

EFFECTO DEL NÚMERO DE APLICACIONES DE PROSTAGLANDINA SOBRE LA REGRESIÓN DE CUERPOS LÚTEOS, EL RETORNO AL CELO Y LA OVULACIÓN, EN DONANTES DE EMBRIONES BOVINOS

Jahir Vicente Garzón Gélvez

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, 2016

**EFFECTO DEL NÚMERO DE APLICACIONES DE PROSTAGLANDINA SOBRE
LA REGRESIÓN DE CUERPOS LÚTEOS, EL RETORNO AL CELO Y LA
OVULACIÓN, EN DONANTES DE EMBRIONES BOVINOS**

Jahir Vicente Garzón Gélvez

Comisión Asesora de Tesis

Director: Med. Vet. (Ph.D.) Gabriel A. Bó

Asesores: Med. Vet.(M.Sc.) Guillermo Brogliati (Codirector)

Tribunal Examinador de Tesis

Med. Vet. (M.B.A.) Humberto E. Tribulo

Biol. (Dra.) Mariana Caccia

Med. Vet. (DCV) Pablo Marini

Presentación formal académica

10 de Agosto de 2016

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Gabriel Bó por su apoyo como amigo y profesional, que me brindo todo su conocimiento y me dio el incentivo para desarrollar esta tesis, sin su ayuda habría sido imposible su realización.

Quiero agradecer a los Drs. Humberto y Ricardo Tribulo por su amistad, conocimiento y por haberme permitido formar parte del grupo de trabajo, el cual me permitió crecer como profesional y persona.

A los Drs. Andrés Tribulo, Martin Ramos, José Trevisan, Rodrigo Cuervo, Exequiel Barzola y Darío López por su incondicional ayuda durante la realización de los experimentos, pero sobre todo, les agradezco por brindarme su amistad.

A todos mis amigos e integrantes del IRAC quienes de una manera u otra siempre me ayudaron en mis estudios y me brindaron su apoyo y amistad.

Agradezco a mi esposa Adriana Quesada, que me brindo todo su apoyo y comprensión para la realización de esta tesis

Agradezco a mi familia por apoyarme a seguir estudiando y por estar siempre presente en los momentos en que los he necesitado.

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis a mis padres Vicente Garzón y Celina Gelvez, a mis hermanos Wilson, Patricia Sandra y a mi sobrina Paula, por brindarme todo su amor y apoyo para la realización de mis estudios, y por brindarme ese hogar que ayudo a la formación de mi personalidad. También quiero dedicar esta tesis a mi esposa Adriana Quesada, por ser mi compañera inseparable, darme el ánimo para culminar esta tesis y contenerme en todo momento.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la administración de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), sobre la regresión de los cuerpos lúteos (CLs), el retorno al celo y la ovulación en vacas donantes de embriones superovuladas. Se realizaron 4 experimentos en los cuales las vacas fueron bloqueadas en el momento de la colecta de embriones, por el número de CLs determinados por palpación rectal, y se separaron en 2 grupos para recibir una inyección de 500 mg de Cloprostenol Sódico en el día de la colecta de embriones, o una segunda inyección 24 h más tarde. Se determinaron las concentraciones de progesterona por RIA y se realizaron ultrasonografías los días de la obtención de muestras de sangre, durante un periodo de 13 días (Experimento 1 y 4) o 19 días (Experimento 2 y 3). La adición de PGF_{2α} 24 h después de la primera no adelantó la regresión de los CLs, el día promedio al celo y a la ovulación, y tampoco aumentó los porcentajes de presentación de celo y ovulación, ni afectó el descenso de los niveles de progesterona. Hubo un mayor porcentaje de vacas que ovularon y tenían un nuevo CL a los 19 días de la colecta de embriones que a los 13 días, sugiriendo que tal vez un intervalo de 19 días entre la colecta embriones y el comienzo de un nuevo tratamiento superovulatorio sea preferible a un intervalo de 13 días. El número de CLs presentes en el momento de la colecta y el tratamiento con PGF_{2α}, influyó el intervalo a la ovulación, donde las vacas con hasta 4 CLs ovularon en un tiempo menor que las vacas con más de 5CLs. Igualmente se encontró una correlación positiva entre la cantidad de CLs al momento de la colecta de embriones y los niveles de progesterona en este mismo momento. Por último, la administración de GnRH 8 días después la administración de PGF_{2α} aumentó el porcentaje de ovulación y presencia de CL a los 13 días de la colecta de embriones. La conclusión general de esta tesis es que la aplicación de dosis repetidas de prostaglandina F_{2α} no resulta en una más rápida regresión de los CLs y ovulación, que la administración de una sola dosis en el momento de la colecta de embriones. Un intervalo de 19 días o más es preferible a un intervalo de 13 días para asegurar la presencia de un CL al inicio de un nuevo tratamiento superovulatorio. Alternativamente se podría utilizar GnRH a los 8 días de la administración de PGF_{2α} para asegurar la presencia de un CL a los 13 días de la colecta.

Palabras clave: Superovulación, Ovulación, Cuerpo lúteo, Celos, Prostaglandina, Vaca.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of administration of prostaglandin F2 alpha (PGF2 α) on the regression of the corpora lutea (CL), return to estrus and ovulation in superovulated embryo donor cows. Four experiments were performed in which cows were blocked at the time of embryo collection by the number of CLs determined by rectal palpation and separated into 2 groups to receive 500 mg of Cloprostenol Sodium injection at the day of embryo collection, or an injection at the day of collection and a second injection 24 hours later. Progesterone concentrations were determined by RIA and ultrasonographic examinations were performed the same day of blood sampling over a period of 13 days (Experiment 1 and 4) or 19 days (Experiment 2 and 3). The addition of PGF2 α 24 hours after the first did not advance the CL regression, day of estrus, day of ovulation and did neither increase affect estrus and ovulation rate or the decrease in progesterone concentrations. There was a higher percentage of ovulated cows that had a new CL 19 days than 13 days after embryo collection, suggesting that a 19-day interval between the embryo collection and the beginning of a new superovulation might be preferable than a 13-day interval. The number of CL present at the time of collection and treatment with PGF2 α influenced the ovulation interval. Cows with up to 4 CL ovulated in fewer days, than cows with more than 5 CL. Also a positive correlation was found between the number of CL at the time of embryo collection and progesterone concentrations at the same moment. Finally, GnRH administration 8 days after administration of PGF2 α increased ovulation rate and the presence of a CL 13 days after embryo collection. The general conclusion of this thesis is that the application of repeated doses of PGF2 α does not result in a faster CL regression and ovulation than the administration of a single dose at the time of the embryo collection of superovulated donor cows. Furthermore, the 19-day interval between the collection and initiation of a new superstimulatory treatment might be preferable than a 13-day interval to ensure the presence of a CL at start of a new superovulation. Alternatively, the administration of GnRH 8 days after PGF2 α could be used to ensure the presence of CL 13 days after collection.

Keywords: superovulation, ovulation, corpus luteum, heat, prostaglandin, cow.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN	1
Desarrollo del cuerpo lúteo.....	3
Luteólisis.....	5
Uso de prostaglandina exógena para inducción de luteólisis.....	6
Resistencia del cuerpo lúteo a la prostaglandina F2 α	9
Efectos de la prostaglandina sobre el útero.....	11
Beneficios del Celo en el útero.....	11
HIPÓTESIS GENERAL	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS	15
Animales y lugar de trabajo.....	15
Experimento 1	16
Experimento 2	17
Experimento 3	18
Experimento 4	19
Ultrasonografía	20
Observación de celos.....	22
Obtención de muestras sanguíneas y determinaciones hormonales.....	24
Análisis estadístico.....	24
CAPÍTULO 3 RESULTADOS	26
Experimento 1	26
Experimento 2	29
Dinámica folicular	31
Experimento 3	32
Experimento 4	34
Análisis conjunto de las vacas tratadas con PGF (sin GnRH) en los experimentos 1, 2, 3 y 4.....	37
Momento de la Ovulación	37
Tiempo de ovulación según la cantidad de CL.....	37
Descenso de la progesterona según la cantidad de CL.....	38
CAPÍTULO 4 DISCUSIÓN	42
CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES	48
CAPÍTULO 6 BIBLIOGRAFÍA	59

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1. Interpretación de porcentaje de remoción de la pintura (Adaptado de Medina, 2012).....	23
Tabla 3.1. Comparación entre los tratamientos de prostaglandina, sobre el día promedio de regresión de los CLs, el día promedio de presentación de celo, y día promedio de ovulación.....	27
Tabla 3.2. Día promedio de regresión luteal y de ovulación en vacas, según la cantidad de cuerpos lúteos (CLs) en el momento de la colecta de embriones.....	27
Tabla 3.3. Relación de Vacas con celo y ovuladas, vacas que no presentaron celo y ovuladas, y vacas con folículos de gran tamaño en experimento 1.....	29
Tabla 3.4. Comparación entre los tratamientos de prostaglandina sobre el día promedio de presentación de celo, de ovulación y día promedio de aparición de CL nuevo.....	31
Tabla 3.5. Comparación día promedio de inicio de la onda ovulatoria, diámetro promedio del folículo preovulatorio, e intervalo promedio desde el inicio de la onda a la ovulación.....	31
Tabla 3.6. Comparación entre los tratamientos de prostaglandina Pg 0 y Pg 0-1 sobre el día de presentación de celo, y el tiempo de ovulación.....	32
Tabla 3.7. Relación de Vacas con celo y ovuladas y vacas que no presentaron celo y ovuladas experimento 3.....	34
Tabla 3.8. Comparación entre los tratamientos Pg y GnRH, sobre el día de regresión de los CL, el día de presentación de celo, y el tiempo de ovulación.....	35
Tabla 3.9. Comparación de porcentaje de ovulación entre trece y diecinueve días.....	37
Tabla 3.10. Día promedio de ovulación de acuerdo a la cantidad de CLs de vacas donantes superovuladas tratadas con 1 o 2 dosis de Cloprostenol Sódico en el día de la colecta de embriones (experimentos 1, 2 3 y 4)..	38
Tabla 3.11. Concentración plasmática de progesterona, de acuerdo a la cantidad de CLs en el momento de la colecta de embriones y vacas que no regresaron sus CLs (media±EE).....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Portada instalaciones IRAC-BIOGEN donde se realizaron los experimentos..	15
Figura 2.2. Donante de embriones Aberdeen Angus Colorado.....	16
Figura 2.3. Diseño experimental para el Experimento 1. US: Ultrasonografía; 2 mL Ciclase; 500 µg Cloprostenol Sódico; Sangre: toma de muestra de sangre para medición de progesterona.....	17
Figura 2.4. Diseño experimental para el Experimento 2. US: Ultrasonografía; 2 mL Ciclase; 500 µg Cloprostenol Sódico; Sangre: toma de muestra de sangre para medición de progesterona.	18
Figura 2.5. Diseño experimental para el Experimento 3. US: Ultrasonografía; 2 mL Ciclase; 500 µg Cloprostenol Sódico; Sangre: toma de muestra de sangre para medición de progesterona.....	19
Figura 2.6. Diseño experimental para el Experimento 4. US: Ultrasonografía; 2 mL Ciclase; 500 µg Cloprostenol Sódico; Sangre: toma de muestra de sangre para medición de progesterona.....	20
Figura 2.7. Imagen Ecógrafo Falco 100, Pie Medical.....	21
Figura 2.8. Ubicación recomendada de la línea de pintura (PS) sobre la zona de fricción (RP) en la espina vertebral de vacas con (a) normal, o (b y c) anormal conformación (Pérez M, 2012b).....	23
Figura 3.1. Curva cuadrática para retorno a la ovulación de vacas superovuladas, posterior a la aplicación de PGF ₂ α y cantidad de cuerpos lúteos (CL) al día 0 del tratamiento.....	28
Figura 3.2. Curva de concentración plasmática de progesterona en respuesta a la administración de una o dos inyecciones de 500 µg de Cloprostenol Sódico en el experimento 2 (media±EE).....	30
Figura 3.3. Curva de concentración plasmática de progesterona en respuesta a la administración de una o dos inyecciones de 500 µg de Cloprostenol Sódico en el experimento 3 (media±EE).....	33
Figura 3.4. Curva de concentración plasmática de progesterona en respuesta a la administración de una o dos inyecciones de 500 µg de Cloprostenol Sódico en el experimento 4 (media±EE).....	36

Figura 3.5. Curva cuadrática para retorno a la ovulación de vacas superovuladas, posterior a la aplicación de PGF2 α y cantidad de cuerpos lúteos (CL) al día 0 del tratamiento para todos los datos de la tesis menos el experimento 139

Figura 3.6. Curva de concentración plasmática de progesterona en respuesta a la administración de una o dos inyecciones de 500 μ g de Cloprostenol Sódico de acuerdo a la cantidad de CLs en el momento de la colecta de embriones (media \pm EE).....40

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Microgramos
AM	Mañana
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CC	Condición corporal
CL	Cuerpo Lúteo
CLs	Cuerpos Lúteos
EB	Benzoato de estradiol
EE	Error estándar
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
g	gramo
h	Hora
hCG	Gonadotrofina coriónica humana
IA	Inseminación artificial
IGF-1	Factor de crecimiento ligado a la insulina
im	Intramuscular
LH	Hormona luteinizante
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
P4	Progesterona
PGF2 α	Prostaglandina
PM	Tarde
SPO	Superovulación

INTRODUCCIÓN

El objetivo de la superovulación (SPO) incluye inducir un gran número de ovulaciones y también una alta tasa de fertilización para obtener el máximo de número de embriones transferibles con una alta probabilidad de producir preñeces (Bó y Mapletoft, 2014).

Los primeros informes sobre la superovulación en bovinos y ovejas fueron realizados en Wisconsin, en los Estados Unidos (citado en Gordon, 1975). Aunque se han logrado avances considerables recientemente en el estudio de la fisiología ovárica, la manipulación de la función ovárica y la bioquímica de las gonadotropinas, los factores inherentes al animal donante y que afectan la respuesta superovulatoria son parcialmente entendidos. Por lo tanto, un alto grado de imprevisibilidad en la respuesta superovulatoria todavía existe después de más de 35 años, creando problemas que afectan a la eficiencia y rentabilidad de la transferencia de embriones comercial (Bó y Mapletoft, 2014).

Durante los últimos años se ha intentado mejorar la producción de embriones mediante SPO por dos vías; la primera, por medio del mejoramiento de protocolos de SPO que permita obtener un mayor número de embriones, pero el número promedio de embriones transferibles de vacas reproductivamente normales se ha mantenido relativamente sin cambios durante los últimos 30 años, tanto para las vacas de razas de carne (Looney, 1986) como para las vacas lecheras (Hasler *et al.*, 1983). Looney (1986) informó de una media de 6,2 embriones transferibles de más de 2.000 donantes de carne que representan 14 razas, y Hasler *et al.* (1983) informó de una media de 6,4 embriones transferibles de casi 700 animales Holstein. Estos promedios pueden compararse con los previstos por el censo anual de la American Embryo Transfer Association (AETA), en el que los promedios eran 7,0 embriones en razas de carne (> 24.000 donantes) y 6.3 embriones para el ganado de leche (> 15.000 donantes) en el 2011 (Hasler, 2014).

La segunda forma de aumentar la producción de embriones, es aumentando el número de colectas por año. La repetición de procesos de superovulación que arrojen buenos resultados depende de diferentes variables, dentro de las cuales se encuentran: el tiempo en el que ocurre la regresión de los cuerpos lúteos (CLs), la manifestación de signos de celo y la presentación de una nueva ovulación después de la colecta de embriones. El pronto regreso al celo después de una SPO es indispensable para realizar un nuevo tratamiento, y de esta manera optimizar la producción de embriones en un menor tiempo (Desaulniers *et al.*, 1990).

Durante varios años se pensó que las superovulaciones sucesivas causaban una reducción progresiva en los tratamientos subsiguientes, pero hay evidencia de que no hay tal relación. En un estudio cuando se superovularon novillas mestizas entre cinco y diez veces no se observó ninguna diferencia entre la recuperación de ovocitos-embryones y el porcentaje de embriones viables recuperados (Kafi y McGowan, 1997). Tradicionalmente, las vacas donantes han sido sometidas a colectas de embriones a intervalos de aproximadamente 60 días. Sin embargo, la información más reciente sugiere que las vacas pueden ser superestimuladas tan a menudo como cada 30 días (Bó *et al.*, 2007a; Bó y Mapletoft, 2014).

En estudios realizados en los últimos años se observó una baja presentación de celo y ovulaciones en los periodos entre tratamientos cuando las vacas fueron sometidas a tratamientos superovulatorios con intervalos de 28 a 30 días (Delgado *et al.*, 2009). La expresión del celo en la vaca es un fenómeno en el que intervienen cambios endocrinos tales como el descenso de los niveles séricos de progesterona (luteólisis) y el aumento de los niveles de estradiol producido por el folículo preovulatorio. Además, dichos estrógenos actúan en el útero aumentando la masa del endometrio y del miometrio, generan contractibilidad uterina, incrementan el flujo sanguíneo y la acción inmunoprotectora en el tejido uterino (Hawk *et al.*, 1960, Hawk *et al.*, 1964; Killingbeck and Lamming, 1963). Esto genera el retorno de un ambiente uterino favorable para la presencia de futuros embriones en un nuevo tratamiento superovulatorio.

Desarrollo del cuerpo lúteo

Después de la ovulación, el nuevo cuerpo lúteo (CL) se desarrolla rápidamente de la pared del folículo que ha ovulado, aumentando gradualmente la secreción de progesterona. Durante el desarrollo temprano del CL, la hormona de crecimiento (GH), pero no la hormona luteinizante (LH), parece afectar principalmente la secreción de progesterona del CL in vivo (Miyamoto *et al.*, 1998) e in vitro (Kobayashi *et al.*, 2001).

El desarrollo del CL se caracteriza por la vascularización altamente activa y la mitosis repetida de las células esteroideogénicas en paralelo. El desarrollo normal del CL y su capacidad para producir progesterona, factores de crecimiento, factores angiogénicos, y sustancias vasoactivas es dependiente de su vascularización (suministro de flujo sanguíneo). La intensidad del proceso angiogénico dentro del CL alcanza un pico 2-3 días después de la ovulación (Reynolds *et al.*, 2000). Por lo tanto, la mayoría de las células esteroideogénicas del CL maduro están en contacto con uno o más capilares (Reynolds *et al.*, 1992; Farin *et al.*, 1986).

El CL está constituido por condensada vasculatura sanguínea, incluyendo grandes vasos sanguíneos y microcapilares. En la vaca, el CL se compone de un gran número de células endoteliales vasculares que pueden ser hasta el 50 % de todas las células del CL. Por otro lado, hay dos tipos de células esteroideogénicas llamadas células luteales grandes y células luteales pequeñas que constituyen aproximadamente el 30 % de todas las células del CL (Oshea *et al.*, 1989; Lei *et al.*, 1991). El CL bovino también tiene diversos tipos de células, tales como las células del músculo liso, los pericitos, fibrocitos y las células inmunes, lo que indica que el CL es un tejido heterogéneo (Penny, 2000; Zheng *et al.*, 1993).

Las células luteales grandes ocupan un gran volumen celular en el CL, ocupando alrededor del 40% del volumen luteal total. Sin embargo, las células luteales grandes representan una pequeña parte de las células luteales, quizás poco menos del 3,5% del total de células luteales en la especie bovina (Oshea *et al.*, 1989).

El origen celular de las células luteales grandes generalmente se ha atribuido a las células de la granulosa, tanto en primates como en rumiantes. En el CL del rumiante, este origen se basa en evaluaciones temporales secuenciales del CL después de la ovulación, luteinización, y el desarrollo del CL. El proceso de diferenciación que da lugar a las células luteales grandes es impresionante. Desde una perspectiva de masa, las células de la granulosa son de solamente 10 micras de diámetro antes del pico preovulatorio de LH, pero aumenta a 38 micras en el CL completamente funcional (Oshea *et al.*, 1989). Este cálculo da un aumento en el volumen de alrededor de $500 \mu\text{m}^3$ en las células de la granulosa, a casi $30.000 \mu\text{m}^3$ en las células luteales grandes, un aumento de 50 veces en el volumen celular (Oshea *et al.*, 1989; Wiltbank, 1994). Por lo tanto, en primates y rumiantes las células de la granulosa se someten a una impresionante hipertrofia durante el desarrollo de la CL. El número de células luteales grandes es similar al número de células de la granulosa en el folículo preovulatorio, lo que es consistente con la idea que las células de la granulosa se diferencian en las células luteales grandes sin hiperplasia, pero sí con hipertrofia sustancial (Smith *et al.*, 1994).

Las células luteales pequeñas se desarrollan a partir de las células esteroideogénicas de la teca del folículo ovulado. En el bovino, las células luteales pequeñas tienen aproximadamente una décima parte del volumen de las células luteales grandes (3000 vs. $30.000 \mu\text{m}^3$). Sin embargo, hay unos 100 millones de células luteales pequeñas/g de tejido, en comparación con 13,8 millones de células luteales grandes (Oshea *et al.*, 1989).

Las células luteales pequeñas ocupan un volumen del 27,7% del CL en el día 8 al 12 del ciclo estral (Oshea *et al.*, 1989). También hay distinciones morfológicas entre estos dos tipos de células esteroideogénicas tales como núcleos esféricos en células grandes, los núcleos irregulares en células pequeñas y presencia de retículo endoplasmático rugoso y muchos gránulos secretorios en células grandes (Sawyer *et al.*, 1979; Farin *et al.*, 1986; Oshea *et al.*, 1990; Wiltbank, 1994). También hay diferencias en los receptores de LH (generalmente mayor en las células pequeñas), E2 (mucho mayor en las células grandes), y $\text{PGF2}\alpha$ (mucho mayor en las células grandes; Fitz *et al.*, 1982; Wiltbank, 1994).

Luteólisis

El cuerpo lúteo (CL) es una glándula endocrina transitoria, cuyo principal producto de secreción es la progesterona, y participa en múltiples procesos como el reconocimiento, la adhesión e implantación del conceptus, el mantenimiento de la gestación y la regulación de la dinámica folicular (Oliveira, 2007; Skarzynski *et al.*, 2008). Si la preñez no se lleva a cabo, el útero aumenta la producción de PGF2 α en el Día 17 después de la ovulación (Wolfenson *et al.*, 1985). La PGF2 α uterina es transportada al ovario mediante un mecanismo de transporte contracorriente (Mapletoft y Ginther 1975; Mapletoft *et al.*, 1976; McCracken *et al.*, 1972.), y el CL sufre una luteolisis funcional y estructural. La liberación pulsátil de PGF2 α por el endometrio es la señal luteolítica en muchas especies, incluida la vaca (Knickerbocker *et al.*, 1988; McCracken *et al.*, 1984; McCracken *et al.*, 1999; Niswender *et al.*, 2000; Hayashi, 2003; Schams and Berisha, 2004)

En general, la luteólisis ha sido analizada en dos pasos, aparentemente consecutivos: a) luteólisis funcional, que es la pérdida de la capacidad de sintetizar progesterona; y b) luteólisis estructural, que es la involución del CL acompañada de la pérdida en la integridad de sus células (Zheng *et al.*, 1994)

El proceso comienza con la disminución del número de receptores uterinos para progesterona (down regulation) más el incremento del número de receptores para estrógenos, que dan las condiciones adecuadas para la expresión de receptores uterinos para oxitocina. Por otro lado los estrógenos de origen folicular interactúan con sus receptores endometriales e inducen la síntesis de receptores para la oxitocina. Luego la oxitocina se une a sus receptores, activa la fosfolipasa A, libera ácido araquidónico e induce la cascada sintética de araquidónico que llevará a la producción de pulsos subluteolíticos de PGF2 α en los días 13-14 del ciclo estral. Dichos pulsos estimulan la liberación de oxitocina del CL, la cual, actuando sobre receptores uterinos, estimula la liberación de PGF2 α en las células endometriales epiteliales y en menor proporción en las células luteales grandes y células luteales pequeñas en los días 14-15 del ciclo estral. De esta manera se activan las rutas luteolíticas (funcional y estructural) que desencadenan la disminución de la producción de progesterona y la apoptosis de las células luteales (Kim *et*

al., 2003). Los pulsos de PGF2 α actúan nuevamente sobre el CL promoviendo la liberación de más oxitocina por parte del CL, y esta oxitocina luteal estimula positivamente la secreción endometrial de PGF2 α . Este mecanismo de retroalimentación positiva funciona hasta que la luteólisis es completa (Cooke *et al.*, 1998).

La acción de la PGF2 α que conduce a la luteólisis consiste en la inhibición de la esteroidogénesis y la inducción de la apoptosis, mediante el papel de las células inmunes (Pate, 1994; Pate y Keyes, 2001) y el desencadenamiento de cascadas de señalización que involucran hormonas como la prolactina; citoquinas como el Factor de Necrosis Tumoral alpha (TNF α), el Interferón gamma (IFN γ) y el Fas ligando (FasL); especies reactivas de oxígeno (ROS), endotelina-1(E1) y la proteína 70 (HSP70) de choque térmico, entre otros (Nakamura y Sakamoto, 2001). El ARNm para los factores (FAS, FasL, ILB1, IL8) que estimulan la migración y la activación de las células inmunes, se incrementan por los pulsos de PGF2 α y se observó un aumento en todos estos factores después del segundo pulso de PGF2 α . Por último, la inhibición de los factores involucrados en el crecimiento y el mantenimiento de vasos sanguíneos se reducen a medida que suceden los pulsos de PGF2 α . Por lo tanto, múltiples vías moleculares están reguladas por los pulsos que inducen la cascada luteolítica completa durante la regresión del CL en los rumiantes.

Uso de prostaglandina exógena para inducción de luteólisis

La prostaglandina fue descubierta en 1930 como una sustancia en el semen humano, y en vesículas seminales de ovinos que causaba una contracción muscular lisa y aumento de la presión sanguínea. Esta sustancia fue llamada “prostaglandina” porque provenía de la próstata (Rathbone *et al.*, 2001). Las prostaglandinas pueden dividirse en tres grupos: las naturales de extracción y las producidas por síntesis llamadas naturales y las sintéticas propiamente dichas. Las primeras son difíciles de obtener y no siempre garantizan un alto grado de pureza. Las naturales de síntesis tienen la fórmula idéntica a las hormonas que se encuentran en los tejidos y la más conocida en el mercado es el Dinoprost. Para sus acciones a nivel reproductivo en bovinos, se utilizan dosis de 25 a 40 mg. Los análogos sintéticos tienen el sitio activo de la molécula similar pero no el resto de la molécula y el

más conocido es el cloprostenol. En general las PGF2 α sintéticas son más potentes y se utilizan en dosis menores y que dependen del análogo. La dosis recomendada de Cloprostenol Sódico es 500 μ g y la del D+Cloprostenol es 150 μ g.

A pesar de que varias hormonas han demostrado capacidad luteolítica directa o indirectamente, la PGF2 α y sus análogos han demostrado que son los más efectivos para la inducción de la luteolisis y la sincronización de celos (Beal, 1996). Después de la administración de cloprostenol, se observó un incremento agudo en la liberación de PGF2 α y de la prostaglandina E2 (PGE2) intraluteal, lo cual confirma que la producción de estas prostaglandinas está involucrada en la luteólisis completa. La administración de PGF2 α induce la expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX 2), la cual estimula la liberación endógena adicional de prostaglandina proveniente de las células luteales grandes (Hayashi, 2003).

Una inyección única intramuscular de PGF2 α puede causar luteólisis en bovinos entre el día 5 y 21 del ciclo estral, y muestra su mayor efecto si es aplicada 12 días después del celo (Beal, 1996). Después de una inyección de PGF2 α en vacas con ciclos normales, las concentraciones de progesterona descienden rápidamente 6 horas después del tratamiento y 24 horas más tarde descienden a niveles menores a 1 ng/ml (Beal, 1996). La presentación de los celos después de la aplicación de una dosis de PGF2 α o cualquiera de sus análogos depende del estadio del ciclo estral y del tamaño y madurez del folículo dominante presente en el momento de realizar el tratamiento (Beal, 1996; Bo *et al.*, 2007b), siendo mejores las respuestas en animales entre los 10 y 15 días después del celo en comparación con los que están en el día cinco a nueve posteriores al estro (Rathbone *et al.*, 2001; Beal, 1996).

La PGF2 α o sus análogos han sido usados para la inducción del celo en vacas después de la SPO, y en promedio entre 60 y 85% de las vacas muestran celo dentro de los 10 días siguientes al tratamiento (Halbert *et al.*, 1989; Misra y Pant, 2003; Mapletoft *et al.*, 1991). Una vez que los múltiples CL regresan y las vacas ovulan, los patrones normales de ondas foliculares son restablecidos y la SPO puede ser nuevamente realizada. El día de recolección de ovocitos-embryones, las vacas reciben una inyección de PGF2 α que a

menudo se repite 10 y 15 días, o luego de los 7 días, si la donante no ha sido observada en celo (Bó *et al.*, 2007b; Delgado *et al.*, 2009).

Generalmente, el parámetro de los días de retorno al celo después de una SPO es mayor, debido al mayor número de CL presentes en el ovario, que además de ocupar espacio en este, producen progesterona, con lo cual se genera un proestro más prolongado de lo normal. Esto es aparentemente debido a que el proceso de luteólisis no es tan rápido como en un ciclo normal, y también, a que quizás haya un desarrollo folicular alterado (Lucy *et al.*, 1990).

Varios trabajos realizados han visto que el aplicar dos inyecciones de PGF2 α en un intervalo de 8 a 12 horas es más eficaz en la luteólisis que una sola inyección en vacas de leche lactantes (Archbald *et al.*, 1993; Archbald *et al.*, 1994) y en vaquillonas (Bergfelt *et al.*, 1994).

En trabajos preliminares en vacas Angus indicaron que cuando se aplicaron 25 mg de Dinoprost los Días 0, 1 y 7 después de la colecta, la regresión de los CL fue más rápida que cuando se aplicó Dinoprost en los Días 0 y 7. No obstante el intervalo al celo fue similar entre los dos tratamientos. Sin embargo como se citó anteriormente la presentación de celo y ovulaciones es baja cuando las vacas se someten a tratamientos superovulatorios con intervalos de 28 a 30 días (Delgado *et al.*, 2009), pudiendo crear un ambiente uterino desfavorable para los embriones en la próxima colecta e incluso favorecer la presentación de infecciones uterinas.

Las causas de fallas de las PGF2 α en la luteólisis (10% de las vacas tratadas) no están claras, pero pueden relacionarse con: a) falta de respuesta de los CL; b) tratamiento demasiado pronto en la fase luteal; c) técnica incorrecta de inyección intramuscular, ya que si se aplica en grasa o en tejido ligamentoso no tiene igual efecto; d) corta vida media de la hormona exógena (Peters y Ball, 1995).

Resistencia del cuerpo lúteo a la prostaglandina F2 α

Durante varios años se ha demostrado que la administración de PGF2 α durante la fase lútea media (Días 8-12 del ciclo estral; CL de vida media) reduce drásticamente las concentraciones de progesterona en plasma y el volumen del CL. Sin embargo, la PGF2 α no induce luteólisis durante la fase lútea temprana (Henricks *et al.*, 1974; Schallenberger *et al.*, 1984; Tsai y Wiltbank, 1998).

El CL adquiere la capacidad de regresar en respuesta a la PGF2 α (capacidad luteolítica) a partir del día 5 del ciclo estral y por mucho tiempo se creyó que era por la falta de receptores para PGF2 α , pero la adquisición de la capacidad luteolítica no parece ser debida a una mayor expresión de receptores de PGF2 α (Wiltbank *et al.*, 1995; Anderson *et al.*, 2001) ya que el tratamiento de vacas con PGF2 α en el día 4 (sin capacidad luteolítica) o el día 11 (con capacidad luteolítica) causó un rápido incremento en genes de respuesta temprana como c-fos (Diaz *et al.*, 2013), y una disminución similar en vitamina C y concentraciones luteales de ciertos mRNA, incluyendo mRNA de receptor de PGF2 α (Tsai y Wiltbank, 1998). Este hallazgo indica que la PGF2 α alcanzó el CL, e inicio ciertas respuestas celulares y moleculares aunque la regresión lútea no se produjo en el CL temprano.

Sin embargo, lesiones en vías intracelulares, específicamente las inductoras de PGF2 α podrían provocar una falla de la regresión completa del CL. Es decir que el tratamiento con PGF2 α en CLs tempranos pueden no activar las vías de producción de PGF2 α intraluteal (Tsai y Wiltbank, 1998).

Las vías de señalización específicas, particularmente las involucradas con el calcio intracelular libre, kinasa 2 beta calcio/calmodulina- kinasa dependiente, se activa sólo en CL maduros y no en CL tempranos (Goravanahally *et al.*, 2009). Adicionalmente, el tratamiento de CL tempranos con PGF2 α no activa las vías de citoquinas implicadas en la activación del sistema inmune, tales como el aumento de ligando CC-quimiocinas (CCL) - 2 (también llamado MCP-1 (Tsai *et al.*, 1997), la interleucina-8, y el ligando de quimiocina CXC (CXCL) -2 (Luo *et al.*, 2011). La base celular para algunas de las acciones diferenciales de PGF2 α parece residir en las células luteales grandes, porque las respuestas

pueden ser imitadas por tratamientos in vitro con $\text{PGF}_{2\alpha}$ de células bovinas de la granulosa durante las diferentes etapas del proceso de luteinización (Tsai y Wiltbank, 2001).

Además, se ha demostrado genes angiogénicos que son regulados de forma diferente, con factores pro-angiogénicos tales como el factor de crecimiento de fibroblastos-2, que aumenta por la $\text{PGF}_{2\alpha}$ en CL tempranos, pero los factores antiangiogénicos tales como el factor de crecimiento de fibroblastos inhibidores de trombospondina-1 y -2 y pentraxina 3 (PTX) aumenta por la $\text{PGF}_{2\alpha}$ en CL mayores (Zalman *et al.*, 2012). De hecho, la regulación diferencial del flujo sanguíneo luteal, parece ser un determinante crítico de la acción diferente de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ en CLs bovinos al principio o la mitad del ciclo (Miyamoto *et al.*, 2005; Acosta *et al.*, 2002). El tratamiento con $\text{PGF}_{2\alpha}$ aumentó de forma aguda el flujo de sangre (de 30 min a 2 h) en el CL de mitad del ciclo, seguido por una disminución sostenida en el flujo de sangre asociada con la regresión del CL. Curiosamente, en el CL temprano, estos cambios en el flujo sanguíneo no se producen en respuesta al tratamiento $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Miyamoto *et al.*, 2005).

Se necesitan más estudios para comprender plenamente los mecanismos que bloquean la acción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el día 5 del CL. La comprensión de estos mecanismos precisos podría permitir el desarrollo de métodos para producir la regresión del CL en el momento adecuado y evitar las respuestas a la muerte en tejidos como el CL durante condiciones inoportunas (Nascimento *et al.*, 2013).

Sin embargo, a pesar de las posibles causas de la falla en la luteólisis en vacas con CLs tempranos, se logró una mejora en la luteólisis completa en protocolos de OvSynch (GnRH-7 días - $\text{PGF}_{2\alpha}$ -56 h-GnRH-16 h- inseminación artificial) adicionando una dosis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ 24 h después de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ del Día 7, incrementando el porcentaje de vacas que tuvieron una luteólisis completa (95.6%), comparada con las que no tuvieron la dosis adicional (84.6%; Brusveen *et al.*, 2009). Resultados similares fueron reportados por otro estudio en donde se mejoró la regresión del CL de 83.0% con una $\text{PGF}_{2\alpha}$ a 97.0% con dos $\text{PGF}_{2\alpha}$ con 24 h de diferencia (Wiltbank *et al.*, 2015). Adicionalmente en protocolos de OvSynch en donde se reduce el período de dominancia del folículo alterando el intervalo desde el primer tratamiento de GnRH al tratamiento con $\text{PGF}_{2\alpha}$ de 7 a 5 días, exige dos

tratamientos con $PGF2\alpha$ para inducir una regresión luteal aceptable y disminuir las concentraciones de progesterona cerca del momento de la inseminación artificial, lo suficiente como para optimizar la fertilidad (Santos *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2012). Esto es especialmente importante cuando se usa una pre-sincronización, debido al incremento de la ovulación a la primera inyección de GnRH, y en consecuencia, una mayor ocurrencia de CLs recién formados que no pueden regresar después de una sola inyección cuando se aplica la $PGF2\alpha$ en el Día 5 (Santos *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2012).

Efectos de la prostaglandina sobre el útero

Entre los beneficios de la $PGF2\alpha$ en el útero esta la estimulación en las contracciones miotéricas (Lindell y Kindahl, 1983) que puede ser un mecanismo que expulsa detritos y microorganismos que contaminan el lumen uterino (Guyton, 1991). Adicionalmente la $PGF2\alpha$ puede tener un efecto estimulante sobre la actividad fagocítica de las células inflamatorias polimorfonucleares PMN uterinas (Paisley *et al.*, 1986).

Beneficios del Celo en el útero

El útero está singularmente adaptado para mantener la gestación y simultáneamente funcionar como una barrera fisiológica, además, éste órgano cuenta con mecanismos que actúan para ejercer tolerancia inmunológica hacia el semen y al mismo tiempo defenderse de la acción de posibles patógenos. En la actualidad se acepta que la respuesta inmune es un proceso complejo cuyas características son determinadas en gran medida por las interacciones que ocurren entre los sistemas inmunológico, endocrino y nervioso (García y Ocampo, 1991; Grossman, 1985). Las hormonas producidas en el hipotálamo y en las gónadas, pueden modificar la actividad de los órganos linfoides o de las células inmunocompetentes localizadas en las distintas mucosas del organismo que constituyen el sistema inmune mucosal común (Pérez, 2012a; Reyes, 1993).

Se ha descrito en los oviductos la presencia de linfocitos y de manera particular de linfocitos intraepiteliales en vaca, cabra, coneja y en mujer (Anzaldúa *et al.*, 2008; Dhaliwal *et al.*, 2001; Pérez *et al.*, 2003). En bovinos durante el diestro, se aumenta el número de linfocitos presentes en la mucosa de la región del ámpula en relación con el istmo, lo que indica que en esta especie también existe un mecanismo de regulación diferenciada en la migración linfocitaria a lo largo del ciclo estral (DuBois *et al.*, 1980).

Se acepta generalmente que el patrón cíclico de la concentración de hormonas esteroides característico para las diferentes etapas del ciclo estral, regula el potencial de patogenicidad de microorganismos que contaminan el útero en el posparto. Por ejemplo, el endometrio es más susceptible a la infección bajo el dominio de la progesterona que bajo el dominio del estrógeno. El mecanismo responsable no está bien claro, pero varias hipótesis se han propuesto. En el útero, la defensa celular contra contaminantes bacterianos es provista por leucocitos uterinos (Frank *et al.*, 1983; Romaniukowa, 1984; Vandeplassche and Bouters, 1976; Vandeplassche, 1984) y durante la fase de estrógeno del ciclo ovárico hay un aumento del flujo sanguíneo en el útero, el aumento de la producción de moco, y la intensificación de la actividad de polimorfonucleares (PMN; Hawk *et al.*, 1960, Hawk *et al.*, 1964; Killingbeck and Lamming, 1963). También se ha descrito el aumento de PMNs en el útero y su lumen durante el metaestro comparado con otros estadios del ciclo estral (Klucinski *et al.*, 1990; Faundez *et al.*, 1994).

Durante el celo la principal hormona actuante es el estrógeno el cual ejerce sus efectos regulatorios a través de dos vías diferentes. En una de ellas participan receptores genómicos que actúan como factores de transcripción en la expresión génica. La otra vía es mediante receptores de membrana plasmática y se caracteriza porque induce efectos rápidos que en cuestión de segundos a minutos se llevan a cabo (Narita *et al.*, 2007).

En la remodelación del tejido estromal endometrial durante la fase proliferativa, participan los estrógenos, moléculas como la interleucina (IL1) y el Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y prostaglandinas. Durante la fase estrogénica en el endometrio ocurren cambios tisulares parecidos a los que se presentan en un evento inflamatorio, como la edematización y la formación de vasos sanguíneos. Estos cambios tienen como

propósito generar condiciones microambientales favorables para el inicio del desarrollo embrionario. Además, ocurre el reclutamiento de leucocitos y la secreción de citoquinas en el endometrio (Castro *et al.*, 2006). Por lo tanto, que ocurra un celo entre la colecta de embriones y el inicio de un nuevo tratamiento superestimulador favorecería el desarrollo de embriones de calidad en la próxima colecta.

HIPÓTESIS GENERAL

La aplicación de dosis repetidas de prostaglandina F2 α resulta en una más rápida regresión de los cuerpos lúteos y el retorno al celo y la ovulación que la administración de una sola dosis en el momento de la colecta de embriones de vacas donantes superovuladas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la administración de prostaglandina F2 α , sobre la regresión de los cuerpos lúteos y el retorno al celo en vacas donantes de embriones superovuladas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar el efecto de la adición de una segunda dosis de prostaglandina F2 α 24 h después de la primera, sobre la regresión de los cuerpos lúteos y el retorno al celo en vacas donantes de embriones (Experimento 1).

Evaluar el efecto de la adición de una segunda dosis de prostaglandina F2 α 24 h después de la primera, sobre la dinámica folicular y la ovulación en vacas donantes de embriones (Experimentos 2 y 3).

Determinar el efecto de la administración de GnRH 8 días después la administración de prostaglandina F2 α sobre el intervalo a la ovulación y el número de vacas donantes que tiene un CL en el momento de inicio del próximo tratamiento superovulatorio, 13 días después de la colecta anterior (Experimento 4),

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y lugar de trabajo

Este trabajo se llevó a cabo en las instalaciones de IRAC-BIOGEN las cuales se encuentran ubicadas en zona rural de Estación Gral Paz, Paraje Pozo del Tigre, provincia de Córdoba, Argentina. Se utilizaron para este estudio vacas Donantes de embriones de razas de carne (Aberdeen Angus, Simmental, Hereford, Brangus), y fueron alimentadas a base de heno de alfalfa, y suplementación con alimento balanceado. El clima que presenta es estacional (primavera: 21 de setiembre a 21 de diciembre, verano: 21 de diciembre a 21 de marzo, otoño: 21 de marzo a 21 de julio. invierno: 21 de julio a 21 de setiembre) por lo cual los experimentos fueron desarrollados en diferentes estaciones: experimento 1 en verano, y los experimentos 2, 3 y 4 en otoño-invierno.



Figura 2.1. Portada instalaciones IRAC-BIOGEN donde se realizaron los experimentos



Figura 2.2. Donante de embriones Aberdeen Angus Colorado

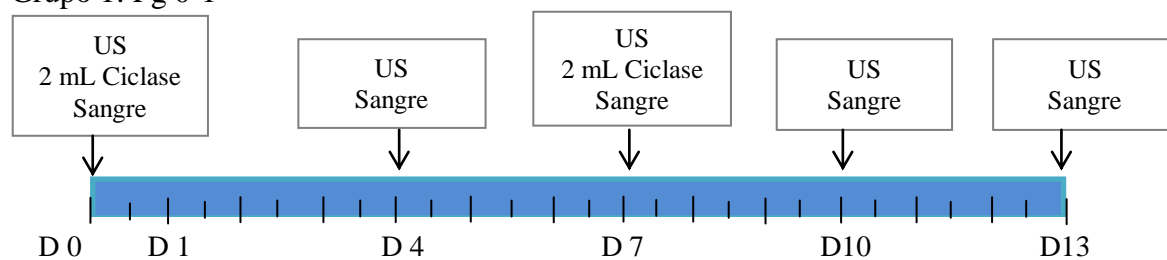
Experimento 1

Se utilizaron 44 vacas donantes de embriones de razas de carne, Aberdeen Angus (30), Brangus (11), y Simmental (3), con una condición corporal de entre 3.0 a 4.5 (escala 1 a 5), mantenidas en condiciones de manejo y sanidad óptimas.

Las vacas fueron tratadas con un protocolo de superovulación convencional en el cual se aplicó en el Día -15 2,5 mg de benzoato de estradiol (EB, Gonadiol, Syntex SA), 50 mg de progesterona (Progestar, Syntex, Argentina) y se insertó un dispositivo con progesterona (DIB 1g, Syntex, Argentina). A los 4 días (Día -11) se comenzó el tratamiento superestimulador que consistió en dosis decrecientes cada 12 h de FSH (Folltropin-V, Vetoquinol, Canadá; dosis total entre 260 y 400 mg NIH-FSH-P1) durante 4 días, 500 µg de Cloprostenol Sódico (Ciclase, Syntex, Argentina) en la mañana (AM) y tarde (PM) del Día -9, retiro del dispositivo el Día -8 AM, el Día -7 AM aplicación de 100 µg de acetato de gonadorelina (GnRH, Gonasyn GDR, Syntex SA, Argentina) y se realizó inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) 12 y 24 h más tarde. Todas las donantes fueron colectadas en el Día 0 y las vacas fueron bloqueadas por la cantidad de CLs palpables al

momento de la colecta de embriones y asignadas a dos grupos. El grupo 1 consistió en la aplicación intramuscular profunda de 500 μg de Cloprostenol Sódico (2 mL, Ciclase, Syntex, Argentina) los Días 0 y 7 (el Día 0 se toma como día en que se realiza la colecta de embriones), a lo que se le conoció como tratamiento “Pg 0-7”; el Grupo 2 se le realizó la aplicación de la misma dosis de Cloprostenol Sódico los Días 0 1 y 7 a la que se le llamó tratamiento “Pg 0-1-7”.

Grupo 1: Pg 0-1



Grupo 2: Pg 0-1-7

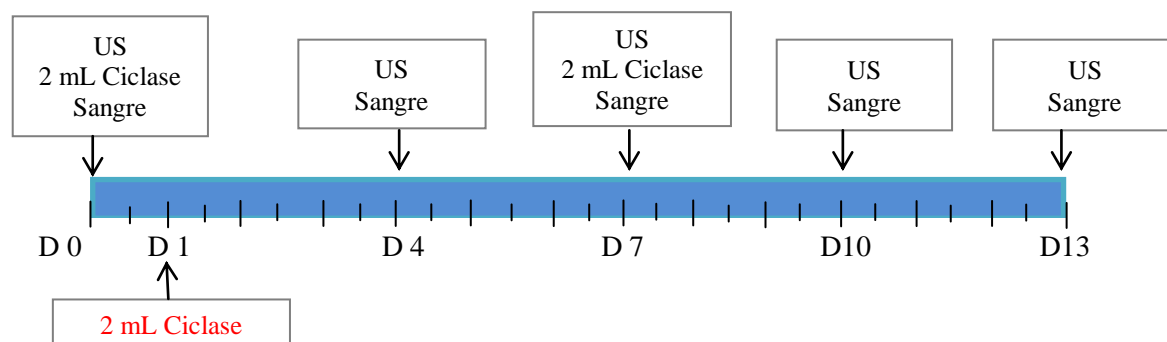


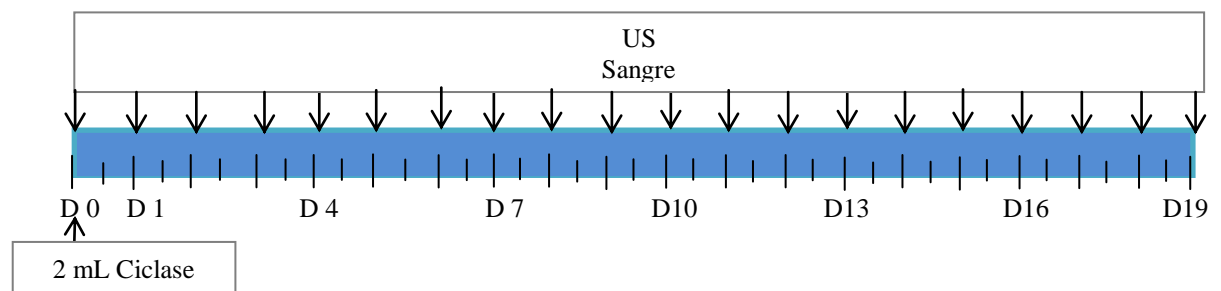
Figura 2.3. Diseño experimental para el Experimento 1. US: Ultrasonografía; 2 mL Ciclase: 500 μg Cloprostenol Sódico; Sangre: toma de muestra de sangre para medición de progesterona.

Experimento 2

Se utilizaron 14 vacas donantes de embriones, de raza de carne (Aberdeen Angus), con una condición corporal entre 3.0 a 4.5 (escala 1 a 5), mantenidas en condiciones de manejo y sanidad óptimas.

Las vacas fueron tratadas con un protocolo de superovulación similar al descrito en el experimento 1 y fueron divididas en dos grupos de la misma manera que en el experimento 1. El grupo 1 consistió en la aplicación intramuscular profunda de 500µg de Cloprostenol Sódico el Día 0, a lo que se le llamó tratamiento “Pg 0”; el Grupo 2 se le aplicó la misma dosis de Cloprostenol Sódico los Días 0 y 1 al que se le llamó tratamiento “Pg 0-1”.

Grupo 1: Pg 0



Grupo 2: Pg 0-1

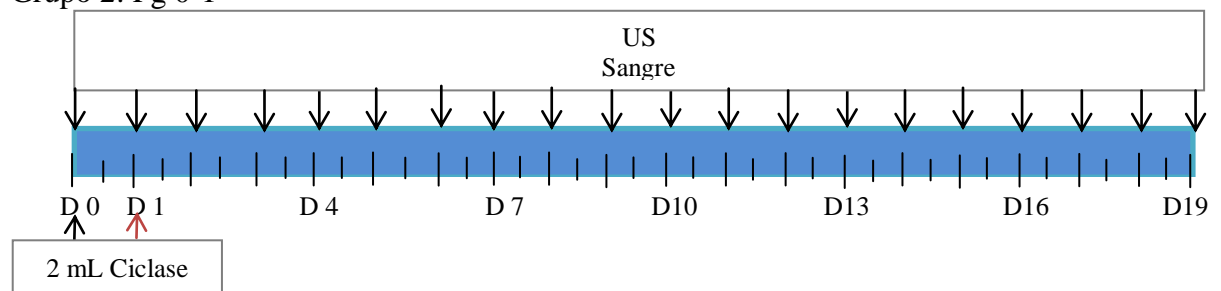


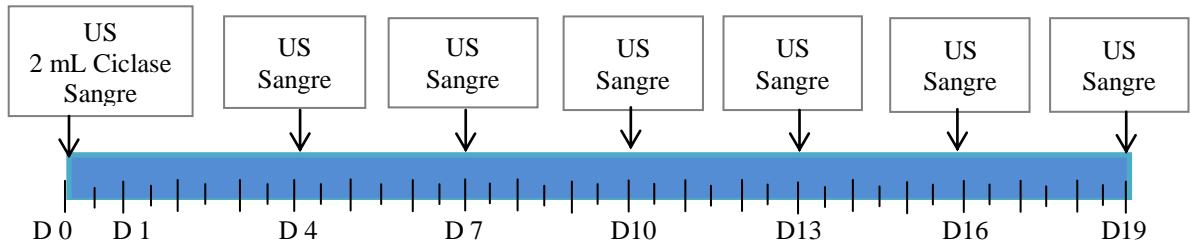
Figura 2.4. Diseño experimental para el Experimento 2. US: Ultrasonografía; 2 mL Ciclase: 500 µg Cloprostenol Sódico; Sangre: toma de muestra de sangre para medición de progesterona.

Experimento 3

Se utilizaron 47 vacas donantes de embriones de razas de carne, Aberdeen Angus (31), Hereford (12) y Simmental (4), con una condición corporal entre 3.0 a 4.5 (escala 1 a 5), mantenidas en condiciones de manejo y sanidad óptimas.

Las vacas fueron sometidas a un tratamiento superovulatorio similar al de los experimentos anteriores y divididas en dos grupos de la misma manera que en los experimentos 1 y 2. El grupo 1 se conocerá como tratamiento “Pg 0”; el Grupo 2 se conocerá como tratamiento “Pg 0-1”.

Grupo 1: Pg 0



Grupo 2: Pg 0-1

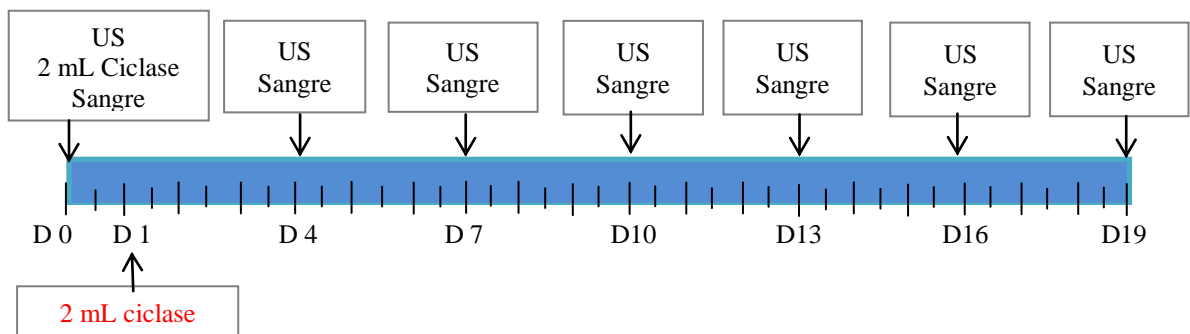


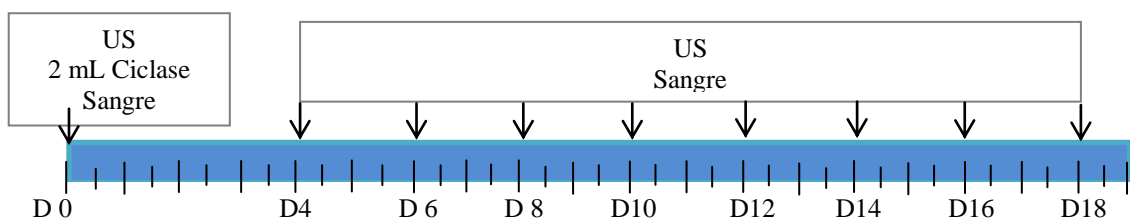
Figura 2.5. Diseño experimental para el Experimento 3. US: Ultrasonografía; 2 mL Ciclase: 500 μ g Cloprostenol Sódico; Sangre: toma de muestra de sangre para medición de progesterona.

Experimento 4

Teniendo en cuenta los resultados de la dinámica folicular del experimento 3 se decidió administrar un inductor de la ovulación (GnRH) 8 días después de la colecta de embriones para lo cual se utilizaron 38 vacas donantes de embriones de razas de carne (Aberdeen Angus).

Las vacas fueron tratadas con el protocolo de superovulación utilizado en los experimentos anteriores y se dividieron en dos grupos de tratamiento igual que en los experimentos anteriores. En este caso el grupo 1 se llamó como tratamiento “Pg 0” igual que en los experimentos anteriores y el grupo 2 “Pg y GnRH” que además de recibir 500 µg de Cloprostenol Sódico el día de la colecta de embriones, recibió 100 µg de acetato de gonadorelina (2 mL, Gonasyn GDR, Syntex SA, Argentina) 8 días después de la colecta de embriones.

Grupo 1: Pg 0



Grupo 2: Pg y GnRH

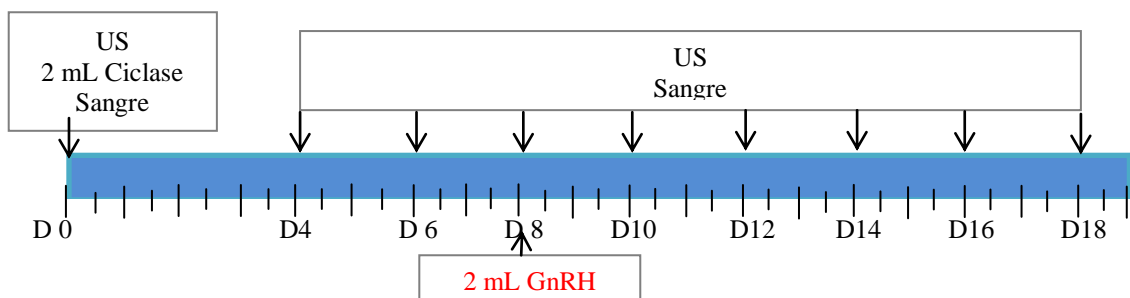


Figura 2.6. Diseño experimental para el Experimento 4. US: Ultrasonografía; 2 mL Ciclase: 500 µg Cloprostenol Sódico; Sangre: toma de muestra de sangre para medición de progesterona.

Ultrasonografía

Las vacas fueron examinadas por ultrasonografía transrectal por medio del equipo Falco 100 Vet (Pie Medical, Holanda con un transductor 8 MHz) en donde se midieron e identificaron los CLs, ovulación y aparición de un nuevo CL. La ovulación fue definida como la desaparición del folículo de mayor diámetro que estaba presente en la

examinación anterior. La regresión de los CL fue determinada como el día en que todas las estructuras luteales presentes en el ovario tenían diámetros menores a los 10 mm. La técnica de seguimiento utilizada fue la descrita por Knopf *et al.* (1989) y Kastelic *et al.* (1990) para los CL.



Figura 2.7. Ecógrafo Falco 100, Pie Medical.

Experimento 1: Se realizaron ultrasonografías (US) transrectales los días 0, 4, 7, 10 y 13.

Experimento 2: Se realizaron US transrectales secuenciales diarias a partir del día 0 hasta el día 19

Experimento 3: Se realizaron ultrasonografías transrectales los días 0, 4, 7, 10, 13, 16 y 19.

Experimento 4: Se realizaron ultrasonografías transrectales los días 0, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18

Observación de celos

Para la detección de celos se utilizaron dos métodos combinados, el primero fue la observación visual de signos de celos dos veces al día (AM, PM), durante una hora en cada turno. Se ha determinado que con 2 o 3 observaciones diarias en momentos estratégicos se obtiene una buena eficiencia de detección que puede alcanzar alrededor del 80% también que la mayor eficiencia de detección se ha alcanzado cuando el tiempo es cercano a los 60 minutos (Ducrot *et al.*, 1999).

Las características tenidas en cuenta para la detección de celo se pueden dividir en dos categorías, las principales y las secundarias (Diskin y Sreenan, 2000; García, 2010). Principales: Pasividad a la monta, único indicador de que la hembra se encuentra en celo. Secundarias: Estas no son específicas del celo. Las hembras las manifiestan antes, durante y después del celo. Por lo tanto además del signo primario se tuvieron en cuenta los siguientes signos:

- Monta de otras vacas
- Descarga de moco
- Hinchazón y enrojecimiento de la vulva
- Pelos de la grupa despeinados y Flancos sucios
- Descansar la barbilla en la espalda
- Olfateo de genitales
- Disminución de alimentación y producción de leche
- Sangrado del metaestro

Para facilitar la detección de celos y mejorar su eficiencia se han desarrollado varios métodos auxiliares reveladores de monta. Un elemento fundamental para la detección del celo es la adecuada identificación de todas las vacas o novillas, así como la disposición de registros al día (Asprón, 2004). Para todo el estudio se ayudó la detección visual de celo, con el uso de pintura en la base de la cola Celotest (Biotay SA, Argentina).

El método para detectar celo descrito como pintura de la base de la cola, fue desarrollado por Macmillan y Curnow (1977), y modificado por Dick (1990), que incluyó la calificación de la remoción de la pintura, ya que de acuerdo al porcentaje de remoción, se establece una determinada puntuación para definir si el animal está en celo “grados 0 a 3” o no “grados 4 y 5” (Dick *et al.*, 1992). En esta se pintó una franja de aproximadamente 20 cm de largo y 5 cm de ancho en la base de la cola, desde la primera vértebra coccígea (Figura 2.8. a). Esta posición se modificó en los casos que la estructura de la pelvis de una vaca en particular fuera anormal, de modo tal que pudiera haber impedido que la pintura quede en la zona de fricción durante la monta por otra vaca (Figura 2.8. b y c).

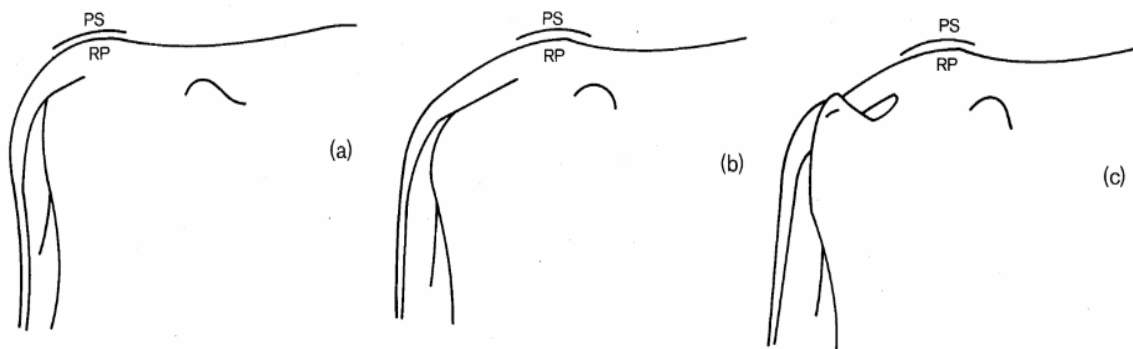


Figura. 2.8. Ubicación recomendada de la línea de pintura (PS) sobre la zona de fricción (RP) en la espina vertebral de vacas con (a) normal, o (b y c) anormal conformación (Pérez M, 2012b)

La pintura se aplicó luego de haber removido cualquier pelo suelto o suciedad por cepillado de la zona de aplicación. La lectura de la pintura se realizó dos veces al día, y la interpretación se realizó según el grado de remoción de pintura (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Interpretación de porcentaje de remoción de la pintura (Adaptado de Medina, 2012)

Grado de remoción de la pintura	Estado
Cuando la pintura no se removió	No está en celo
Hasta el 30% de la pintura removida	
De 30 al 100% de la pintura removida	Está en celo

Obtención de muestras sanguíneas y determinaciones hormonales

Las muestras de sangre se obtuvieron los días que se hicieron las ultrasonografías en cada uno de los experimentos exceptuando el experimento 1, en el cual no se realizó toma de muestras sanguíneas para perfiles de progesterona.

Para las determinaciones hormonales de progesterona se tomaron muestras de 10 mL de sangre de la vena yugular en tubos heparinizados. Las muestras fueron conservadas a 4°C y dentro de los 30 minutos de obtenidas fueron centrifugadas a 3000 RPM durante 20 minutos para separar el plasma, que se congeló a – 20°C hasta su posterior análisis (De Castro *et al.*, 2004).

Se determinaron las concentraciones plasmáticas de progesterona mediante radioinmunoensayo (RIA) en fase sólida de origen comercial (DPC, Coat-A-Count Progesterone, Los Angeles, USA) en el laboratorio de la Cátedra de Teriogenología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Todas las muestras fueron evaluadas por duplicado. Los coeficientes de variación intra-ensayo e inter ensayo fueron menores al 5%. La sensibilidad del método fue estimada en 0,2 ng/mL.

Análisis Estadístico

Todos los estudios fueron realizados con diseños en bloque, en donde se dividieron a las vacas en dos grupos equiparados por la cantidad de CL. Las variables cantidad promedio de CL, día promedio de celo, día promedio de ovulación, día promedio de regresión de los CL, fueron analizados por medio del test de análisis de la varianza (ANOVA).

Las concentraciones plasmáticas de progesterona se analizaron mediante Modelos Lineales Mixtos en los que se incluyó la identificación del animal como componente aleatorio y al tratamiento y día como componente fijo. En el modelo también se incluyó la interacción día x tratamiento (Experimentos 2, 3 y 4).

Para analizar el día de ovulación, de acuerdo a la cantidad de CL en el momento de la colecta de embriones, se realizó una regresión lineal en donde la variable independiente fue la cantidad de CL y la regresora fue el día de ovulación, y se generó una gráfica de dispersión con su respectiva línea de tendencia, este análisis se realizó para el experimento 1 y adicionalmente se realizó un análisis general de los todos los datos obtenidos en esta tesis menos los datos del grupo GnRH del experimento 4. Se realizó un análisis de correlación de Pearson para las variables cantidad de CLs y los niveles de progesterona en sangre (ng/ml) en el momento de la colecta de embriones para todos los datos de esta tesis menos los datos del experimento 1. Para todos estos análisis se utilizó el software Infostat 2.0 ® (Infostat, Universidad Nacional de Córdoba, 2013).

RESULTADOS

Experimento 1

Se detectó la regresión de los CL por ultrasonografía en la totalidad de las vacas tratadas (n=44) antes de finalizar el experimento. Al analizar el momento de regresión de los CL en las vacas tratadas, se observó que para el grupo Pg 0 - 7 el tiempo fue de $5,4 \pm 0,5$ días y para el grupo Pg 0-1- 7 de $5,3 \pm 0,3$ días por lo que no se observó diferencia entre los grupos ($P = 0,80$).

Durante el experimento, el 60,8% (14/23) de los animales del grupo Pg 0-7 y 52,3% (11/21) del grupo Pg 0-1-7 presentaron celo. El día de presentación de celo en el primer grupo fue de $7,2 \pm 0,3$ días y de $7,3 \pm 0,5$ para el segundo grupo, siendo similares para los dos grupos ($P = 0,38$).

De igual manera, no se encontró diferencia ($P = 0,30$) en el porcentaje de ovulación (69,5 y 66,6%), en donde el tiempo fue de $8,5 \pm 0,9$ y $9,8 \pm 0,9$ días para los grupos Pg 0-7 y Pg 0-1-7, respectivamente (Tabla 3.1.). El 60% de los animales tuvieron un nuevo CL visible al chequeo ultrasonográfico el día 13 para los dos grupos evaluados, en donde no se muestra ninguna diferencia entre estos ($P= 0,97$).

Cuando se analizó el tiempo de ovulación de los animales tratados según la cantidad de CL el día de la colecta, se encontró que el intervalo de ovulación fue menor entre las vacas con 1-2 CLs y 3-4CLs que el de las vacas con más de 5 CLs ($P < 0,01$). Es decir que las vacas de menor cantidad de CLs (1-2) ovularon en un menor tiempo (Tabla 3.2.).

Tabla 3.1. Comparación entre los tratamientos de prostaglandina, sobre el día promedio de regresión de los CLs, el día promedio de presentación de celo, y día promedio de ovulación.

Grupo	N	Regresión luteal (día ± EE)	N	Celo (día ± EE)	N	Ovulación (día ± EE)
Pg 0 y 7	23/23	5,4 ± 0,5	14/23	7,2 ± 0,3	16/23	8,5 ± 0,9
Pg 0, 1 y 7	21/21	5,3 ± 0,3	11/21	7,3 ± 0,5	14/21	9,8 ± 0,9

Las medias no difieren significativamente (P>0,3)

Tabla 3.2. Día promedio de regresión luteal y de ovulación en vacas, según la cantidad de cuerpos lúteos (CLs) en el momento de la colecta de embriones.

Cuerpos lúteos	n	Ovulación (día ± EE)	n	Regresión (día ± EE)
1-2	6	4.5±0.5 ^a	8	4.0±0.0
3-4	5	7.6±1.47 ^b	6	5.5±1.5
5-10	8	10.38±0.89 ^c	11	5.36±0.47
11-15	7	11.71±0.61 ^c	11	5.91±0.61
>15	4	10.75±0.75 ^c	8	5.88±0.55
Total de animales	30		44	

^{abc} Las medias con distintos superíndices difieren significativamente (P<0,01)

Lo anterior es explicado por el comportamiento de los datos graficados (cantidad de CLs en el momento de la colecta de embriones e intervalo a la ovulación), para los cuales la línea de tendencia que más se ajustó fue la de tipo cuadrática (Figura 3.1.). De la misma curva se generó la fórmula para el cálculo del día de ovulación a partir de la cantidad de CL: Día de Ovulación = CL (1,02)+[(-0,03)(CL)]+4,18

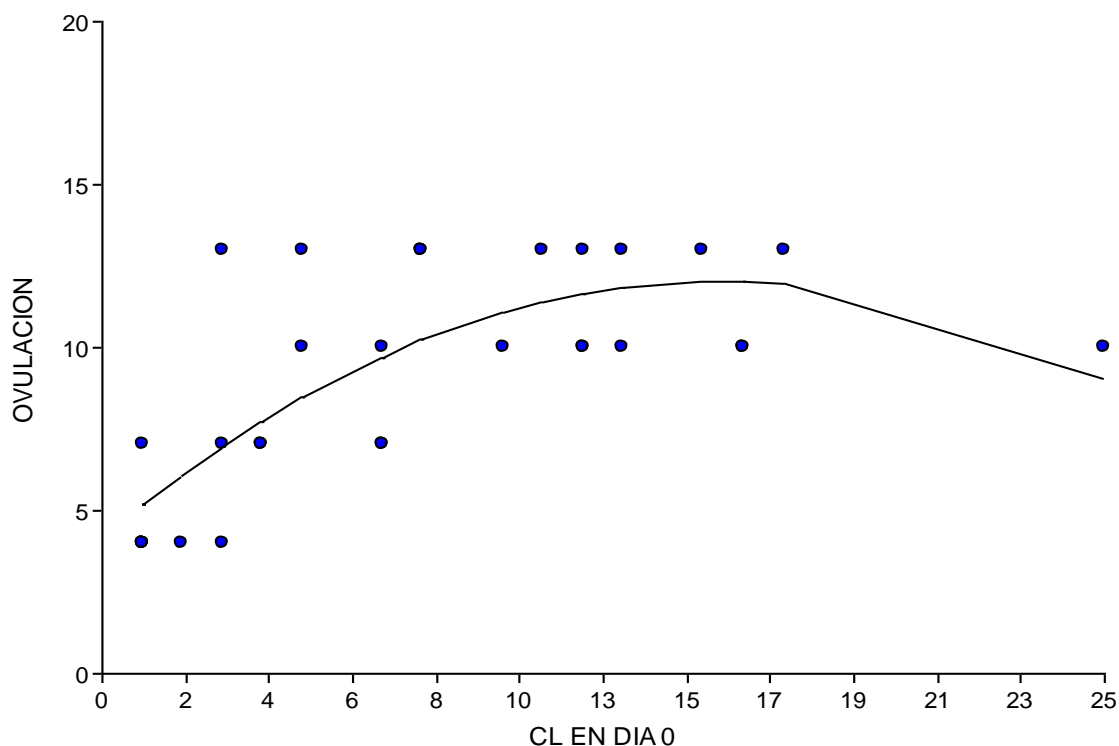


Figura 3.1. Curva cuadrática para retorno a la ovulación de vacas superovuladas, posterior a la aplicación de PGF2 α y cantidad de cuerpos lúteos (CL) al día 0 del tratamiento.

Cuando se realizó un análisis de las vacas que presentaron celo, se observó que en ambos grupos, un porcentaje de vacas que aunque presentaron celo no ovularon, y finalizaron el experimento con folículos de más de 10 mm de diámetro, siendo de 28,5% para el grupo Pg 0-1 (4/14) y 27,3% para el grupo Pg 0-1-7 (3/11). Igualmente de las vacas que no presentaron celo un porcentaje de ellas ovularon para cada grupo, 66,6% para el grupo Pg 0-1 (6/9), y 60% para el grupo Pg 0-1-7 (6/10). Las que no ovularon, terminaron con un folículo de más de 10 mm de diámetro, 33,3% para el grupo Pg 0-1 (3/9), y 40% para el grupo Pg 0-1-7 (4/10). Para ninguno de los análisis de estas variables se encontraron diferencias entre los grupos ($P > 0,2$; Tabla 3.3.).

Tabla 3.3. Relación de Vacas con celo y ovuladas, vacas que no presentaron celo y ovuladas, y vacas con folículos de gran tamaño en experimento 1.

VACAS CON CELO					
Grupo	Celo	Celo y ovuladas	Celo y no ovuladas	Celo y no ovuladas	Celo y no ovuladas
			Fol <10mm	fol 10-20mm	fol >20mm
Pg 0 y 1	14/23 (60,8%)	10/14 (71,4%)	0/14 (0%)	4/14 (28,5%)	0/14 (0%)
Pg 0, 1 y 7	11/21 (53,3%)	8/11 (72,7%)	0/11 (0%)	2/11 (18,1%)	1/11 (9%)

VACAS SIN CELO					
Grupo	No celo	No celo y ovuladas	No celo y no ovuladas	No celo y no ovuladas	No celo y no ovuladas
			fol <10mm	fol 10-20mm	fol >20mm
Pg 0 y 1	9/23 (39,2%)	6/9 (66,6%)	1/9 (11,1%)	1/9 (11,1%)	1/9 (11,1%)
Pg 0, 1 y 7	10/21 (46,7%)	6/10 (60%)	0/10 (0%)	1/10 (10%)	3/10 (30%)

Las medias y los porcentajes no difieren ($P > 0,2$)

Experimento 2

Las concentraciones plasmáticas de progesterona de la totalidad de las vacas tratadas ($n=14$) disminuyeron a niveles basales antes de finalizar el Experimento (Figura 3.2). Al analizar el momento de regresión de los niveles de progesterona en las vacas tratadas, se observó que al Día 3 tanto en el grupo de Pg 0 como el grupo Pg 0 - 7 las concentraciones de progesterona estaban en promedio por debajo de 1 ng/mL y al analizar la curvas de descenso de progesterona de los dos grupos no se encontró diferencia significativa ($P=0,8629$).

Durante el experimento el 85,7% (6/7) de los animales del grupo Pg 0 y del grupo Pg 0-1 presentaron celo. Sin embargo, el día promedio de la presentación de celo en el grupo Pg 0 fue menor que el en el grupo Pg 0-1, siendo de $7,0 \pm 0,7$ días y de $9,7 \pm 0,5$ respectivamente ($P = 0,0323$).

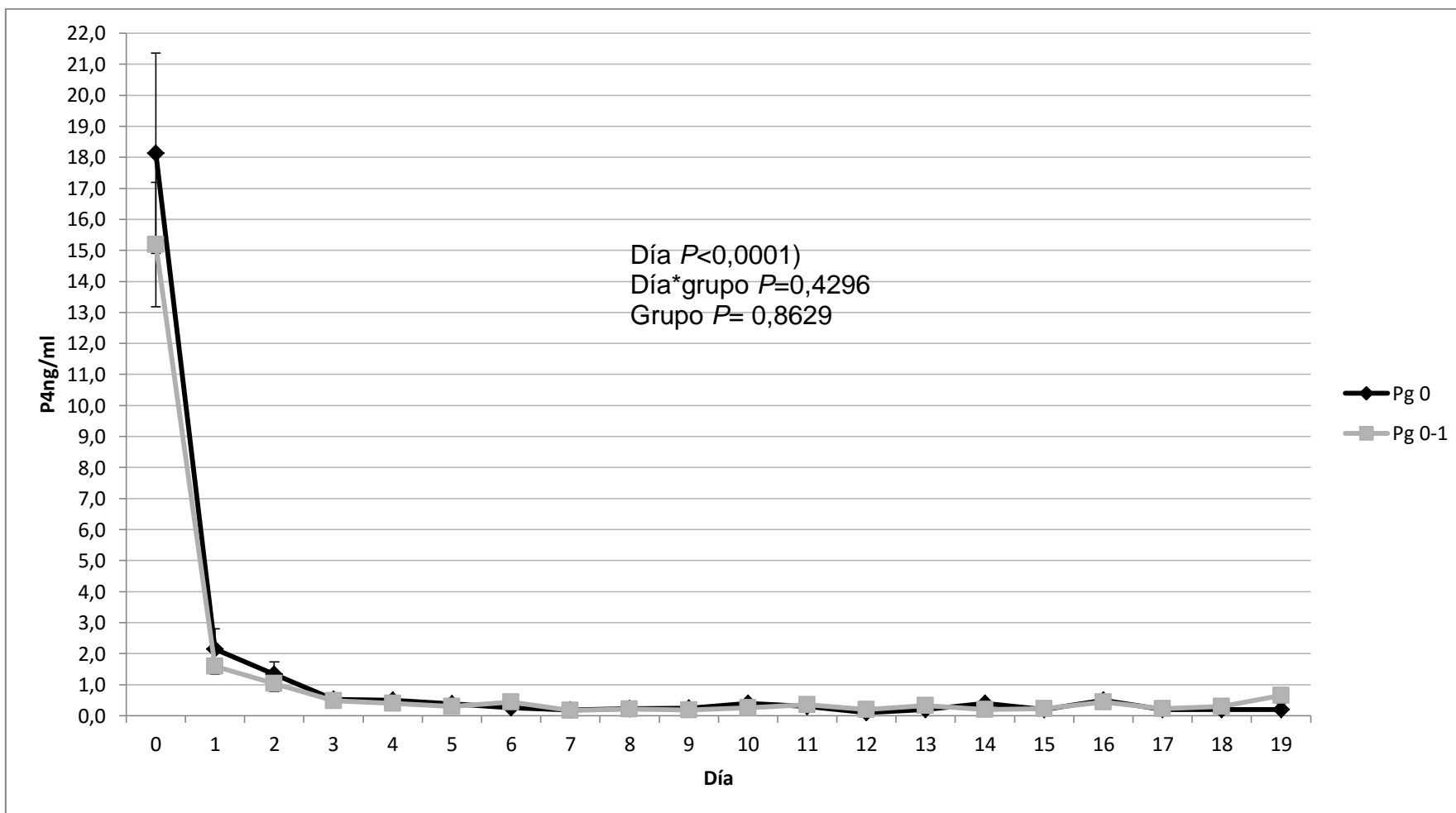


Figura 3.2. Curva de concentración plasmática de progesterona en respuesta a la administración de una o dos inyecciones de 500 µg de Cloprostenol Sódico en el experimento 2 (media±EE).

Por el contrario para la variable día promedio de ovulación no se evidencio una diferencia ($P = 0,1336$) siendo el día de ovulación promedio de $8,5 \pm 0,6$ días para el grupo Pg 0 y de $10,0 \pm 0,5$ días para el grupo Pg 0-1 (Tabla 3.4.).

Tabla 3.4. Comparación entre los tratamientos de prostaglandina sobre el día promedio de presentación de celo, de ovulación y día promedio de aparición de CL nuevo.

Grupo	N	Celo (día \pm EE)	N	Ovulación (día \pm EE)	n	Día cl nuevo (día \pm EE)
Pg 0	6/7	$7,0 \pm 0,7^a$	6/7	$8,5 \pm 0,6$	6/7	$10,8 \pm 0,5$
Pg 0-1	6/7	$9,7 \pm 0,5^b$	4/7	$10,0 \pm 0,7$	4/7	$12,3 \pm 0,8$

^{ab} Las medias en la misma columna difieren significativamente ($P < 0,05$)

Dinámica folicular

Para el análisis del inicio de la onda ovulatoria, diámetro del folículo preovulatorio e intervalo del inicio de onda a la ovulación se vio que estas fueron similares para los dos grupos (Tabla 3.5.), no encontrándose diferencias entre los grupos para ninguna de dichas variables ($P > 0,1$).

Tabla 3.5. Comparación día promedio de inicio de la onda ovulatoria, diámetro promedio del folículo preovulatorio, e intervalo promedio desde el inicio de la onda a la ovulación.

TX	Día inicio de onda	Diam. Fol. Preovulatorio (mm \pm EE)	Intervalo inicio onda- ovulación (días \pm EE)
Pg 0	$2,3 \pm 1,0$	$12,3 \pm 1,5$	$6,3 \pm 1,8$
Pg 0-1	$3,3 \pm 1,0$	$13,0 \pm 2,3$	$6,7 \pm 1,0$

Las medias no difieren ($P > 0,1$).

Experimento 3

Las concentraciones plasmáticas de progesterona no disminuyeron a niveles basales en la totalidad de las vacas tratadas (n=47) antes de finalizar el experimento, debido a que una vaca siempre mantuvo concentraciones de progesterona por encima de 1 ng/mL. Al analizar el momento de disminución las concentraciones de progesterona en las vacas tratadas, se observó que en el Día 7 para el grupo Pg 0 y el Día 4 el grupo Pg 0-1 las concentraciones de progesterona estaban en promedio por debajo de 1 ng/mL (Figura3.3). Sin embargo, al realizar los análisis de las curvas de descenso de progesterona no se encontró diferencia entre los grupos ($P = 0,9982$).

La presentación de celo fue similar para los dos grupos, siendo del 79,2% para el grupo Pg 0 y 78,3% para el grupo Pg 0-7 ($P=0,9395$). El día promedio de presentación de celo en el primer grupo fue de $7,2 \pm 0,4$ días y de $7,2 \pm 0,3$ días para el segundo, no encontrándose diferencia para ninguna de estas dos variables ($P = 0,9223$). Para la variable día promedio de ovulación se encontraron resultados similares entre los grupos ($P = 0,7824$) siendo $10,3 \pm 0,4$ días para el grupo Pg 0 y de $9,7 \pm 0,5$ días para el grupo Pg 0-1, los porcentajes de ovulación también fueron similares 83,3% y 91,3% respectivamente, y tampoco se observaron diferencias (Tabla 3.6.).

Tabla 3.6. Comparación entre los tratamientos de prostaglandina Pg 0 y Pg 0-1 sobre el día de presentación de celo, y el tiempo de ovulación.

Grupo	N	Celo (días)	N	Ovulación (días)
Pg 0	19/24 79,2%	$7,2 \pm 0,4$	20/24 83,3%	$10,3 \pm 0,4$
Pg 0-1	18/23 78,3%	$7,2 \pm 0,3$	21/23 91,3 %	$10,1 \pm 0,4$

Las medias y porcentajes no difieren ($P>0,4$).

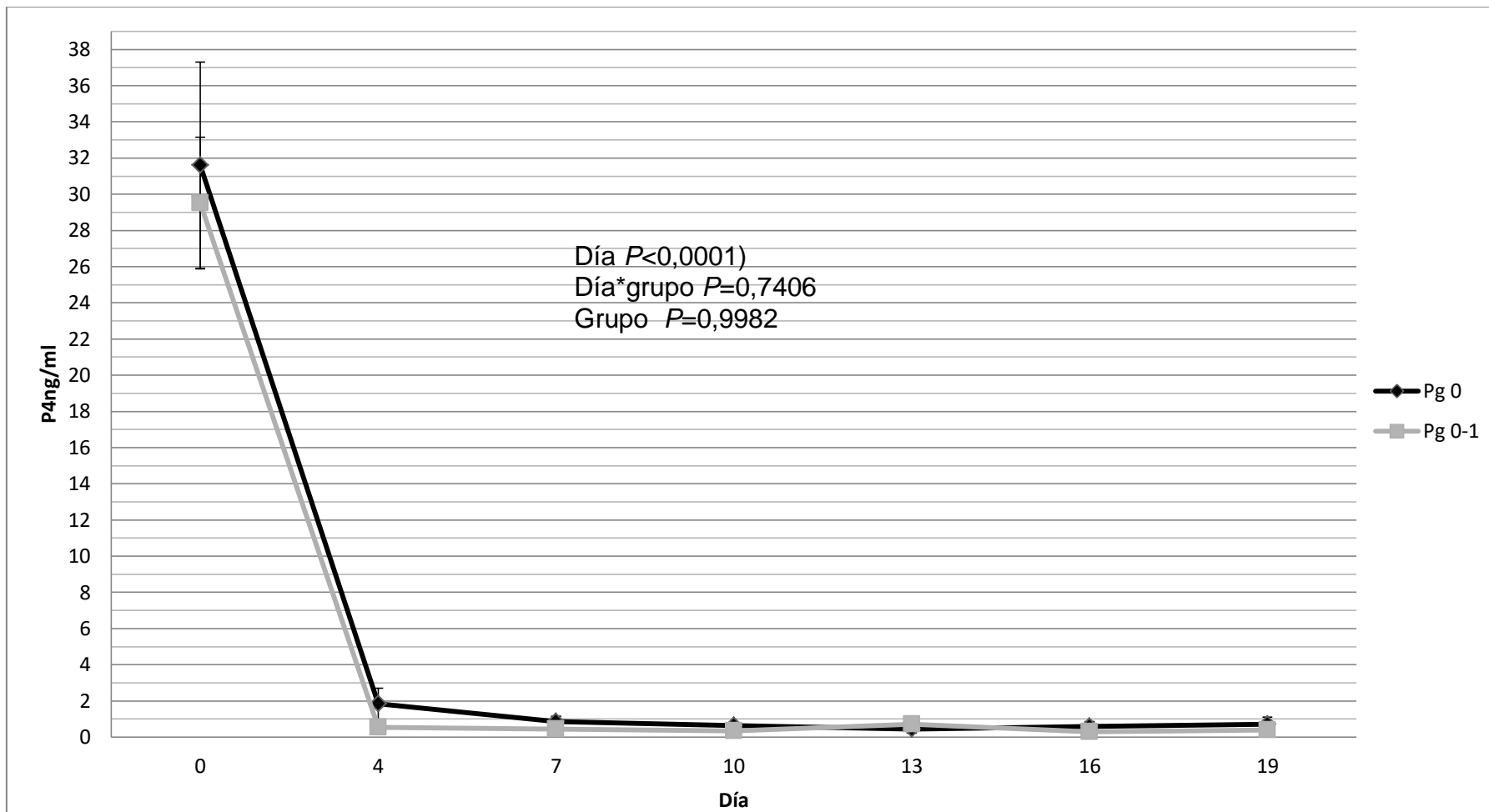


Figura 3.3. Curva de concentración plasmática de progesterona en respuesta a la administración de una o dos inyecciones de 500 µg de Cloprostenol Sódico en el experimento 3 (media±EE).

Cuando se realizó un análisis de las vacas que presentaron celo, se siguió observando que al igual que en el experimento 1, en ambos grupos hay un porcentaje de vacas que aunque presentaron celo no ovularon, siendo de 10,5% para el grupo Pg 0 (2/9) y 5,6% para el grupo Pg 0-1 (1/18). Igualmente de las vacas que no presentaron celo un porcentaje de ellas ovularon para cada grupo, 40,0% para el grupo Pg 0 (2/5), y 20,0% para el grupo Pg 0-1 (1/5), no encontrándose diferencias entre los grupos ($P > 0,1$; Tabla 3.7.).

Tabla 3.7. Relación de Vacas con celo y ovuladas y vacas que no presentaron celo y ovuladas experimento 3

TX	Celo		Sin Celo	
	Ovuladas	No ovuladas	Ovuladas	No ovuladas
Pg 0	17/19 (89,5%)	2/19 (10,5%)	3/5 (60,0%)	2/5 (40,0%)
Pg 0-1	17/18 (94,4%)	1/18 (5,6%)	4/5 (80,0%)	1/5 (20,0%)

Los porcentajes no difieren ($P > 0,1$)

Experimento 4

En este experimento las concentraciones plasmáticas de progesterona no disminuyeron en la totalidad de las vacas tratadas ($n=38$) al finalizar el experimento (Figura 3.4.), debido a que cuatro vacas del grupo Pg y dos vacas del grupo GnRH permanecieron con concentraciones de progesterona por encima de 1 ng/mL. Al analizar el momento de disminución de las concentraciones de progesterona en las vacas tratadas, se observó que al Día 6 el grupo de GnRH los niveles de progesterona estaban en promedio por debajo de 1ng/mL, no siendo así para el grupo Pg. Pero al analizar las curvas de progesterona de los dos grupos no se encontró diferencia entre estos ($P=0,5354$).

Durante el experimento, la presentación del celo fue similar tanto para el grupo Pg como para el grupo GnRH (63,1%; 12/19). El día de presentación de celo en el primer

grupo fue de $8,0 \pm 1,1$ días y de $7,6 \pm 0,4$ días para el segundo grupo respectivamente, sin encontrarse diferencia entre los grupos para esta variable ($P = 0,7386$).

Al analizar el porcentaje de ovulación para los grupos se evidenció que este fue menor para el grupo Pg, siendo de 68,4% para el grupo Pg y de 94,7% para el Grupo GnRH ($P=0.0364$), por consecuencia de este resultado se evidenció también un mayor número de vacas con un CL a los 13 días después de la colecta de embriones (Tabla 3.8.). Para el día de ovulación promedio se encontraron resultados muy similares entre los grupos, siendo $10,3 \pm 1,1$ días para el grupo Pg y $9,1 \pm 0,2$ días para el grupo GnRH ($P=0,2370$).

Tabla 3.8. Comparación entre los tratamientos Pg y GnRH, sobre el día de regresión de los CL, el día de presentación de celo, y el tiempo de ovulación.

Grupo	N	Celo (día ± EE)	n	Ovulación (día ± EE)	Cl nuevo Dia 13
Pg n=19	12/19 (63,1%)	8,0±1,1	13/19 ^a (68,4%)	10,3±1,1	13/19 ^a (68,4%)
GnRH n=19	12/19 (63,1%)	7,6±0,4	18/19 ^b (94,7%)	9,1±0,18	18/19 ^b (94,7%)

^{ab}Porcentajes en la misma columna con superíndices distintos difieren significativamente ($P<0,05$)

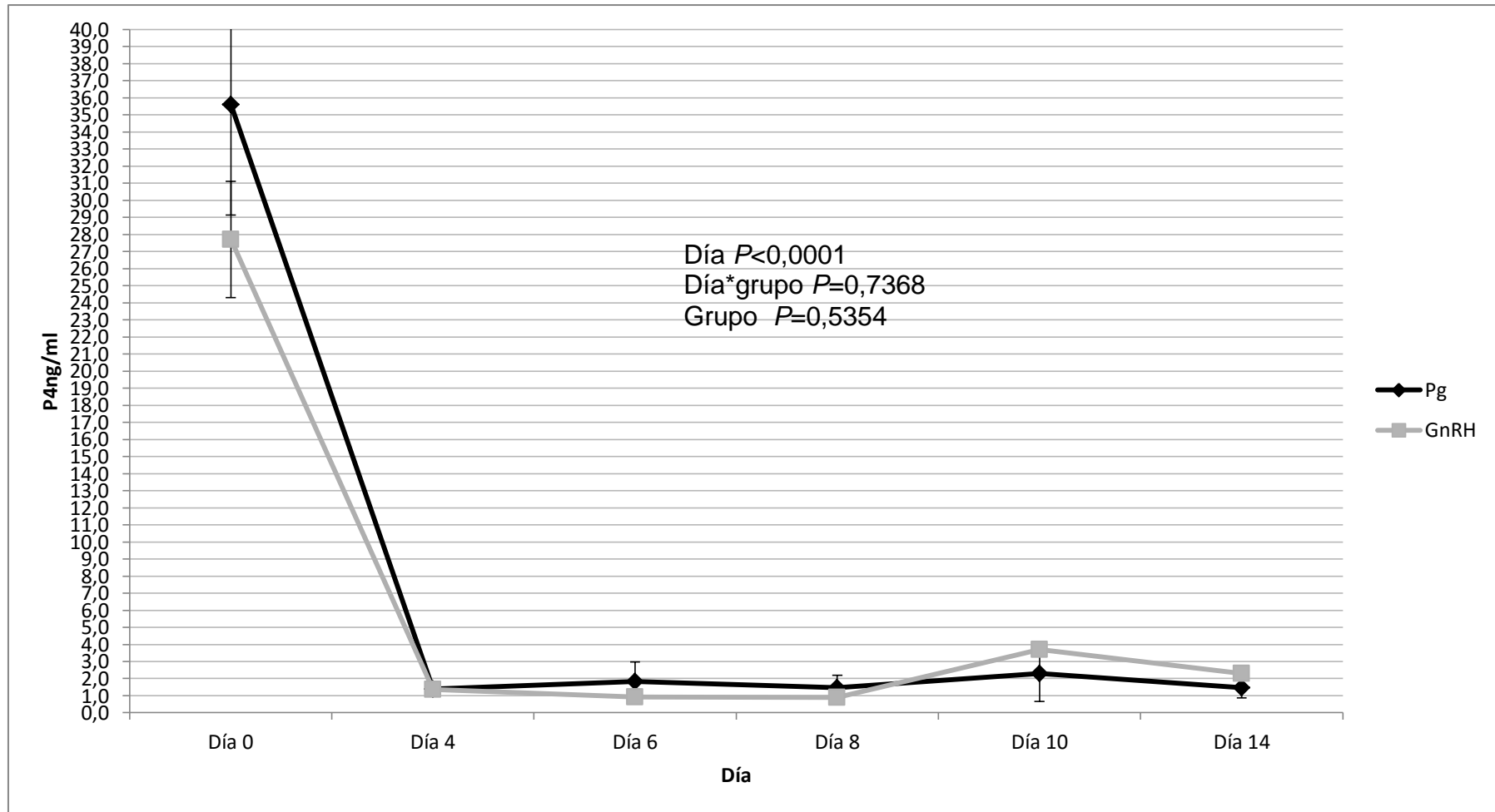


Figura 3.4. Curva de concentración plasmática de progesterona en respuesta a la administración de una o dos inyecciones de 500 µg de Cloprostenol Sódico en el experimento 4 (media±EE).

Análisis conjunto de las vacas tratadas con PGF (sin GnRH) en los experimentos 1, 2, 3 y 4.

Momento de la Ovulación

Se realizó un análisis tomando los datos de todas las vacas ovuladas que se usaron en los distintos experimentos (n=124 vacas) y se dividieron en dos grupos, vacas con trece días de intervalo entre colecta e inicio de nuevo tratamiento y vacas con 19 días intervalo (Tabla 3.9.), encontrándose que el porcentaje de vacas ovuladas a los 13 días de la colecta (68,3%) fue menor ($P=0,0460$) que las vacas con 19 días (83,6%).

Tabla 3.9. Comparación de porcentaje de ovulación entre trece y diecinueve días.

Días	N	Ovulación
13 días	63	43/63 ^a (68,3%)
19 días	61	51/61 ^b (83,6%)

^{ab} Los porcentajes difieren significativamente ($P<0,05$).

Tiempo de ovulación según la cantidad de CL

También teniendo en cuenta los hallazgos vistos en el experimento 1 en donde se evidencio una correlación positiva entre la cantidad de CLs en el momento de la colecta y el día promedio de ovulación, se decidió analizar nuevamente esta variable con el total de las vacas ovuladas que se usaron en todos los experimentos (n=88 vacas) en la cual se siguió evidenciando la misma correlación positiva (Tabla 3.10.; $P <0,0001$).

Tabla 3.10. Día promedio de ovulación de acuerdo a la cantidad de CLs de vacas donantes superovuladas tratadas con 1 o 2 dosis de Cloprostenol Sódico en el día de la colecta de embriones (experimentos 1, 2 3 y 4).

Cuerpos Lúteos	N	Ovulación (día ± EE)
1-2	9	6,0 ± 1,0 ^a
3-4	7	7,9 ± 1,1 ^b
5-10	21	10,3 ± 0,5 ^c
11-15	23	10,8 ± 0,4 ^c
>15	28	10,4 ± 0,3 ^c

^{abc} Las medias con diferentes superíndices difieren significativamente ($P < 0,01$)

Al igual que en el experimento 1 se genera una gráfica con el comportamiento de los datos graficados (cantidad de cuerpos lúteos en el momento de la colecta de embriones e intervalo a la ovulación), para los cuales la línea de tendencia que más se ajusta en este caso es de tipo polinomio de tercer grado (Figura 3.5.).

Descenso de la progesterona según la cantidad de CL

Se realizó el análisis de las curvas de progesterona teniendo en cuenta la cantidad de los CLs al momento de la colecta de embriones y las vacas que no disminuyeron las concentraciones plasmáticas de progesterona (Figura 3.6.), para lo cual se dividieron las vacas en 6 grupos. Se observa que hay diferencia entre los grupos ($P=0,00403$), al igual que una interacción día x grupo ($P < 0,0004$). En el Día 0 se observa que a medida que aumenta la cantidad de CLs los niveles de progesterona aumentan en todos los grupos, siendo mayores en las vacas con más de 15 CLs y menores en las vacas de 1-2 CLs (Tabla 3.11.), en los días 4, 10, 13 y 19 se observa que los niveles promedios de progesterona son mayores para el grupo de las vacas que no regresaron los CLs, con respecto a los demás grupos ($P < 0,0475$). Adicionalmente se realizó un análisis de correlación de Person para las variables Cls y concentraciones plasmáticas de progesterona presentes en el momento de la colecta de embriones dando como resultado una correlación de 0,70 ($P < 0,0001$).

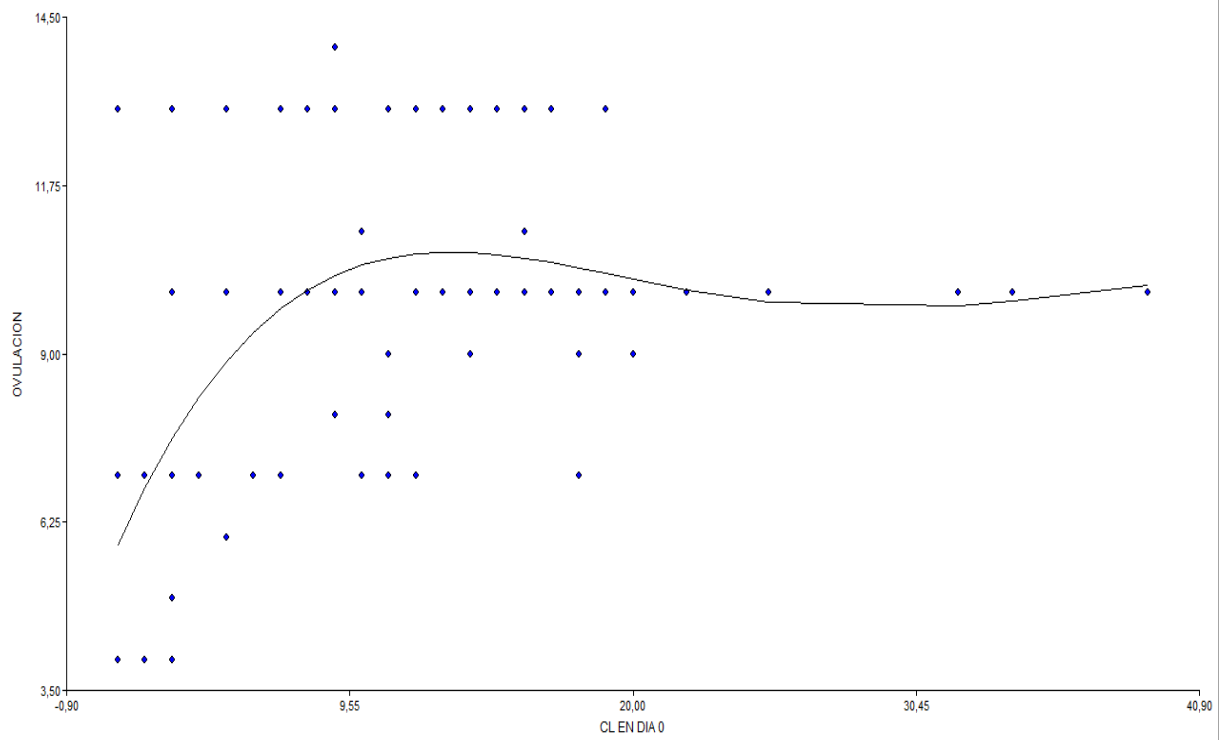


Figura 3.5. Curva cuadrática para retorno a la ovulación de vacas superovuladas, posterior a la aplicación de PGF2 α y cantidad de cuerpos lúteos (CL) al día 0 del tratamiento para todos los datos de la tesis menos el experimento 1.

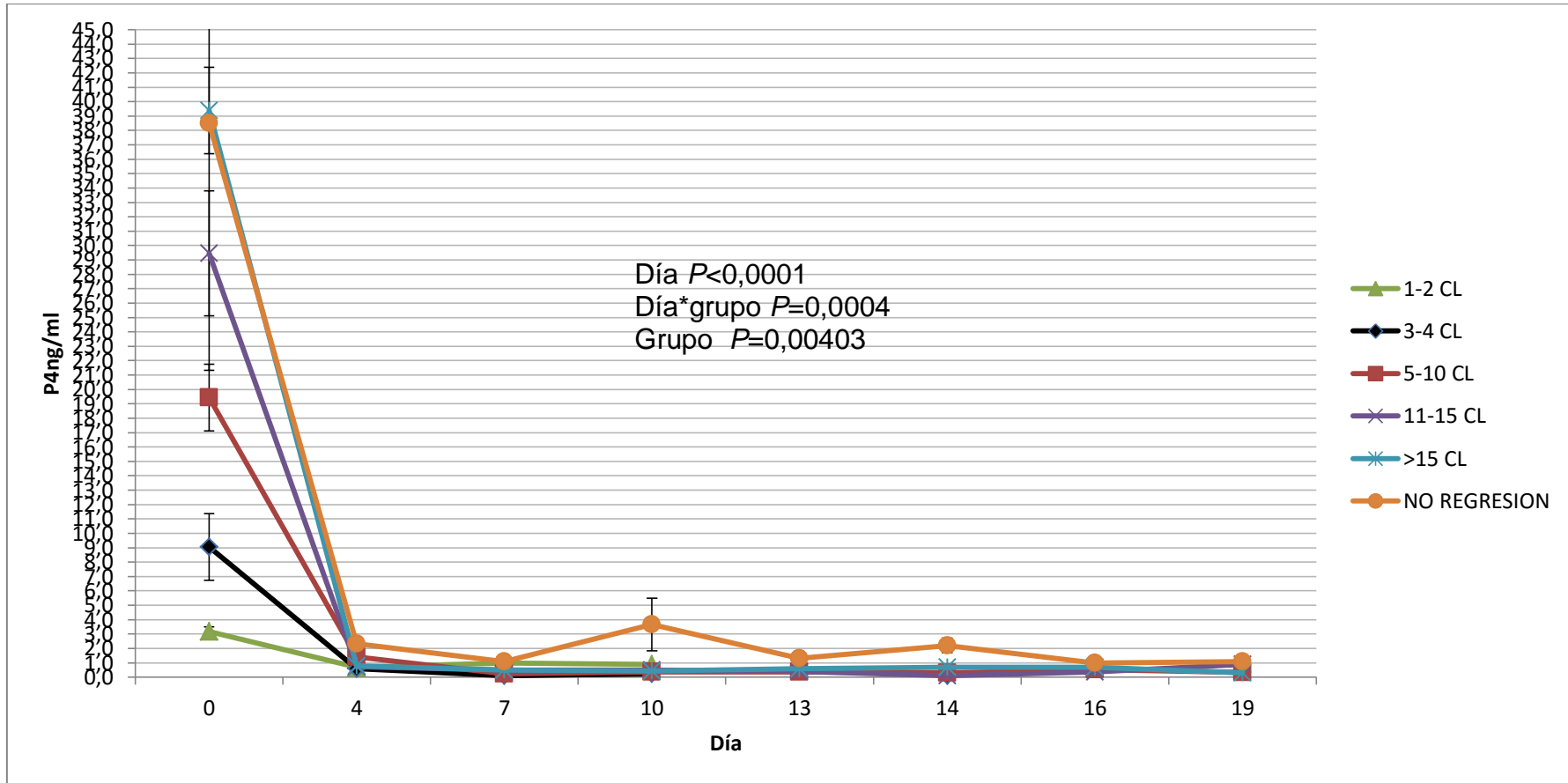


Figura 3.6. Curva de concentración plasmática de progesterona en respuesta a la administración de Cloprostenol Sódico, de acuerdo a la cantidad de CLs en el momento de la colecta de embriones (media±EE).

Tabla 3.11. Concentración plasmática de progesterona, de acuerdo a la cantidad de CLs en el momento de la colecta de embriones y vacas que no regresaron sus CLs (media±EE).

Grupo	n	Día 0	Día 4	Día 10	Día 13	Día 19
1-2 CL	3	3,2 ± 0,3 a	0,7 ± 0,3 a	0,9 ± 0,0 a		
3-4 CL	4	9,1 ± 2,3 ab	0,6 ± 0,2 a	0,3 ± 0,1 a		
5-10 CL	26	19,4 ± 2,3 ab	1,4 ± 0,9 a	0,4 ± 0,1 a	0,4 ± 0,1 a	0,3 ± 0,1 a
11-15 CL	23	29,5 ± 4,4 bc	0,7 ± 0,1 a	0,5 ± 0,1 a	0,4 ± 0,1 a	0,9 ± 0,0 a
>15 CL	36	39,4 ± 3,0 c	0,8 ± 0,1 a	0,4 ± 0,1 a	0,6 ± 0,1 a	0,3 ± 0,0 ab
No regresión	7	38,5 ± 17,6 c	2,3 ± 2,7 b	0,7 ± 1,8 b	1,3 ± 0,0 b	1,1 ± 0,0 b

^{abc} Las medias con diferentes superíndices difieren significativamente (P<0,05)

DISCUSION

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados en esta tesis, no soportan la hipótesis de que la aplicación de dosis repetidas de PGF2 α después de la colección de embriones adelanta la regresión de los CLs, el día promedio de retorno al celo y la ovulación en vacas superovuladas al no encontrarse diferencias significativas para ninguna de dichas variables en los tratamientos en donde se usan PGF2 α en diferentes momentos después de la colecta de embriones.

En el experimento 1, el tiempo transcurrido para la regresión luteal (entendida como el momento cuando un CL tiene un diámetro menor a 10 mm visible a la ultrasonografía transrectal) fue $5,4\pm 0,5$ y $5,3\pm 0,3$ días para los tratamientos Pg 0-7 y Pg 0-1-7, respectivamente. En este caso se encontraron diferencias con el trabajo publicado por Mapletoft *et al.* (1991), quienes reportaron tiempos entre 3,1 y 3,6 días. La diferencia en este parámetro puede deberse a que en el trabajo publicado por Mapletoft *et al.* (1991), la regresión luteal se determinó cuando las concentraciones de progesterona descendieron a niveles menores que 1 ng/mL, por lo que de alguna manera, algunos de los CLs observados en nuestro trabajo pudieron haber sido afuncionales. Kastelic *et al.* (1990) reportaron que el tejido luteal se incrementa de la misma manera que las concentraciones de progesterona durante el crecimiento luteal (días 2, 5 y 8), pero durante la regresión luteal, el tejido regresa más despacio que las concentraciones de progesterona sanguíneas. Sin embargo, los niveles de progesterona fueron menores a 1 ng/mL cuando el CL era menor a 10 mm de diámetro (Kastelic *et al.*, 1990).

Teniendo en cuenta que en la regresión luteal, la media resultante fue entre los días 5,4 y 5,6, la aplicación de una prostaglandina el Día 7 después de la colecta de embriones parecería innecesaria. Por esta razón, se decidió realizar estudios adicionales complementarios con una aplicación doble (Días 0 y 1) y una sencilla (Día 0) para evaluar

la verdadera necesidad de una segunda aplicación de Cloprostenol Sódico sobre las variables evaluadas.

La baja presentación de celos que se dio en el experimento 1 (en donde un número mayor de vacas ovularon con respecto a las vacas que presentaron signos de celo) puede ser explicada por que las vacas con estrés calórico (el experimento se realizó en las estaciones de verano e inicios de otoño en donde las altas temperaturas fueron características) alteran el crecimiento folicular ovárico y su dominancia durante el periodo preovulatorio, lo que genera una función anormal ovárica manifestada por una disminución del pico de estradiol en el proestro (Wilson *et al.*, 1998) y consecuentemente una menor expresión de celos.

A pesar de que en el experimento 2 el día promedio de celo el grupo Pg 0 fue menor ($P = 0,0323$) que el grupo Pg 0-1, siendo de $7,0 \pm 0,7$ días, y $9,7 \pm 0,5$ días respectivamente, esta diferencia desapareció cuando se aumentó el número de vacas en el experimento 3, atribuyéndose esta diferencia al azar y al tamaño de la muestra (Button *et al.*, 2013).

En el experimento 1, cuando se analizaron las vacas que no presentaron celo y no ovularon se encontró que 2/9, y 4/10 vacas en el tratamiento Pg 0-7 y Pg 0-1-7 respectivamente, tuvieron al final del experimento (Día 13) un folículo mayor o igual a 10 mm, posiblemente dominante, en donde se podría generar una ovulación con la formación de un nuevo CL días después de la evaluación. Debido a esto, se decide en el experimento 2, realizar el seguimiento por 19 días, ya que los 13 días esperados serían pocos. Esto quedo en evidencia al evaluar los resultados del análisis en el cual se combinaron todos los experimentos de la tesis, donde se encontró que una mayor cantidad de vacas tuvieron un CL detectado por ultrasonografía a los 19 días que a los 13 días de la colecta de embriones y el primer tratamiento con $PGF2\alpha$.

Al seguirse presentando vacas que no ovulaban, aun en periodos entre tratamiento de 19 días, se decidió realizar el experimento 4, en el cual se administró una dosis de GnRH 8 días después de la colecta de embriones. Se decidió tomar el intervalo de 8 días debido a que según los análisis del experimento 2, se observó que en este día las vacas contaban con

un folículo maduro (9 a 10mm) que probablemente posean la capacidad ovulatoria y pueden responder a la GnRH (Sartori *et al.*, 2001; Silcox *et al.*, 1993), lográndose una tasa de ovulación del 94.7%.

Lograr que las vacas posean un CL funcional cuando se inicia un nuevo protocolo superovulatorio es importante debido a que se logra una alta concentración de progesterona y se demostró que las altas concentraciones de progesterona durante la superestimulación mejora la calidad de los embriones recuperados en el día 7 (Rivera *et al.*, 2011). En este trabajo las vacas fueron superestimuladas con alta progesterona durante la segunda onda folicular, durante la primera onda folicular con baja progesterona, o durante la primera onda folicular con la suplementación de progesterona, utilizando 2 CIDRs para aumentar las concentraciones de esta hormona. Aunque, el número total de ovocitos/embriones que se recogieron no fue diferente entre los grupos, el porcentaje de embriones transferibles era mucho menor para las vacas superestimuladas durante la primera onda folicular (55,9%), que durante la segunda onda folicular (88,5%) o durante la primera onda folicular con la suplementación con progesterona (78,6%). Este resultado es consistente con la noción de que la progesterona elevada durante el crecimiento del folículo pueden permitir la producción de un mejor ovocito para posterior fecundación y el desarrollo embrionario (Rivera *et al.*, 2011). Sin embargo, un estudio reciente mostro que embriones colectados de vacas con ovulaciones simples, que tenían folículos en crecimiento con baja o alta progesterona, no tenían una diferencia en la calidad de los embriones en el día 7 (58,3 vs. 53,3%; Cerri *et al.*, 2011b) pero posteriormente en un estudio complementario (Cerri *et al.*, 2011a) se reportó que las vacas con baja progesterona tenían un aumento de las concentraciones basales de LH, una dinámica folicular alterada y una composición de líquido folicular que podrían alterar la calidad de los ovocitos. Una diferencia particularmente distinta en vacas con baja progesterona fue el desarrollo prematuro de vías que conducen a la secreción de PGF2 α uterina. Así, una función uterina alterada también podría tener un importante papel en la reducción de la fertilidad en las vacas que tienen baja concentraciones de progesterona antes de la inseminación artificial. Otro estudio de evaluación de la calidad de embriones de siete días en vacas con ovulaciones simples y con desarrollo folicular producido en baja vs. alta progesterona, encontró un mayor porcentaje embriones grado 1 y 2 en vacas con alta progesterona, que en baja progesterona antes de la

inseminación artificial (86,5 vs. 61,5%; $P < 0,02$). Por lo tanto, estos resultados son consistentes con la idea de que la baja progesterona durante el crecimiento del folículo reduce la fertilidad y esta disminución de la fertilidad está relacionada con una menor calidad del embrión en el día 7 (Wiltbank *et al.*, 2011).

En este momento no es posible proporcionar una explicación definitiva sobre la razón por la que progesterona alta antes de la inseminación produce una mayor fertilidad. Sin embargo, los efectos de la mejora de la fertilidad son dramáticos y consistentes en vacas lecheras (Inskeep, 2004). Además, los protocolos que aumentan los niveles de progesterona durante el tratamiento de sincronización de celos mejoran significativamente las tasas de preñez en vacas lecheras (Wiltbank *et al.*, 2012; Santos y Bisinotto, 2015). Por lo tanto, los resultados del experimento 4 puede ser una alternativa para aumentar los niveles de progesterona en el momento que se empieza la superestimulación de la onda folicular al tener un CL funcional en este momento. En trabajos realizados en Brasil con donantes Holstein se encontró una mejor calidad embrionaria cuando se usaron dos implantes de norgestomet que cuando se utilizó uno solo (Martins *et al.*, 2012). Además, el aumento de los niveles de progesterona mediante la administración de un dispositivo con 1,9 g de progesterona mejoró significativamente la calidad embrionaria en donantes Nelore superovuladas durante la primera onda folicular (Nasser *et al.*, 2011).

Cuando se unieron los datos de presentación de celo de los grupos Pg 0-1-7, Pg 0-7, Pg 0-1 y Pg 0 (n=86 vacas) se obtuvo un día promedio de presentación de celo de $7,4 \pm 0,18$ días, lo que difiere del resultado encontrado por Halbert *et al.* (1989), quienes mencionaron la aparición de signos de celo entre los días 10 y 18, pero no diferentes a los encontrados por Mapletoft *et al.* (1991) y Desaulniers *et al.* (1990), quienes lo reportaron entre 7,2 y 7,6 días respectivamente, después del tratamiento realizado con $\text{PGF2}\alpha$ a vacas superovuladas. Con respecto a los porcentajes de presentación de signos de celo, los resultados del presente estudio, tuvieron una presentación de celo de 69,4%, y varió desde un 52,3 hasta el 85,7%, resultados similares a los presentados por Mapletoft *et al.* (1991), quienes observaron entre 56% y 88% y a los de Desaulniers *et al.*, (1990), quienes lo hicieron entre 60 y 65%.

En el momento en que se analizaron los datos agrupados por la cantidad de CLs el día de la colecta de embriones, se demuestra que existe diferencia entre las respuestas para la variable ovulación, en donde las vacas con hasta 4 CLs ovulan en un tiempo menor que las vacas con más de 5 CLs. Esta diferencia puede deberse a que el tiempo para restablecer los valores reproductivos hormonales en las vacas con más de 4 CLs es mayor que en vacas con menores cantidades de CLs. Si se administra una dosis de PGF2 α en vacas de ciclos normales el día 8 del ciclo (día 0, celo), las vacas entrarán en celo en promedio entre 48 y 72 h y ovularán en 4 días en promedio. Si el folículo dominante en el momento de la inyección se encuentra en la fase estática tardía o de regresión, el folículo dominante de la próxima onda será el ovulatorio y el animal entrará en celo y ovulará entre 5 y 7 días después (Bó *et al.*, 2007b). En la presente tesis la ovulación se dio en un periodo mayor a 4 días lo cual evidencia que el ciclo estral y el retorno al celo después de un tratamiento con PGF2 α esta alterado en vacas que fueron superovuladas. Esto se puede evidenciar además cuando se realizó el análisis teniendo en cuenta la cantidad de CLs. Las vacas con 1-2 CL se comportaron de manera similar a vacas con ciclos normales, ya que fueron las que ovularon en $6,0 \pm 1,0$ días. Mientras que las que tenían 3-4 CL ovularon a los $7,9 \pm 1,1$ días. Los tiempos de respuesta al tratamiento se ven afectados y aumentados ante una presencia de más de 4 CL, posiblemente debido a que algunos CLs tardan más en regresar y a que aparentemente existe una asociación negativa entre los múltiples CLs y los folículos.

Esto puede deberse a que a pesar de que todos los CL regresan en las vacas tratadas, es claro que se necesita de un tiempo determinado para que la dinámica folicular se restablezca y que de nuevo se genere un folículo preovulatorio, un aumento de estradiol sanguíneo, un pico de LH y una nueva ovulación. Dos estudios realizados (Desaulniers *et al.*, 1990; Lucy *et al.*, 1990) sugieren que las muy altas concentraciones de progesterona pueden generar una retroalimentación negativa sobre la secreción de FSH y el posterior desarrollo folicular, debido a que en vacas con respuestas superovulatorias buenas (mayor a un embrión colectado) 1 o 2 días después de que la progesterona sanguínea empieza a descender (días 11-12 después de la colecta) se observa un aumento de la cantidad de folículos menores a 5 mm de diámetro (Lucy *et al.*, 1990).

Algunos trabajos plantean que la progesterona tiene una relación dosis-dependiente sobre el crecimiento del folículo dominante (Adams *et al.*, 1992), pero que esta relación está más relacionada con el efecto inhibitorio de la progesterona sobre la pulsatilidad de la LH y consecuentemente sobre la selección, dominancia y crecimiento final del folículo dominante ovulatorio (Kulick *et al.*, 1999; Stock y Fortune, 1993). Sin embargo, es posible en el caso de vacas superovuladas que, al ser los niveles de progesterona mayores a los niveles normales de la fase luteal, la supresión de la progesterona sobre la liberación de la GnRH se exprese en una disminución tanto de LH como de FSH. Esta idea puede ser soportada con los datos encontrados en esta tesis, en donde se evidencia que hay una correlación positiva entre la cantidad de CLs y la duración del intervalo a la ovulación. Además la correlación positiva que existe entre la cantidad de CLs que existen en el momento de la colecta de embriones y los niveles de progesterona que poseen estas vacas en el mismo momento y que fueron medidos en esta tesis con un índice alto de correlación de (0,70; $P < 0,0001$).

Por último, si bien no hay diferencia entre aplicar dosis de PGF2 α adicionales a la que se aplica del momento de la colecta de embriones, en las variables día promedio de ovulación, día promedio de celo, ni en las curvas de descenso de la progesterona, se corre el riesgo de que los niveles de progesterona no regresen y que la vaca no pueda retornar rápidamente a un ciclo estral normal, como ocurrió con 7 de las 99 vacas utilizadas en esta tesis. Para el caso eventual de que una donante no responda a la primera inyección de PGF2 α sería beneficiosa la aplicación de una segunda dosis de PGF2 α 24 h después de la aplicación de la primera. En esta tesis las vacas que no regresaron los niveles de progesterona provenían de los grupos en donde solo se les aplicó una sola dosis de PGF2 α .

CONCLUSIONES

La conclusión general de esta tesis es que la aplicación de dosis repetidas de PGF2 α no resulta en una más rápida regresión de los CLs y el retorno al celo y la ovulación que la administración de una sola dosis en el momento de la colecta de embriones de vacas donantes superovuladas.

Las curvas de descenso de las concentraciones de progesterona son similares en vacas superovuladas donde se aplica una dosis de PGF2 α en el día de la colecta de embriones a las vacas que se les adiciona una segunda dosis de PGF2 α 24 h después de la primera.

La cantidad de CLs presentes el día de la colecta de embriones y la administración de PGF2 α influyó el intervalo a la ovulación. Las vacas con hasta 4 CLs ovularon en un tiempo menor que las vacas con 5 o más CLs.

Se encontró que una mayor cantidad de vacas tuvieron un CL detectado por ultrasonografía a los 19 días que a los 13 días después de la colecta de embriones y el primer tratamiento con PGF2 α . De esta manera un intervalo de 19 o 20 días entre la colecta de embriones y el inicio de un nuevo tratamiento superovulatorio, asegura una mayor cantidad de vacas que hayan ovulado y restablecido sus patrones normales de crecimiento folicular antes de iniciarse un nuevo tratamiento superovulatorio.

La administración de GnRH 8 días después la administración de PGF2 α aumentó el porcentaje de vacas donantes con un nuevo CL a los 13 días de la colecta de embriones. Esta práctica puede ser recomendada en el caso de tener necesidad de superovular las vacas con un intervalo corto de tiempo.

BIBLIOGRAFIA

- Acosta T.J., Yoshizawa N., Ohtani M., Miyamoto A. 2002. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F-2 alpha injection in the cow. *Biology of Reproduction* 66: 651-658.
- Adams G.P., Matteri R.L., Ginther O.J. 1992. The effect of progesterone on growth of ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating FSH in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 95: 627-640.
- Anderson L.E., Wu Y.L., Tsai S.J., Wiltbank M.C. 2001. Prostaglandin F-2 alpha receptor in the corpus luteum: recent information on the gene, messenger ribonucleic acid, and protein. *Biology of Reproduction* 64: 1041-1047.
- Anzaldúa S., Villaseñor H., Pérez M. 2008. Variación en la distribución de linfocitos epiteliales e intersticiales en tubas uterinas de la coneja al inicio de la gestación. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 46: 333-344.
- Archbald, L.F., Risco, C., Chavette, P., Constant, S., Tran, T., Klapstein, E., Elliot, J. 1993. Estrus and pregnancy rate of dairy cows given one or two doses of prostaglandin F2 alpha 8 or 24 hours apart. *Theriogenology* 40: 873-884.
- Archbald, L.F., Constant, S., Tran, T., Risco, C., Klapstein, E., Elliott, J. 1994. Effect of sequential treatment with prostaglandin F2 alpha and/or oxytocin on estrus and pregnancy rate of lactating dairy cows. *Theriogenology* 42: 773-780.
- Asprón, M.A. 2004. Curso de actualización-manejo reproductivo del ganado bovino. publicado en internet, disponible en: http://www.ivis.org/continuing_education/short_courses/reproduction_bovine/aspron/es/ivis.pdf. Activo Diciembre 2014.
- Beal W.E. 1996. Application of knowledge about corpus luteum functions in control of estrus and ovulation in cattle. *Theriogenology* 45: 1399-1411.
- Bergfelt D.R., Lightfoot K.C., Adams G.P. 1994. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology* 42: 895-907.
- Bó, G. A., Mapletoft, R. J. 2014. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology* 81: 38-48.

- Bó G.A., Mapletoft R.J., Adams G.P. 2007a. Alternative treatments for superovulation of beef and dairy donor cows. 2007 CETA/ACTE and CLGA, Joint Convention, Summerside Prince Edward Island, Canada; pp 3-20.
- Bó G.A., Cutaia L., Moreno D., Tribulo H.E. 2007b. Sincronización de celos e inseminación artificial. 1a ed. Instituto de Reproducción Animal Córdoba, Córdoba, Argentina. 275 pp.
- Brusveen D. J., Souza A. H., Wiltbank M. C. 2009. Effects of additional prostaglandin F_{2α} and estradiol-17β during Ovsynch in lactating dairy cows. *Journal of dairy science* 92(4), 1412-1422.
- Button K.S., Ioannidis J.P., Mokrysz C., Nosek B.A., Flint J., Robinson E.S., Munafò M.R. 2013. Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience. *Nature reviews. Neuroscience* 14 : 365-76.
- Castro Rendón W.A., Castro Álvarez J.F., Guzmán Martínez C., Bueno-Sanchez J.C. 2006. Blastocyst-endometrium interaction: intertwining a cytokine network. *Braz J Med Biol Res.* 39: 1373-1385.
- Cerri R.L.A., Chebel R.C., Rivera F., Narciso C.D., Oliveira R.A., Amstalden M., Baez-Sandoval G.M., Oliveira L.J., Thatcher W.W., Santos J.E.P. 2011a. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle. II. Ovarian and uterine responses. *Journal of dairy science* 94: 3352-3365.
- Cerri R.L.A., Chebel R.C., Rivera F., Narciso C.D., Oliveira R.A., Thatcher W.W., Santos J.E.P. 2011b. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle. I. Ovarian and embryonic responses. *Journal of dairy science* 94: 3342-3351.
- Cooke R.G., Ahmad N., Nicholson T. 1998. Effect of progesterone and estradiol-17 on oxytocin-induced PGF_{2α} release and endometrial oxytocin receptor concentrations in ovariectomized goats. *Prostaglandins Other Lipid Mediators* 55: 109-120.
- 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.
- Delgado L.A., Amagua J.I., Guzmán F. 2009. Efecto de la dosis de prostaglandina sobre el regreso de los cuerpos lúteos y el retorno al celo en vacas donantes de embriones. Tesis especialidad. Instituto de Reproducción Animal de Córdoba. Córdoba, Argentina. 18 pp.
- Desaulniers D.M., Guay P., Vaillancourt D. 1990. Estrus induction with prostaglandin F_{2α}, cloprostenol or fenprostalene during the normal estrous cycle, superovulation and after embryo collection. *Theriogenology* 34: 667-682.

- Dhaliwal G.S., Murray R.D., Woldehiwet Z. 2001. Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. *Animal Reproduction Science* 67: 135-152.
- Diaz F.J., Luo W., Wiltbank M.C. 2013 Prostaglandin F₂α regulation of mRNA for activating protein 1 transcriptional factors in porcine corpora lutea (CL): lack of induction of JUN and JUND in CL without luteolytic capacity. *Domestic Animal Endocrinology* 44: 98-108.
- Dick A. R. 1990. Studies on the use of the CIDR intravaginal device for reproductive management of the dairy cattle. Tesis de Maestría. Univ. de Massey. Nueva Zelanda. 331 pp.
- Dick, A.R.; Bergonzelli, P.; Rubio, R. 1992. Actualización en manejo reproductivo para mejorar la fertilidad del rodeo lechero. Aportes para mejorar la eficiencia en la detección de celo en vacas en pastoreo y su implicancia económica. Proc. Primer Congreso Nacional de Lechería de Venado Tuerto. Venado Tuerto, Pcia de Santa Fe. Argentina. pp 27-33.
- Diskin Michael G., Sreenan Joseph M., 2000 Expression and detection of oestrus in cattle, *Animal Reprod. Nutr. Dev.* 40: 481-491.
- DuBois J.A., Wordinger R.J., Dickey J.F. 1980. Tissue concentrations of mast cells and lymphocytes of the bovine uterine tube (oviduct) during the estrous cycle. *American journal of veterinary Research.* 41: 806-808.
- Ducrot C., Grohn Y., Bugnard F., Senlis Y., Sulpice P., Gilbert R. 1999. A field study on estrus detection in lactating beef cattle. *Veterinary Research* 30: 87-98.
- Farin C.E., Moeller C.L., Sawyer H.R., Gamboni F., Niswender G.D. 1986. Morphometric analysis of cell types in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. *Biology of Reproduction* 35: 1299-1308.
- Faundez, R., Duszewska, A.M., Klucinski, W., Spohr, I., Sitarska, E., 1994. Occurrence of leukocytes and epithelial cells in the lumen of the reproductive tract during the ovarian cycle. *Proceedings of the 18th World Buiatr. Congress.* Bologna, Italy. pp. 305-308.
- Fitz T.A., Mayan M.H., Sawyer H.R., Niswender G.D. 1982. Characterization of 2 steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. *Biology of Reproduction* 27: 703-711.
- Frank, T., Anderson, K.L., Smith, A.R., Whitmore, H.L., Gustafsson, B.K., 1983. Phagocytosis in the uterus: a review. *Theriogenology* 20: 103-111.
- García Luciano. 2010. Reproducción, Características del ciclo estral. Publicado en internet, disponible en <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-carne/genetica/articulos/reproduccion-caracteristicas-ciclo-estral-t2789/p0.htm>. Activo Noviembre 2013.

- Garcia T.F. y Ocampo. L. A. 1991. Interacción entre los sistemas inmunitario y gonadal. *Ciencia* 42: 155-169.
- Goravanahally M.P., Salem M., Yao J., Inskip E.K., Flores J.A. 2009. Differential gene expression in the bovine corpus luteum during transition from early phase to midphase and its potential role in acquisition of luteolytic sensitivity to prostaglandin F2 alpha. *Biol Reprod.* 80: 980-988.
- Gordon I. 1975. Problems and prospects in cattle egg transfer. *Irish Veterinary Journal* 29: 21-62.
- Grossman, C.J. 1985, interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science* 227: 257-261.
- Guyton A.C., 1991. The lymphatic system. *Textbook of Medical Physiology*, 8th Edition. Saunders, Philadelphia. pp. 180-184.
- Halbert G.W., Leslie K.E., Walton J.S., Betteridge K.J. 1989. Evaluation of return to estrus in superovulated dairy heifers following prostaglandin treatment. *Theriogenology* 31: 201.
- Hasler J.F., McCauley A.D., Schermerhorn E.C., Foote R.H. 1983. Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology* 19: 83-99.
- Hasler J.F. 2014. 40th Anniversary Special Issue Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology* 81: 152-169.
- Hawk, H.W., Turner, G.D., Sykes, J., 1960. The effect of ovarian hormones on the uterine defense mechanism during the early stages of induced infection. *American journal of veterinary research* 21: 644-656.
- Hawk, H.W., Brinfield, T.H., Turner, G.D., Whitmore, G.W., Norcross, M.A. 1964. Effect of ovarian status on induced and inflammatory response in cattle uteri. *American journal of veterinary research* 25: 362-366.
- Hayashi Kanako. 2003. Changes in prostaglandin secretion by the regressing bovine corpus luteum, Prostaglandins other Lipid Mediators 70: 339-349.
- Henricks D.M., Long J.T., Hill J.R., Dickey J.F. 1974. The effect of prostaglandin F2 α during various stages of the oestrous cycle of beef heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 41: 113-120.
- 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.

- Inskeep, E.K. 2004. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *Journal of Animal Science* 82: E24-E39.
- Kafi M., McGowan M.R. 1997. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science* 48: 137-157.
- 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.
- Killingbeck, J., Lamming, G.E. 1963. Influence of uterine secretions on phagocytosis. *Nature* 198: 111-112.
- Kim S., Choi Y., Spencer T., Bazer F.W. 2003. Effects of the estrous cycle, pregnancy and interferon tau on expression of cyclooxygenase two (COX-2) in ovine endometrium. *Reprod. Biol. Endocrinology*. 20: 1-58.
- Klucinski W., Targowski S.P., Miernik-Degorska E., Winnicka A. 1990. The phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes isolated from normal uterus and that with experimentally induced inflammation in cows. *J. Vet. Med. A.* 37: 506-512.
- Knickerbocker J.J., Wiltbank M.C., Niswender G.D. 1988. Mechanisms of luteolysis in domestic livestock. *Domestic Animal Endocrinology* 5:91-107.
- Knopf L., Kastelic J.P., Schallenbeger E., Ginther O.J. 1989. Ovarian follicular dynamics in heifers: Test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Domestic Animal Endocrinology* 6: 111-120.
- Kobayashi S., Miyamoto A., Berisha B., Schams D. 2001. Growth hormone, but not luteinizing hormone, acts with luteal peptides on prostaglandin F₂ and progesterone secretion by bovine corpora lutea in vitro. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 63: 79-92.
- Kulick L.J., Kot K., Wiltbank M.C., Ginther O.J. 1999. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology* 52: 913-921.
- Lei Z.M., Chegini N., Rao C.V. 1991. Quantitative cell composition of human and bovine corpora lutea from various reproductive states. *Biology of Reproduction* 44: 1148-1156.
- Lindell, J.O., Kindahl, H. 1983. Exogenous prostaglandin F₂ promotes uterine involution in the cow. *Acta Veterinaria Scandinavica* 24: 269-274.
- Looney C.R. 1986. Superovulation in beef females. *Proceedings of the 5th Annual Convention of the AETA*. AETA. pp 16-32.

- Lucy M.C., Macmillan K.L., Thatcher W.W., Drost M., Tan H.S. 1990. Effect of timing of prostaglandin PGF₂ α injection subsequent to embryo collection on the resumption of normal follicular development following superovulatory treatment in cattle. *Theriogenology* 34: 7-19.
- Luo W., Diaz F.J., Wiltbank M.C. 2011. Induction of mRNA for chemokines and chemokine receptors by prostaglandin F₂ α is dependent upon stage of the porcine corpus luteum and intraluteal progesterone. *Endocrinology* 152: 2797-2805.
- Macmillan K.L., Curnow R.J. 1977. Tail painting — a simple form of oestrus detection in New Zealand dairy herds, *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* 5(4): 357-361.
- Martins C.M., Rodrigues C.A., Vieira L.M., Mapletoft R.J., Bó G.A., Sá Filho M.F., Baruselli P.S. 2012. The effect of timing of the induction of ovulation on embryo production in superstimulated lactating Holstein cows undergoing fixed-time artificial insemination. *Theriogenology* 78: 974-980.
- Mapletoft, R. J., and Ginther, O. J. 1975. Adequacy of the main uterine vein and the ovarian artery for uterine induced luteolysis in the ewe. *American Journal of Veterinary Research* 36: 957-967
- Mapletoft, R. J., Del Campo, M. R., and Ginther, O. J. 1976. Local venoarterial pathway for uterine induced luteolysis in cows. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 153: 289-294.
- Mapletoft R.J., Bo G.A., Willmott N., Pierson R.A. 1991. The effect of dose of cloprostenol on return to estrus of superovulated donor cows. *Theriogenology* 35: 237.
- McCracken J. A., Carlson J.C., Glew M.E., Goding J.R., Baird D. T., Green K., Samuelsson B. 1972. Prostaglandin F₂ α identified as a luteolytic hormone in sheep. *Nature* 238(83): 129-134.
- McCracken J.A., Schramm W., Okulicz W.C. 1984. Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF₂ from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. *Animal Reproduction Science* 7: 31-55.
- McCracken J.A., Custer E.E., Lamsa J.C. 1999. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiological Reviews* 79: 263-323.
- Medina L. 2012. Cómo maximizar la eficiencia y eficacia en la detección de celo con el uso combinado de pinturas y prostaglandinas en vacas lecheras cíclicas, Tesina de grado, Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional de Centro de la Provincia de Buenos Aires, Buenos Aires Argentina. 32 pp.
- Misra A.K., Pant H.C. 2003. Estrus induction following PGF₂ α treatment in the superovulated buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 59: 1203-1207.

- Miyamoto A., Takemoto K., Acosta T.J., Othani M., Yamada J., Fukui Y. 1998. Comparative activities of growth hormone and luteinizing hormone in the direct stimulation of local release of progesterone from microdialyzed ovine corpora lutea in vivo. *Journal of Reproduction and Development* 44: 273-280.
- Miyamoto A., Shirasuna K., Wijayagunawardane M.P., Watanabe S., Hayashi M., Yamamoto D. 2005. Blood flow: a key regulatory component of corpus luteum function in the cow. *Domestic Animal Endocrinology* 29: 329-339.
- Nakamura T., Sakamoto K. 2001. Reactive oxygen species up-regulates cyclooxygenase-2, p53, and Bax mRNA expression in bovine luteal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 284: 203-210.
- Narita S., Goldblum R.M., Watson C.S., Brooks E.G., Mark Estes D., Curran E.M., Midoro-Horiuti T. 2007. Environmental estrogens induce mast cell degranulation and enhance IgE-mediated release of allergic mediators. *Environmental Health Perspectives* 115: 48-52.
- Nascimento Anibal B., Souza Alexandre H., Keskin A., Sartori R., Wiltbank M. C. 2013. Lack of complete regression of the Day 5 corpus luteum after one or two doses of PGF 2α in nonlactating Holstein cows, *Theriogenology* 81: 389-395.
- Nasser L.F., Sá Filho M. F., Reis E. L., Rezende C. R., Mapletoft R.J., Bó G A, Baruselli P. S. 2011. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 76: 320-327.
- 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. *Physiological Reviews* 80: 1-29.
- Olivera Martha A. 2007. Vías implicadas en la luteólisis bovina. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 20: 387-393.
- Oshea J.D., Rodgers R.J., McCoy K., Docchio M.J. 1990. Ultrastructural cytology of the cyclic corpus luteum of the cow. *Acta Anatomica* 138:154-165.
- Oshea J.D., Rodgers R.J., Docchio M.J. 1989. Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. *Journal of Reproduction and Fertility* 85:483-487.
- Paisley L.G., Mickelsen W.D., Anderson P.B. 1986. Mechanisms and therapy for retained fetal membranes and uterine infections of cows: a review. *Theriogenology* 25: 353-381.
- Pate J.L., Keyes P.L. 2001. Immune cells in the corpus luteum: friends or foes?. *Reproduction* 122: 665-676.

- Pate J.L. 1994. Cellular components involved in luteolysis. *Journal of Animal Science* 72:1884-1890.
- Penny L.A. 2000. Monocyte chemoattractant protein 1 in luteolysis. *Rev. Reprod.* 5:63-66.
- Pérez Martínez M., Luna J., Mena R., Romano M. C. 2003. Lymphocytes and T lymphocytes subsets are regionally distributed in the female goat reproductive tract: influence of the stage of the oestrus cycle. *Research in Veterinary Science* 72: 115-121.
- Pérez M. 2012a. Influencia de los estrógenos y progesterona (ciclo estral) sobre la dinámica migratoria de células del sistema inmune a las mucosas del tracto genital de mamíferos domésticos, Memorias III foro sobre tópicos selectos en producción animal avances en inmunología aplicada en la producción animal. Tulancingo de Bravo, Mexico. pp 7-15.
- Pérez Martín Matías. 2012b. Cómo maximizar la eficiencia y eficacia en la detección de celo con el uso combinado de pinturas y prostaglandinas en vacas lecheras cíclicas. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional de Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. 27pp.
- Peters, A.R., Ball, P.J.H. 1995. *Reproduction in Cattle*, Third Edition. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK. 242pp.
- Rathbone M.J., Kinder J.E., Fike K., Kojima F., Clopton D., Ogle C.R., Bunt C.R. 2001. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. *Advanced Drug Delivery Reviews* 50: 277-320.
- Reyes G.M. 1993. La importancia de la interleucina 6 como mediador de las interacciones neuroendocrina-inmunológicas. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* XXVII: 333-346.
- Reynolds L.P., Killilea S.D., Redmer D.A. 1992. Angiogenesis in the female reproductive system. *FASEB J.* 6: 886-892.
- Reynolds L., Grazul-Bilska A., Redmer D. 2000. Angiogenesis in the corpus luteum. *Endocrine* 12: 1-9.
- Ribeiro E.S., Bisinotto R.S., Favoreto M.G., Martins L.T., Cerri R.L.A., Silvestre F.T., Greco L.F., Thatcher W.W., Santos J. E. P. 2012. Fertility in dairy cows following presynchronization and administering twice the luteolytic dose of prostaglandin F-2 alpha as one or two injections in the 5-day timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* 78: 273-284.
- Rivera F.A, Mendonca L.G.D., Lopes G., Santos J.E.P., Perez R.V., Amstalden M., Correa-Calderon A., Chebel R.C. 2011. Reduced progesterone concentration during

- growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. *Reproduction* 141:333-342.
- Romaniukowa K. 1984. Phagocytosis in the uterus. In: *Proceedings of the 10th International Congress on Animal Reproduction and AI*. Urbana, Champaign, US. pp. 30-33.
- Santos J.E., Bisinotto R.S. 2015 Eficacia de los tratamientos con progesterona en vacas lecheras de alta producción. XI. Simposio internacional de reproducción animal, Córdoba, Argentina. pp. 162-175
- Santos J.E., Narciso C.D., Rivera F., Thatcher W.W., Chebel R.C. 2010. Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed artificial insemination protocol on reproduction of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93: 2976 -88.
- Sartori R., Fricke Paul M., Ferreira João C.P., Ginther O.J. and Wiltbank Milo C. 2001, Follicular Deviation and Acquisition of Ovulatory Capacity in Bovine Follicles, *Biology of Reproduction* 65: 1403-1409.
- Sawyer H.R., Abel J.H., McClellan M.C., Schmitz M., Niswender G.D. 1979. Secretory granules and progesterone secretion by ovine corpora lutea in vitro. *Endocrinology* 104:476-486.
- Schallenberger E., Schams D., Bullermann B., Walters D. 1984. Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during prostaglandin-induced regression of the corpus luteum in the cow. *Journal of Reproduction and Fertility* 71: 493-501.
- Schams D., Berisha B. 2004. Regulation of corpus luteum function in cattle: an overview. *Reproduction in Domestic Animals* 39:241-251.
- Silcox R.W., Powell K.L., Kiser T.E. 1993. Ability of dominant follicles (DF) to respond to exogenous GnRH administration is dependent on their stage of development. *Journal of Animal Science* 71(1): 219.
- Skarzynski D.J., Skarzynski G, Ferreira-Dias, and Okuda K. 2008. Regulation of Luteal Function and Corpus Luteum Regression in Cows: Hormonal Control, Immune Mechanisms and Intercellular Communication. *Reproduction in Domestic Animals* 43 (2): 57–65.
- Smith M.F., McIntush E.W., Smith G.W. 1994. Mechanisms associate with corpus luteum development. *Journal of Animal Science* 72: 1857-1872.
- Stock A.E., Fortune J.E. 1993. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology* 132: 1108-1114.

- Tsai S.J., Juengel J.L., Wiltbank M.C. 1997. Hormonal regulation of monocyte chemoattractant protein-1 messenger ribonucleic acid expression in corpora lutea. *Endocrinology* 138: 4517-4520.
- Tsai S.J., Wiltbank M.C. 1998. Prostaglandin F2 α regulates distinct physiological changes in early and mid-cycle bovine corpora lutea. *Biology of Reproduction* 58: 346-352.
- Tsai S.J., Wiltbank M.C. 2001. Differential effects of prostaglandin F-2 α on in vitro luteinized bovine granulosa cells. *Reproduction* 122: 245-253.
- Vandeplasse M., Bouters, R. 1976. Puerperal metritis in the bovine. *Proceedings of the 4th International Congress on Animal Reproduction and AI. Krakow. Poland.* pp. 660-666.
- Vandeplasse M. 1984. Stimulation and inhibition of phagocytosis in domestic animals. *Proceedings of the 10th International Congress on Animal Reproduction and AI. Urbana, Champaign, US. III.* pp. 475-477.
- Wilson S.J., Marion R.S., Spain J.N., Spiers D.E., Keisler D.H., Lucy M.C. 1998. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1 Lactating cows. *Journal of Dairy Science* 81: 2124-2131.
- Wiltbank M.C., Shiao T.F., Bergfelt D.R., Ginther O.J. 1995. Prostaglandin-F2- α receptors in the early bovine corpus-luteum. *Biology of Reproduction* 52: 74-78.
- Wiltbank M. C., Souza A. H., Carvalho P. D., Bender R.W., Nascimento A.B. 2011. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. *Reproduction, Fertility and Development* 24(1): 238-243.
- Wiltbank M.C., Souza A.H., Giordano J.O., Nascimento A.B., Vasconcelos J.M., Pereira M.H.C., Fricke P.M., Surjus R.S., Zinsly F.C.S., Carvalho P.D., Bender R.W., Sartori, R. 2012. Positive and negative effects of progesterone during timed AI protocols in lactating dairy cattle. *Anim. Reprod.* 9(3): 231-241.
- Wiltbank M.C., Baez G.M., Cochrane F., Barletta R.V., Trayford, C.R., Joseph R.T. 2015. Effect of a second treatment with prostaglandin F2 α during the Ovsynch protocol on luteolysis and pregnancy in dairy cows. *Journal of dairy science* 98 (12): 8644-8654
- Wiltbank M.C. 1994. Cell-types and hormonal mechanisms associated with mid-cycle corpus-luteum function. *Journal of Animal Science* 72: 1873-1883.
- Wolfenson D., Thatcher W.W., Drost M., Caton D., Foster D.B., LeBlanc M.M. 1985. Characteristics of prostaglandin F measurements in the ovarian circulation during the oestrous cycle and early pregnancy in the cow. *Journal of Reproduction and Fertility.* 75:491-499.

- Zalman Y., Klipper E., Farberov S., Mondal M., Wee G., Folger K., et al. 2012. Regulation of angiogenesis-related prostaglandin F₂α-induced genes in the bovine corpus luteum. *Biology of Reproduction* 86: 1-10.
- Zheng J., Fricke P.M., Reynolds L.P., Redmer D.A. 1994. Evaluation of growth, cell proliferation, and cell death in bovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Biology of Reproduction* 51: 623-632.
- Zheng J., Redmer D.A., Reynolds L.P. 1993. Vascular development and heparin-binding growth factors in the bovine corpus luteum at several stages of the estrous cycle. *Biology of Reproduction* 49: 1177-1189.