumen en la Tabla 3.1. El tratamiento con eCG al retirar el dispositivo intravaginal aumentó la tasa de ovulación ($P=0,018$) y mostró una tendencia estadística a aumentar el diámetro del folículo ovulatorio ($P=0,081$) y la tasa de crecimiento folicular ($P=0,077$) desde el retiro del dispositivo hasta la ovulación. El área del CL fue mayor al día 14 para las vacas con eCG ($419,5 \pm 17,7 \text{ mm}^2$) vs. sin eCG ($318,3 \pm 11,1 \text{ mm}^2$; $P=0,007$). En las vacas tratadas con eCG, fueron mayores el área del CL desde el día 6 hasta el día 14 post inseminación ($P=0,045$) y la concentración sérica de progesterona hasta el día 14 post inseminación ($P=0,001$; Tabla 3.1). En la Figura 3.1 se presenta el desarrollo del CL durante los primeros 30 días post inseminación y la concentración sérica de progesterona durante los primeros 14 días post inseminación. El área del CL entre el día 8 y el día 22 luego de la inseminación fue mayor ($P<0,05$) en el grupo que recibió eCG (Figura 3.1A). Hubo interacción (eCG X día; $P=0,001$) en las concentraciones séricas de progesterona, que fueron afectadas por el tratamiento con eCG

($P=0,045$) entre los días 6 y 14 luego de la inseminación, tanto en aquellas que resultaron preñadas como en las que no se preñaron con la IATF (Figura 3.1B).

Tabla 3.1. Respuesta ovárica a la administración de eCG (400 UI) luego de un tratamiento para IATF en vacas en anestro y con cría al pie (media±SEM).

	Tasa de ovulación (vacas ovuladas / sincronizadas)	Diámetro del folículo ovulatorio (mm)	Tasa de crecimiento folicular* (mm/día)	Área del CL** (mm ²)	Progesterona en sangre*** (ng/mL)
Con eCG	65,2%(15/23)	14,5 ± 0,4	1,4 ± 0,2	344,3 ± 25,1	3,0 ± 0,2
Sin eCG	30,4%(7/23)	13,1 ± 0,7	0,9 ± 0,2	274,2 ± 23,9	1,8 ± 0,2
<i>P</i> -valor	0,018	0,081	0,077	0,045	0,001

*Desde el retiro del dispositivo a la ovulación

**Desde el día 6 hasta el día 14 luego de la inseminación

***Durante los 14 días luego de la inseminación

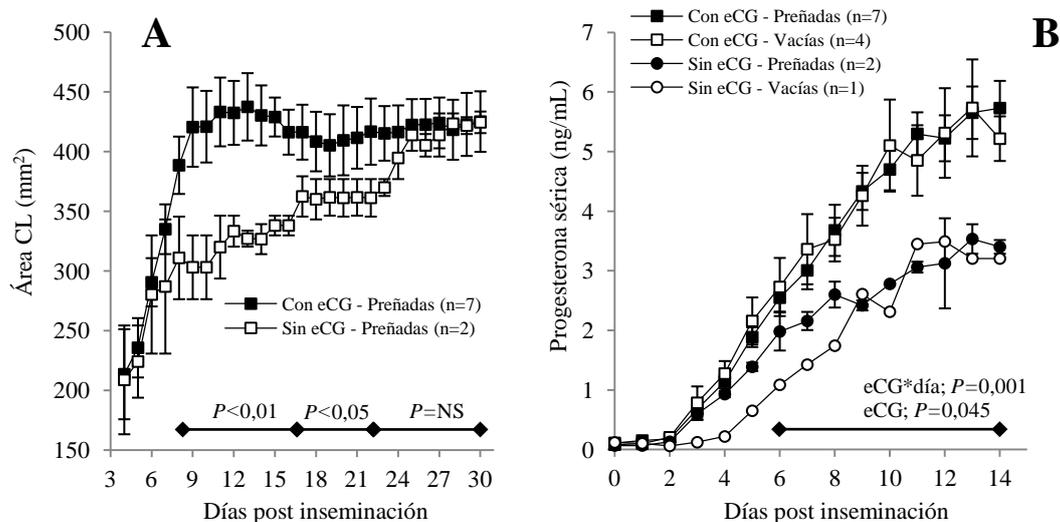


Figura 3.1. Área del CL en vacas preñadas (A) y concentración sérica de progesterona en vacas que ovularon (B) en respuesta a la administración de 400 UI de eCG al retiro del dispositivo en vacas en anestro y con cría al pie (media±SEM).

En las vacas que ovularon, el CL mantuvo un desarrollo y actividad normal en el 73,3% (11/15) de las vacas tratadas con eCG y en el 42,9% (3/7) de las vacas sin eCG

($P=0,16$). Luego del tratamiento de sincronización de la ovulación, se observaron tres patrones diferentes de fase luteal. Un patrón fue considerado como el normal esperable luego de la ovulación, cuando se mantuvo un CL de buen tamaño y concentraciones séricas de progesterona por encima de 1 ng/mL hasta 14 días luego de la ovulación, mientras que hubo dos patrones de respuesta alterada con regresión prematura del CL, confirmado por las concentraciones séricas de progesterona para ambos grupos experimentales. Estos otros dos patrones considerados como fases luteales cortas de 12 y 7 días de duración, fueron confirmados por el descenso en las concentraciones séricas de progesterona a valores por debajo de 1 ng/mL. En las vacas que recibieron eCG, esta respuesta con cuerpos lúteos alterados y bajas concentraciones séricas de progesterona se observó en el 26,7% (4/15), mientras que en las que no recibieron eCG esta respuesta se observó en el 57,1% (4/7; $P=0,17$). En la Figura 3.2 se muestran los resultados para estas respuestas observadas.

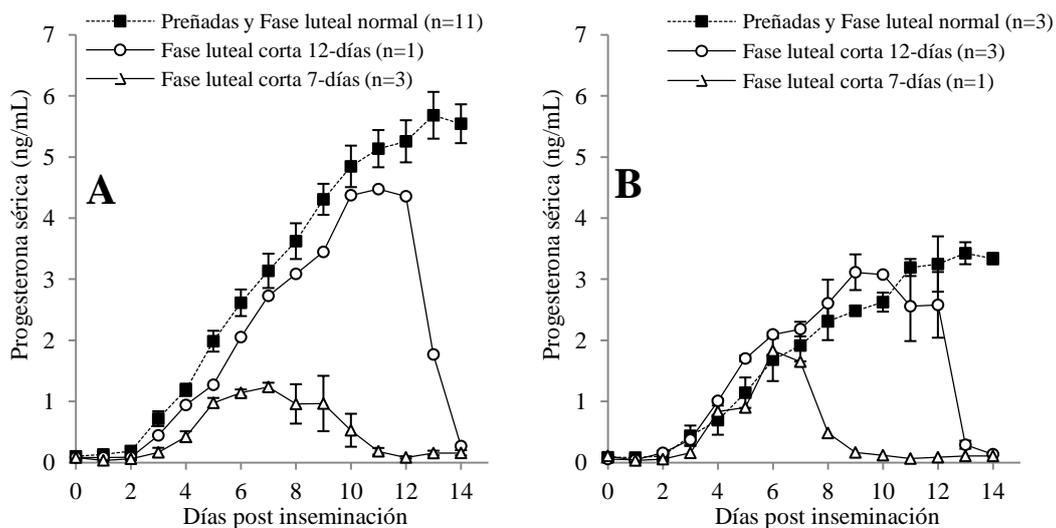
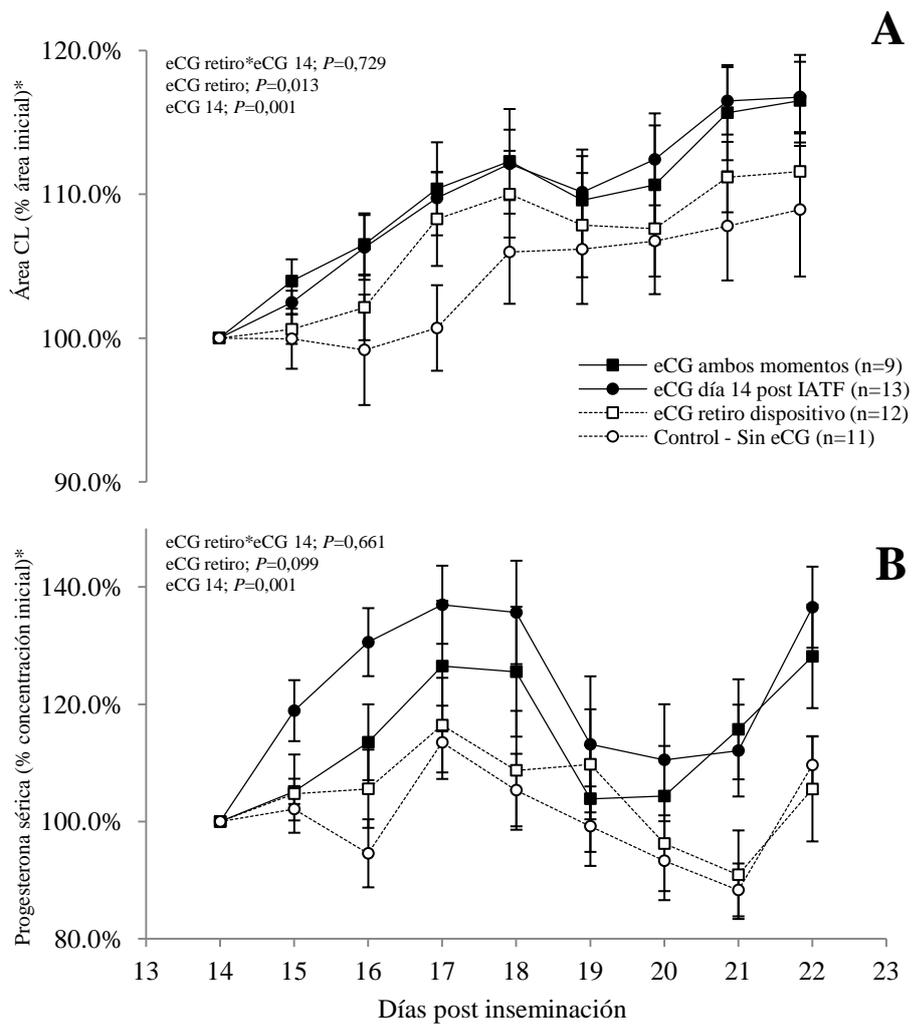


Figura 3.2. Concentración sérica de progesterona en respuesta a la administración de 400 UI de eCG (A) o no (B) al retiro del dispositivo, durante 14 días luego de la inseminación en vacas en anestro y con cría al pie (media±SEM).

Efecto de la administración de eCG 14 días luego de la inseminación sobre la actividad luteal en vacas de cría en anestro posparto

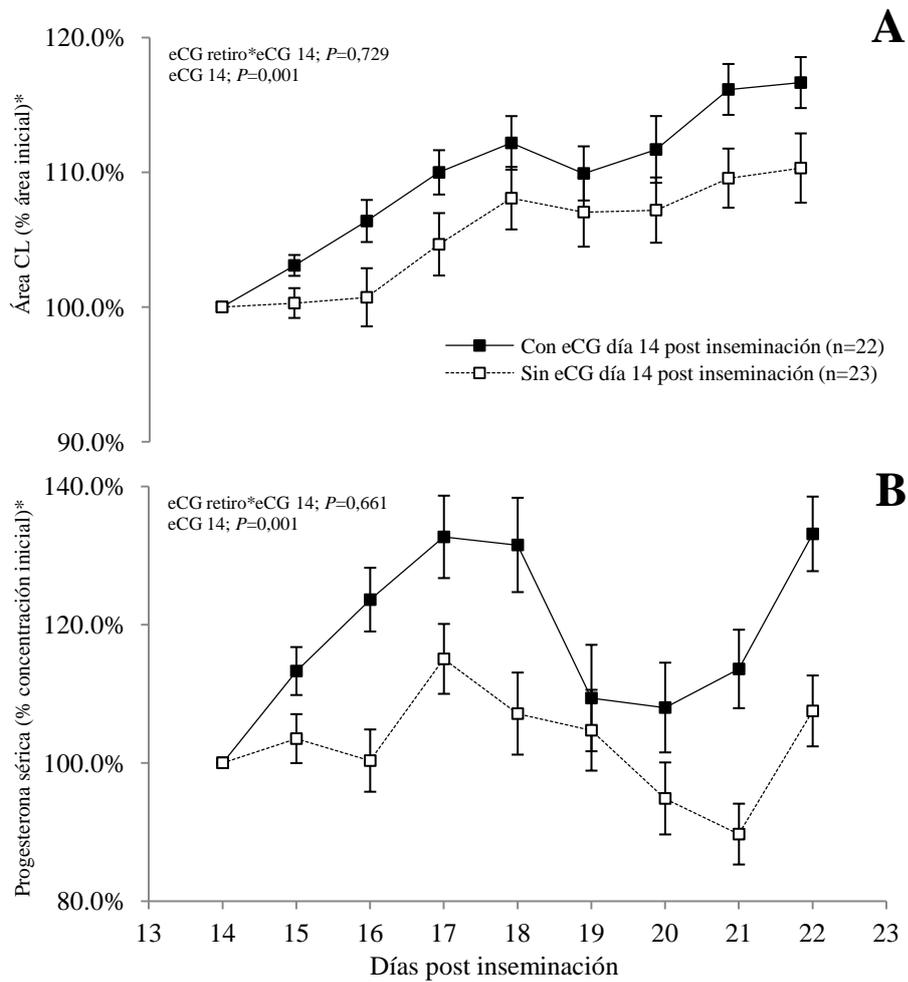
Experimento II

El desarrollo del CL y las concentraciones séricas de progesterona en vacas preñadas desde el día 14 hasta el día 22 luego de la inseminación se presentan en la Figura 3.3. Para normalizar los valores al día 14 y evitar que la variación individual impidiera observar el efecto en cada grupo experimental, los valores son presentados en términos de porcentaje con respecto al valor inicial. En las vacas que resultaron preñadas a los 30 días, la concentración sérica de progesterona fue superior a partir del día 15 para las vacas que recibieron eCG al día 14, con un aumento promedio de $20,6 \pm 5,8\%$ vs. $2,8 \pm 5,0\%$ en comparación con las vacas que no recibieron eCG en este momento ($P=0,001$). Los valores se mantuvieron significativamente más altos en estas vacas tratadas al día 14 y no hubo interacción con el tratamiento realizado al retirar el dispositivo ni en el área del CL ($P=0,729$; Figura 3.3A) ni en la concentración sérica de progesterona ($P=0,661$; Figura 3.3B). Cuando los resultados se analizaron como efecto principal considerando la administración o no de eCG al día 14, hubo un efecto significativo a favor del tratamiento con eCG al día 14 sobre el área del CL ($P=0,001$; Figura 3.4A) y sobre las concentraciones séricas de progesterona ($P=0,001$; Figura 3.4B), no estando afectado por el tratamiento al retiro del dispositivo. Por este motivo los resultados se muestran como efecto principal comparando las vacas con y sin eCG al día 14. Este efecto fue significativo en los días 15, 16, 17 y 18 con una concentración promedio de $11,0 \pm 0,6$ ng/mL en las vacas que se administró eCG al día 14 comparado con las que no recibieron eCG al día 14 ($7,2 \pm 0,5$ ng/mL; $P=0,001$; Figura 3.4B).



*Los valores están normalizados al 100% al día 14 luego de la inseminación.

Figura 3.3. Área del CL (A) y concentración sérica de progesterona (B) desde el día 14 hasta el día 22, en respuesta a la administración de 400 UI de eCG al día 14 luego de la inseminación en vacas en anestro y con cría al pie.



*Los valores están normalizados al 100% al día 14 luego de la inseminación.

Figura 3.4. Área del CL (A) y concentración sérica de progesterona (B) desde el día 14 hasta el día 22, efecto principal considerando la administración o no de 400 UI de eCG al día 14 luego de la inseminación en vacas en anestro y con cría al pie.

El desarrollo del folículo de mayor diámetro desde el día 14 hasta el día 22 luego de la inseminación en las vacas preñadas que recibieron o no eCG al día 14 se presenta en la Figura 3.5. Para el análisis se dividieron los grupos en aquellas vacas con un patrón similar al de 3 ondas o al de 2 ondas. El patrón de 3 ondas fue definido para aquellas vacas cuyo folículo de mayor diámetro al día 14 venía regresando o estaba en fase estática y el patrón de 2 ondas para aquellas vacas en las que dicho folículo estaba en fase de crecimiento. Los

resultados se analizaron como efecto principal considerando la administración o no de eCG al día 14, ya que sobre esta variable no hubo efecto ni interacción del tratamiento de eCG al retiro del dispositivo. En las vacas con patrones de 2 ondas cuyo folículo dominante estaba en franco crecimiento y con un diámetro de $8,3 \pm 0,3$ mm al momento de administrar eCG al día 14, el efecto fue significativo en los días 17 y 18 aumentando a un diámetro de $11,3 \pm 0,5$ mm vs. $9,8 \pm 0,5$ mm comparado con las que no recibieron eCG al día 14 ($P < 0,05$; Figura 3.5B). Por otra parte, en las vacas con un patrón similar al de 3 ondas en las que el folículo dominante de la segunda onda venía regresando con un diámetro de $8,9 \pm 0,3$ mm, el efecto de la eCG sobre el diámetro folicular no fue evidente.

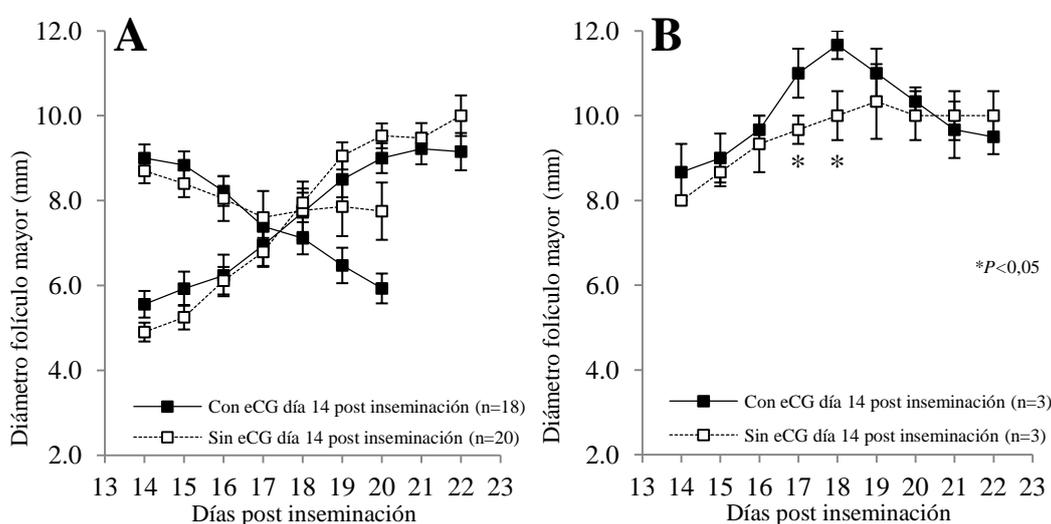


Figura 3.5. Desarrollo del folículo de mayor diámetro para vacas preñadas con patrones de 3 ondas (A) y con patrones de 2 ondas (B) desde el día 14 hasta el día 22. Considerándose muestra el efecto de la administración de 400 UI de eCG al día 14 luego de la inseminación en vacas en anestro y con cría al pie.

Las concentraciones séricas de estradiol 17β en vacas preñadas desde el día 14 hasta el día 18 luego de la inseminación se presentan en la Figura 3.6A. No hubo interacción, (eCG al retiro del dispositivo X eCG al día 14 post inseminación; $P=0,650$), ni efecto de los tratamientos (con eCG al día 14 $P=0,120$; sin eCG al día 14 $P=0,132$). Cuando los resultados se analizaron como efecto principal considerando la administración o no de eCG

al día 14 (Figura 3.6B), la concentración sérica de estradiol17 β fue superior el día 16 con un aumento promedio de $6,530 \pm 0,910$ vs. $2,690 \pm 0,204$ pmol/L para las vacas con o sin eCG al día 14 respectivamente ($P=0,001$).

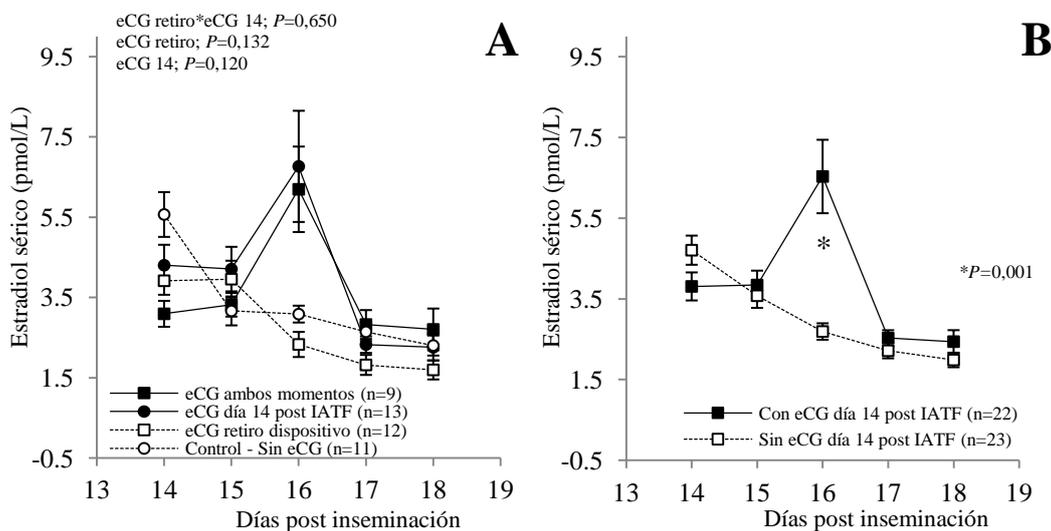


Figura 3.6. Concentración sérica de estradiol17 β desde el día 14 hasta el día 18 (A) y efecto principal considerando la administración o no de 400 UI de eCG al día 14 luego de la inseminación (B), en vacas en anestro y con cría al pie.

Las concentraciones séricas de estradiol17 β en vacas preñadas con patrones de 3 ondas desde el día 14 hasta el día 18 luego de la inseminación se presentan en la Figura 3.7A y para las de 2 ondas en la Figura 3.7B. No hubo interacción, (eCG al retiro del dispositivo X eCG al día 14 post inseminación; $P=0,697$) para vacas con patrones de 3 ondas ni para las de 2 ondas ($P=0,379$). No hubo efecto de los tratamientos (con eCG al día 14; $P=0,253$ vs. sin eCG al día 14; $P=0,164$) para vacas con patrones de 3 ondas ni para las de 2 ondas (con eCG al día 14; $P=0,234$ vs. sin eCG al día 14; $P=0,949$). Cuando los resultados se analizaron como efecto principal considerando la administración o no de eCG al día 14 (Figura 3.8), la concentración sérica de estradiol17 β fue superior el día 16 tanto para vacas con patrones de 3 ondas como para las de 2 ondas con un aumento promedio de $6,366 \pm 1,009$ vs. $2,588 \pm 0,220$ pmol/L para las de 3 ondas ($P=0,004$; Figura

3.8A) y un aumento promedio de $8,680 \pm 2,724$ vs. $3,375 \pm 0,403$ pmol/L para las de 2 ondas ($P=0,034$; Figura 3.8B), con o sin eCG al día 14 respectivamente.

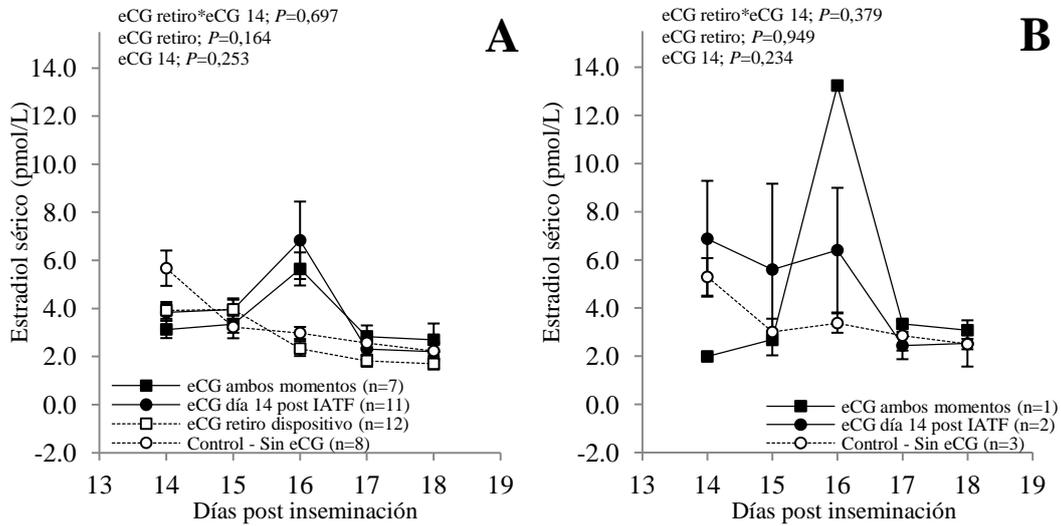


Figura 3.7. Concentración sérica de estradiol 17β para vacas preñadas con patrones de 3 ondas (A) y con patrones de 2 ondas (B) desde el día 14 hasta el día 18, en respuesta a la administración de 400 UI de eCG al día 14 luego de la inseminación en vacas en anestro y con cría al pie.

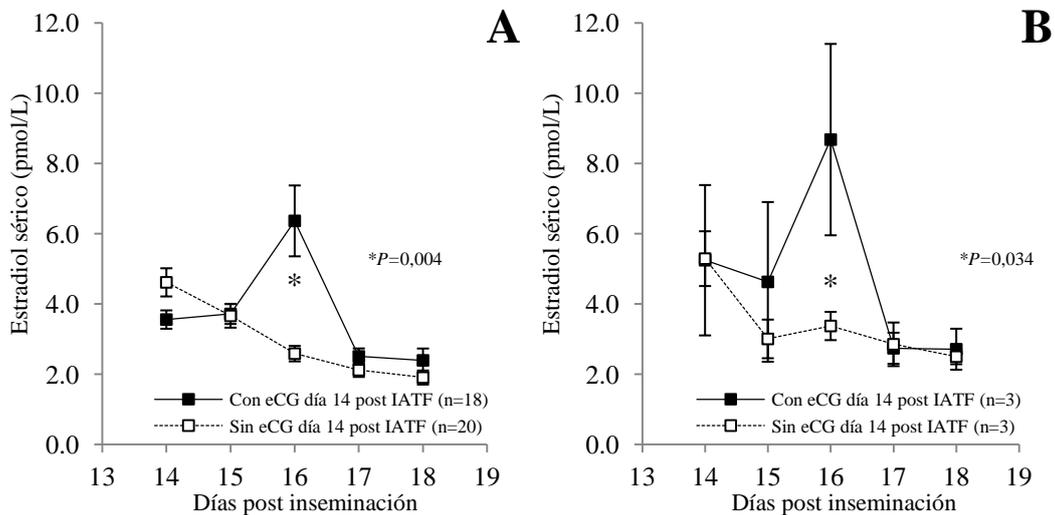


Figura 3.8. Concentración sérica de estradiol 17β para vacas preñadas con patrones de 3 ondas (A) y con patrones de 2 ondas (B) desde el día 14 hasta el día 18, efecto principal considerando la administración o no de 400 UI de eCG al día 14 luego de la inseminación en vacas en anestro y con cría al pie.

Tasa de preñez y mantenimiento de la gestación en vacas con cría

Experimento III

La administración de eCG al retirar el dispositivo incrementó significativamente la tasa de preñez 62,1% (77/124) comparado con aquellas que no recibieron eCG 48,3% (58/120; $P < 0,05$). La tasa de preñez obtenida con la administración de eCG al día 14 fue intermedia con respecto a los grupos anteriores 57,6% (72/125; $P = NS$). El doble tratamiento al retiro del dispositivo y a los 14 días luego de la inseminación incrementó aún más la tasa de preñez a un 78,9% (101/128) siendo superior frente a los demás grupos ($P < 0,05$; Figura 3.9). Las pérdidas embrionarias o fetales tempranas entre los días 30 y 60 luego de la inseminación fue en promedio 1,9% (6/308), no hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales (Tabla 3.2).

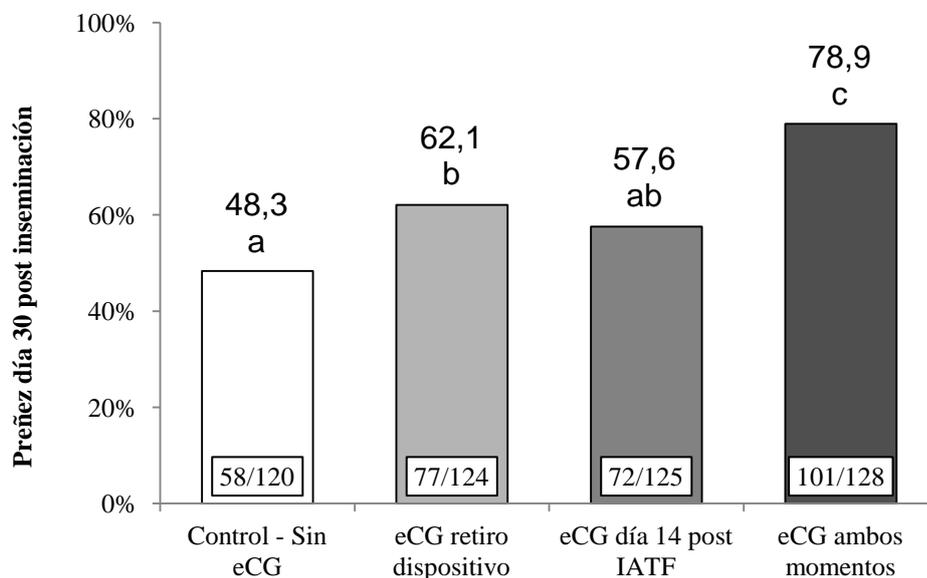


Figura 3.9. Tasa de preñez luego de la administración de 400 UI de eCG al retiro del dispositivo intravaginal de progesterona y/o 14 días luego de la inseminación en vacas de carne en anestro.

Tabla 3.2. Tasa de preñez a los 60 días y pérdidas embrionarias/fetales luego de la administración de eCG al retiro del dispositivo intravaginal de progesterona y/o 14 días luego de la inseminación en vacas de carne en anestro.

	Tasa de preñez US 60 días (n=497)	Pérdidas entre 30 y 60 días de gestación (n=308)
Control - Sin eCG	48,3% (58/120) ^a	0,0% (0/58) ^a
eCG retiro dispositivo	59,7% (74/124) ^b	3,9% (3/77) ^a
eCG 14 días post-IATF	55,2% (69/125) ^{ab}	4,2% (3/72) ^a
eCG ambos momentos	78,9% (101/128) ^c	0,0% (0/101) ^a

Diferentes superíndices dentro de una misma columna representan diferencias significativas ($P < 0,05$).

Tasa de preñez y mantenimiento de la gestación en vaquillonas

Experimento IV

La tasa de preñez se incrementó con la administración de eCG al retiro del dispositivo 46,9% (83/177) comparado con aquellas que no recibieron eCG 36,9% (66/179; $P < 0,05$). La tasa de preñez obtenida con la administración de eCG al día 14 fue intermedia con respecto a los grupos anteriores 39,0% (64/164; $P = \text{NS}$). Con el doble tratamiento al retiro del dispositivo y a los 14 días luego de la inseminación se obtuvo una tasa de preñez de 46,7% (79/169), no mostrando ningún efecto la administración a los 14 días luego de la inseminación ($P < 0,05$; Figura 3.10). Las pérdidas embrionarias o fetales tempranas entre los días 30 y 60 luego de la inseminación fue en promedio 4,8% (14/292), no hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales (Tabla 3.3).

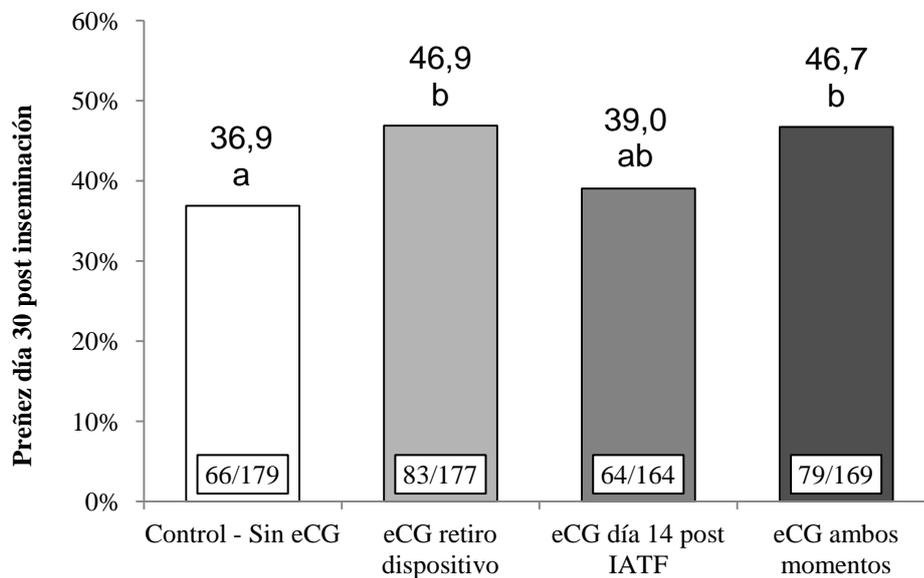


Figura 3.10. Tasa de preñez luego de la administración de 400 UI de eCG al retiro del dispositivo intravaginal de progesterona y/o 14 días luego de la inseminación en vaquillonas en anestro.

Tabla 3.3. Tasa de preñez a los 60 días y pérdidas embrionarias/fetales; luego de la administración de eCG al retiro del dispositivo intravaginal de progesterona y/o 14 días luego de la inseminación en vaquillonas en anestro.

	Tasa de preñez US 60 días (n=689)	Pérdidas entre 30 y 60 días de gestación (n=292)
Control - Sin eCG	34,1% (61/179) ^a	7,6% (5/66) ^a
eCG retiro dispositivo	44,1% (78/177) ^b	6,0% (5/83) ^a
eCG 14 días post-IATF	37,8% (62/164) ^{ab}	3,1% (2/64) ^a
eCG ambos momentos	45,6% (77/169) ^b	2,5% (2/79) ^a

Diferentes superíndices dentro de una misma columna representan diferencias significativas ($P < 0,05$).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados en esta tesis soportan la hipótesis que la administración de eCG al finalizar un tratamiento para IATF y/o 14 días luego de ésta, favorece el desarrollo folicular periovulatorio y la actividad luteal durante el período crítico de la gestación. Además, la adición de eCG permitió aumentar la tasa de preñez sugiriendo así una disminución en las pérdidas embrionarias.

El tratamiento con eCG al retiro del dispositivo aumentó la proporción de vacas que ovularon, incrementó el tamaño del CL y las concentraciones séricas de progesterona durante las primeras dos semanas de gestación en vacas en anestro. Estos resultados son novedosos en vacas de cría *Bos taurus*. Como consecuencia, este tratamiento aumentó la tasa de preñez de manera significativa cuando se lo aplicó a vacas en anestro posparto. Cuando fue administrada a los 14 días luego de la inseminación aumentó aún más la función luteal, lo que favorecería el reconocimiento materno del embrión y el mantenimiento de la gestación. Esto se vio reflejado en un aumento en la tasa de preñez obtenida en vacas en anestro posparto. Por otro lado, también se vio que incrementa las concentraciones séricas de estradiol 17β a los 2 días de su aplicación, esto demuestra que además, ejerce efecto estimulante sobre la actividad folicular.

La adición de eCG al tratamiento para IATF aumentó la proporción de vacas en anestro que alcanzaron la ovulación mostrando su efecto como inductor de la ovulación. Estos tratamientos son comúnmente usados en vacas en anestro posparto con una reducida secreción de gonadotrofinas donde principalmente están afectadas por el amamantamiento, la subnutrición o lo que es peor aún, la combinación de ambos factores (Yavas y Walton,

2000b; de Castro *et al.*, 2011). En esta situación donde hay un bajo aporte de LH, el desarrollo del folículo preovulatorio, la tasa de ovulación, el desarrollo del CL subsiguiente y las concentraciones de progesterona son inadecuadas (Roche *et al.*, 1992; Yavas y Walton, 2000a). La actividad similar a las gonadotropinas de la eCG ha sido reportada en bovinos, demostrando que esta hormona tiene afinidad por los receptores de LH en las células de la granulosa o de la teca (Revisado por Murphy, 2012). Por lo tanto, el efecto similar de FSH y LH de la eCG en el desarrollo folicular, puede explicar la mayor tasa de ovulación obtenida en nuestros trabajos.

En las vacas que ovularon, el CL fue más competente en las que recibieron eCG frente a las que no recibieron, aumentando su tamaño y concentración de progesterona. El mecanismo por el cual la eCG aumenta la función luteal aún está sin dilucidarse. Nuestros resultados coinciden con lo reportado por otros autores en vacas de las razas Nelore, Holstein y cruza *Bos taurus*, donde el mecanismo por el cual la eCG aumentó la fertilidad ha sido relacionado no solamente con el crecimiento folicular sino también con los cambios en el desarrollo del CL (Baruselli *et al.*, 2004; Bó *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2009; Dorneles Tortorella *et al.*, 2013). El desarrollo del CL en rumiantes ocurre dentro de la primer semana luego de la ovulación, con cambios bioquímicos y morfológicos en las células de la teca interna y de la granulosa del folículo preovulatorio (Alila y Hansel, 1984). Estos cambios llevan a establecer la secreción de progesterona por parte de la luteinización de las células esteroideogénicas (Niswender *et al.*, 1994). Por lo que, el aumento del diámetro folicular hallado en nuestro trabajo podría estar relacionado con el efecto positivo en las células esteroideogénicas del folículo ovulatorio y la formación de un CL más competente observado en las vacas tratadas.

El CL está compuesto por células endoteliales vasculares, células esteroideogénicas grandes y chicas, células de músculo liso, pericitos, fibrocitos y células inmunes, indicando que el CL es un tejido heterogéneo (Niswender *et al.*, 2000; Diaz *et al.*, 2002). Por otro lado, una de las hormonas multifuncionales presentes en la reproducción es la prolactina (PRL), varios genes relacionados al desarrollo del CL han sido identificados como

objetivos directos de esta hormona (Stocco, 2012). Un estudio reciente reportó que las administraciones de eCG en vacas superovuladas sugiere una posible participación de esta hormona en la regulación de la expresión de receptores de PRL contribuyendo al desarrollo del CL y un aumento en la síntesis de progesterona (Fátima *et al.*, 2012). Cuando se analizaron los efectos de la eCG en la expresión génica global, se observó que parece estar estimulando la expresión de proteínas esteroidogénicas como la STAR (*steroidogenic acute regulatory protein*), así como la regulación de la biosíntesis del colesterol y los genes estructurales relacionados. La expresión diferencial de éstos genes se propone como una causa importante que conduce a un aumento del volumen del CL y la mejora en la producción de progesterona (Fátima *et al.*, 2012). Recientemente, en un experimento realizado en vacas cruce *Bos taurus X Bos indicus* que recibieron eCG antes de la desviación folicular, se observaron modificaciones esteroidogénicas en las características específicas relacionadas a las mitocondrias (formas mitocondriales y número de células luteales grandes). Por otra parte, cuando la administración se realizó luego de la desviación folicular ovárica, se observaron cambios relacionados con la proliferación de tejido (número de células luteales chicas y volumen mitocondrial total) (Rigoglio *et al.*, 2013). El efecto de la eCG en el desarrollo del CL observado en nuestro estudio podría estar debido, quizás, al aumento de la proporción, tamaño o función de las células luteales.

La intervención con hormonas luteotróficas podría favorecer la función luteal y así mejorar las condiciones maternas para el establecimiento de la gestación. Altas concentraciones séricas de progesterona fueron obtenidas con el tratamiento de eCG, y éstos resultados son coincidentes con lo reportado hace algunos años por Thatcher *et al.*, (1994), donde sugieren que una adecuada diferenciación y función del CL es esencial para el desarrollo embrionario y el ambiente uterino. El soporte de la progesterona durante la gestación temprana es clave para el mantenimiento de la gestación (Spencer *et al.*, 2007; Lonergan, 2011; Bazer, 2013). Estudios previos encontraron un efecto favorable de los niveles de progesterona durante la fase luteal temprana sobre el desarrollo embrionario (Mann *et al.*, 2000) mostrando que las vacas con embriones con mejor desarrollo y con mayor producción de IFN- τ al día 16 tuvieron mayores concentraciones de progesterona a partir del día 4 o 5 que las vacas con embriones con menor desarrollo embrionario

(Lonergan *et al.*, 2013). También se ha demostrado que la administración de progesterona desde el día 2 al día 5 aumenta 10 veces la elongación del *conceptus* al día 14 (Garret *et al.*, 1988), y desde el día 5 al día 9 aumenta la producción de IFN- τ al día 16 (Mann *et al.*, 2006), así como cuando se administró a partir del día 3, se encontró un efecto similar en vaquillonas de carne (Carter *et al.*, 2008). Estudios recientes reportan que la secreción de progesterona durante la fase luteal media depende principalmente del tamaño del CL (Lüttgenau *et al.*, 2011b). Por lo tanto, tratamientos que aumenten las concentraciones de progesterona durante la fase luteal temprana aumentarán el desarrollo del embrión (Garrett *et al.*, 1988; Mann *et al.*, 2006), además están positivamente correlacionadas con la secreción de IFN- τ (Kerbler *et al.*, 1997). En nuestro trabajo, la administración de eCG incrementó las concentraciones séricas de progesterona durante 14 días luego de la inseminación, previo al período crítico de la gestación siendo éste un momento crucial para el desarrollo embrionario. Se ha reportado que el éxito en el reconocimiento materno de la gestación depende de un adecuado desarrollo embrionario y por ende producción de IFN- τ , que esto a su vez depende de un ambiente hormonal apropiado y en particular una adecuada producción de progesterona luego de la ovulación (Mann y Lamming, 2001). Por el contrario, bajas concentraciones de progesterona durante la gestación temprana permitirán un aumento en la pulsatilidad de LH y estimulación del crecimiento folicular (Lüttgenau *et al.*, 2011a), que podría conducir a altas concentraciones de estradiol perjudiciales para la supervivencia del embrión alrededor del día 16 del ciclo estral (Mann *et al.*, 1999; Thatcher *et al.*, 2001). El aumento sostenido de concentraciones circulantes de progesterona, obtenidas en nuestro trabajo, tuvo lugar previo al reconocimiento materno de la gestación, lo que podría ser un factor favorable para la supervivencia embrionaria luego de la inseminación en un tratamiento para IATF en vacas en anestro posparto.

En este estudio encontramos fases luteales cortas con regresión prematura del CL confirmadas por una marcada disminución en las concentraciones séricas de progesterona, a pesar de que estos animales recibieron una exposición previa a la progesterona. Varios estudios han reportado que las fases luteales cortas son frecuentes cuando las concentraciones de progesterona son deficientes antes de la ovulación, ya sea, antes de la primera ovulación en la pubertad, después del parto o luego del anestro estacional

(Inskeep, 2004). Es bien sabido que un CL que regresa antes del día 14 luego de la inseminación no puede soportar el reconocimiento materno de la gestación. Un tratamiento previo con progesterona debe evitar esta respuesta para garantizar una fase luteal normal luego de la sincronización de la ovulación (Inskeep, 2004). Sin embargo, en nuestro estudio fueron observadas fases luteales cortas luego del tratamiento con progesterona. Dos patrones diferentes de regresión prematura del CL determinado por ecografía y confirmado por una brusca disminución en las concentraciones séricas de progesterona fueron evidentes en ambos grupos de tratamiento, encontrándose fases luteales cortas de 12 días y 7 días. El desarrollo folicular preovulatorio, las concentraciones de gonadotrofinas previas y/o posteriores a la ovulación y los receptores luteales para LH han sido reportados que afectan la función luteal (Inskeep y Dailey, 2005). Además, en otros trabajos ha sido demostrado que la secreción prematura de PGF α por parte del útero es la responsable de fases luteales cortas (Cooper *et al.*, 1991). Si el útero no ha estado previamente expuesto a progestágenos, la PGF α aumenta de manera prematura en el momento en que el primer CL comienza a secretar progesterona (Inskeep, 2004). Lo que ocurrió en nuestro trabajo, debido al anestro posparto y a la baja CC de las vacas con cría, tal vez fue debido al soporte insuficiente de la LH resultando en la formación de CL de vida corta. Aunque no se alcanzaron diferencias estadísticas, en el grupo con eCG el 26,7% (4/15) de las vacas ovuladas tuvieron fases luteales cortas, mientras que en el grupo sin eCG esta respuesta se produjo en el 57,1% (4/7). Por lo tanto, nuestros resultados indican de forma novedosa, por un lado que existe una incidencia de cuerpos lúteos subnormales o de regresión prematura luego de un tratamiento con progesterona en vacas en anestro posparto. Adicionalmente, nuestro estudio sugiere que este problema podría reducirse con la administración de eCG al final de un tratamiento de sincronización de la ovulación.

La administración de eCG al finalizar un tratamiento con progesterona en vacas ha sido descrito hace varios años (Roche *et al.*, 1992). Sin embargo su uso asociado a los tratamientos con estradiol y progesterona para IATF ha sido evaluado recientemente en los últimos años, tanto en vacas *Bos taurus* como *Bos indicus* (Bó *et al.*, 2003; Baruselli *et al.*, 2004). Nuestros resultados muestran que la administración de eCG permite incrementar la tasa de preñez tanto en vacas con cría al pie con más de 60 días posparto como en

vaquillonas, ambas en anestro. Los resultados son coincidentes con trabajos de campo donde se postula que el estímulo de la eCG sobre el desarrollo folicular y la ovulación no sería necesario en vacas ciclando o en buena CC (Cutaia *et al.*, 2003), justificándose su uso principalmente en hembras en anestro. Por lo tanto, estos resultados demuestran que en vacas *Bos taurus* en anestro la mayor tasa de preñez obtenida cuando administramos eCG se debe a que un mayor porcentaje de vacas alcanzan la ovulación y que éstas vacas luego presentan mayores concentraciones de progesterona en sangre, lo que genera un ambiente uterino adecuado para el reconocimiento materno de la gestación.

En la actualidad, el uso de eCG en bovinos es común en la inducción y sincronización de la ovulación. Sin embargo el uso de la eCG luego de la ovulación no había sido abordado de manera profunda. Esta estrategia fue evaluada hace pocos años en vacas de leche asociado a hCG (Bartolomé *et al.*, 2009, 2012) en las que se encontró un efecto favorable de la eCG sobre la tasa de preñez cuando fue administrada al día 22 luego de la inseminación (Perez Wallace, 2013). En un trabajo realizado en vacas cruza cebú, donde se administró eCG al día 14 luego de la IATF (Cutaia *et al.*, 2010), se observó un aumento en la tasa de preñez de 30,8% (sin eCG) a 47,2% (con eCG; $P < 0,05$), siendo este efecto menor en la medida que aumentaba el período posparto por encima de 90 días. Nuestros estudios demuestran que la administración de 400 UI de eCG a los 14 días luego de la inseminación aumentan las concentraciones de progesterona, independientemente si se administra una dosis al momento de retirar el dispositivo. A partir de este resultado, en un siguiente estudio evaluamos el efecto de una dosis de eCG previo a la ovulación y/o 14 días luego de la IATF sobre la tasa de preñez y las pérdidas embrionarias en vacas con cría. La administración de 400 UI de eCG al retiro del dispositivo aumentó la tasa de preñez. Cuando se administró una segunda dosis de eCG 14 días luego de la inseminación, el resultado fue aún mejor, sugiriendo un posible efecto favorable sobre el mantenimiento de la gestación temprana en vacas en anestro. Este mismo diseño experimental fue aplicado en vaquillonas en anestro donde observamos que la administración de eCG al retiro del dispositivo aumentó la tasa de preñez, pero sin embargo, la eCG al día 14 luego de la IATF no tuvo ningún efecto sobre la fertilidad. Esta respuesta es generada por el efecto favorable de la eCG en la inducción de la ovulación y en la calidad del CL subsecuente. Sumado a

esto, la administración de una segunda dosis de 400 UI de eCG 14 días luego de la inseminación sugiere un posible efecto sobre el mantenimiento de la gestación en los primeros 30 días en vacas multíparas con cría y en anestro, no observándose el mismo efecto en vaquillonas. Si bien esta respuesta en vacas en anestro podría estar asociada a un mayor soporte luteal generado por la eCG como se observa en los Experimentos I y II, no deberían descartarse otros efectos adicionales de la eCG sobre el *conceptus* o el ambiente uterino.

En resumen, como forma de mejorar el soporte luteotrófico y el mantenimiento de la gestación se ha evaluado el uso de eCG luego de la ovulación con resultados promisorios en vacas con cría al pie en anestro y pobre condición corporal. La eCG administrada 14 días luego de la inseminación aumentó las concentraciones de progesterona en sangre durante el período crítico de la gestación y en algunos casos mejora la tasa de preñez. Por otro lado, también se vio que incrementa las concentraciones séricas de estradiol 17β a los 2 días de su aplicación, esto demuestra que además ejerce un efecto estimulante sobre la actividad folicular.

CONCLUSIONES

La administración de 400 UI de eCG al retirar el dispositivo con progesterona incrementó el desarrollo del folículo ovulatorio, la proporción de hembras que ovularon, el desarrollo del cuerpo lúteo y las concentraciones séricas de progesterona durante la fase gestación temprana.

La administración de 400 UI de eCG a los 14 días luego de la inseminación aumentó las concentraciones de progesterona durante el período crítico del desarrollo embrionario. Esto sugiere un mejor soporte luteal durante el reconocimiento materno de la gestación en vacas de carne en anestro posparto.

La administración de 400 UI de eCG al momento del retiro del dispositivo aumentó la tasa de preñez, tanto en vacas con cría como en vaquillonas en anestro. La administración de una segunda dosis de eCG 14 días luego de la inseminación incrementó aún más la tasa de preñez, sugiriendo un posible efecto favorable sobre la sobrevivencia embrionaria y el mantenimiento de la gestación temprana en vacas multíparas en anestro. El efecto favorable de la segunda dosis de eCG no fue evidente en vaquillonas en anestro.

Implicancias prácticas

Los resultados de esta tesis muestran claramente el beneficio de utilizar una dosis de eCG al retirar el dispositivo con progesterona en vacas de carne en anestro. Este tratamiento ha comenzado a implementarse en condiciones comerciales donde se aplican programas de IATF. Es probable que el uso de esta hormona se transforme en un componente esencial en la aplicación de esta tecnología en vacas en anestro. La información aportada es muy novedosa en cuanto al mecanismo que explica la mayor tasa de preñez obtenida con la administración de eCG.

Por otra parte, aparece la alternativa de administrar una segunda dosis de eCG 14 días luego de la inseminación. Si bien este tratamiento muestra resultados promisorios en el presente estudio, como toda nueva tecnología debe transitar el proceso de validación antes de ser implementado en condiciones comerciales de producción. Debemos contar con mayor información para tener una posición más clara para incorporarlo o no a los programas de IATF en vacas con cría y en anestro.

BIBLIOGRAFÍA

- Alila, H.W., Hansel, W., 1984. Origin of different cell types in bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. *Biol. Reprod.* 31, 1015–1025.
- Allen, W.R., Moor, R.M., 1972. The origin of the equine endometrial cups. *J. Reprod. Fert.* 29, 313 – 316.
- Anualpec, 2012. Estadísticas agropecuarias. Publicado en internet, disponible en <http://www.anualpec.com.br>. Activo Noviembre 2013.
- Bartolome, J.A., 2009. Mortalidad embrionaria y fetal temprana de origen no infeccioso en vacas lecheras. En 8° Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina, pp. 1-10.
- Bartolome, J.A., Melendez, P., Kelbert, D., Swift, K., McHale, J., Hernandez, J., Silvestre, F., Risco, C.A., Arteché, A.C.M., Thatcher, W.W., Archbald, L.F., 2005. Strategic use of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) to increase pregnancy rate and reduce pregnancy loss in lactating dairy cows subjected to synchronization of ovulation and timed insemination. *Theriogenology* 63, 1026–1037.
- Bartolome, J.A, Perez Wallace, S., de la Sota, R.L., Thatcher, W.W., 2012. The effect of administering equine chorionic gonadotropin (eCG) and human chorionic gonadotropin (hCG) post artificial insemination on fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology* 78, 1110–1116.
- Bartlett, A., Pain, S.J., Hughes, P.E., Stott, P., van Wettere, W.H., 2009. The effects of PG600 and boar exposure on oestrus detection and potential litter size following mating at either the induced (pubertal) or second oestrus. *Anim. Reprod. Sci.* 114, 219-227.
- Baruselli, P.S., Reis, E.L., Marques, M.O., Nasser, L.F., Bó, G.A., 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 479–486.
- Bazer, F.W., 2013. Contributions of an animal scientist to understanding the biology of the uterus and pregnancy. *Reprod. Fertil. Dev.* 25, 129–147.
- Binelli, M., Thatcher, W., Mattos, R., Baruselli, P., 2001. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology* 56, 1451–1463.
- Bó, G.A., Baruselli, P.S., Martínez, M.F., 2003. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 307–326.
- Bó, G.A., Cutaia, L., Peres, L.C., Pincinato, D., Maraña, D., Baruselli, P.S., 2007. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive

- performance of *Bos indicus* cattle. In: Juengel, J.L., Murray, J.F., Smith, M.F. (Eds), *Reproduction in Domestic Ruminants VI*, Nottingham University Press, Nottingham, England, pp. 223–236.
- Bousfield, G., Liu, W.K., Sugino, H., Ward, D., 1987. Structural studies on equine glycoprotein hormones. Amino acid sequence of equine lutropin b-subunit. *J. Biol. Chem.* 262, 8610-8620.
- Bridges, P.J., Wright, D.J., Buford, W.I., Ahmad, N., Hernandez-Fonseca, H., McCormick, M.L., Schrick, F.N., Dailey, R.A., Lewis, P.E., Inskeep, E.K., 2000. Ability of induced corpora lutea to maintain pregnancy in beef cows. *J. Anim. Sci.* 78, 2942–2949.
- Carter, F., Forde, N., Duffy, P., Wade, M., Fair, T., Crowe, M.A., Evans, A.C.O., Kenny, D.A., Roche, J.F., Lonergan, P., 2008. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reprod. Fertil. Dev.* 20, 368–375.
- Christakos, S., Bahl, O., 1979. Pregnant Mare Serum Gonadotropin. Purification and physicochemical, biological and immunological characterization. *J. Biol. Chem.* 54, 4253-4261.
- Committee on bovine reproductive nomenclature., 1972. Recommendations for standardizing bovine reproductive terms. *Cornell Vet.*, pp. 216–237.
- Cooper, D.A., Carver, D.A., Villeneuve, P., Silvia, W.J., Inskeep, E.K., 1991. Effects of progestagen treatment on concentrations of prostaglandins and oxytocin in plasma from the posterior vena cava of post-partum beef cows. *J. Reprod. Fertil.* 91, 411–421.
- Crowe, M.A., 2008. Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 43 (Suppl 5), 20–28.
- Cutaia, L., Veneranda, G., Tríbulo, R., Baruselli, P.S., Bó, G.A., 2003. Programas de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo en rodeos de cría: factores que lo afectan y resultados productivos. En 5° Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina, pp. 119-132.
- Cutaia, L., Ramos, M., Chesta, P., Bó, G.A., 2010. Pregnancy rates in suckled beef cows synchronized with progesterone intravaginal devices and receiving eCG fourteen days after breeding. In: IETS Annual Meeting, Argentina, pp. 168.
- de Castro, T., Ibarra, D., Rodriguez, M., Valdez, L., Benquet, N., Rubianes, E., 2011. Resumption of postpartum ovarian cyclicity after different suckling manipulation treatments in primiparous beef cows. *Anim. Prod. Sci.* 51, 111–114.

- de Castro, T., Valdez, L., Rodriguez, M., Benquet, N., Rubianes, E., 2004. Decline in assayable progesterone in bovine serum under different storage conditions. *Trop. Anim. Health Prod.* 36, 381–384.
- Demmers, K.J., Derecka, K., Flint, A., 2001. Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction* 121, 41–49.
- Diaz, F.J., Anderson, L.E., Wu, Y.L., Rabot, A., Tsai, S.J., Wiltbank, M.C., 2002. Regulation of progesterone and prostaglandin F₂α production in the CL. *Mol. Cell. Endocrinol.* 191, 65–80.
- DIEA, 2013. Anuario estadístico Agropecuario. Estadísticas agropecuarias. Publicado en internet. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,754,O,S,0,MNU;E;27;9;MNU;,%EF%BF%BD>. Activo Diciembre 2013.
- Diskin, M.G., Morris, D.G., 2008. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod. Domest. Anim.* 43 (Suppl 2), 260–267.
- Diskin, M.G., Murphy, J.J., Sreenan, J.M., 2006. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 96, 297–311.
- Diskin, M.G., Parr, M.H., Morris, D.G., 2012. Embryo death in cattle: an update. *Reprod. Fertil. Dev.* 24, 244–251.
- Dorneles Tortorella, R., Ferreira, R., Tonello dos Santos, J., Silveira de Andrade Neto, O., Barreta, M.H., Oliveira, J.F., Bayard Gonçalves, P., Pereira Neves, J., 2013. The effect of equine chorionic gonadotropin on follicular size, luteal volume, circulating progesterone concentrations, and pregnancy rates in anestrus beef cows treated with a novel fixed-time artificial insemination protocol. *Theriogenology* 79, 1204–1209.
- Evans, G., Robinson, T.J., 1980. The control of fertility in sheep: endocrine and ovarian responses to progestagen-PMSG treatment in the breeding season and in anestrus. *J. Agric. Sci. (Camb)* 94, 69–88.
- Fátima, L.A., Baruselli, P.S., Gimenes, L.U., Binelli, M., Rennó, F.P., Murphy, B.D., Papa, P.C., 2012. Global gene expression in the bovine corpus luteum is altered after stimulatory and superovulatory treatments. *Reprod. Fertil. Dev.* 25 (7), 998–1011.
- Garrett, J.E., Geisert, R.D., Zavy, M.T., Morgan, G.L., 1988. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *J. Reprod. Fertil.* 84, 437–446.
- Giassetti, M., Pontes, E., Niemeyer, C., Siqueira, A., Fedozzi, F., Lima, M., Marques, V., Bertan, C., Miglino, M., Arruda, R., Papa, P., Binelli, M., 2008. Quantificação do Interferon-tau durante o reconhecimento materno da gestação em fêmeas bovinas *Bos taurus indicus*. *Braz. J. Vet. Res. anim. Sci.* 45 (Suppl), 111–120.

- Guilbault, L.A., Dufour, J.J., Thatcher, W.W., Drost, M., Haibel, G.K., 1986. Ovarian follicular development during early pregnancy in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 78, 127-135.
- Hoppen, H.O., 1994. The equine placenta and equine chorionic gonadotropin - an overview. *Exp. Clin. Endocr.* 102, 235-243.
- Howard, J.M., Manzo, R., Dalton, J.C., Frago, F., Ahmadzadeh, A., 2006. Conception rates and serum progesterone concentration in dairy cattle administered gonadotropin-releasing hormone 5 days after artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 95, 224-233.
- Humblot, P., 2001. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. *Theriogenology* 56, 1417-1433.
- Humphrey, W.D., Murphy, B.D., Rieger, D., Mapletoft, R.J., Manns, J.G., Fretz, P.B., 1979. Effects of FSH-LH ratio of PMSG on ovulatory responses. *Theriogenology* 11, 101.
- InfoStat. Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W., InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Imakawa, K., Anthony, R.V., Kazemi, M., 1987. Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophectoderm. *Nature* 330, 377-379.
- Inskeep, E.K., 2004. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *J. Anim. Sci.* 82, 24-39.
- Inskeep, E.K., Dailey, R.A., 2005. Embryonic death in cattle. *Vet. Clin. Food Anim. Pract.* 21, 437-461.
- Kastelic, J.P., Bergfelt, D.R., Ginther, O.J., 1990. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology* 33, 1269-1278.
- Kerbler, T.L., Buhr, M.M., Jordan, L.T., Leslie, K.E., Walton, J.S., 1997. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology* 47, 703-714.
- Lonergan, P., 2011. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. *Theriogenology* 76, 1594-1601.
- Lonergan, P., O'Hara, L., Forde, N., 2013. Role of diestrus progesterone on endometrial function and conceptus development in cattle. *Anim. Reprod.* 10 (3), 223-227.

- Lüttgenau, J., Beindorff, N., Ulbrich, S.E., Kastelic, J.P., Bollwein, H., 2011a. Low plasma progesterone concentrations are accompanied by reduced luteal blood flow and increased size of the dominant follicle in dairy cows. *Theriogenology* 76, 12–22.
- Lüttgenau, J., Ulbrich, S.E., Beindorff, N., Honnens, A., Herzog, K., Bollwein, H., 2011b. Plasma progesterone concentrations in the mid-luteal phase are dependent on luteal size, but independent of luteal blood flow and gene expression in lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 125, 20–29.
- Mann, G.E., 2000. Progesterone and Fertility. *George E. Mann* 1, 85–92.
- Mann, G.E., Fray, M.D., Lamming, G.E., 2006. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-tau production in the cow. *Vet. J.* 171, 500–503.
- Mann, G.E., Lamming, G.E., 1999. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod. Domest. Anim.* 34, 269–274.
- Mann, G.E., Lamming, G.E., Robinson, R.S., Wathes, D.C., 1999. The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *J. Reprod. Fertil.* 54(Suppl), 317-328.
- Mann, G.E., Lamming, G.E., 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 121, 175–180.
- Martal, J., Lacroix, M.C., Loudes, C., Saunier, M., Wintenberger-Torrès, S., 1979. Trophoblastin, an antiluteolytic protein present in early pregnancy in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 56, 63–73.
- Martinuk, S.D., Manning, A.W., Black, W.D., Murphy, B.D., 1991. Effects of carbohydrates on the pharmacokinetics and biological activity of equine chorionic gonadotropin *In Vivo*. *Biol. Reprod.* 45, 598–604.
- Menchaca, A., de Castro, T., Alvarez, M., Chifflet, N., 2005. Uso combinado de IATF y destete precoz en vacas de cría en anestro posparto. En: XXXIII Jornadas de Buiatría, Paysandú, Uruguay, pp. 193-194.
- Menchaca, A., Rubianes, E., 2004. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 16, 403–413.
- Menchaca, A., Núñez, R., Wijma, R., García Pintos, C., Fabini, F., de Castro, T., 2013. Como mejorar la fertilidad de los tratamientos de IATF en vacas *Bos taurus*. En 10º Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina, pp. 103–133.
- Moor, R.M., Rowson, L.E.A., 1966. The corpus luteum of the sheep: effect of the removal of embryos on luteal function. *J. Endoc.* 34, 497-502.

- Moore, Jr.W., Ward, D., 1980a. Pregnant Mare Serum Gonadotropin. Rapid chromatographic procedures for the purification of intact hormone and isolation of subunits. *J. Biol. Chem.* 255, 6923-6929.
- Moore, Jr.W., Ward, D., 1980b. Pregnant Mare Serum Gonadotropin: an in vitro biological characterization of the lutropin-follitropin dual activity. *J. Biol. Chem.* 255, 6930-6936.
- Moudgal, N.R., Papkoff, H., 1982. Equine luteinizing hormone possesses follicle-stimulating hormone activity in hypophysectomized female rats. *Biol. Reprod.* 26, 935-942.
- Murphy, B.D., 2012. Equine chorionic gonadotropin : an enigmatic but essential tool. *Anim. Reprod.* 9 (3), 223–230.
- Murphy, B.D., Martinuk, S.D., 1991. Equine chorionic gonadotropin. *Endocr. Rev.* 12, 27–44.
- Nascimento, A.B., Souza, A.H., Guenther, J.N., Dalla Costa, F.P., Sartori, R., Wiltbank, M.C., 2013. Effects of treatment with human chorionic gonadotrophin or intravaginal progesterone-releasing device after AI on circulating progesterone concentrations in lactating dairy cows. *Reprod. Fertil. Dev.* 25, 818–824.
- Niswender, G.D., Juengel, J.L., McGuire, W.J., Belfiore, C.J., Wiltbank, M.C., 1994. Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. *Biol. Reprod.* 50, 239–247.
- Niswender, G.D., Juengel, J.L., Silva, P.J., Rollyson, M.K., McIntush, E.W., 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol. Rev.* 80, 1–29.
- Nogueira, M.F.G., Melo, D.S., Carvalho, L.M., Fuck, E.J., Trinca, L.A., Barros, C.M., 2004. Do high progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo recipients synchronized with PGF₂ α and eCG?. *Theriogenology* 61, 1283–1290.
- Okuda, K., Miyamoto, Y., Skarzynski, D.J., 2002. Regulation of endometrial prostaglandin F₂ α synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23, 255–264.
- Peippo, J., Machaty, Z., Peter, A., 2011. Terminologies for the pre-attachment bovine embryo. *Theriogenology* 76, 1373–1379.
- Perez Wallace, S., 2013. Tratamientos hormonales para reducir pérdidas de gestación en vacas lecheras. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Argentina, pp. 90.
- Perry, G.A., Smith, M.F., Roberts, A.J., MacNeil, M.D., Geary, T.W., 2007. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 85, 684–689.

- Peters, A.R., Martinez, T.A., Cook, A.J.C., 2000. A meta-analysis of studies of the effect of GnRH 11-14 days after insemination on pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 54, 1317–1326.
- Rigoglio, N.N., Fátima, L.A., Hanassaka, J.Y., Pinto, G.L., Machado, A.S.D., Gimenes, L.U., Baruselli, P.S., Rennó, F.P., Moura, C.E.B., Watanabe, I.S., Papa, P.C., 2013. Equine chorionic gonadotropin alters luteal cell morphologic features related to progesterone synthesis. *Theriogenology* 79, 673–679.
- Roche, J.F., Crowe, M.A., Boland, M.P., 1992. Postpartum anoestrus in dairy and beef cows. *Anim. Reprod. Sci.* 28, 371–378.
- Sartori, R., Bastos, M.R., Wiltbank, M.C., 2010. Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 22, 151–158.
- Sartori, R., Gumen, A., Guenther, J.N., Souza, A.H., Caraviello, D.Z., Wiltbank, M.C., 2006. Comparison of artificial insemination versus embryo transfer in lactating dairy cows. *Theriogenology* 65, 1311-1321.
- Sartori, R., Rosa, G.J.M., Wiltbank, M.C., 2002. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J. Dairy Sci.* 85, 2813–2822.
- Schams, D., Papkoff, H., 1972. Chemical and immunochemical studies on Pregnant Mare Serum Gonadotropin. *Bioch. Bioph. Acta* 263, 139-148.
- Senasa, 2012. Estadísticas agropecuarias. Publicado en internet, disponible en <http://www.senasa.gov.ar/estadistica.php>. Activo Octubre 2013.
- Sherman, G.B., Wolfe, M.W., Farmerie, T.A., Clay, C.M., Threadgill, D.S., Sharp, D.C., Nilson, J.H., 1992. A single gene encodes the beta subunits of equine luteinizing hormone and chorionic gonadotropin. *Mol. End. (Baltimore)* 6, 951-959.
- Sirois, J., Fortune, J.E. 1990. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: A model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology* 127(2): 916-925.
- Snedecor, G.W., Cochran, W.C., 1980. *Statistical methods*. The Iowa State University Press, Ames, IA.
- Souza, A.H., Viechnieski, S., Lima, F.A., Silva, F.F., Araújo, R., Bó, G.A., Wiltbank, M.C., Baruselli, P.S., 2009. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. [*Theriogenology* 72, 10–21.](#)
- Spencer, T.E., Burghardt, R.C., Johnson, G.A., Bazer, F.W., 2004. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim. Reprod. [*Sci.* 82-83, 537–550.](#)*

- Spencer, T.E., Johnson, G.A., Bazer, F.W., Burghardt, R.C., Palmarini, M., 2007. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reprod. Fertil. Dev.* 19, 65–78.
- StataCorp. 2011. Stata: Release 12. Statistical Software. College Station, TX: StataCorp LP.
- Stevenson, J.S., Portaluppi, M.A., Tenhouse, D.E., Lloyd, A., Eborn, D.R., Kacuba, S., DeJarnette, J.M., 2007. Interventions after artificial insemination: Conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to Gonadotropin-releasing Hormone, human Chorionic Gonadotropin, and Progesterone. *J. Dairy Sci.* 90, 331-340.
- Stevenson, J.S., Tiffany, S.M., Inskeep, E.K. 2008. Maintenance of pregnancy in dairy cattle after treatment with human chorionic gonadotropin or gonadotropin-releasing hormone. *J. Dairy Sci.* 91, 3092-3101.
- Stocco, C., 2012. The long and short of the prolactin receptor: the corpus luteum needs them both!. *Biol. Reprod.* 86 (3), 85, 1-2.
- Sugino, H., Bousfield, G., Moore, Jr.W., Ward, D., 1987. Structural studies on equine glycoprotein hormones. Amino acid sequence of equine chorionic gonadotropin b-subunit. *J. Biol. Chem.* 262, 8603-8609.
- Thatcher, W.W., Binelli, M., Burke, J., Staples, C.R., Ambrose, J.D., Coelho, S., 1997. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. *Theriogenology* 47, 131–140.
- Thatcher, W.W., Driancourt, M.A., Terqui, M., Badinga, L., 1991. Dynamics of ovarian follicular development in cattle following hysterectomy and during early pregnancy. *Domestic Anim. End.* 8, 223-234.
- Thatcher, W.W., Guzeloglu, A., Mattos, R., Binelli, M., Hansen, T.R., Pru, J.K., 2001. [Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology* 56, 1435–1450.](#)
- [Thatcher, W.W., Moreira, F., Pancarci, S.M., Bartolome, J.A., Santos, J.E.P., 2002. Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23, 243–254.](#)
- Thatcher, W.W., Staples, C.R., Danet-Desnoyers, G., Oldick, B., Schmitt, E.P., 1994. Embryo health and mortality in sheep and cattle. *J. Anim. Sci.* 72, 16–30.
- Thomas, E.S., Fuller, W.B., 2004. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. [Reprod. Biol. Endocrinol.](#) 2, 49.

Vasconcelos, J.L.M., Sartori, R., Oliveira, H.N., Guenther, J.G., Wiltbank, M.C., 2001. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. [Theriogenology 56, 307–314.](#)

[Vizcarra, J.A., Ibañez, W., Orcasberro, R., 1986.](#) Repeatability and reproducibility of two systems to evaluate body condition in Hereford beef cows. 7 Investigaciones Agronómicas, Montevideo, Uruguay, pp. 45–47.

Walsh, S.W., Williams, E.J., Evans, A.C.O., 2011. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. [Anim. Reprod. Sci. 123, 127–138.](#)

Yavas, Y., Walton, J.S., 2000a. Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: A review. *Theriogenology* 54, 1–23.

Yavas, Y., Walton, J.S., 2000b. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: A review. *Theriogenology* 54, 25–55.