



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

EFECTO DE LA PROLONGACIÓN DEL PROESTRO EN PROTOCOLOS DE IATF SOBRE LA DINÁMICA OVÁRICA Y LA FERTILIDAD EN VAQUILLONAS (*BOS TAURUS*)

Juan Manuel Rodríguez Pérsico

Tesis

Para optar al Grado Académico de
Magister en Reproducción Bovina

Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela para Graduados
Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC)

Córdoba, Noviembre 2017

**EFECTO DE LA PROLONGACIÓN DEL PROESTRO EN
PROTOCOLOS DE IATF SOBRE LA DINÁMICA OVÁRICA Y LA
FERTILIDAD EN VAQUILLONAS (*BOS TAURUS*)**

Juan Manuel Rodríguez Pérsico

Comisión Asesora de Tesis

Director: Med. Vet., M.Sc., Ph.D. Santiago S. Callejas

Co-director: Med. Vet., M.Sc., Ph.D. Gabriel A. Bó

Tribunal Examinador de Tesis

1 Med. Vet. M.Sc. Jorge A. Carcedo

2 Med. Vet. Dr. Andrés Tríbulo

3 Med. Vet. Dr. Pablo Marini

Presentación formal académica

Córdoba, 15 de Noviembre de 2017

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer profundamente al Dr. Santiago Callejas, quien desinteresadamente me brindo todo el soporte técnico y compartió todos sus conocimientos a lo largo de estos años. Fue mi director de tesis pero se convirtió en un gran amigo.

También quiero agradecer a mi co-director de tesis, el Dr. Gabriel Bó, que me apoyó técnicamente y sus aportes son siempre significativos e invaluable.

Mi agradecimiento eterno irá a mi gran amigo y colega, Guillermo Esperanza, con quien compartí infinidad de experiencias y fue, sin dudas, uno de los pilares más importantes para poder realizar esta tesis. Sin él, esta tesis no habría sido una realidad.

Un agradecimiento especial a mi amigo y colega Matías Berengua y a su madre “La Tuti” (Susana) quienes me abrieron las puertas de su casa en Germania y me recibieron siempre como a uno más de la familia durante dos experimentos y muchas otras veces.

A Agustín y Marcelo Aragón de Estancia La Montonera por haberme abierto las tranqueras del campo y la puerta de su casa para poder hacer el experimento más desafiante (la dinámica). A Matías Bustillo de Estancia San Fermín, por haberme facilitado absolutamente todo, durante dos temporadas, y a todo el personal del campo que siempre se mostraron predisuestos.

A mi amigo y colega Juan Pablo Caride que siempre me apoya y me dio una gran mano para uno de los Experimentos, pero que siempre está a disposición y compartimos muchas más cosas, de trabajo y de la vida.

También al colega y compañero Martín Garriz, uno de los veterinarios de la Chacra Experimental Manantiales, que me ayudó durante otro de los estudios.

Al Dr. Alejandro Ham quien fuera mi jefe en Biogénesis Bagó y que luego se convertiría en un gran amigo. Él fue quien hizo más fuerza en los inicios allá por 2013 para empezar a transitar este camino.

A mis grandes amigos y colegas, fanáticos de la reproducción, con quienes hemos compartido horas y días enteros hablando del tema y de los cuales he aprendido muchas cosas técnicas, profesionales y de la vida; y que de alguna forma u otra han colaborado en el transcurso de esta tesis: Javier de la Mata, Santiago Perez Wallace y los ya mencionados Guillermo y Juan Pablo.

Al laboratorio Biogénesis Bagó que me ha apoyado desde diversos puntos de vista para realizar los experimentos y cursar. Y también ser parte activa de mi formación a lo largo de estos últimos años.

A muchos otros que sin saberlo también han hecho sus aportes para poder seguir adelante con el desarrollo de los estudios o bien con la tesis.

Finalmente a mis amigos y a mi familia, que sin tener nada que ver con lo agropecuario, nunca dudaron en respaldar mi decisión de ir por el camino de la medicina veterinaria y mucho más aún el de la reproducción.

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis a mi familia.

A mi madre Graciela, a mi Padre Oscar y a María del Pilar quienes me han apoyado incondicionalmente y brindado todo lo que estuvo a su alcance. Hoy soy quien soy gracias a ellos.

A Camilo, mi sobrino y a mi hermano Facundo con quien tenemos un vínculo de unión muy fuerte y compartimos y nos apoyamos en todo.

A mi tía Adriana, quien fomentó en mi vida el interés por la investigación y fue gran responsable del inicio de este proyecto.

Finalmente, quiero dedicar especialmente esta tesis a mi esposa Ana, quien me brinda su apoyo absoluto y en quien he sentido el respaldo necesario para completar la desafiante tarea de finalizar este proyecto. Es mi contención diaria y quien me llena el alma. Es mi gran compañera de aventuras, sin importar dónde.

RESUMEN

Esta tesis tuvo como objetivo evaluar el efecto de incrementar la duración del proestro en protocolos de IATF, basados exclusivamente en estradiol y progesterona, sobre la performance reproductiva de vaquillonas *Bos taurus* de razas carniceras. Se realizaron cuatro experimentos donde se evaluaron diferentes combinaciones de prolongación del proestro: 6 o 7 días de tratamiento con un dispositivo intravaginal con progesterona e inducción de ovulación a 24, 36 o 48 h luego del retiro del mismo. Se evaluó la dinámica folicular, características luteales, concentración de progesterona y tasa de preñez. En el Experimento I se demostró que todas las combinaciones lograron incrementar entre 11,3 a 19,1 h la duración del proestro respecto al protocolo Convencional (7 días con BE 24 h) que fue de $67,5 \pm 7,7$ h ($P < 0,05$). No se encontraron diferencias en el diámetro del folículo dominante preovulatorio, ni en la tasa de crecimiento diario, ni en la tasa de ovulación. Sin embargo, incrementar el tiempo hasta la aplicación del inductor de ovulación tendió a aumentar la dispersión de las ovulaciones ($P < 0,1$). Por otro lado, tampoco hubo diferencia en el tamaño del CL ni la concentración de progesterona. Las tasas de preñez fueron evaluadas en el Experimento II siendo que sólo la combinación de 6 días y BE a las 36 h (6D36EB) obtuvo similar resultado (62,3%) al protocolo Convencional (7D24 = 68,4%; $P > 0,1$). Para el Experimento III se realizaron 3 réplicas donde se evaluó la tasa de preñez de la combinación 6D36EB frente a un protocolo convencional de 7 días pero utilizando CPE como inductor de ovulación al retiro del dispositivo. Los resultados fueron similares y no difirieron entre tratamientos (6D36EB = 55,2% vs. 7D ECP = 54,3%; $P = 0,5$). Finalmente, en el Experimento IV se evaluó el efecto de inducir la ovulación con BE (6D36EB) o GnRH a las 72 h (J-Synch) o la combinación de ambos (6D36EB+GnRH72). La tasa de preñez entre J-Synch, 6D36EB y 6D36EB + GnRH72 fue similar en aquellos animales que tenían un CL al inicio del protocolo (54,5%, 50,9% y 49,1%, respectivamente), mientras que fue mayor ($P < 0,05$) en los que no sólo tenían folículos (72,3%, 46,8% y 43,5%, respectivamente). En conclusión, fue posible incrementar la duración del proestro mediante diferentes estrategias, utilizando exclusivamente estradiol y progesterona, pero no fue posible aumentar la tasa de preñez a la IATF en vaquillonas.

Palabras clave: Proestro, Ovulación, Estradiol, Progesterona, Inseminación Artificial.

ABSTRACT

The aim of this thesis was to evaluate the effect of prolonging the proestrous length during estradiol and progesterone-based fixed-time artificial insemination protocols on reproductive performance in *Bos taurus* beef heifers. Four experiments were carried on to compare different strategies of proestrous prolonging: treatment with an intravaginal progesterone insert for 6 or 7 days and induction of ovulation with EB at 24, 36 or 48 h from removal. Follicular dynamic, luteal characteristics, progesterone concentration and pregnancy rate were evaluated. During Experiment I it was demonstrated that it was possible for all combinations to prolong the proestrous for 11,3 to 19,1 h compared to the Conventional protocol (7 days with EB 24 h) which resulted in $67,5 \pm 7,7$ h ($P < 0,05$). No differences were founded between protocols for dominant follicle diameter at ovulation, daily follicular growth rate and ovulation rate. However, distribution of ovulation tended ($P < 0,01$) to be more dispersed in groups that received the inductor of ovulation later. There were not differences among groups for CL diameter and progesterone concentration. In Experiment II pregnancy rates were evaluated and just group 6D36EB (6 days and EB at 36 h of removal) obtained similar results (62,3%) than Conventional protocol (7D24 = 68,4%; $P > 0,1$). Three replicates were done for Experiment III in order to evaluate pregnancy rates of 6D36EB compared to a Conventional protocol which uses ECP as inductor of ovulation at insert removal. Results were similar between treatments (6D36EB = 55,2% vs. 7D ECP = 54,3%; $P = 0,5$). Finally, Experiment IV evaluated the effect of inducing ovulation with EB at 36 h (6D36EB) or GnRH at 72 h (J-Synch) or combination of both (6D36EB+GnRH72). Pregnancy rate between J-Synch, 6D36EB y 6D36EB+GnRH72 was similar in those animal which had had a CL at the beginning of the protocol (54,5%, 50,9% y 49,1%, respectively), but was greater ($P < 0,05$) in those which had had just follicles ≥ 10 mm (72,3%, 46,8% y 43,5%, respectively). In conclusion, it was possible to prolong the proestrous length during a fixed-time artificial insemination protocol but it was no possible to enhance pregnancy rate in beef heifers.

Key words: Proestrous, Ovulation, Estradiol, Progesterone, Artificial Insemination

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo 1.

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| Fisiología del ciclo estral en la hembra bovina..... | 2 |
| Impacto y uso de los programas de inseminación artificial a tiempo fijo | 3 |
| <i>Programas de IATF basados en estradiol y progesterona</i> | 3 |
| <i>Programas de IATF basados en GnRH y Prostaglandina</i> | 5 |
| Madurez fisiológica del folículo (ovocito) y fertilidad | 5 |
| Prolongación del proestro | 7 |
| Programa Co-Synch de 5 días | 8 |
| Programa J-Synch | 9 |
| HIPÓTESIS GENERAL | 12 |
| OBJETIVO GENERAL | 12 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 12 |

Capítulo 2.

| | |
|-----------------------------------|----|
| MATERIALES Y MÉTODOS | 13 |
| Animales e instalaciones | 13 |
| Experimento I | 14 |
| Experimento II | 16 |
| Experimento III | 18 |
| Experimento IV | 20 |
| Ultrasonografías | 22 |
| <i>Parámetros ováricos</i> | 23 |
| Condición Corporal | 24 |

| | |
|--|----|
| Colecta de muestras de sangre y determinaciones hormonales | 24 |
| Descongelado del semen | 25 |
| Análisis estadístico | 25 |
| Capítulo 3. | |
| RESULTADOS | 26 |
| Experimento I | 26 |
| Experimento II | 29 |
| Experimento III | 30 |
| Experimento IV | 31 |
| Capítulo 4. | |
| DISCUSIÓN | 32 |
| Capítulo 5. | |
| CONCLUSIONES | 46 |
| Capítulo 6. | |
| BIBLIOGRAFÍA | 47 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|-----------|
| Tabla 3.1. Respuesta ovárica (Media \pm E.E.) en vaquillonas cíclicas sometidas a diferentes tiempos de permanencia del dispositivo intravaginal e inducidas a ovular a diferentes horarios en el Experimento I | 27 |
| Tabla 3.2. Tasa de preñez a la IATF para vaquillonas tratadas con diferentes protocolos de sincronización en el Experimento II | 30 |
| Tabla 3.3. Tasa de preñez a la IATF para vaquillonas tratadas con dos protocolos de sincronización diferentes en el Experimento III | 30 |
| Tabla 3.4. Tasa de preñez a la IATF para vaquillonas tratadas con diferentes protocolos de sincronización y con diferentes estructuras ováricas presentes al inicio de los mismos en el Experimento IV | 31 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 2.1. Esquema del diseño experimental del Experimento I | 15 |
| Figura 2.2. Esquema del diseño experimental del Experimento II | 17 |
| Figura 2.3. Esquema del diseño experimental del Experimento III | 19 |
| Figura 2.4. Esquema del diseño experimental del Experimento IV | 21 |
| Figura 3.1. Intervalo de tiempo (h) desde el retiro del DISP hasta la ovulación con los diferentes tratamientos para los animales del Experimento I | 28 |
| Figura 3.2. Distribución de las ovulaciones luego de la sincronización con los diferentes tratamientos para los animales del el Experimento I. Tiempo en horas (h) desde el retiro de los dispositivos intravaginales con P4 | 29 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------|--------------------------------------|
| °C | grados Celsius |
| µg | Microgramos |
| ANOVA | Análisis de Varianza |
| BE o EB | Benzoato de estradiol |
| CC | Condición Corporal |
| CL | Cuerpo Lúteo |
| CPE | Cipionato de estradiol |
| D | Días |
| DISP | Dispositivo intravaginal |
| E.E. | Error Estándar de la Media |
| E2 | Estradiol |
| eCG | Gonadotrofina coriónica equina |
| EO | Estructura Ovárica |
| Exp. | Experimento |
| FD | Folículo Dominante |
| FDA | Food and Drug Administration |
| Fol. | Folículos |
| FSH | Hormona folículo estimulante |
| g | Gramos |
| GnRH | Hormona liberadora de gonadotrofinas |
| h | Horas |
| i.m. | Intramuscular |
| IA | Inseminación Artificial |

| | |
|--|--|
| IATF | Inseminación Artificial a Tiempo Fijo |
| IFN- τ | Interferón tau |
| LH | Hormona Luteinizante |
| mg | Miligramos |
| MHz | Mega Hertz |
| mL | Militros |
| mm | Milímetros |
| mm ² | Milímetros cuadrados |
| N ₂ | Nitrógeno |
| ng | Nanogramos |
| Ovul. | Ovulación |
| P ₄ | Progesterona |
| PG o PGF _{2α} | Prostaglandina F _{2α} |
| RCF | Relative Centrifugal Force |
| RIA | Radioinmunoensayo |
| UI | Unidades Internacionales |
| US | Ultrasonografía |

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La Inseminación Artificial (IA) es una de las técnicas más importantes y efectivas para el mejoramiento genético-productivo de los bovinos (Cutaia et al., 2003). Uno de los mayores beneficios consiste en el acceso a individuos (toros) de elevado mérito genético. Otras ventajas frecuentemente reconocidas son: la facilidad para los cruzamientos, el aumento de la prole de un reproductor y, particularmente en hembras jóvenes, más precisamente de alrededor de 15 meses de edad, la utilización de toros seleccionados para bajo peso al nacer (Patterson et al., 2000). Este último es de gran impacto ya que, además de la incorporación de genética, se reduce significativamente las tasas de partos distócicos, ahorrando tiempo e inversión en tratamientos (Short et al., 1990; Patterson et al., 2000).

Sin embargo, la necesidad de detectar el celo para realizar la IA, complica su practicidad, requiriendo una significativa inversión en tiempo y recursos humanos, con frecuentes errores, comprometiendo la eficiencia de la misma. Para evitar la necesidad de detectar celo, fueron desarrollados programas de sincronización de celos e inseminación artificial a tiempo fijo (IATF; Bó et al., 2002a, 2002b). Estos permiten iniciar la sincronización del ciclo estral de los animales, sin tener en cuenta el día en que se encuentren. Al finalizar el tratamiento, es posible realizar una IA en un número elevado de animales en un breve lapso de tiempo.

Dicho objetivo es el culmen de una secuencia de hallazgos científicos históricos, alcanzado sólo después de haber profundizado los primeros estudios sobre cambios morfológicos en los ovarios y los primeros indicios de ondas foliculares (Rajakoski, 1960); haber incorporado la ultrasonografía al estudio de las ondas foliculares para comprender en profundidad el comportamiento de la dinámica ovárica (Savio et al., 1988; Sirois and Fortune,

1988; Ginther et al., 1989a y 1989b); y finalmente, disponer comercialmente de las hormonas involucradas en la regulación del ciclo estral. La combinación de todo ese conocimiento fue determinante para la creación de programas que permitieran manejar y controlar el ciclo estral en las hembras bovinas, sincronizando no solo el surgimiento de una nueva onda folicular, sino también la ovulación de un ovocito fértil, para ser recibido y alojado en un útero preparado para mantener la gestación (Perry et al., 2005; Mussard et al., 2007; Lonergan et al. 2013).

Fisiología del ciclo estral en la hembra bovina

Varios autores han realizado revisiones focalizadas en la fisiología del ciclo estral en bovinos (Evans, 2003; Callejas, 2004 y 2005; Adams et al., 2008; Forde et al., 2011a). La duración del ciclo estral en los bovinos se ubica alrededor de 17 a 25 días y está regulado por el eje hipotálamo – hipófisis – ovario – útero (Callejas, 2004). A su vez, está influenciado por la cantidad de ondas foliculares. La mayoría de las hembras bovinas tienen entre 2 y 3 (Savio et al., 1988), pudiendo variar por la edad y la raza (Ginther et al., 1989a; Bó et al., 2003; Noseir, 2003), donde las razas indicas pueden tener hasta 4 ondas (Bó et al., 2003; Sartori et al., 2004). Las diferentes fases del desarrollo folicular (emergencia, selección, desviación, dominancia y ovulación; ésta última sólo para el folículo de la última onda del ciclo) están dirigidas por gonadotrofinas y otras hormonas provenientes de la adenohipófisis.

El ciclo estral por su parte, posee cuatro etapas bien definidas (Peter et al., 2009), aunque permiten agruparlas en dos más significativas: la fase folicular, siendo la más corta y que incluye el proestro (aproximadamente 2 días de duración) y el estro [variando entre 2 y 24 h de duración (Callejas, 2004)]; y la fase luteal, que prosigue a la anterior y es de mayor duración e incluye el metaestro (correspondiente a los primeros 5 días pos-ovulación) y al diestro (aproximadamente 13 días de duración). Inmediatamente luego de la ovulación, comienza la primera de las dos etapas del ciclo estral que encierra la fase luteal, el metaestro. Durante la misma, se luteinizan las células que formaban el folículo dominante ovulado, para dar formación al cuerpo lúteo (CL). Al cabo del 5° día, se encuentra un CL maduro que produce niveles crecientes de progesterona (P4), dando inicio a la etapa del diestro (Peter et

al., 2009). Con el inicio de la regresión del CL funcional, del ciclo estral en curso, comienza la fase folicular, siendo el proestro la primera de las dos etapas que la conforman. El proestro se caracteriza con un creciente nivel de estradiol (E2) circulante en sangre, proveniente del folículo que a esas alturas ya ejerce su dominancia, y un bajo nivel de P4. Finalmente, sobreviene la segunda etapa de la fase folicular y última del ciclo estral, el estro. Caracterizado por un muy elevado nivel circulante de E2, que dispara el comportamiento de celo del animal, y finaliza con la ovulación del folículo dominante (Peter et al., 2009), el cual ocurre en el día 1 del metaestro.

Impacto y uso de los programas de inseminación artificial a tiempo fijo

En Argentina y la región son de elección los tratamientos que combinan una fuente de P4 (dispositivos intravaginales de liberación lenta de P4: DISP) y el uso de diferentes sales de E2 para controlar el ciclo estral de la hembra bovina y permitir la implementación de programas de IATF, siendo mayoritariamente utilizados en los rodeos de cría (Bó et al., 2013), aunque son perfectamente aplicables a vacas lecheras (Bó et al., 2008). A diferencia de nuestra región, en Estados Unidos, el uso del E2 está prohibido por la Food and Drug Administration (FDA) para su empleo en reproductores, por lo que existe una gran variedad de protocolos que combinan el uso de análogos de la Hormona Liberadora de Gonadotrofinas (GnRH) y prostaglandina F2 α (PG; Bridges et al., 2008b), combinado o no con un DISP (Lamb et al., 2001), para la sincronización del ciclo estral en vacas con cría y lecheras.

- **Programas de IATF basados en estradiol y progesterona**

Estos protocolos incorporan el uso de un DISP y, generalmente, dos aplicaciones de E2 (Bó et al, 2013). Bó et al. (1994) sugirieron que la administración conjunta de P4 y E2 tiene un efecto aditivo sobre la secreción de las gonadotrofinas, permitiendo manipular con precisión la dinámica ovárica. Siendo así, la primer dosis de E2 administrada en conjunto con la aplicación del DISP, tiene por objetivo disminuir por un lado, la secreción de FSH, y por el otro, la amplitud de los pulsos de LH, frenando la producción de estradiol en el folículo dominante, para finalmente atresarse (Diskin et al, 2002; Callejas, 2005). Esta situación es

seguida de un aumento de la FSH la cual reclutará una nueva onda folicular. La emergencia de la misma, posterior a la aplicación del BE, se produce alrededor de los 4 días (Moreno et al., 2001; de la Mata y Bó, 2012), siendo que Sá Filho et al. (2011a) informan 2,5 días para vacas y vaquillonas índicas. Bó et al. (1994, 1995) informaron sobre la emergencia de la nueva onda folicular a los 4,2 y 4,3 días posteriores a la aplicación de 17β estradiol, en vacas y vaquillonas, mientras que Martínez et al. (2000) indicaba 3,4 días.

La segunda aplicación de E2, administrada al momento de retirar los DISP y aplicar un agente luteolítico (fin del diestro; inicio del proestro) tiene como objetivo la inducción de la ovulación del folículo dominante (Callejas, 2005). El mecanismo de acción para tal fin se basa en que, frente a la ausencia de P4 y los elevados niveles de E2 (sumados los endógenos, provenientes del folículo dominante, más los exógenos de la sal de E2 inyectada) impactan sobre el hipotálamo, alterando (sincronizando) el pico de LH y por lo tanto la ovulación (Martínez et al., 2005).

Existen diferentes estrategias de uso del E2 al finalizar un protocolo de IATF. Las mismas combinan diferentes sales de E2, con diferentes dosis y en diferentes momentos (Callejas, 2005; Bó et al., 2013).

Cuando se administra 1 mg de BE a las 24 h desde el retiro del DISP, Martínez et al. (2005) reportan un intervalo (retiro DISP-ovulación) de $77,3 \pm 1,9$ h en vaquillonas carniceras al utilizar un DISP con 1,9 g P4. Por otro lado, Ré et al. (2013) reportan $82,7 \pm 3,1$ h en vaquillonas para leche. El cipionato de estradiol (CPE) es generalmente utilizado al mismo momento del retiro de los DISP. Rodríguez Pésico et al. (2015) indican un intervalo hasta la ovulación de $65,3 \pm 12,3$ h cuando se administraron 0,5 mg de CPE en vaquillonas para carne. Por otro lado, Colazo et al. (2003) utilizaron 0,5 mg de CPE al retiro o a las 24 h y obtuvieron un intervalo de $81,6 \pm 5,0$ h y $86,4 \pm 3,5$ h hasta la ovulación, en vaquillonas de carne. En un estudio realizado en vacas carniceras no lactantes que comparan ambos ésteres de E2, benzoato de estradiol (BE) y CPE, Uslenghi et al. (2014) reportan un intervalo retiro DISP-ovulación de $65,4 \pm 2,3$ h al utilizar 1 mg de BE a las 24 h desde el retiro del DISP y $66,0 \pm 3,3$ h cuando se aplicó 1 mg de CPE junto con el retiro del DISP.

- **Programas de IATF basados en GnRH y Prostaglandina**

Estos protocolos se caracterizan por la combinación de dos aplicaciones de GnRH y un agente luteolítico, generalmente PG. La GnRH actúa a nivel hipotalámico, liberando gonadotrofinas: FSH y LH (McDonald, 1978). Su administración genera el aumento de dichas gonadotrofinas, ejerciendo su acción a nivel ovárico (Callejas, 2004; 2005). Estos programas de IATF fueron originalmente descritos por Pursley et al. (1995) para vacas lecheras en lactancia (Ovsynch), mientras que Geary y Whittier (1998) lo adaptaron a vacas carniceras (Co-Synch).

La 1° GnRH tiene como objetivo ovular los folículos presentes, que tengan esa capacidad ya desarrollada (Sartori et al., 2001). El surgimiento de una nueva onda folicular ocurre alrededor de 1,5 días después (Martínez et al., 2000; de la Mata y Bó, 2012). Posteriormente, utilizan una PG para lisar el CL presente (propio del ciclo en curso y/o el inducido por la 1° GnRH), poniendo fin al diestro y dando inicio al proestro (Pursley et al., 1995; Peter et al., 2009). Finalizan con una 2° GnRH que tiene por objetivo la inducción de la ovulación del folículo dominante.

Madurez fisiológica del folículo (ovocito) y fertilidad

En las vacas y vaquillonas (*Bos taurus*) para carne, el folículo dominante alcanza el punto de desviación (Peter et al., 2009) aproximadamente a los 8 mm de diámetro (Sartori et al., 2004) mientras que en vacas lecheras lo hace aproximadamente a los 8,5 mm (Sartori et al., 2001). En este último estudio, la capacidad de ovular por parte del folículo dominante fue determinada para un diámetro alrededor de 10 mm. En otro estudio, Perry et al. (2005) determinaron que inducir la ovulación a folículos ≤ 11 mm de diámetro conlleva una disminución en la tasa de preñez y un posterior aumento de la muerte embrionaria tardía. Esa baja fertilidad fue asociada a menores concentraciones de E2 al momento de la IATF, un incremento menos marcado de la P4 luego de la IATF, y menores concentraciones de P4 circulante posteriormente. En un estudio en que se evaluó la ovulación espontánea versus la inducción prematura del pico de LH en vacas de cría secas y en lactancia, se observó una

reducción del diámetro del folículo ovulatorio, del área del CL que se desarrolló posteriormente, y consecuentemente su función luteal, medida en cuanto a su capacidad de producción de P4, y por último también disminuyó la fertilidad (Mussard et al., 2007). Situaciones similares fueron observadas en vacas lecheras en lactancia inducidas a ovular folículos de menores diámetros mediante el empleo de GnRH (Vasconcelos et al., 2001). Por el contrario, en el mismo tipo de vacas, el no inducir la ovulación y dejar que los folículos maduren y ovulen solos, resultó en un mayor diámetro del folículo ovulatorio y mayor concentración de E2 debido a un período de crecimiento folicular preovulatorio más prolongado (Herlihy et al., 2012).

Por otra parte, aquellos animales que manifiestan celo alrededor de la IATF logran una tasa de preñez mayor (Echternkamp y Thallman, 2011), lo que coincide con las observaciones de Sá Filho et al. (2010) en vacas indicas y cruza índicas con cría (76,7% vs 36,2%). La concentración de E2, tanto al día de la aplicación de la PG como de la IATF, también fue mayor en animales que manifestaron celo respecto de los que no lo manifestaron. Esto podría significar que esos animales en celo habrían alcanzado la concentración suficiente de E2 para preparar a las células foliculares para su luteinización (formación y función), independientemente del diámetro folicular (Perry et al., 2005). En consecuencia, el diámetro ovulatorio no ejerció efecto sobre la fertilidad cuando la ovulación se produjo espontáneamente (Perry et al., 2005) introduciendo la idea de madurez fisiológica del folículo (ovocito).

Mussard et al. (2007) sugieren entonces que la mejora en la fertilidad está dada en parte, por la madurez folicular que va más allá del diámetro del folículo preovulatorio (a pesar que el mismo se asocia a una mayor tasa de ovulación y mayor tasa de preñez según Sá Filho et al., 2010), y también por la interacción de diversas variables que afectan a ese proceso fisiológico, citando por ejemplo: concentración de E2 preovulatorio, competencia del ovocito, funcionalidad del oviducto y transporte espermático, ambiente uterino, concentración de progesterona en la fase lútea, y duración del proestro (Perry et al., 2005) lo que coincide también con lo reportado por Bridges et al. (2008a).

Prolongación del proestro

Bridges et al. (2010) reportaron resultados sobre el efecto de alargar el proestro utilizando protocolos Co-Synch, en donde un proestro largo (2,25 días) versus uno corto (1,25 días) no tuvo efecto significativo sobre el diámetro folicular preovulatorio, pero aumentó significativamente la preñez (50% versus 2,6%, respectivamente) en vacas de cría secas y en lactancia. Incluso en otro experimento similar, un proestro largo (2,2 días) versus uno corto (1,2 días) nuevamente no generó diferencias en cuanto a diámetro folicular, pero aumento significativamente ($P < 0,05$) la concentración de E2 durante ese proestro (Bridges et al., 2010). Lo mismo había sido observado un tiempo antes, en vacas de 2° servicio, en donde fue evaluado el efecto de acortar la permanencia del DISP y la prolongación del proestro, resultando en iguales diámetros foliculares, pero tendiendo ($P = 0,06$) a producir mayores concentraciones de E2 a favor del protocolo Co-Synch de 5 días (Bridges et al., 2009). El acortar el proestro (de 2 días a 1 día) disminuyó la tasa de preñez en vacas y vaquillonas de cría posparto (Dadarwal et al., 2013). En éste mismo sentido, Colazo y Ambrose (2011) describen que sería posible predecir en un 80,1% la probabilidad de preñez cuando el proestro tiene una duración de 72 h, mientras que la misma cae cuando el proestro tiene una duración diferente, en más o en menos tiempo.

La mayor capacidad de producir E2 por parte del folículo dominante en crecimiento se da al 4° día de la emergencia de la onda (Valdez et al., 2005) cuando la misma es inducida con GnRH. En este mismo sentido, Bridges et al. (2008a) postula que reduciendo la permanencia del DISP de 7 a 5 días, los folículos tendrán aproximadamente 3 a 4 días, en lugar de 5 a 6 días, desde la emergencia de la onda, al momento en que se induzca la regresión del CL y el retiro del DISP. Esto es complementado por lo informado por Dadarwal et al. (2013) en donde determinó que un menor nivel de P4 durante el desarrollo folicular conlleva a un mayor diámetro folicular al momento de la IATF y mayor tamaño y funcionalidad del CL posterior, en cuanto a la producción de P4. Esto posiblemente se deba también a que un elevado nivel de P4 retrasa el reclutamiento folicular (Echternkamp y Thallman, 2011).

Los programas de IATF que buscan incrementar la duración del proestro, influyen sobre la capacidad esteroidogénica del folículo y sobre el ambiente uterino, aumentando las concentraciones séricas de E2 al momento del estro y de P4 durante la fase luteínica posterior. Altas concentraciones de E2 al momento de la IATF fueron asociadas a altas tasa de preñez (Jinks et al., 2012). Del mismo modo, Atkins et al. (2013) informan sobre la asociación positiva entre la concentración de E2 a la IATF y las concentraciones séricas de P4 al día 7, siendo al mismo tiempo independiente del tamaño del folículo ovulatorio. En un estudio realizado en vacas, Mann y Lamming (2000) postulan que un bajo nivel de E2 durante la fase folicular podría resultar en una reducción de la inhibición de la concentración de los receptores de oxitocina en el CL. Consecuentemente, mayor cantidad de oxitocina se uniría a dichos receptores, dando lugar a episodios luteolítico mediados por $PGF2\alpha$ desde el útero, resultando en una luteólisis prematura del CL presente, responsable del mantenimiento de la gestación. Por otra parte, en un antiguo estudio realizado en ovejas, Miller et al. (1977) determinaron que aquellas hembras que no recibieron suplementación de E2, tuvieron menos probabilidad de mantener los embriones, vieron reducido el peso de su útero y también la cantidad de proteínas intraluminales al día 21. En esta misma línea de trabajo, en un reciente estudio realizado en vacas, Madsen et al. (2015) realizaron un trabajo que tuvo como objetivo estudiar el rol del E2 preovulatorio sobre la supervivencia de embriones y el mantenimiento de la gestación. A fin de evitar el efecto del diámetro folicular, la secreción endógena de E2, el largo del proestro y la consecuente P4, fueron utilizadas hembras castradas a las que se les transfirieron embriones de excelente calidad al día 7. El diagnóstico de gestación por ultrasonografía (US) al día 29 reveló tasas de preñez de 21%, 29% y 4% para los tratamientos con CPE, BE o sin E2, respectivamente. Cuando los grupos con E2 fueron agrupados y comparados con el grupo sin E2, aquellos animales que recibieron la mímica del E2 preovulatorio tuvieron mayor probabilidad de mantener la gestación al día 29 ($P < 0,05$).

Programa Co-Synch de 5 días

Sobre una modificación realizada al protocolo original Co-Synch, Bridges et al. (2008a) informaron un incremento del 10,5% en la tasa de preñez en vacas carniceras con cría, al acortar de 7 a 5 días la permanencia del DISP, y alargar el proestro hasta 72 horas,

momento en que se realiza la IATF en conjunto con la administración de GnRH. Este protocolo fue denominado Co-Synch 5 días + DISP (5D Co-Synch). La propuesta original (Bridges et al., 2008a) considera la aplicación de dos dosis de PG para lizar el CL original más el inducido por la 1° GnRH, en aquellas hembras que responden a la misma. El esquema planteado fue la administración de la 1° dosis al retiro del DISP y la 2° a las 12 horas. La necesidad de la doble dosis, así como la estrategia de la aplicación, fueron motivo de estudio. Los resultados en vacas indican que es necesario administrar la doble dosis, ya sea juntas (al retiro del DISP) o separadas (8 horas), según lo reportado por Bridges et al. (2012). Sin embargo, Rabaglino et al. (2010a) concluyó que una dosis de PG es suficiente para regresar los CL y obtener un aceptable porcentaje de preñez en vaquillonas, cosa que fue corroborada también por de la Mata y Bó (2012).

Este protocolo fue replicado en diversos tipos de hembras bovinas, vacas y vaquillonas, secas y en lactancias, con diversos resultados. Para vacas de cría en lactancia se informaron resultados de preñez a la IATF del 51,0%, 70,4% y 58,1% (Bridges et al., 2008a, 2012; Whittier et al., 2013; respectivamente); en vaquillonas carniceras del 52,9%, 55,9% al 62,5% (Esperanza, 2012; Kasimanickam et al., 2014; Perry et al., 2012); y para vaquillonas tipo lecheras del 48,6% al 59,4% (Rabaglino et al., 2010a, 2010b). Particularmente el estudio de Perry et al. (2012) describe que los mejores resultados se obtienen cuando las vaquillonas estaban cíclicas.

Programa J-Synch

Con la misma motivación que había sido planteada por Bridges et al. (2008a) sobre el efecto de prolongar la duración del proestro sobre el desarrollo y maduración folicular, con todas sus implicancias antes mencionadas, y la mejora sobre la tasa de preñez, surgió un protocolo basado en el uso de BE. Siendo así, de la Mata y Bó (2012) denominaron J-Synch al protocolo consistente en la administración de BE junto con un DISP para la sincronización de una nueva onda folicular. Al cabo de 6 días, el DISP es retirado junto con la aplicación de PG, dando inicio al proestro, el cual tendrá una duración de 72 h, cuando se realizará la IATF en conjunto con la inducción de la ovulación mediante una dosis de GnRH. A diferencia del

protocolo 5D Co-Synch que inicia con una GnRH, el protocolo J-Synch al iniciar con BE no genera un CL secundario, por lo que sólo es necesaria la aplicación de una dosis de PG al retirar los DISP [Rabaglino et al. (2010a); de la Mata y Bó (2012)]. Estos últimos autores compararon en vaquillonas carniceras la sincronización de la emergencia de una nueva onda folicular mediante GnRH (5D Co-Synch) o BE (J-Synch), dejando en ambos protocolos un proestro de 72 horas. La sincronización de la ovulación fue realizada con GnRH al momento de la inseminación, en ambos grupos. No hubo diferencias significativas entre los protocolos J-Synch y 5D Co-Synch ($P>0,1$) en cuanto a la tasa de ovulación (91,6% vs 92,8%), intervalo entre el retiro DISP - ovulación (97,1±17,4 h vs 95,1±12,5 h), diámetro de folículo dominante preovulatorio (11,7±0,2 vs 12,0±0,5 mm), ni la tasa de preñez (50% vs 57%).

En Argentina y la región se realizaron varios estudios que apuntaron a evaluar la eficacia del J-Synch para mejorar las tasas de preñez en programas de IATF. En un estudio realizado en vaquillonas lecheras y comparando además con un protocolo convencional (7 días de DISP con BE a las 24 h), Ré et al. (2013) informaron resultados similares a los descriptos previamente. El intervalo entre el retiro DISP – ovulación fue menor para el convencional (82,7±3,1 h) que para los protocolos J-Synch (103,8±3,3 h) y 5D Co-Synch (96,8±3,3 h), mientras que la tasa de preñez difirió numéricamente, pero no estadísticamente (53,4%, 62,7% y 54,5%, respectivamente). Por otro lado, Bó et al (2016) informan en un primer estudio, una mejora significativa en la tasa de preñez de 10,5% cuando el J-Synch fue comparado con un protocolo convencional (basado en E2 y DISP) al cabo de varias réplicas, involucrando 791 vaquillonas para carne. En un segundo estudio informan, sobre 2349 vaquillonas, todas tratadas además con 300 UI de eCG, una diferencia significativa en la tasa de preñez a favor del J-Synch de 5,4% (56,1% vs 50,7%). En ese mismo sentido, Villa et al. (2017) obtuvieron una tasa de preñez de 55% y 48,3% (J-Synch vs Convencional, respectivamente), en vaquillonas con buen desarrollo reproductivo y alta tasa de ciclicidad, sin llegar a diferenciarse significativamente.

Como conclusión, diremos que existe una gran cantidad de programas de IATF, ajustados a todas las categorías (vacas y vaquillonas, de razas carniceras y lecheras, de origen índico, taurino o sus cruza) y que son ampliamente utilizados para la producción bovina en

toda la región (Binelli et al., 2014; Bó et al., 2013; Colazo y Mapletoft, 2014). Pero cuáles son los objetivos que estos programas deben alcanzar y cuáles son los desafíos a superar?

Resulta cierto que más importante que el diámetro folicular al momento de una IATF, aunque está demostrada su asociación (Sá Filho et al., 2010), resulta la madurez de ese folículo, su capacidad de producir E2, y las consecuencias positivas de éste (Mussard et al., 2007; Bridges et al., 2008a; Herlihy et al., 2012) en el ciclo siguiente. Esto quiere decir que al momento de inducir (sincronizar) la ovulación, resulta fundamental contar con un folículo fisiológicamente maduro, siendo éste el objetivo a alcanzar en un protocolo de sincronización del estro y la ovulación para realizar una IATF. A su vez, los animales deberían estar, o haber manifestado, celo lo que se correlaciona con una mejor respuesta a la sincronización y una mayor tasa de preñez (Sá Filho et al., 2010). Esta madurez fisiológica es una interacción de diversas variables, donde prolongar el proestro contempla el beneficio de varias de ellas en forma conjunta (Perry et al., 2005; Mussard et al., 2007). Finalmente, Dickinson et al. (2016) plantean un nuevo desafío: no sólo hay que lograr mejores índices de preñez, sino mejorar el mantenimiento de la gestación, reduciendo las pérdidas.

En función de los antecedentes desarrollados, surge el interés de evaluar el incremento de los índices reproductivos mediante la implementación de protocolos de proestro prolongado, basados íntegramente en estradiol y progesterona, empleados en programas de IATF en vaquillonas para carne.

HIPÓTESIS GENERAL

Incrementar la duración del proestro en protocolos de IATF que utilizan exclusivamente estradiol y progesterona, aumenta la tasa de preñez cuando es comparado con un protocolo con un proestro de duración convencional, en vaquillonas *Bos taurus* de razas carniceras.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de incrementar la duración del proestro en protocolos de IATF basados exclusivamente en estradiol y progesterona sobre la dinámica folicular, características del cuerpo lúteo y tasa de preñez en vaquillonas *Bos taurus* de razas carniceras.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudiar el efecto de prolongar el proestro sobre el diámetro del folículo dominante preovulatorio, tasa de crecimiento folicular, momento y tasa de ovulación, área del cuerpo lúteo consecuente y concentración plasmática de progesterona en vaquillonas (Experimento I).

Comparar las tasas de preñez a la IATF en vaquillonas sincronizadas con protocolos de proestro prolongado con un protocolo de duración de proestro convencional (Experimento II y III).

Comparar las tasas de preñez a la IATF en vaquillonas sincronizadas con protocolos de proestro prolongado que utilizan exclusivamente estradiol y progesterona con un protocolo que utiliza además GnRH (Experimento IV).

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales e instalaciones

En los 4 experimentos que conforman este trabajo fueron utilizadas vaquillonas *Bos taurus* de raza Aberdeen Angus, negras y coloradas, de alrededor de 15 meses de edad (14 a 18 meses). Los ensayos fueron realizados en 5 establecimientos comerciales de la provincia de Buenos Aires, Argentina, donde los animales se alimentaban a base de pasturas consociadas o campos naturales de muy buena oferta forrajera. Las instalaciones de cada establecimiento contaba con adecuadas facilidades (manga, cepo, casilla de operaciones, corrales), suficientes para garantizar un eficiente trabajo y seguridad, tanto de las personas como de los animales.

Para la inclusión de las hembras a cada uno de los experimentos se utilizaron los siguientes criterios: ausencia de patologías clínicas evidentes a la evaluación general (como claudicaciones, cegueras, etc.) y ultrasonográfica (como quistes foliculares, cuerpos lúteos quísticos); condición corporal (CC) mayor o igual a 2,5 (escala 1-5; ver Condición Corporal); presencia de un CL o folículos \geq a 10 mm de diámetro con buen tono uterino a la evaluación ultrasonográfica previa (ver Ultrasonografías). En todos los trabajos realizados con los animales (aplicación de dispositivos intravaginales, tratamientos inyectables, colecta de muestras de sangre, inseminación y ecografías), todos los involucrados en el estudio, cumplieron con procedimientos de bienestar animal y las buenas prácticas ganaderas.

Experimento I

Este experimento fue desarrollado en el mes de Mayo de 2015, en el establecimiento “Las Montoneras” de la localidad de Navarro, Buenos Aires, Argentina. El objetivo de este experimento fue estudiar el efecto de la prolongación del proestro sobre la respuesta ovárica, evaluando la dinámica folicular, el momento de la ovulación, tamaño del CL y concentraciones plasmáticas de P4.

Se trabajó con 43 vaquillonas Aberdeen Angus de 15 a 16 meses de edad, con una CC de $3,4 \pm 0,2$ (escala 1-5). La totalidad de las mismas estaban cíclicas (presencia de un CL) a la ultrasonografía (US; Honda HS 101 V) del Día -7. Ese día las vaquillonas fueron asignadas homogéneamente a 5 grupos en función de la duración del tratamiento con el DISP (6 y 7 días) y el horario de inducción de ovulación con BE: 1) 7D24 (n=9), 2) 7D36 (n=9), 3) 7D48 (n=7), 4) 6D36 (n=9) y 5) 6D48 (n=8). Aquellas asignadas a los grupos de 7 días de DISP recibieron 2 mg de BE (Bioestrogen®, Biogénesis Bagó, Argentina) por vía i.m. junto a un DISP (Cronipres Monodosis®, Biogénesis Bagó, Argentina) conteniendo 0,558 g de P4 al Día -7; aquellas pertenecientes a los grupos de 6 días recibieron el mismo tratamiento pero un día después (Día -6; Figura 2.1).

En todos los grupos los DISP fueron retirados al Día 0 junto con la aplicación i.m. de 0,150 mg de D-Cloprostenol (PG; Enzaprost® D-C, Biogénesis Bagó, Argentina). La inducción de la ovulación fue realizada con 1 mg de BE por vía i.m. a diferentes tiempos luego del retiro del DISP, según el grupo correspondiente: a las 24 h (7D24), 36 h (6D36 y 7D36) y 48 h (6D48 y 7D48). Se realizó US ovárica (Berger LC 2010 PLUS) al momento de retirar los DISP (Día 0 – Hora 0) y luego cada 12 h, a partir del retiro del DISP hasta las 132 h. Del mismo modo, al Día 15 luego del retiro del DISP se realizó una US para confirmar ovulación por la presencia de un CL, junto con la colecta de una muestra de sangre en tubos heparinizados (Vacutainer, BD) para determinación de P4 mediante radioinmunoensayo (RIA).

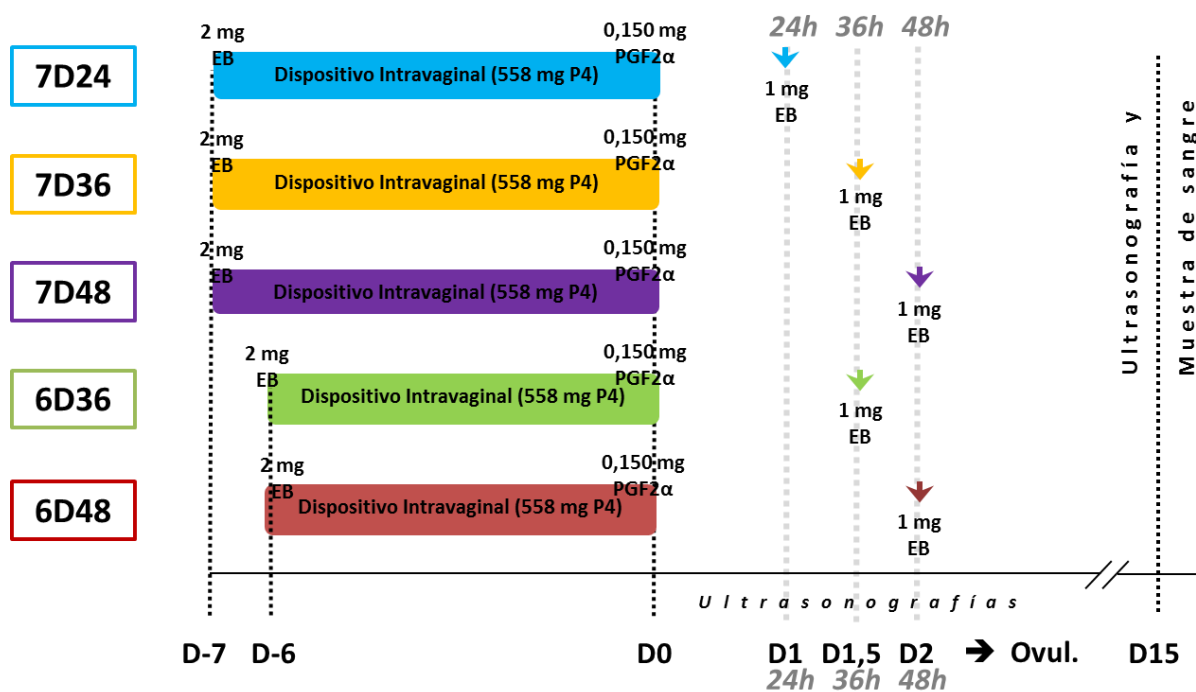


Figura 2.1. Esquema del diseño experimental del Experimento I. Se distribuyeron los animales en 5 grupos para recibir un dispositivo con P4 por 6 o 7 días (6D o 7D), combinado con BE al colocarlos y con PGF2α al retirarlos. Fue utilizado 1 mg de BE como inductor de ovulación a diferentes tiempos luego del retiro del dispositivo con P4: 24 h (Grupo 7D24 – protocolo convencional); 36 h (Grupos 6D36 y 7D36); o 48 h (Grupos 6D48 y 7D48). Se realizaron ultrasonografías de los ovarios cada 12 h hasta la ovulación y al día 15 para evaluación del CL, junto con la colecta de una muestra de sangre. Referencias. D: tiempo en Días, respecto al retiro de los dispositivos intravaginales con progesterona; h: tiempo en horas, respecto al respecto al retiro de los dispositivos intravaginales con progesterona; mg: miligramos; P4: progesterona; BE: benzoato de estradiol; PGF2α: Prostaglandina F2α; Ovul.: ovulación.

Experimento II

Este experimento fue desarrollado al inicio del servicio de primavera 2015 en el establecimiento “San Fermín” de la localidad de Gral. Pinto, Buenos Aires, Argentina. El objetivo fue evaluar el efecto de la prolongación del proestro sobre la tasa de preñez a la IATF en protocolos convencionales (7 días de DISP) o cortos (6 días de DISP).

Se trabajó con 219 vaquillonas de 14 a 15 meses de edad, Aberdeen Angus, con una CC de $3,4 \pm 0,3$ (escala 1-5). Un día antes (Día -8) del inicio de los tratamientos se realizó US (Honda HS 101V – 5 MHz) para evaluar estructuras ováricas (EO): CL (20,4%) o folículos $\geq 10\text{mm}$ (79,6%) y determinar la CC. Las vaquillonas fueron distribuidas homogéneamente (según EO y CC) a 4 grupos en función de la duración del tratamiento con los DISP (6 o 7 días) y el horario de inducción de ovulación con BE. El Día -7 (grupos 7D24 y 7D36) y Día -6 (grupos 6D36 y 6D48) se administraron 2 mg de BE (Bioestrogen®, Biogénesis Bagó, Argentina) vía i.m. junto a un DISP (Cronipres® Monodosis, Biogénesis Bagó, Argentina) conteniendo 0,558 g de P4. Todos los DISP fueron retirados al Día 0 y en ese mismo momento todos los animales recibieron 0,150 mg de D-Cloprostenol (PG; Enzaprost® D-C, Biogénesis Bagó, Argentina) vía i.m. Para la inducción de ovulación se administró 1 mg de BE vía i.m. a las 24 h (7D24, n=57), 36 h (7D36, n=55; 6D36, n=53) o 48 h (6D48, n=54) posteriores al retiro del DISP.

El horario de la IATF se basó en los datos de momento de ovulación del Experimento I, y fueron en este estudio: 7D24=54h; 7D36=72h; 6D36=72h; 6D48=80h. La misma fue realizada por un único operador y con semen proveniente de un único toro (“Chamigo” de Estancias y Cabañas Don Benjamín, Argentina), de probada fertilidad y de la misma partida. Se realizó el diagnóstico de gestación por US a los 47 días pos IATF (Figura 2.2).

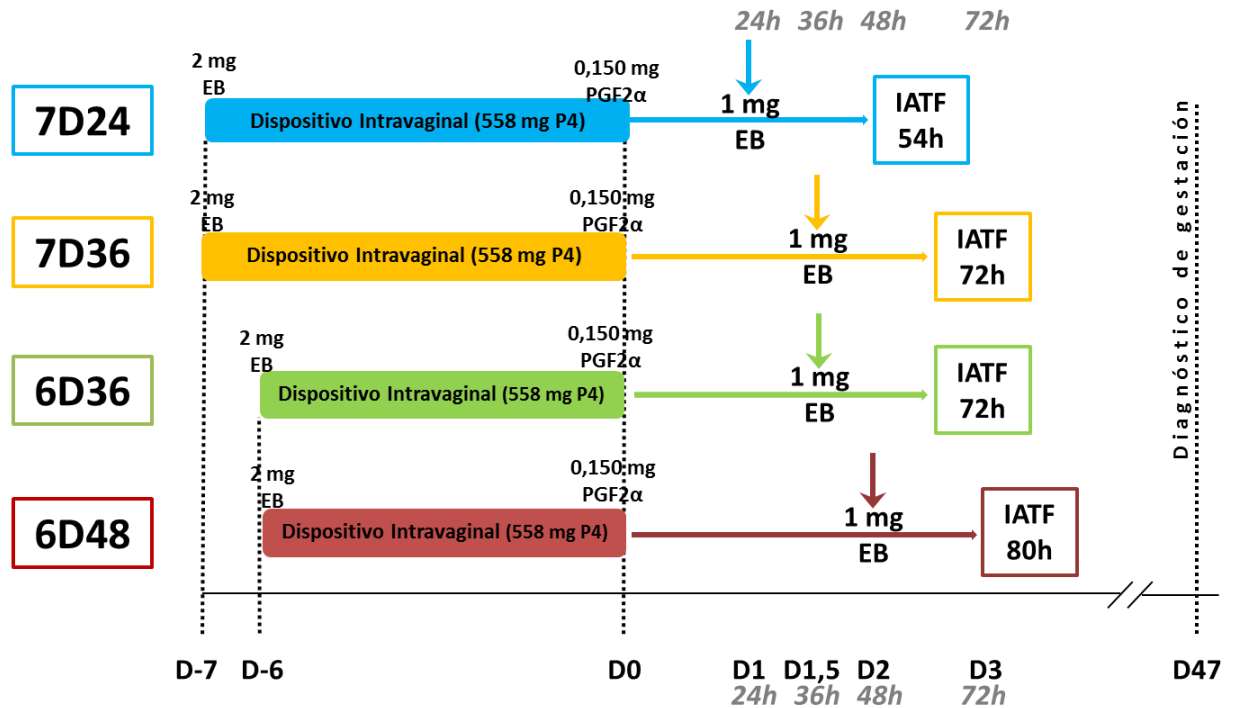


Figura 2.2. Esquema del diseño experimental del Experimento II. Se distribuyeron los animales en 4 grupos para recibir un dispositivo con P4 por 6 o 7 días (6D o 7D), combinado con BE al colocarlos y con PGF2 α al retirarlos. Fue utilizado 1 mg de BE como inductor de ovulación a diferentes tiempos luego del retiro del dispositivo con P4: 24 h (Grupo 7D24 – protocolo convencional); 36 h (Grupos 6D36 y 7D36); o 48 h (Grupo 6D48). Se realizó el diagnóstico de gestación por ultrasonografías al Día 47 del estudio. *Referencias.* D: tiempo en Días, respecto al retiro de los dispositivos intravaginales con progesterona; h: tiempo en horas, respecto al respecto al retiro de los dispositivos intravaginales con progesterona; mg: miligramos; P4: progesterona; BE: benzoato de estradiol; PGF2 α : Prostaglandina F2 α ; IATF: inseminación artificial a tiempo fijo.

Experimento III

Para este experimento se realizaron 3 réplicas: establecimiento “El Primo” de la localidad de Salto (réplica 1); establecimiento “El Tigre” en la localidad de Beguerie (réplica 2); y establecimiento “Manantiales” en la localidad de Chascomús (réplica 3). Todos ubicados en la provincia de Buenos Aires, Argentina. Las réplicas 1 y 2 fueron realizadas en otoño mientras que la réplica 3 en primavera. El objetivo fue estudiar el efecto de un protocolo corto con proestro prolongado, combinado con BE como inductor de la ovulación comparado con un protocolo convencional usando CPE como inductor de ovulación, sobre la tasa de preñez a la IATF en vaquillonas para carne.

Se trabajó con 188 vaquillonas de 15 a 16 meses de edad, Aberdeen Angus, con una CC entre 3 y 4 (escala 1-5). El Día 0 se realizó US (Honda HS 101V – 5 MHz) para evaluar EO, resultando el 68,6% con presencia de CL y el 31,4% con folículos ≥ 10 mm; además, se determinó la CC. Las vaquillonas fueron distribuidas homogéneamente, basado en su EO, a dos grupos para recibir un tratamiento u otro: 6D36EB (n=96) o 7DECP (n=92). El Día 0 todos los animales recibieron por vía i.m. 2 mg de BE (Bioestrogen®, Biogénesis Bagó, Argentina) junto a un DISP (Cronipres® Monodosis, Biogénesis Bagó, Argentina) conteniendo 0,558 g de P4. Los DISP fueron retirados al Día 6 (6D36EB) o Día 7 (7DECP) y en ese mismo momento los animales recibieron 0,150 mg de D-Cloprostenol (PG; Enzaprost® D-C, Biogénesis Bagó, Argentina) vía i.m. Para la inducción de ovulación se utilizó: 0,5 mg de CPE (Croni-Cip®, Biogénesis Bagó, Argentina) vía i.m. al momento del retiro del DISP para el grupo 7DECP; o 1 mg de BE vía i.m. a las 36 h (Día 7,5) de retirados los DISP para el grupo 6D36EB.

La IATF se realizó a las 48 h (7DECP) o 72 h (6D36EB) desde el retiro de los DISP, según el grupo correspondiente. La misma fue realizada por un único operado. Se utilizó semen proveniente de un único toro dentro de cada réplica. Réplicas 1 y 2, ambos toros pertenecientes a Alta CIALE: “Escándalo” (Angus Colorado) en “El Primo” y “Sinclair Timeless” (Angus Negro) en “El Tigre”. En la réplica 3, “Cedar Ridge” (Angus Negro) de Juan Debernardi S.R.L. (Figura 2.3).

El diagnóstico de gestación fue realizado por US (Honda HS 101V – 5 MHz) a los 40, 41 y 44 días posteriores a la inseminación para las réplicas 1, 2 y 3, respectivamente.

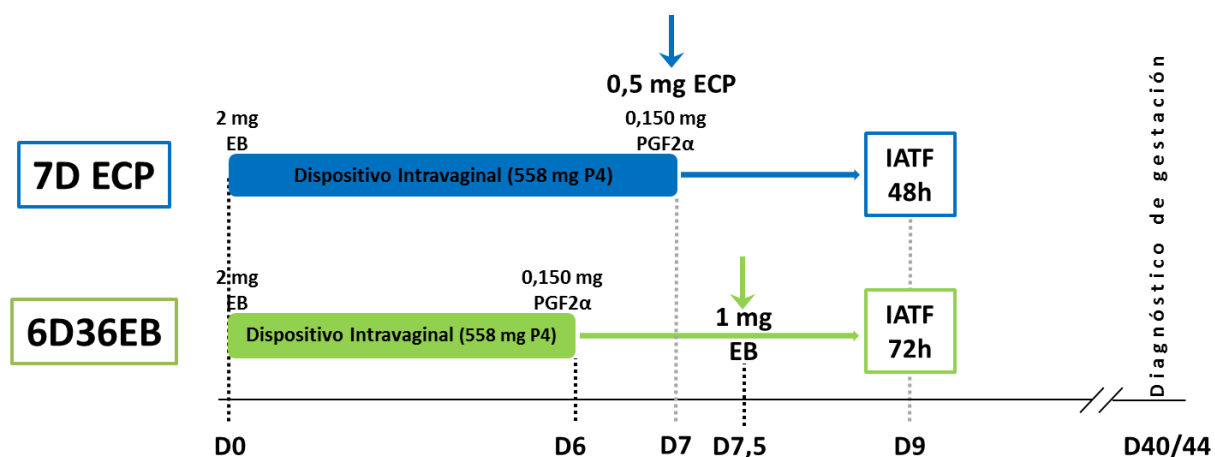


Figura 2.3. Esquema del diseño experimental del Experimento III. Se realizaron 3 réplicas del mismo diseño. Al Día 0, todos los animales recibieron 2 mg de BE conjuntamente con un dispositivo intravaginal con P4. En uno de los dos grupos, el dispositivo con P4 fue retirado al Día 7 junto con la aplicación de PGF2α y 0,5 mg de CPE en el Grupo 7DECP (Convencional) para ser IATF 48 h después; mientras que en el otro grupo, el dispositivo con P4 fue retirado al Día 6 junto con la aplicación de PGF2α y 36 h después recibieron 1 mg de BE para ser IATF a las 72 h desde el retiro del dispositivo con P4. Se realizó el diagnóstico de gestación por ultrasonografías entre los Días 40 a 44 del estudio, según la réplica. Referencias. D: tiempo en Días, respecto al inicio del protocolo de sincronización; mg: miligramos; P4: progesterona; BE: benzoato de estradiol; PGF2α: Prostaglandina F2α; IATF: inseminación artificial a tiempo fijo.

Experimento IV

Este experimento fue ejecutado al inicio del servicio de primavera 2016 en el establecimiento “San Fermín” de la localidad de Gral. Pinto, Buenos Aires, Argentina. El objetivo fue comparar el efecto de la sincronización con protocolos cortos que utilizan como inductor de ovulación BE (6D36EB) o GnRH (J-Synch) o la combinación de ambos (6D36EB+GnRH72) sobre la tasa de preñez a la IATF en vaquillonas.

Se trabajó con 310 vaquillonas de 14 a 15 meses de edad, Aberdeen Angus, con una CC de $3,7 \pm 0,2$ (escala 1-5). Un día antes (Día -1) del inicio de los tratamiento se realizó US (Honda HS 101V – 5 MHz) para evaluar EO: CL = 54,2%; Folículos $\geq 10\text{mm}$ = 45,8%. Así mismo, se determinó la CC. Las vaquillonas fueron distribuidas homogéneamente según EO y CC a 3 grupos: 6D36EB (n=104), 6D36EB+GnRH72 (n=104) o GnRH72 (J-Synch; n=102). El Día 0 todos los animales recibieron por vía i.m. 2 mg de BE (Bioestrogen®, Biogénesis Bagó, Argentina) junto a un DISP (Cronipres® 0,5 g, Biogénesis Bagó, Argentina) conteniendo 500 mg de P4. Todos los DISP fueron retirados de todos los animales al Día 6, y en ese mismo momento recibieron 0,150 mg de D-Cloprostenol (PG; Enzaprost® D-C, Biogénesis Bagó, Argentina) vía i.m. La inducción de ovulación fue realizada con 1 mg de BE (Bioestrogen®, Biogénesis Bagó, Argentina) a las 36 h posteriores al retiro del DISP para el grupo 6D36EB. Por otra parte, el grupo GnRH72 (J-Synch) recibió 10,5 µg de acetato de buserelina (Gonaxal®, Biogénesis Bagó, Argentina) por vía i.m. a las 72 h de retirado los DISP. El grupo 6D36EB+GnRH72 recibió ambos inductores de ovulación, en los mismos tiempo mencionados.

La IATF se realizó a las 72 h de retirados los DISP. Se utilizó semen proveniente de un único toro (“CATRIAN” de CIAVT) de probada fertilidad. El diagnóstico de gestación fue realizado por ultrasonografía (Honda HS 101V – 5 MHz) a los 36 días pos IATF (Figura 2.4).

Fueron descartados tres animales: uno por pérdida del DISP y otros dos por no volver a la manga, todos del grupo 6D36EB+GnRH72.

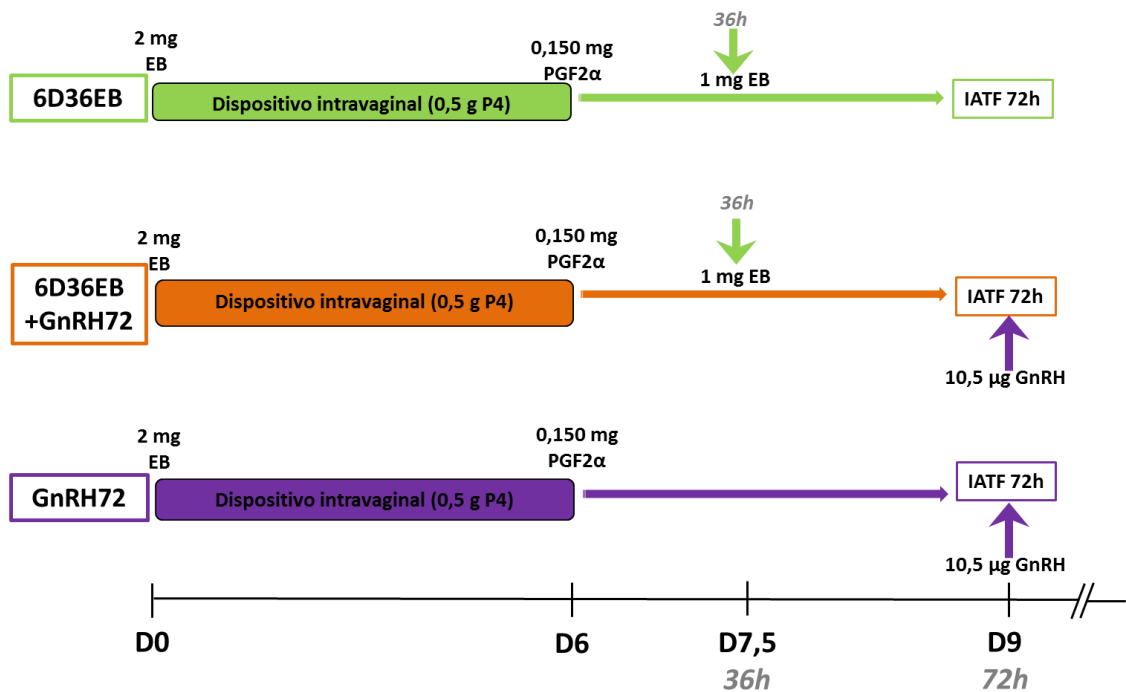


Figura 2.4. Esquema del diseño experimental del Experimento IV. Al Día 0, todos los animales recibieron 2 mg de BE conjuntamente con un dispositivo intravaginal con P4. El mismo fue retirado a los 6 días junto con la aplicación de PGF2 α . El Grupo 6D36 recibió 1 mg de BE como inductor de la ovulación 36 h luego del retiro del dispositivo con P4, mientras que el grupo GnRH72 (J-Synch) recibió 10,5 μ g de GnRH luego del retiro del dispositivo con P4. El grupo 6D36EB+GnRH72 recibió la combinación de ambos inductores en los mismos horarios. Todos los animales fueron IATF a las 72 h desde el retiro del dispositivo con P4. Se realizó el diagnóstico de gestación por ultrasonografías a los 36 días de la IATF. Referencias. D: tiempo en Días, respecto al inicio del protocolo de sincronización; mg: miligramos; μ g: microgramos; P4: progesterona; BE: benzoato de estradiol; PGF2 α : Prostaglandina F2 α ; GnRH: hormona liberadora de gonadotrofina; IATF: inseminación artificial a tiempo fijo.

Ultrasonografías

Todas las evaluaciones ultrasonográficas, de todos los animales, en cada uno de los experimentos, fueron ejecutadas en las mangas, con el animal sujetado e inmovilizado debidamente con el cepto en la casilla de operaciones.

Al inicio de cada experimento se realizó un estudio ultrasonográfico con un equipo Honda HS 101 V (Honda, Japón) con un transductor transrectal de 5.0 MHz con el cual se evaluó: el útero, para corroborar la ausencia de preñez y su normal desarrollo; y los ovarios, para determinar la estructura ovárica predominante, clasificando los animales según la siguiente escala:

- Descarte: folículo menor a 10 mm de diámetro sin tono uterino y/o desarrollo uterino anormal (ningún animal con éste grado fue incluido en los experimentos).
- Folículos: presencia de un folículo mayor o igual a 10 mm de diámetro con normal desarrollo del útero y aceptable a buen tono.
- CL: presencia de un cuerpo lúteo, con normal desarrollo del útero y buen tono.

En el Experimento I fue utilizado además un equipo Berger LC 2010 PLUS en modo B con un transductor transrectal de 7,5 MHz para la realización del trabajo de dinámica folicular, donde los ovarios de las vaquillonas fueron evaluados cada 12 horas desde el retiro de los DISP hasta la ovulación con el objetivo de realizar el seguimiento del folículo dominante (FD). El mismo equipo fue empleado para evaluar las características del cuerpo lúteo subsecuente. Tanto los folículos como los cuerpos lúteos fueron medidos mediante el calibre del equipo.

El diagnóstico de gestación de los experimentos II, III y IV fue realizado con el equipo Honda HS 101 V entre los 36 y 47 días pos IATF.

- **Parámetros ováricos**

El **diámetro** (mm) de todos los folículos fue calculado según Kastelic et al. (1990), en base al promedio del diámetro vertical y horizontal. Para estudiar el CL también se midieron sus diámetros vertical y horizontal. En función de ellos, se determinó el **área** (mm²) según lo descrito por Kastelic et al. (1990). En el caso de los CL que presentaban una cavidad, el área de la misma (calculada según la misma metodología) fue descontada del área total.

La **tasa de crecimiento** (mm/día) del FD preovulatorio fue determinada para cada uno de los folículos mediante una regresión lineal, utilizando el Día como variable independiente y el Diámetro como variable dependiente. De ésta forma, se calculó la tasa promedio de crecimiento (pendiente) para cada uno de los grupos (Ginther et al., 1989a).

Se consideró que el FD había **ovulado** cuando se produjo la desaparición del mismo y en su lugar apareció un cuerpo lúteo (Ross et al., 2004; ultrasonografía: día 15); en cuyo caso este folículo fue considerado el **folículo dominante preovulatorio**.

El **momento de ovulación** fue definido como el tiempo promedio (horas) entre la última observación del FD preovulatorio y aquel en el que dicho folículo desapareció (Manes et al., 2012).

La **tasa de ovulación** (%) fue definida como la cantidad de animales cuyo FD preovulatorio desapareció hasta las 120 h posteriores al retiro del DISP y en su lugar apareció un CL a la ultrasonografía del día 15 en relación al total de animales de cada grupo.

Condición corporal

La condición corporal fue determinada utilizando la escala 1 a 5, donde 1 corresponde a un animal emaciado y 5 a uno obeso (Houghton et al., 1990). La misma fue determinada al inicio de los tratamientos de cada uno de los experimentos y a la ultrasonografía del diagnóstico de gestación (Experimentos II, III y IV).

Colecta de muestras de sangre y determinaciones hormonales

Las muestras de sangre fueron colectadas por punción de la vena coccígea utilizando tubos de vacío de 10 mL con heparina sódica (Vacutainer, BD) para la obtención de plasma. Para cada animal se empleó una aguja descartable nueva de 18Gx1” (PrecisionGlide, BD Vacutainer, BD) acoplada a un dedal plástico. Inmediatamente posterior a su obtención, las muestras fueron refrigeradas a 4°C y mantenidas en esas condiciones hasta su procesamiento. Dentro de las 4 horas desde la colecta fueron centrifugadas (1000 RCF por 10 minutos a temperatura ambiente). El plasma fue trasvasado con pipeta Pasteur descartable de 3 mL a tubos de poliestireno de 6,5 mL (Polistor) y conservados luego a -20°C hasta la remisión al laboratorio de análisis.

Las concentraciones plasmáticas de progesterona fueron determinadas mediante la técnica de RIA en el Laboratorio de Endocrinología de la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA). La determinación de P4 se realizó mediante el empleo de un kit comercial para RIA (COAT A COUNT, Siemens Medical Solution, CA, USA) previamente validado para su uso en plasma bovino (Toribio et al., 1994). El coeficiente de variación intra-ensayo fue menor que 6% para concentraciones entre 0,1 y 40 ng/mL, el coeficiente inter-ensayo fue menor que 3,5% y la sensibilidad fue de 0,01 ng/mL. Todas las muestras fueron determinadas por duplicado.

En el Experimento I las muestras fueron colectadas al momento de la ultrasonografía del Día 15, momento en que se evaluaron las características del CL.

Descongelado de semen

Tanto en el Experimento II, III (todas las réplicas) y IV, el semen fue descongelado en un equipo DEPS (Descongelador Electrónico de Pajuelas de Semen, Argentina) configurado a 36°C. Inmediatamente después de quitar las pajuelas del N₂ líquido, fueron colocadas en el agua (36°C) del equipo descongelador. Nunca fueron descongeladas más de 6 pajuelas al mismo momento. Se respetó el tiempo mínimo de permanencia de las pajuelas en el agua (1 minuto) y nunca superó los 10 minutos. La temperatura del agua fue controlada por al menos 2 termómetros, uno de alcohol y otro tipo tarjeta.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados utilizando el software estadístico InfoStat, Versión 2017 (Di Rienzo et al., 2017).

En el Experimento I se analizaron mediante ANOVA las variables continuas puntuales: diámetro del folículo dominante al retiro del DISP (mm) y diámetro del folículo dominante preovulatorio (mm), tasa de crecimiento (mm/día), área del CL (mm²), intervalo retiro del DISP – ovulación (horas) y concentración plasmática de P4 (ng/mL). Para evaluar el patrón de crecimiento del folículo dominante se utilizó la función de Modelos Lineales Generales y Mixtos donde se consideró como tiempo 0 el momento del retiro del DISP y se consideraron las mediciones de los folículos hasta la ovulación. La tasa de ovulación (%) fue comparada por el Test de diferencia de proporciones. La distribución de ovulaciones se evaluó mediante la Prueba F para igualdad de varianzas.

En el Experimento II se evaluó la tasa de preñez teniendo en cuenta el efecto de los tratamientos (4). En el Experimento III se evaluó la tasa de preñez teniendo en cuenta el efecto de los tratamientos (2), la estructura ovárica (CL, Fol \geq 10mm), la réplica (1,2,3), la interacción entre tratamiento*réplica y la interacción tratamiento*estructura ovárica. En el Experimento IV se evaluó la tasa de preñez teniendo en cuenta el efecto de los tratamientos (3), de la estructura ovárica (CL o Fol \geq 10mm) y la interacción tratamiento*estructura ovárica.

En todos los casos se fijó un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0,05$). Fue considerado como una tendencia cuando el valor de P fue $\geq 0,05$ y $< 0,1$.

RESULTADOS

Experimento I

El **diámetro del folículo dominante al momento del retiro del DISP** fue mayor ($P<0,05$; Tabla 3.1) en los grupos 7D24 y 7D36 que en los grupos 6D48 y 6D36, mientras que el grupo 7D48 fue intermedio y solo difirió del grupo 6D48 ($P<0,05$). Al agrupar éstos valores de los grupos 7 días se evidencia que los folículos son mayor diámetro al retiro que aquellos de los grupos de 6 días ($P<0,05$). El **diámetro del folículo dominante preovulatorio** no varió entre los grupos ($P>0,1$), como tampoco lo hizo la **tasa de crecimiento diario** ($P>0,1$).

Tabla 3.1. Respuesta ovárica (Media \pm E.E.) en vaquillonas cíclicas sometidas a diferentes tiempos de permanencia del dispositivo intravaginal e inducidas a ovular a diferentes horarios en el Experimento 1.

| VARIABLE | TRATAMIENTO | | | | |
|--|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | 7D24 | 7D36 | 7D48 | 6D36 | 6D48 |
| Cantidad de animales (n) | 9 | 9 | 7 | 9 | 8 |
| Diámetro FD al retiro DISP (mm) | 8,7 \pm 1,8 ^a | 8,9 \pm 1,6 ^a | 7,5 \pm 0,9 ^{a,b} | 6,8 \pm 1,0 ^{b,c} | 5,9 \pm 1,3 ^c |
| | 8,5 \pm 1,6 ^a | | | 6,4 \pm 1,2 ^b | |
| Diámetro FD preovulatorio (mm) | 11,9 \pm 0,8 | 12,7 \pm 2,1 | 11,8 \pm 1,2 | 11,4 \pm 0,6 | 11,8 \pm 1,5 |
| Tasa de crecimiento FD (mm/día) | 1,3 \pm 0,5 | 1,4 \pm 0,9 | 1,5 \pm 0,6 | 1,4 \pm 0,3 | 1,8 \pm 0,5 |
| Tasa de ovulación (%) | 88,9% (8/9) | 77,8% (7/9) | 57,1% (4/7) | 88,9% (8/9) | 87,5% (7/8) |
| Intervalo retiro DISP-ovulación (h) | 67,5 \pm 7,7 ^a | 78,0 \pm 9,8 ^b | 81,0 \pm 11,5 ^b | 82,5 \pm 6,2 ^b | 86,6 \pm 11,4 ^b |
| Prolongación efectiva del Proestro (h) | Referencia | +11,3 | +13,5 | +15,0 | +19,1 |
| Área del CL al Día 15 (mm ²) | 301,3 \pm 102,5 | 228,8 \pm 43,9 | 228,1 \pm 73,0 | 220,8 \pm 58,9 | 246,2 \pm 50,7 |
| Concentración plasmática de P4 al Día 15 (ng/mL) | 15,9 \pm 5,3 | 15,0 \pm 8,9 | 8,8 \pm 6,3 | 11,9 \pm 3,3 | 14,0 \pm 3,7 |

a,b Letras diferentes para una misma fila difieren significativamente ($P<0,05$)

La cantidad de animales que lograron ovular no fue diferente entre los grupos, por lo que la **tasa de ovulación** no difirió entre los mismos ($P>0,1$).

Hubo una diferencia significativa en el **intervalo de tiempo entre el retiro del DISP y la ovulación** (Tabla 3.1; Figura 3.1), donde las vaquillonas pertenecientes al grupo 7D24 ovularon antes que el resto de los grupos ($P<0,05$), los cuales no se distinguieron entre sí. La diferencia entre la media de ovulación del grupo 7D24 y la del resto de los grupos fue de 14,5 h.

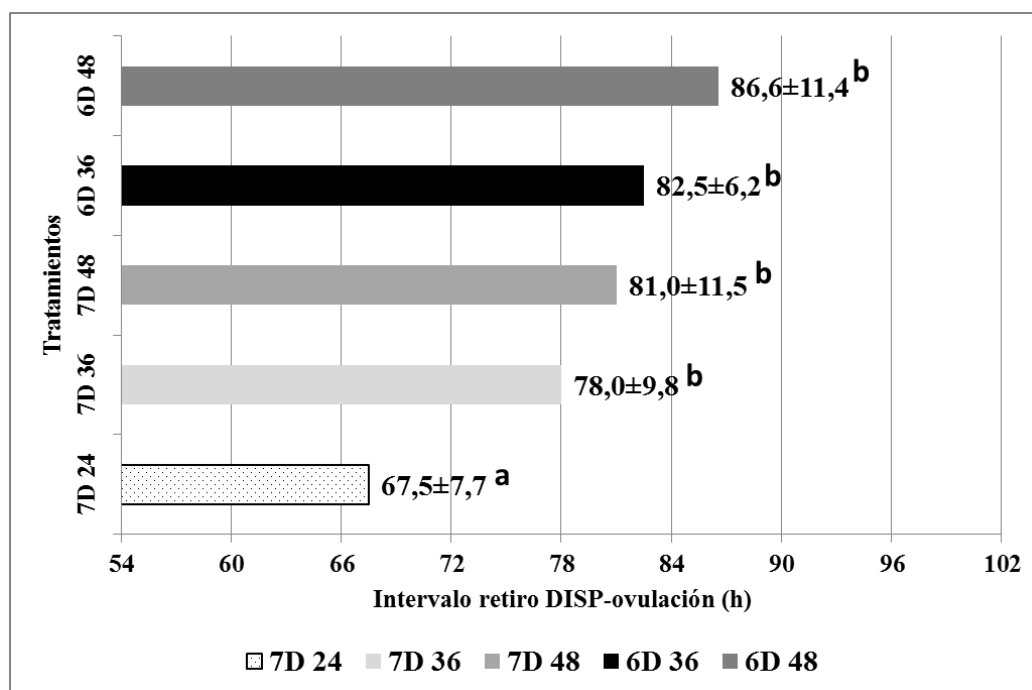


Figura 3.1. Intervalo de tiempo (h) desde el retiro del DISP hasta la ovulación con los diferentes tratamientos para los animales del Experimento I.

La **dispersión de la ovulaciones** (Figura 3.2) tendió a ser mayor en los dos grupos en los cuales se administró el inductor de ovulación (BE) a las 48 h de la remoción del DISP (6D48 y 7D48) con respecto al grupo 6D36 ($P<0,10$).

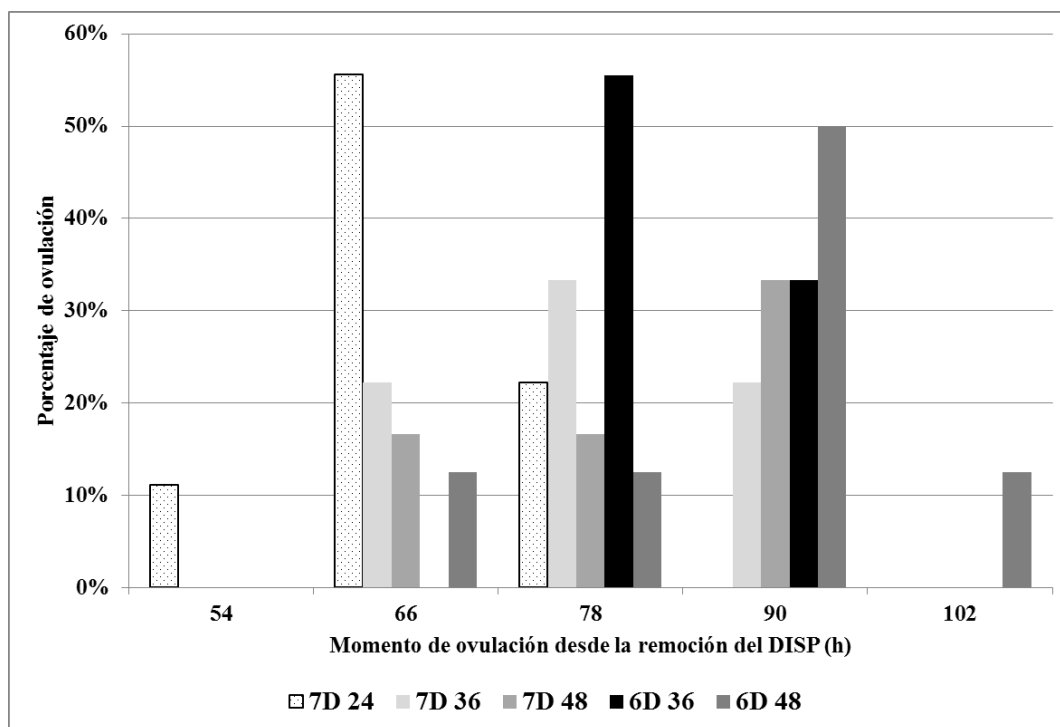


Figura 3.2. Distribución de las ovulaciones luego de la sincronización con los diferentes tratamientos para los animales del el Experimento I. Tiempo en horas (h) desde el retiro de los dispositivos intravaginales con P4.

El **área del CL** a los 15 días de retirados los DISP no presentó diferencias significativas entre los grupos ($P>0,1$). Del mismo modo, los resultados de determinación de la **concentración plasmática de P4** tampoco arrojaron diferencias entre los grupos ($P>0,1$; Tabla 3.1).

Experimento II

No se observaron diferencias significativas para la **tasa de preñez** (Tabla 3.2) entre los grupos 6D36 (62,3%) y 7D24 (68,4%; $P>0,5$). A su vez, la tasa de preñez de ambos grupos fue mayor que 7D36 (41,8%; $P<0,05$). La tasa de preñez del grupo 6D48 (50,0%) no difirió de los grupos 6D36 ni 7D36 ($P>0,2$) pero fue menor que 7D24 ($P<0,05$).

Tabla 3.2. Tasa de preñez a la IATF para vaquillonas tratadas con diferentes protocolos de sincronización en el Experimento II.

| | 7D24 | 7D36 | 6D36 | 6D48 |
|-----------------------|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Tasa de preñez | 68,4% ^a | 41,8% ^{b,c} | 62,3% ^{a,d} | 50,0% ^{c,d} |
| | (39/57) | (23/55) | (33/53) | (27/54) |

Letras diferentes difieren significativamente (P<0,05)

Experimento III

Hubo efecto Réplica (P<0,05) donde la tasa de preñez fue mayor en la Réplica 2 que en la Réplica 1 (65,1% y 41,2%, respectivamente), mientras que la Réplica 3 (59,6%) no se diferenció del resto. No hubo efecto de la EO, ni sus interacciones (P>0,1). Tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas para la tasa de preñez cuando fueron comparados los resultados del grupo 6D36EB frente al 7DECP (P>0,1).

Tabla 3.3. Tasa de preñez a la IATF para vaquillonas tratadas con dos protocolos de sincronización diferentes en el Experimento III.

| | 6D36EB | 7DECP | P |
|------------------|----------------------|----------------------|------------|
| Réplica 1 | 38,2% (13/34) | 44,1% (15/34) | 0,6 |
| Réplica 2 | 63,6% (21/33) | 66,7% (20/30) | 0,7 |
| Réplica 3 | 65,5% (19/29) | 53,6% (15/28) | 0,5 |
| TOTAL | 55,2% (53/96) | 54,3% (50/92) | 0,5 |

Experimento IV

Se observó un efecto significativo de la interacción Tratamiento*EO como consecuencia de que el grupo GnRH72 (J-Synch) logró la mayor tasa de preñez en los animales que tuvieron un folículo ≥ 10 mm como EO al inicio del tratamiento ($P < 0,05$; Tabla 3.4). No difirieron entre sí los otros tratamientos (6D36EB y 6D36EB+GnRH72; $P > 0,05$). En los animales que tuvieron un CL como EO al inicio del tratamiento, las diferencias no fueron significativas ($P > 0,05$; Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Tasa de preñez a la IATF para vaquillonas tratadas con diferentes protocolos de sincronización y con diferentes estructuras ováricas presentes al inicio de los mismos en el Experimento IV.

| | GnRH72 (J-Synch) | 6D36EB | 6D36EB+GnRH72 |
|---|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Cuerpo Lúteo | 54,5% (30/55) | 50,9% (29/57) | 49,1% (27/55) |
| Folículos ≥ 10mm | 72,3% ^a (34/47) | 46,8% ^b (22/47) | 43,5% ^b (20/46) |

a,b Letras diferentes difieren significativamente ($P < 0,05$)

DISCUSIÓN

Incrementar la duración del proestro en protocolos de IATF, utilizando exclusivamente estradiol y progesterona, no logró aumentar la tasa de preñez que puede ser obtenida con un protocolo de sincronización con una duración de proestro convencional en vaquillonas *Bos taurus* de razas carniceras. En consecuencia, los resultados obtenidos permiten rechazar la hipótesis planteada.

No obstante, aumentar el intervalo entre el retiro del DISP y la aplicación del inductor de ovulación permitió incrementar la duración efectiva del proestro para todas las combinaciones evaluadas (7 o 6 días de tratamiento con DISP combinado con diferentes tiempos de inducción con BE). Y si bien las mismas no se vieron reflejadas en una mejora de las tasas de preñez en las condiciones de los estudios que conforman ésta tesis, existen antecedentes (Bridges et al., 2008a; 2009; 2010; de la Mata y Bó, 2012; Lonergan et al., 2013; de la Mata, 2016) que muestran los efectos positivos sobre la madurez del ovocito y el potencial efecto sobre el útero. Sin embargo, la combinación (6D36EB) que mejor performance mostró en los primeros estudios (prolongación del proestro y tasa de preñez) no logró mejorar la tasa de preñez cuando fue comparada con un protocolo de proestro prolongado pero que emplea la GnRH como inductor de ovulación (J-Synch). Por el contrario, la tasa de preñez se vio disminuía significativamente con el protocolo 6D36EB, incluso cuando se evaluó la combinación de ambos inductores (BE+GnRH). Sin embargo, este efecto negativo solo fue observado en los animales que no tenían un CL; llamando la atención este resultado, por lo que futuros trabajos deberán profundizar en esta temática, que permitan confirmar los resultados observados en el presente trabajo y encontrar una explicación a lo sucedido.

Los resultados del Experimento I muestran que, tomando como referencia el grupo 7D24, el cual tuvo una duración de tratamiento con progesterona de 7 días y se indujo la

ovulación con 1 mg de BE a las 24 horas de finalizado el mismo, se logró aumentar efectivamente la duración del proestro entre 11,3 h y 13,5 h, cuando la inducción de la ovulación fue retrasada 12 h o 24 h (7D36 y 7D48, respectivamente). En ese mismo sentido, la reducción de un día en la duración del tratamiento con P4 (de 7 para 6 días), combinado con un retraso de la aplicación del inductor de ovulación (tomando como referencia el tiempo transcurrido entre el retiro del DISP y la inyección del inductor), logró un aumento efectivo del tiempo de proestro en 15 h y 19,1 h (6D36 y 6D48). Resulta interesante contrastar dicho análisis con lo reportado por Dadarwal et al. (2013) quienes informan sobre la reducción de la preñez cuando el proestro fue disminuido de 48 para 24 h. En el mismo sentido, Bridges et al. (2008a; 2010) informan sobre los beneficios de prolongar el proestro y su impacto sobre el incremento en la producción de E2 por parte del folículo dominante preovulatorio, aunque sin aumentar su diámetro, y sobre la tasa de preñez.

En el Experimento I, el proestro aumentó significativamente para todas las variantes estudiadas (7D36, 7D48, 6D36 y 6D48) y, coincidentemente con lo reportado por Bridges et al. (2008a y 2010), los diámetros de los folículos dominantes preovulatorios no variaron entre grupos ($11,9 \pm 1,3$ mm²), aunque sí lo hicieron al momento del retiro de los DISP, donde los tratamientos de 6 días tenían 1 día menos y alrededor de 2,1 mm menos en promedio. Esto último coincide con lo reportado recientemente por de la Mata (2016) al comparar el protocolo J-Synch frente a un convencional (7D CPE) en vaquillonas de razas carniceras, donde el diámetro del folículo dominante al retiro del DISP era significativamente menor en el tratamiento de 6 días ($8,3 \pm 1,2$ vs $10,0 \pm 2,4$ mm), mientras que el diámetro del folículo dominante al momento de la ovulación no fue diferente entre los grupos ($13,0 \pm 1,0$ vs $12,8 \pm 0,9$ mm). En un estudio similar en vaquillonas Holando Argentino, Ré et al. (2013) tampoco encontraron diferencias entre el diámetro promedio del folículo preovulatorio cuando compararon un protocolo convencional (7D 24EB) y el J-Synch siendo $12,8 \pm 0,5$ vs $13,1 \pm 0,6$ mm, respectivamente. Sin embargo, de la Mata (2016) halló que la tasa de crecimiento diario de los folículos dominantes del protocolo el J-Synch, con proestro prologando, tendió a ser mayor frente al protocolo convencional ($1,3 \pm 0,4$ vs $1,0 \pm 0,4$ mm/día, respectivamente), lo que no fue posible establecer en el Experimento I donde no se diferenció

la tasa de crecimiento para el protocolo convencional (7D24) y aquellos de proestro prolongado, siendo en promedio de $1,5 \pm 0,6$ mm/día.

Si bien durante el Experimento I no fue posible establecer una diferencia en cuanto a la tasa de crecimiento y el tamaño del folículo dominante preovulatorio, como se mencionó anteriormente, sí fue posible incrementar la duración del proestro respecto al protocolo convencional. Durante el proestro, los niveles de P4 son bajos, lo que resulta en un aumento de la frecuencia de la pulsatilidad de la LH (Kojima et al. 1992; Savio et al., 1993). El aumentar la duración del proestro incrementa el tiempo de exposición del folículo dominante a los pulsos de LH, lo que impacta sobre la capacidad esteroidogénica del mismo, aumentando su producción de E2 (Bridges, 2009 y 2010; Larimore et al., 2016). Uno de los objetivos de los protocolos de IATF debería ser lograr un folículo fisiológicamente maduro al momento de la IA (Mussard et al., 2007), lo que puede inferirse en parte a través de la relación existente con el diámetro del mismo (Perry et al., 2007; Sá Filho et al., 2010). Un mayor tamaño folicular ha sido asociado a un folículo mejor desarrollado, más maduro (Perry et al., 2005), que produce mayores niveles de E2 y, esto último, a mayores tasas de preñez (Bridges et al., 2009, 2010; Jinks et al., 2012; Atkins et al., 2013). Si bien aquí no fue posible medir los niveles de E2, sí fue posible comprobar un crecimiento folicular desarrollado por más tiempo a menores niveles de P4 y, teóricamente, pulsos de LH más frecuente. En este mismo sentido, de la Mata (2016) informa que con el protocolo J-Synch comparado con un convencional (7D CPE) obtuvo similares niveles de E2 preovulatorio en vaquillonas para carne, aunque el protocolo corto no recibió E2 exógeno y el convencional sí (0,5 mg de CPE), pudiendo inferir que los folículos del protocolo J-Synch podrían haber producido más E2. Por el contrario, Bridges et al. (2010) en un estudio en vacas y sin aplicar E2 exógeno, reportan una diferencia significativa en los niveles preovulatorios de E2 al incrementar la duración del proestro en 1 día.

El aumento en los niveles de estradiol es importante ya que estaría, entre otras funciones, condicionando la funcionalidad del CL. Así, Perry et al. (2005) indican que la concentración intra-folicular de estradiol tiene un rol determinante en la preparación de las células foliculares para su luteinización (formación y funcionalidad). El estradiol actúa sobre las células de la granulosa, aumentando la expresión de receptores de LH (Bao et al., 1997;

Larimore et al., 2016) y favoreciendo la luteinización y posterior producción de P4 por parte del CL consecuente.

En relación a lo planteado precedentemente, varios autores (Mussard et al., 2007; Bridges et al., 2010) han observado una asociación entre el incremento del proestro y el aumento de la producción de P4 por parte del CL resultante de ese folículo más estimulado, lo que se traduciría en mayores concentraciones de P4 circulante. Como se mencionó anteriormente, los diámetros de los folículos preovulatorios no difirieron entre los grupos del Experimento I como así tampoco el área de los CL consecuentes que tuvieron en promedio $247,5 \pm 72,5$ mm². Si bien hubo diferencias numéricas, donde el protocolo convencional tuvo el área de mayor tamaño ($301,3 \pm 102,5$ mm²), también tuvo la variación más grande. En un estudio en vaquillonas Holando Argentino, Callejas et al. (2011) informan un resultado semejante, con un diámetro de CL de $375,8 \pm 77,4$ mm² para un protocolo similar al grupo 7D24. El resto de los grupos del Experimento I tuvieron un área de CL más parecido entre sí que con el convencional, y que entre todos ellos promedió $230,9 \pm 52,8$ mm². Estos resultados difieren de lo informado por de la Mata (2016) donde el grupo de proestro prolongado (J-Synch) logró incrementos significativos del tamaño del CL subsiguiente cuando fue comparado con un protocolo convencional. El objetivo implícito de pretender lograr un CL de mayor volumen o diámetro radica en que varios autores han relacionado positivamente el tamaño del CL con su nivel de producción de P4 (Vasconcelos et al., 2001; Perry et al., 2005), siendo que la misma es de gran importancia para el desarrollo del embrión y el mantenimiento de la gestación temprana (Spencer et al., 2007; Lonergan et al. 2013; Bazer, 2013; Perry, 2017). Respecto a los valores plasmáticos de P4 obtenidos durante el Experimento I, tampoco se diferenciaron entre los grupos y tuvieron una media de $13,5 \pm 5,8$ ng/mL. En un estudio más exhaustivo, de la Mata (2016) logró demostrar cómo el incremento del proestro con el protocolo J-Synch aumentó significativamente los niveles plasmáticos de P4 en la fase luteal siguiente a la ovulación. Por otro lado, Bridges et al. (2010) al trabajar con vacas e incrementando la duración del proestro en 24 h, lograron aumentar significativamente (Exp. 1) o tender a aumentar (Exp. 2) la concentración plasmática de P4 posterior. En consecuencia, futuros trabajos deberán continuar estudiando el protocolo de proestro prolongado (6D36) que permitan analizar el porqué de no haber logrado aumentar el área del cuerpo lúteo y los niveles de progesterona circulante.

Thatcher et al. (1994) describen un complejo suceso de eventos previos a la ovulación, los cuales tienen un efecto significativo sobre la diferenciación y función de CL en formación, lo que resultará esencial para el desarrollo embrionario y por ende producción de IFN- τ (Mann y Lamming, 2001). La P4 producida por ese CL temprano cumple un rol fundamental en el establecimiento de la gestación, a través de un significativo efecto sobre el ambiente uterino (Mann y Lamming, 2001; Lonergan et al., 2013). Esa P4 tiene gran efecto sobre el desarrollo del conceptus, pero exclusivamente mediado por el endometrio (Clemente et al., 2009). Tanto en el ciclo estral como en la preñez temprana, ocurren cambios temporales en el transcriptoma del endometrio (Forde et al., 2009; 2011b). Estos cambios ocurren hasta el reconocimiento materno, cuando el conceptus induce modificaciones sobre la expresión génica del endometrio (Forde et al., 2011c). Elevados niveles de P4 durante el metaestro y el diestro temprano han sido asociados al adelantamiento de esos cambios temporales a nivel del endometrio (Forde et al., 2009) y a la modificación del momento de disminución de los receptores de P4 en el epitelio luminal (Okumu et al., 2010). Consecuentemente a lo mencionado, fue descrito por Carter et al. (2008) un incremento en la elongación del conceptus, lo que se asoció a una mayor supervivencia embrionaria. Finalmente, aquellas vacas que tienen mayor concentración de P4 a partir del día 4 o 5 fueron las que presentaron embriones con mejor desarrollo y mayor producción de IFN- τ al día 16 (Lonergan et al., 2013).

La estrategia de evaluación adoptada en esta tesis sobre el inductor de ovulación (base estradiol), está relacionada a dos factores principales: la diferente farmacocinética que poseen las sales de estradiol mayormente utilizadas para tal fin, siendo el benzoato y cipionato de estradiol (Vynckier et al., 1990; Madsen et al., 2015); y la practicidad operativa en cuanto a la cantidad de encierres que son necesarios para cumplir con el protocolo de sincronización del ciclo estral para realizar una IATF (Uslenghi et al., 2010, 2014; Veiga et al., 2011).

En una revisión realizada por Callejas (2005), se informa sobre los resultados de un estudio de Hanlon et al. (1997) desarrollado con vaquillonas lecheras tratadas con un DISP que, 24 h después de ser removido, se administró BE, lo cual indujo un pico de LH a las 16,1 h en promedio (mediana 40 h pos DISP) y la ovulación media fue a las 40 h (mediana 64 h pos DISP). En un estudio similar más reciente, Ré et al. (2013) informan en vaquillonas

Holando, utilizando un DISP de 1 g por 7 días, un intervalo retiro DISP-ovulación de 82,7 h. Basados en los primeros trabajos, Mapletoft et al. (1999) concluyeron que el momento ideal de la inseminación era entre las 52 y 56 h luego del retiro del DISP, siendo alrededor de 12 h antes de la ovulación.

Muchos esfuerzos han sido realizados para intentar disminuir la cantidad de encierres en los protocolos de IATF. Los primeros intentos se centralizaron en adelantar la aplicación del BE al día del retiro del DISP en lugar de 24 h después. En un estudio comparativo en vacas, Cutaia et al. (2001) encontraron que el intervalo entre el retiro de DISP hasta la ovulación no difirió entre tratamientos (BE 0h = 54 h vs BE 24h = 66 h) pero la varianza fue significativamente mayor en el grupo BE 0h. En otro estudio, Cesaroni et al. (2000) reportaron tasas de preñez en vaquillonas de 15 meses de edad que recibieron BE a las 0 h (59%) similares a aquellas que lo recibieron a las 24 h (49,2%).

Finalmente fue utilizado otro inductor de la ovulación, el cipionato de estradiol. A diferencia del BE, el CPE tiene una farmacocinética completamente diferente (Madsen et al., 2015), alcanzado una concentración máxima significativamente menor y presentando una mayor vida media (Vynckier et al., 1990). Basado en ello, se pensó en su uso al momento de retirar los DISP. Colazo et al. (2003) reportaron que el CPE, en vaquillonas para carne, administrado al retiro del DISP o 24 h después, fue efectivo para sincronizar la ovulación cuando al inicio del mismo se utilizó una sal de estradiol de baja dispersión, tal es el 17 β -estradiol a la dosis de 5 mg. En otro estudio, Callejas et al. (2011) realizado en vaquillonas Holando Argentino se comparó el efecto de 1 mg de CPE al momento del retiro del DISP vs 1 mg de BE 24 h después del retiro sobre la dinámica ovárica. El intervalo retiro del DISP – ovulación fue similar entre los grupos (64,5 h para el CPE 0 h vs 66,0 h para el BE 24 h) pero significativamente más disperso para CPE con un rango entre 54 y 78 h. Estos datos coinciden con lo reportado por Uslenghi et al. (2014) en vacas, donde 1 mg de BE 24 h tuvo un intervalo retiro DISP-ovulación de 65,4 h con un rango de 54 a 78 h mientras que el grupo CPE 0 h fue de 66,0 h con un rango de 42 a 90 h, aunque no difirieron estadísticamente. En otro estudio, Rodríguez Pérsico et al. (2015) informan que en vaquillonas carniceras, utilizando un DISP con 558 mg de P4 y 0,5 mg CPE al retiro, el intervalo retiro DISP-ovulación fue de 65,3 h.

Hoy día está aceptado que no hay diferencias en las tasas de preñez a la IATF cuando es utilizado CPE al momento del retiro o BE 24 h después del mismo. Veiga et al. (2011) en un estudio con varias réplicas en vaquillonas informan 63,2% (CPE) frente a 60,6% (BE) sin diferencias, lo que coincide con Rodríguez Pérsico et al. (2014) donde los resultados de preñez a la IATF en vaquillonas fueron 66,0% (CPE) frente a 69,4% (BE).

Los resultados de fertilidad hallados en el Experimento II muestran al protocolo convencional (7D24) logrando una elevada tasa de preñez (68,4%) a la IATF, según la frecuencia de resultados reportados por Bó et al. (2016) donde, sobre una base de más de 400.000 IATF en condiciones de campo, el 41% de las veces las tasas de preñez se ubican entre 51 a 60%, mientras que un 24% de las veces lo hicieron entre el 61 y 70%. Así mismo, ese resultado también coincide con lo reportado por Rodríguez Pérsico et al. (2014) en vaquillonas carniceras para un tratamiento convencional donde obtuvieron un 69,4% de preñez a la IATF. Sin embargo, el grupo con igual duración de tratamiento con P4 (7 días), el retrasar la inducción de la ovulación con 1 mg de BE (de 24 h para 36 h), y a pesar de haber incrementado efectivamente el proestro en +11,3 h, redujo significativamente la tasa de preñez. Este hallazgo no coincide con lo informado por Bridges et al. (2008a; 2010) que al aumentar la duración del proestro, aumentaron la preñez trabajando con vacas. Sin embargo, el bajo resultado de preñez del grupo 7D36 podría explicarse en parte por la distribución de las ovulaciones observada para este grupo en el Experimento I, donde el 28,6% (2/7) de las vaquillonas ovularon a las 66 h, siendo antes del horario de IATF (72 h) utilizado para el Experimento II.

Por otro lado, los grupos de 6 días de duración del tratamiento con P4 (6D36 y 6D48), arrojaron resultados variables. Si bien la tasa de preñez no difiere entre ellos, a pesar de haber una diferencia numérica de 12,3% a favor del 6D36 frente al 6D48, éste último fue marcadamente menor al convencional (-18,4%). Esto tampoco coincide con lo reportado por Bridges et al. (2008a; 2010), ya que éste grupo también tuvo un incremento de su proestro de +19,1 h respecto al convencional. Por el contrario, el grupo 6D36 con un incremento efectivo del proestro de +15 h respecto del grupo 7D24, logró resultados de preñez similares, con tan

solo 6,1% de diferencia numérica a favor del convencional y, del mismo modo, ubicándose en el rango de resultados elevados (>60%) reportados por Bó et al. (2016).

Resulta evidente, analizando en conjunto los grupos 7D36 y 6D48, que aumentar el proestro no implica necesariamente mejorar la preñez a la IATF. Existen otros factores intervinientes que determinan el resultado de un trabajo de IATF. Quizá una parte podría ser explicada con la tendencia encontrada en el Experimento I, donde a medida que se aumenta el tiempo del proestro, se incrementa la dispersión de las ovulaciones; y a su vez, la relación con el horario establecido para realizar la IA que fue basado en el intervalo medio desde el retiro del DISP hasta la ovulación. Dicha situación queda muy bien evidenciada al comprar los grupos de 6 días, donde para el grupo 6D36 el 100% de las ovulaciones ocurrieron entre las 78 y 90 h, habiéndose inseminado a las 72 h, mientras que para el grupo 6D48 el 71,4% de las ovulaciones ocurrieron entre las 90 y 102 h, habiéndose inseminado a las 80 h, siendo que el 28,6% de las mismas ocurrió antes de la IA.

La evaluación conjunta de los resultados obtenidos en los Experimentos I y II permitieron conocer el impacto sobre la dinámica ovárica de las diferentes combinaciones de duración de proestro propuestas en los diferentes protocolos de sincronización del ciclo estral. A su vez, la complementación con resultados de preñez similares al protocolo convencional y a lo reportado por diversos autores (Bó et al., 2002a, 2002b; Cutaia et al., 2003; Callejas, 2005; Bó et al., 2013) permitieron identificar que el protocolo 6D36 fue el que presentó mayores ventajas (sincronización de las ovulaciones y practicidad en cuanto a los horarios para la IATF) respecto a las otras variantes (7D36 y 6D48), razón por la cual se profundizó el trabajo con el mismo. Por otra parte, se definió cambiar el protocolo convencional de referencia (7D 24) a uno que, en lugar de utilizar el BE como inductor de ovulación, emplea el cipionato de estradiol al finalizar el tratamiento de 7 días con P4 (retiro del DISP): protocolo 7DECP. Este protocolo es ampliamente utilizado en todas las categorías y razas y, como fue mencionado anteriormente, hay variados reportes que indican que se logran similares tasas de preñez cuando es comparado con el anterior, sumando además la ventaja operativa de evitar un encierre de los animales (Uslenghi et al., 2010, 2014; Sá Filho et al., 2011b; Veiga et al., 2011).

Para el Experimento III, se realizaron 3 réplicas del mismo estudio. A pesar de haberse encontrado un efecto réplica, las diferencias en las tasa de preñez logradas por los tratamientos 6D36EB (proestro prolongado) y el convencional (7DECP) fueron similares y se ubicaron alrededor del 54,8%. Estos resultados coinciden con los reportes de varios autores donde, trabajando con vaquillonas, son informadas tasas de preñez con protocolos convencionales (0,5 mg de CPE al retiro del DISP, luego de 7 u 8 días) de 52,2% (Biondini et al., 2011), 53,1% (de la Mata, 2016), 54,4% (Vassolo et al. 2011) e incluso algo más elevado como 66,0% (Rodríguez Pérsico et al., 2014).

Finalmente, para el Experimento IV se realizó un estudio donde, dejando fija la duración del tratamiento con progesterona durante 6 días, siendo todos de proestro prolongado, se trabajó sobre diferentes inductores de ovulación: BE o la GnRH o la combinación de ambos. Los protocolos cortos Co-Synch (5 días de DISP) y J-Synch (6 días de DISP) utilizan GnRH al momento de la IATF, con el objetivo de ovular el folículo dominante (Bridges et al., 2008a; de la Mata y Bó, 2012; respectivamente). Inducir la ovulación a folículos ≤ 11 mm de diámetro conlleva una disminución en la tasa de preñez y un posterior aumento en las pérdidas embrionarias (Perry et al., 2005). Sin embargo, incrementar la duración del proestro estimula el desarrollo folicular, generando un folículo más maduro, más fisiológico, evitando la ovulación de folículos pequeños que comprometerán el desarrollo luteal y limitarán el mantenimiento de la gestación (Vasconcelos et al., 2001; Mussard et al., 2007; Bridges et al., 2010; Lonergan et al. 2013).

Si bien hubo una interacción entre el grupo (tratamiento) y la estructura ovárica presente al inicio del tratamiento, al analizar el resultado de tasa de preñez del grupo 6D36EB en general (49%), se observa que es inferior a la obtenida en los Experimentos previos (Exp. II = 62,3%; Exp. III Réplica 2 = 63,6% y Exp. III Réplica 3 = 65,5%). Al ser comparada también con la preñez total lograda por el grupo J-Synch, que fue del 62,7%, se evidencia que ésta es superior. Estos resultados para el grupo J-Synch a nivel general coinciden con lo reportado en vaquillonas carniceras por Bó et al. (2016) donde al cabo de una serie de réplicas reporta 61,9% para el tratamiento J-Synch y que se diferenciaron del acumulado del grupo convencional (51,4%). Por otra parte, Ré et al. (2013) al trabajar con vaquillonas Holando

Argentino, reportaron resultados similares para el tratamiento J-Synch, siendo comparado con el Co-Synch de 5 días y un convencional, obteniendo las siguientes tasa de preñez: 62,7%, 54,5% y 53,4%, respectivamente. En otro estudio similar también en vaquillonas Holando Argentino, Ré et al. (2015) reportan 63,6% de tasa de preñez para el J-Synch frente a 61,9% del protocolo convencional (7D24EB), no habiendo diferencia entre los mismos. Por el contrario, en un estudio reciente en vaquillonas Aberdeen Angus, Erbiti et al. (2017) compararon el efecto de distintos protocolos sobre las tasas de preñez a la IATF: convencional (7DECP), J-Synch y Co-Synch 5 días, obteniendo 61,1%^a (69/113), 55,5%^b (61/110) y 38,1%^b (43/113), respectivamente. Estos autores utilizaron 300 UI de eCG en la mitad de los animales de cada grupo no observando interacción de dicha hormona con el tratamiento, pero sí un efecto de la misma.

Abriendo los datos por estructura ovárica, siguiendo el resultado estadístico obtenido en el análisis de la información del Experimento IV, se evidencia una notable y significativa diferencia a favor del grupo J-Synch (GnRH72) en aquellas vaquillonas que al inicio del tratamiento tuvieron folículos ≥ 10 mm (sin CL). Focalizando sobre el resultado obtenido por el protocolo J-Synch, se observa que los mismos son contrarios a lo reportado por Núñez-Olivera et al. (2016) quienes trabajaron con vaquillonas carniceras y también hallaron interacción entre el tratamiento y la estructura ovárica, pero aquellas vaquillonas que tenían un CL al inicio del protocolo se preñaron 77% (n=173) frente a aquellas que sólo tuvieron folículos al inicio y se preñaron 61% (n=140), siendo significativamente menor ($P < 0,05$). A diferencia de lo hallado en ese trabajo y en el Experimento IV, en el estudio de Erbiti et al. (2017) antes mencionado, no hubo interacción entre el tratamiento (7DECP, J-Synch o Co-Synch 5D) y la estructura ovárica al inicio del protocolo (CL o folículos > 10 mm), indicando que el desempeño del tratamiento J-Synch fue independientemente de la estructura ovárica al inicio. Cabe señalar que estos autores no observaron una mejora en la preñez al utilizar el tratamiento J-Synch con respecto al tratamiento convencional.

Corriendo el eje del J-Synch (GnRH72) pero focalizando sobre el uso de la GnRH, en este caso puntual a las 48 h del retiro de los dispositivos y comparándolo con 1 mg de BE a las 24 h en protocolos convencionales de 7 días de duración y utilizando 300 UI de eCG, Menchaca et al. (2013) reportan resultados de un estudio realizado en vaquillonas (cruza

Angus o Hereford con Braford) de 24 meses los cuales coinciden con los hallazgos del Experimento IV. Estos autores indican que la tasa de preñez no difirió entre tratamientos cuando los animales tuvieron un CL al inicio del protocolo [EB24 40,9% (18/44) vs GnRH48 60,7% (17/28), pero sí lo hicieron cuando no tenían un CL y sólo presentaban folículos ≥ 8 mm siendo que el grupo BE24h obtuvo 26,4% (34/129) frente al grupo GnRH48h 40,3% (54/134; $P < 0,05$).

Por otra parte, los hallazgos del Experimento IV pueden relacionarse, aunque contradictoriamente, con lo informado por Villa et al. (2017) donde se comparó la tasa de preñez obtenida con el protocolo J-Synch frente a un convencional (7DECP), trabajando con dos rodeos de vaquillonas carniceras, la tasa de ciclicidad (presencia de CL) al momento de iniciar el protocolo fue de 60,8% para el primer rodeo y de 27,3% para el segundo. No hubo efecto de la estructura ovárica, pero sí de la interacción entre Grupo y Rodeo. El protocolo J-Synch obtuvo 55% de preñez en el primer rodeo (y no difirió del convencional con 48,3%), mientras que logró 52,3% en el segundo rodeo, el de menor ciclicidad, siendo que el convencional logró significativamente mejor preñez (70,5%) no coincidiendo con los resultados del Experimento IV donde la diferencia del grupo J-Synch fue dada por esa mayor preñez lograda por aquellas vaquillonas sin CL y con folículos ≥ 10 mm al inicio; y por otro lado, los datos reportados por Villa et al. (2017) en el grupo de mayor ciclicidad coinciden con lo reportado por Erbiti et al (2017) donde, sin haber efecto de la estructura ovárica, el tratamiento convencional logró una preñez similar al J-Synch.

En los resultados reportados por de la Mata (2016) se observa que, cuando el plano nutricional de las vaquillonas fue negativo, se condicionó la tasa de preñez obtenida con el protocolo J-Synch (37,8%), siendo significativamente inferiores que con un protocolo convencional (49,3%). Una posible explicación fue atribuida a una baja pulsatilidad de LH (Yavas y Walton, 2000), lo que se traduciría en un menor tamaño folicular (menores concentraciones de estradiol), forzando a ovular un folículo pequeño (Sartori et al., 2001) o fallando en la ovulación. Por el contrario, en el Experimento IV, aquellas que no tuvieron un CL al inicio sino un folículo ≥ 10 mm lograron la mejor tasa de preñez. Una posible explicación para la tasa de preñez de este subgrupo podría ser que los animales de este estudio tenían una excelente condición corporal y un plano nutricional muy bueno y francamente

positivo, por lo que no hubo limitaciones para el desarrollo folicular, con una normal pulsatilidad de la LH (Schillo et al., 1992), alcanzando un desarrollo óptimo bajo la influencia de un proestro prologando y todos los beneficios antes mencionados (Perry et al., 2005; Mussard et al., 2007; Bridges et al., 2008a; de la Mata, 2016). En consecuencia, el uso de la GnRH para el grupo J-Synch habría favorecido la ovulación sincrónica de esos folículos bien desarrollados y maduros. Aunque esto no logra explicar por qué razón, este subgrupo con folículos $\geq 10\text{mm}$ logró preñarse más que el subgrupo con un CL.

Por otra parte, se esperaba que el grupo que combinaba ambos inductores de ovulación (6D36EB+GnRH72) mejorara los resultados de preñez respecto del J-Synch y sin embargo fue, aunque numéricamente, el de peor performance reproductiva. Esa hipótesis se basaba en el beneficio de sumar estradiol exógeno, potenciando el impacto benéfico que fue descrito para el E2 sobre el desarrollo folicular (Larimore et al., 2016) y el útero y su medio ambiente (Madsen et al., 2015; Perry, 2017). Sin embargo, de la Mata (2016) al comparar el perfil sérico de estradiol entre el protocolo J-Synch y el convencional (habiendo recibido 0,5 mg de CPE) observó que son similares, por lo que postula que el J-Synch habría producido más estradiol como consecuencia de una mejor estimulación durante el proestro prolongado, basándose en lo reportado por Bridges et al. (2009, 2010) referente a este tema puntual. Asumiendo que la buena condición y oferta nutricional antes mencionada para los animales de este estudio haya permitido tener una óptima pulsatilidad de LH durante el proestro y por lo tanto el desarrollo folicular haya sido muy bueno para el grupo J-Synch, produciendo buenos niveles de estradiol, no siendo necesaria una fuente exógena, pueden explicar en parte por qué la adición de BE no mejoró la tasa de preñez.

Sin embargo, resta aún establecer por qué razón la preñez fue menor en éste subgrupo (6D36EB+GnRH72 y folículo $\geq 10\text{mm}$) respecto al subgrupo J-Synch (GnRH72) y folículo $\geq 10\text{mm}$, siendo que la única diferencia fue la adición de 1 mg de BE. En este sentido, Lammoglia et al. (1998) en un estudio en vaquillonas evaluaron diferentes dosis de BE (aplicado entre 24 y 30 h pos retiro del DISP) y su relación con el pico de LH. Siendo así, al estudiar tres niveles de dosificación (0,2 mg, 0,38 mg y 0,75 mg), determinaron que una dosis tan baja como 0,2 mg de BE fue suficiente para desencadenar un pico de LH. Así mismo, la

concentración del pico de LH aumentó linealmente con la dosis y fue independiente de la estructura ovárica al inicio del protocolo; en el mismo estudio, también establecieron una relación inversa que muestra cómo, al aumentar la dosis de BE, se adelanta el tiempo en que sucede el pico de LH. Finalmente, definen que la dosis mínima más efectiva pareciera ser 0,4 mg de BE. Basado, por un lado, en el fundamento de un muy buen plano nutricional y su relación con la pulsatilidad de LH, con un óptimo desarrollo folicular (Schillo et al., 1992), y por el otro, con la dosis utilizada de 1 mg de BE y la relación entre el nivel de dosificación y el pico de LH, en cuanto a la anticipación y el aumento de la magnitud (Lammoglia et al., 1998), podría especularse entonces con la posibilidad de que las ovulaciones de los grupos del Experimento IV que recibieron BE (6D36EB y 6D36EB+GnRH72) hayan forzado a ovular tempranamente folículos de menor tamaño, comprometiendo así la fertilidad (Perry et al., 2005; Mussard et al., 2007).

Volviendo sobre la información obtenida durante el Experimento I, se había identificado que la hora media de ovulación fue similar para los grupos de 6 días (6D36 = $82,5 \pm 6,2$ h y 6D48 = $86,6 \pm 11,4$ h). Sin embargo, la tendencia en la dispersión fue dada por que hubo un 25% de los animales del grupo 6D48 que ovularían antes de la hora establecida para la IATF (80 h). Esa podría ser una de las razones de la menor fertilidad de este grupo en la tasa de preñez del Experimento II. Si bien no hubo ovulaciones adelantadas en el grupo 6D36 durante el Experimento I y la tasa de preñez fue muy buena en el Experimento II, con la misma lógica planteada, podría especularse que las variaciones entre establecimientos, animales, condiciones nutricionales (Experimento I: buena; Experimento IV: excelente), estación del año (Experimento I: otoño; Experimento IV: primavera), manejo (Experimento I: intensidad de trabajos, ecografías cada 12 h; Experimento IV: menor intensidad), etc. podrían haber tenido impacto en los tiempos de ovulación de las vaquillonas del experimento IV de los grupos que recibieron 1 mg de BE a las 36 h pos retiro del DISP, incrementado el porcentaje de animales que ovularon en forma temprana, condicionando entonces la tasa de preñez.

Otro enfoque para intentar explicar el aparente efecto negativo del estradiol en el Experimento IV puede relacionarse a algunos resultados reportados por Menchaca et al.

(2013) donde evaluaron el uso de BE 24 h comparado con GnRH 48 h en protocolos convencionales de 7 días en vaquillonas. Ya fue mencionado anteriormente que en aquellas hembras que presentaron un CL al inicio no hubo diferencias en la tasa de preñez, pero sí lo hubo en aquellas sin CL y con folículos ≥ 8 mm, siendo que la GnRH48 logró mejor tasa de preñez que BE24. Sin embargo, en otro estudio de similares características también utilizando 300 UI de eCG, estos mismos autores reemplazaron el BE (1 mg) 24 h por 0,5 mg de CPE al momento del retiro de los dispositivos, comparándolo con GnRH 48 h y encontraron que no hubo diferencias en la tasa de preñez obtenida entre los tratamientos con CPE o GnRH ya sea que tuvieran un CL o no al inicio (CL-CPE 67,5%; CL-GnRH 60,9%; sinCL-CPE 59,6%; sinCL-GnRH 54,6%; $P > 0,1$). Pareciera evidente que existe una diferencia entre utilizar 1 mg de BE que 0,5 mg de CPE como inductores de ovulación. Ya fueron mencionadas las diferentes curvas farmacocinéticas de ambas sales (Vynckier et al., 1990; Madsen et al., 2015) y las implicancias de los niveles de dosificación utilizando como modelo el BE (Lammoglia et al., 1998). Pero será que existe otro mecanismo implicado, donde más allá de la sal empleada, haya un impacto negativo de la cantidad de estradiol. Podría especularse entonces que 1 mg de BE resultaría en un exceso de estradiol y podría ser en parte la causa que haya condicionado la tasa de preñez tanto en lo reportado por Menchaca et al. (2013) como los grupos con BE en el Experimento IV.

En resumen, fue posible aumentar la duración del proestro con diferentes estrategias respecto a un protocolo convencional, aunque no se lograron identificar otros beneficios descriptos en la literatura. El protocolo 6D36EB fue identificado como una herramienta alternativa a los protocolos convencionales, aunque no fue posible establecer una mejora en las tasas de preñez, remarcando que implica un encierro más de los animales. Sin embargo, no logró mejorar la tasa de preñez frente al protocolo J-Synch. Adicionar estradiol exógeno a este último pareció limitar la tasa de preñez en vaquillonas que no estaban cíclicas al inicio del protocolo. En cambio, cuando los animales estaban cíclicos (con CL), el protocolo 6D36EB, el J-Synch o la combinación de ambos lograron similares tasas de preñez. Resultados contradictorios dentro de esta misma tesis, como aquellos comparados con datos reportados por otros autores, indican que aún quedan mecanismos de acción para ser esclarecidos.

CONCLUSIONES

El incremento de la duración del proestro durante un protocolo de IATF que utiliza exclusivamente E2 y P4, no aumenta la tasa de preñez en vaquillonas carniceras *Bos taurus* cuando es comparado con un protocolo Convencional.

El FD ovulatorio del tratamiento basado en 6 días DISP e inducción de la ovulación a las 36 h desde el retiro del mismo (6D36ED), posee un menor diámetro que el FD del tratamiento Convencional al momento del retiro del DSIP, pero no tiene diferencias en el momento previo a su ovulación.

El tratamiento basado en 6 días de duración del DISP e inducción de la ovulación a las 36 h desde el retiro del mismo (6D36ED), logró sincronizar las ovulaciones con menor dispersión y no se diferenció del protocolo Convencional, mientras que logró un proestro significativamente más prolongado.

El tratamiento basado en 6 días de duración del DISP e inducción de la ovulación a las 36 h desde el retiro del mismo (6D36ED), logró iguales tasas de preñez que los tratamientos Convencionales con 7 días de duración del DISP e inducción de la ovulación con BE a las 24 h o bien CPE al momento del retiro del mismo.

El protocolo basado en 6 días de duración del DISP e inducción de la ovulación a las 36 h desde el retiro del mismo (6D36ED), logró iguales tasas de preñez que un protocolo de 6 días de duración donde la ovulación es inducida a las 72 h desde el retiro del mismo (protocolo J-Synch) cuando las vaquillonas tenían un CL al momento del inicio del tratamiento. En cambio, cuando no tenían un CL el protocolo J-Synch logró mejor tasa de preñez.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, G. P., R. Jaiswal, J. Singh, and P. Malhi. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 69:72–80.
- Atkins J.A., Smith M.F., MacNeil M.D., Jinks E.M., Abreu F.M., Alexander L.J. and Geary T.W. 2013. Pregnancy establishment and maintenance in cattle. *Journal of Animal Science* 91: 722-733.
- Bao, B., Garverick, H.A., Smith, G.W., Smith, M.F., Salfen, B.E. and Youngquist, R.S. 1997. Changes in Messenger Ribonucleic Acid Encoding Luteinizing Hormone Receptor, Cytochrome P450-Side Chain Cleavage, and Aromatase Are Associated with Recruitment and Selection of Bovine Ovarian Follicles. *Biology of Reproduction* 56: 1158-1168.
- Bazer, F.W. 2013. Contributions of an animal scientist to understanding the biology of the uterus and pregnancy. *Reproduction, Fertility and Development*. 25, 129–147.
- Binelli, M., Sartori, R., Vasconcelos, J. L., Monteiro Jr, P.L.J., Pereira, M.H.C. and Ramos, R.S. 2014. Evolution in fixed-time: from synchronization of ovulation to improved fertility. At Juengel, JL; Miyamoto, A; Price, C; Reynolds, LP, 493-506.
- Biondini, M., Zangrilli, G., Preisseger, G. y Callejas, S.S. 2011. Efectos de la sal de estradiol y de la duración del tratamiento con progesterona sobre el porcentaje de preñez a la IATF. *Inseminación artificial. Rev. vet.* 22: 2, 127-130.
- Bó, G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A, Tribulo, H.E., Caccia, M and Mapletoft, R.J. 1994. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology* 41(8): 1555-1569.
- Bó, G.A., Adams, G.P., Caccia, M., Martinez, M., Pierson, R.A. and Mapletoft, R.J. 1995. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science* 39: 193-204.

- Bó, G.A., Cutaia, L., Tribulo, R., 2002a. Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos para carne: algunas experiencias realizadas en Argentina. Primera Parte. Revista Taurus 14:10–21.
- Bó, G.A., Cutaia, L., Tribulo, R., 2002b. Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos para carne: algunas experiencias realizadas en Argentina. Segunda Parte. Revista Taurus 15:17–32.
- Bó, G.A., Baruselli, P.S. and Martinez, M.F. 2003. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. Animal Reproduction Science 78:307-326.
- Bó, G.A., Cutaia, L.E., Souza, A.H. y Baruselli, P.S. 2008. Actualización sobre protocolos de IATF en bovinos de leche. Memorias del 3° Simposio Internacional de Reproducción Animal Aplicada, Londrina, Brasil (95-110).
- Bó G.A., Baruselli P.S., Mapletoft R.J. 2013. Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. Animal Reproduction Science 10: 137-142.
- Bó, G.A., de la Mata, J.J., Baruselli, P.S. and Menchaca, A. 2016. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. Theriogenology 86:388-396.
- Bridges, G.A., Hesler, L.A., Grum, D.E., Mussard, M.L., Gasser, C.L. and Day, M.L. 2008a. Decreasing the interval between GnRH and PGF2 α from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. Theriogenology 69(7): 843-851.
- Bridges, A., Lake, S., Lemenager, R. and Claeys, M. 2008b. Timed-artificial insemination in beef cows: what are the option? Purdue Extension - Animal Science AS-575-W.
- Bridges, G.A., Mussard, M.L., Hesler, L.A. and Day, M.L. 2009. Comparison of follicular dynamics and hormone concentrations between the 7 d and 5 d CO-Synch + CIDR program in two-year-old beef cows. Journal of Animal Science 87(E-Suppl.): 464.
- Bridges, G.A., Mussard, M.L., Burke, C.R. and Day, M.L. 2010. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. Animal Reproduction Science 117(3-4): 208-215.
- Bridges, G.A., Ahola, J.K., Brauner, C., Cruppie, L.H., Currin, J.C., Day, M.L., Gunn, P.J., Jaeger, J.R., Lake, S.L., Lamb, G.C., Marquezini, G.H., Peel, R.K., Radunz, A.E., Stevenson, J.S. and Whittier, W.D. 2012. Determination of the appropriate delivery of

- prostaglandin $F_{2\alpha}$ in the five-day CO-Synch + controlled intravaginal drug release protocol in suckled beef cows. *Journal of Animal Science* 90(13): 4814-4822.
- Callejas, S.S. 2004. Control farmacológico del ciclo estral bovino: bases fisiológicas, protocolos y resultados. Parte I. *Revista Taurus* 24: 22-34.
- Callejas, S.S. 2005. Control farmacológico del ciclo estral bovino: bases fisiológicas, protocolos y resultados. Parte II. *Revista Taurus* 25: 16-35.
- Callejas, S.S., Uslenghi, G., Larghi, J., Cledou, G. y Cabodevila, J. 2011. Uso de cipionato de estradiol para sincronizar ovulaciones en vaquillonas Holando. *Revista Argentina de Producción Animal Vol 31 Supl. 1: 403-437.*
- Carter, F., Forde, N., Duffy, P., Wade, M., Fair, T., Crowe, M.A., Evans, A.C., Kenny, D.A., Roche, J.F. and Lonergan, P. 2008. Effect of increasing progesterone concentration from day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reproduction, Fertility and Development* 20:368-375.
- Cesaroni, G., Butler, H., Mc Dermott, E. y Cano, A. 2000. Preñez de vaquillonas inseminadas a tiempo fijo después de un tratamiento con CIDR asociado a GnRH o con benzoato de estradiol aplicado 0 o 24 h postratamiento. *Revista Taurus* 6:20-25.
- Clemente, M., De La Fuente, J., Fair, T., Al Naib, A., Gutierrez-Adan, A., Roche, J.F., Rizos, D. and Lonergan, P. 2009. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? *Reproduction* 138:507-517.
- Colazo M.G., Kastelic J.P. and Mapletoft R.J. 2003. Effects of estradiol cypionate (CPE) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. *Theriogenology* 60: 855-865.
- Colazo M.G. and Ambrose D.J. 2011. Neither duration of progesterone insert nor initial GnRH treatment affected pregnancy per timed-insemination in dairy heifers subjected to a Co-synch protocol. *Theriogenology* 76: 578-588.
- Colazo, M.G. and Mapletoft, R.J. 2014. A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle. *Canadian Veterinary Journal* 55:772-780.
- Cutaia, L., Moreno, D., Villata, L. and Bó, G.A. 2001. Synchrony of ovulation in beef cows treated with progesterone vaginal devices and estradiol benzoate administered at device removal or 24 hours later. *Theriogenology* 55:244.

- Cutaia, L.; Veneranda, G.; Tríbulo, R.; Baruselli, P.S. y Bó, G.A. 2003. Programas de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo en rodeos de cría: factores que lo afectan y resultados productivos. 5° Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina. Pág. 119-132.
- Dadarwal, D., Mapletoft, R.J., Adams, G.P., Pfeifer, L.F.M., Creelman, C. and Singh, J. 2013. Effect of progesterone concentration and duration of proestrus on fertility in beef cattle after fixed-time artificial insemination. *Theriogenology* 79(5): 859-866.
- de la Mata, J.J. y Bó, G.A. 2012. Sincronización de celos y ovulación utilizando protocolos de benzoato de estradiol y GnRH en períodos reducidos de inserción de un dispositivo con progesterona en vaquillonas para carne. *Revista Taurus* 55:17-23.
- de la Mata. 2016. Prolongación del proestro y reducción del período de inserción del dispositivo con progesterona en vaquillonas para carne inseminadas a tiempo fijo. Tesis Magíster. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. 68 pp.
- Dickinson, S.E., Geary, T.W., Monnig, J.M., Pohler, K.G., Green, J.A. and Smith, M.F. 2016. Efeito da maturação do folículo pré-ovulatório no estabelecimento da prenhez em bovinos: o papel da competência oocitária e do ambiente materno. 30° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. Foz do Iguaçu, Brasil.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, Facultas de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Diskin, M.G., Austin, E.J. and Roche, J.F. 2002. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 23:211-228.
- Evans, A. C. 2003. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reproduction in Domestic Animals* 38:240-246.
- Echternkamp, S.E. and Thallman, R.M. 2011. Factors affecting pregnancy rate to estrous synchronization and fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Journal of Animal Science* 89: 3060-3068.
- Erbiti, F., Lissarrague, C., Cabodevila, J. y Callejas, S.S. 2017. Efecto de tratamientos cortos con progesterona, del estado reproductivo y de la eCG sobre la preñez en vaquillonas IATF. 12° Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina. Pág. 374.

- Esperanza, G. 2012. Efecto de la utilización en IATF de dispositivos intravaginales de progesterona por cinco días combinados con GnRH, en vaquillonas británicas de 24 meses de edad. Tesis de Especialidad en Reproducción Bovina. Instituto de Reproducción Animal Córdoba, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. 8pp.
- Forde N., Carter F., Fair T., Crowe M.A., Evans A.C.O., Spencer T.E., Bazer F.W., McBride R., Boland M.P., O'Gaora P., Lonergan P. and Roche J.F. 2009. Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. *Biology of Reproduction* 81: 784-794.
- Forde N., Beltman M.E., Lonergan P., Diskin M., Roche J.F., Crowe M.A. 2011a. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Animal Reproduction Science* 124: 163-169.
- Forde N., Beltman M.E., Duffy G.B., Duffy P., Mehta J.P., O'Gaora P., Roche J.F., Lonergan P. and Crowe M.A. 2011b. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: Effect of low circulating progesterone and consequences for the conceptus elongation. *Biology of Reproduction* 84: 266-278.
- Forde. N., Carter, F., Spencer, T.E., Bazer, F.W., Sandra, O., Mansouri-Attia, N., Okumu, L.A., Mcgettigan, P.A., Mehta, J.P., McBride, R., O'gaora, P., Roche, J.F. and Lonergan, P. 2011c. Conceptus-induced changes in the endometrial transcriptome: how soon does the cow know she is pregnant? *Biology of Reproduction* 85:144-156.
- Geary, T.W. and Whittier, J.C. 1998. Effects of timed insemination following synchronization of ovulation using the Ovsynch or Co-Synch protocol in beef cows. *The Professional Animal Scientist* 14:217-220.
- Ginther, O.J, Kastelic, J.P. and Knopf, L. 1989a. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Animal Reproduction Science* 20:187-200.
- Ginther, O. J., L. Knopf, and J. P. Kastelic. 1989b. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *Journal of Reproduction and Fertility* 87:223–230.
- Hanlon, D.W., Williamson, N.B., Wichtel, J.J., Steffert, I.J., Craigie, A.L. and Pfeiffer, W.V. 1997. Ovulatory responses and plasma luteinizing hormone concentrations in dairy heifers after treatment with exogenous progesterone and estradiol benzoate. *Theriogenology* 47: 963-975.

- Herlihy, M.M., Crowe, M.A., Diskin, M.G., and Butler, S.T. 2012. Effects of synchronization treatments on ovarian follicular dynamics, corpus luteum growth, and circulating steroid hormone concentrations in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95: 743-754.
- Houghton, P.L., Lemenager, R.P., Moss, G.R. and Hendrix, K.S. 1990. Prediction of postpartum beef cow body composition using weight to height ratio and visual body condition score. *Journal of Animal Science* 68: 1428-1437.
- Jinks E.M., Smith M.F., Atkins J.A., Pohler K.G., Perry G.A., MacNeil M.D., Roberts A.J., Waterman R.C., Alexander L.J. and Geary T.W. 2012. Preovulatory estradiol and the establishment and maintenance of pregnancy in suckled beef cows. *Journal of Animal Science* 91: 1176-1185.
- Kasimanickam R., Firth P., Schuenemann G.M., Whitlock B.K., Gay J.M., Moore D.A., Hall J.B. and Whittier W.D. 2014. Effect of the first GnRH and two doses of PGF 2α in a 5-day progesterone-based Co-Synch protocol on heifer pregnancy. *Theriogenology* 81: 797-804.
- 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.
- Kojima, N., Stumpf, T.T., Cupp, A.S., Werth, L.A., Roberson, M.S., Wolfe., M.W. Kittok, R.J. and Kinder, J.E. 1992. Exogenous progesterone and progestins as used in estrous synchrony regimens do not mimic the corpus luteum in regulation of LH and 17 α -estradiol in circulation of cows. *Biology of Reproduction* 47:1009-1017.
- Lamb, G.C., Stevenson, J.S., Keslert, D.J., Garverick, H.A., Brown, D.R. and Salfen, B.E. 2001. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F 2α for ovulation control in postpartum suckled beef cows. *Journal Animal Science* 79:2253-2259.
- Lammoglia, M.A., Short, R.E., Bellows, S.E., Bellows, R.A. MacNeil, M.D. and Hafs, H.D. 1998. Induced and Synchronized Estrus in Cattle: Dose Titration of Estradiol Benzoate in Peripubertal Heifers and Postpartum Cows After Treatment with an Intravaginal Progesterone-Releasing Insert and Prostaglandin F 2α . *Journal of Animal Science* 76:1662-1670.

- Larimore, E.L., Amundson, O.L., Bridges, G.A., McNeel, A.K., Cushman, R.A. and Perry, G.A. 2016. Changes in ovarian function associated with circulating concentrations of estradiol before a GnRH-induced ovulation in beef cows. *Domestic Animal Endocrinology* 57:71-79.
- Lonergan, P., O'Hara, L. and Forde, N. 2013. Role of diestrus progesterone on endometrial function and conceptus development in cattle. *Animal Reproduction* (10) 3:223-227.
- Madsen C.A., Perry G.A., Mogck C.L., Daly R.F., MacNeil M.D., Geary T.W. 2015. Effects of preovulatory estradiol on embryo survival and pregnancy establishment in beef cows. *Animal Reproduction Science* 158: 96-103.
- Manes, J., Aller, J.F., Callejas, S.S., Hozbor, F. and Alberio, R.H. 2012. Influence of the Length of Progestagen Treatment and the Time of Oestradiol Benzoate Application on the Ovulatory Follicle Size and Ovulation Time in Anoestrous and Cyclic Beef Cows. *Reproduction in Domestic Animals* 47: 412–418.
- Mann, G.E. and Lamming, G.E. 2000. The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrous cycle in the cow. *Animal Reproduction Science* 64:171-180.
- Mann, G.E. and Lamming, G.E. 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 121, 175–180.
- Mapletoft, R.J., Bó, G.A., Martínez, M., Colazo, M., Caccia, M. y Adams, G.P. 1999. Control del desarrollo folicular y su uso en programas de inseminación artificial a tiempo fijo en ganado de carne. 3° Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina. Pág. 51-69.
- Martínez, M.F., Adams, G.P., Kastelic, J.P., Bergfelt, D.R. and Mapletoft, R.J. 2000. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. *Theriogenology* 55(5): 757-769.
- Martínez, M.F., Kastelic, J.P., Bó, G.A., Caccia, M. and Mapletoft, R.J. 2005. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. *Animal Reproduction Science* 86:37-52.
- McDonald, L.E. 1978. *Reproducción y endocrinología veterinaria*. Editorial Interamericana. 466 pp.

- Menchaca, A., Núñez-Olivera, R., Wijma, R., García Pintos, C., Fabini, F. y de Castro, T. 2013. Cómo mejorar la fertilidad de los tratamientos de IATF en vacas *Bos taurus*. 10° Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina. Pág. 103-133.
- Miller, B.G., Moore, N.W., Murphy, L., and Stone, G.M., 1977. Early pregnancy in the ewe: effects of oestradiol and progesterone on uterine metabolism and on embryo survival. *Australian Journal of Biological Sciences* 30: 279–288.
- Moreno, D., Cutaia, L., Villata, F., Ortisi, F. and Bó, G.A. 2001. Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology* 55(1): 408. (Abstract)
- Mussard, M.L., Burke, C.R., Behlke, E.J., Gasser, C.L. and Day, M.L. 2007. Influence of premature induction of a luteinizing hormone surge with gonadotropin-releasing hormone on ovulation, luteal function, and fertility in cattle. *Journal of Animal Science* 85: 937-943.
- Noseir, W. M. 2003. Ovarian follicular activity and hormonal profile during estrous cycle in cows: the development of 2 versus 3 waves. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1:50.
- Núñez-Olivera, R., Bó, G.A. and Menchaca, A. 2016. Association between proestrus length, preovulatory follicular diameter, estrus behavior and pregnancy rate in progesterone-estradiol based treatment J-Synch for FTAI in *Bos taurus* beef heifers. 18th International Congress on Animal Reproduction. Tours, France. P. 477.
- Okumu, L.A., Forde, N., Fahey, A.G., Fitzpatrick, E., Roche, J.F., Crowe, M.A. and Lonergan, P. 2010. The effect of elevated progesterone and pregnancy status on mRNA expression and localisation of progesterone and oestrogen receptors in the bovine uterus. *Reproduction* 140:143-153.
- Patterson, D.J., Wood, S.L. and Randle, R.F. 2000. Procedures that support reproductive management of replacement beef heifers. *Journal of Animal Science* 77: 1-15.
- Perry, G.A., Smith, M.F., Lucy, M.C., Green, J.A., Parks, T.E., MacNeil, M.D., Roberts, A.J. and Geary, T.W. 2005. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy succes. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA (PNAS)* 102(14): 5268-5273.

- Perry, G.A., Smith, M.F., Roberts, A.J., MacNeil, M.D. and Geary, T.W. 2007. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *Journal of Animal Science* 85:684-689.
- Perry, G.A., Grant, J.K., Walker, J.A., Bridges, G.A., Kruse, S.G., Bird, S., Heaton, K., Arias, R., and Lake, S.L. 2012. Comparison of three CIDR based fixed-time AI protocols for beef heifers. South Dakota State University - BEEF 2012-01.
- Perry, G.A. 2017. Efecto de la madurez folicular sobre el establecimiento de la preñez. 12° Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina. Pág. 171-190.
- Peter, A. T., H. Levine, M. Drost, and D. R. Bergfelt. 2009. Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. *Theriogenology* 71: 1343–1357.
- Pursley J.R., Mee, M.O. and Wiltbank, M.C. 1995. Synchronización of ovulation in dairy cows using PGF_{2α} and GnRH. *Theriogenology* 44: 915-923.
- Rabaglino, M.B., Risco, C.A., Thatcher, M.J., Kim, I.H., Santos, J.E.P., Thatcher, W.W. 2010a. Application of one injection of prostaglandin F_{2α} in the five-day Co-Synch + CIDR protocol for estrous synchronization and resynchronization of dairy heifers. *Journal of Dairy Science* 93(3): 1050-1058.
- Rabaglino, M.B., Risco, C.A., Thatcher, M.J., Lima, F., Santos, J.E.P and Thatcher, W.W. 2010b. Use of a five-day progesterone-based timed IA protocol to determine if flunixin meglumine improves pregnancy per timed AI in dairy heifers. *Theriogenology* 73(9): 1311-1318.
- Rajakoski, E. 1960. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical and left-right variations. *Acta Endocrinologica (Copenhagen)*, Suppl. 52:1-68.
- Ré, M., de la Mata, J.J. and Bó, G.A. 2013. Synchronization of ovulation in dairy heifers using a shortened estradiol-based protocol that provides for a lengthened proestrus. *Reproduction, Fertility and Development* 26(1): 118. (Abstract)
- Ré, M.G., Curchod, G., Alessio, D., Caccia, M., de la Mata, J.J. y Bó, G.A. 2015. Tratamientos que prolongan el proestro usando estradiol y progesterona en vaquillonas de leche. 11° Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina. Pág. 159-166.

- Rodríguez Pérsico, J.M., Huguenine, E. y Callejas, S.S. 2014. Efecto de dos protocolos para sincronizar la ovulación sobre el porcentaje de preñez post IATF en vaquillonas para cría. *Revista Argentina de Producción Animal Supl. 1*: 1-35.
- Rodríguez Pérsico, J.M., Esperanza, G., Russo, S.N. y Callejas, S.S. 2015. Sincronización de las ovulaciones con cipionato de estradiol en vaquillonas tratadas con un dispositivo intravaginal con progesterona. 11° Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina. Pág. 385.
- Ross, P.J., Aller, J.F., Callejas, S.S., Butler, H. and Alberio, R.H. 2004. Estradiol benzoate given 0 or 24 h after the end of a progestagen treatment in postpartum suckled beef cows. *Theriogenology* 62: 265–273.
- Sá Filho, M.F., Crespilho, A.M., Santos, J.E.P., Perry, G.A. and Baruselli, P.S. 2010. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Animal Reproduction Science* 120(1-4): 23-30.
- Sá Filho, M.F., Baldrighi, J.M., Sales, J.N., Crepaldi, G.A., Carvalho, J.B. and Baruselli, P.S. 2011a. Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science* 129(3-4): 132-139.
- Sá Filho, M.F., Sales, J.N.S. e Baruselli, P.S. 2011b. Atualização dos protocolos de IATF em fêmeas bovinas de corte. 9° Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba. Argentina. Pág. 165-189.
- Sartori R., Fricke P.M., Ferreira J.C.P., Ginther O.J. and Wiltbank. 2001. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biology of Reproduction* 65: 1403-1409.
- Sartori, R., J. M. Haughian, R. D. Shaver, G. J. Rosa, and M. C. Wiltbank. 2004. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *Journal of Dairy Science* 87:905-920.
- Savio, J.D., Keenan, L., Boland, M.P. and Roche, J.F. 1988. Pattern growth of dominant follicles during the oestrus cycle of heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 83: 663-671.

- Savio, J.D., Thatcher, W.W., Badinga, L., de la Sota, R.L. and Wolfenson, D. 1993. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 97:197-203.
- Schillo, K.K., Hall, J.B. and Hileman, S.M. 1992. Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifers. *Journal of Animal Science* 70:3994-4005.
- Short, E.R., Staigmiller, R.B., Bellows, R.A., Greer, R.C., 1990. Breeding heifers at one year of age: biological and economic considerations. En: *Proceedings of the 39th Annual Beef Cattle Short Course*. University of Florida, Gainesville, FL, pp. 93–106.
- Sirois, J. and Fortune, J.E. 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biology of Reproduction* 39: 308-317.
- Spencer, T.E., Johnson, G.A., Bazer, F.W., Burghardt, R.C. and Palmarini, M. 2007. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reproduction, Fertility and Development* 19, 65–78.
- Thatcher, W.W., Staples, R., Oldick, B. and Schmitt, E., 1994. Embryo health and mortality in sheep and cattle. *Journal of Animal Science* 72, 16–30.
- Toribio, R.E., Molina, J.R., Bolaños, J.M. and Kindahl, H. 1994. Blood levels of the prostaglandin F_{2α} metabolite during the postpartum period in *Bos indicus* cows in the humid tropics. *Transboundary and Emerging Diseases*, 41(1-10), 630-639.
- Uslenghi, G.; Chayer, R. y Callejas, S. 2010. Efectividad del cipionato de estradiol inyectado al final de un tratamiento con progesterona sobre la eficiencia reproductiva. *Reproducción en vacas. Rev. Vet.* 21: 1, 55–58.
- Uslenghi, G.; Gonzalez Chaves, S.; Cabodevila, J. y Callejas, S. 2014. Effect of estradiol cypionate and amount of progesterone in the intravaginal device on synchronization of estrus, ovulation and on pregnancy rate in beef cows treated with FTAI based protocols. *Animal Reproduction Science* 145:1-7.
- Valdez, K.E., Cuneo, S.P., Gorden, P.J. and Turzillo, A.M. 2005. The role of thecal androgen production in the regulation of estradiol biosynthesis by dominant bovine follicles during the first follicular wave. *Journal of Animal Science* 83: 597-603.

- Vasconcelos, J.L., Sartori, R., Oliveira, H.N., Guenther, J.G., and Wiltbank, M.C. 2001. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 56(2): 307-314.
- Vassolo, V., Ruppel, V., Cledou, G. y Callejas, S.S. 2011. Efecto de utilizar dispositivos intravaginales con progesterona y cipionato de estradiol combinado o no con GnRH sobre el porcentaje de preñez a la IATF. 9° Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina.
- Veiga, P., Montiel, J., Chayer, R., Uslenghi, G. y Callejas, S.S. 2011. Efecto de diferentes ésteres de estradiol usados para sincronizar la ovulación sobre el porcentaje de preñez post IATF en vaquillonas Angus. *InVet.* 13(2): 39-45.
- Villa, M., García, M., Saint Martin, M y Rodríguez Pérsico, J.M. 2017. Efecto de la utilización de un protocolo corto (J-Synch) sobre la tasa de preñez en vaquillonas *Bos taurus*. 12° Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina. Pág. 398.
- Vynckier, L., Debackere, M., De Kruif, A. and Coryn, M. 1990. Plasma estradiol-17 β concentrations in the cow during induced estrus and after injection of estradiol- 17 β benzoate and estradiol-17 β cypionate - a preliminary study. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 13, 36-42.
- Whittier, W.D., Currin J.F., Schramm H., Holland S., Kasimanickam R.K. 2013. Fertility in Angus cross beef cows following 5-day CO-Synch + CIDR or 7-day CO-Synch + CIDR estrus synchronization and timed artificial insemination. *Theriogenology* 80: 963– 969.
- Yavas, Y. and Walton J.S. 2000. Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: A review. *Theriogenology* 54: 1-23.