



**Universidad Nacional del Litoral**

*Facultad de Ciencias Veterinarias*

*Doctorado en Ciencias Veterinarias*

*Tesis presentada para optar por el grado académico de  
Doctor en Ciencias Veterinarias*

**EFEECTO DE DIFERENTES  
TRATAMIENTOS CON PROGESTERONA  
SOBRE EL CRECIMIENTO FOLICULAR Y  
LA FERTILIDAD DE VACAS LECHERAS  
CON BAJA CONDICIÓN CORPORAL**

**AUTOR: Méd. Vet. DIEGO GERMÁN SCANDOLO LUCINI**

**DIRECTOR: PhD. JULIÁN ALBERTO BARTOLOMÉ**

**CO-DIRECTOR: Dr. HUGO HÉCTOR ORTEGA**

*“La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real.  
Es un viaje, nunca una llegada”  
Karl Raimund Popper (1902-1994)*

*Dedico este trabajo a mi familia,  
especialmente a mis padres y a mi hermano Daniel,  
quienes me enseñaron el camino de la superación*

# AGRADECIMIENTOS

*A mis padres, pilares fundamentales, por su confianza y permanente contención.*

*A mi hermano Daniel, por estar siempre presente brindándome su apoyo incondicional.*

*A Melisa, por ser mi sostén y brindarme su comprensión.*

*A mi Director, Dr. Julián Bartolomé, quien con su conocimiento, experiencia y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo.*

*A mi Co-Director, Dr. Hugo Ortega, por haber aceptado ser parte de este proyecto y estar siempre disponible para la corrección de manuscritos.*

*A la Facultad de Ciencias Veterinarias, por haberme permitido continuar con mi formación académica profesional, especialmente a sus autoridades por el apoyo y confianza.*

*A la Universidad Nacional del Litoral, por otorgarme los recursos necesarios para costear mis estudios.*

# INDICE GENERAL

INDICE GENERAL .....	I
INDICE DE TABLAS .....	IV
INDICE DE FIGURAS .....	V
ABREVIATURAS UTILIZADAS .....	VI
RESUMEN .....	VIII
ABSTRACT .....	X
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Ciclo estral bovino .....	2
1.1.1 Ondas foliculares y control neuroendócrino del crecimiento folicular.....	2
1.1.2 Formación del cuerpo lúteo y secreción de progesterona.....	6
1.1.3 Luteolisis.....	7
1.2 Reinicio de actividad ovárica posparto en vacas lecheras .....	10
1.3 Patologías uterinas posparto y factores de riesgo asociados.....	14
1.4 Balance energético negativo y su relación con la fisiología reproductiva.....	18
1.5 Cambios en la eficiencia reproductiva y su asociación con la aparición de los protocolos de sincronización de celo y ovulación .....	24
1.6 Sincronización de celos con PGF2 $\alpha$ .....	25
1.7 Protocolos de sincronización de la ovulación.....	26
1.7.1 Protocolo Ovsynch.....	26
1.7.1.1 Respuesta ovulatoria a la primera GnRH del protocolo Ovsynch .....	27
1.7.1.2 Concentración plasmática de P4 de origen endógena y/o exógena durante el crecimiento folicular .....	29
1.7.1.3 Inducción de una luteolisis completa en respuesta a la PGF2 $\alpha$ .....	30
1.7.1.4 Relación entre la concentración de P4 y la respuesta ovulatoria a la segunda GnRH del protocolo Ovsynch.....	31
1.7.2 Protocolos de presincronización para mejorar la eficiencia del protocolo Ovsynch .....	33
1.8 Protocolos de sincronización a base de estrógenos y progesterona.....	37
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>43</b>
2.1 Hipótesis general.....	44
2.2 Hipótesis específicas .....	44
2.3 Objetivos .....	44

<b>3. Materiales y Métodos .....</b>	<b>45</b>
3.1 Estudio 1: <i>Evaluación del tratamiento con un dispositivo intravaginal de 3,0 g de progesterona antes y durante el Ovsynch sobre el crecimiento folicular y la concentración de progesterona plasmática en vacas lecheras con baja condición corporal .....</i>	46
3.1.1 Población en estudio .....	46
3.1.2 Diseño experimental .....	46
3.1.3 Muestreo de sangre para determinación de progesterona plasmática, glucosa, IGF-1 y BHB .....	47
3.1.4 Ultrasonografía de ovarios y diagnóstico de preñez .....	48
3.1.5 Análisis estadístico .....	49
3.2 Estudio 2: <i>Evaluación de la aplicación de GnRH o BE al inicio de un protocolo de sincronización de la ovulación con un dispositivo intravaginal de 1,9 o 3,0 g de progesterona sobre el crecimiento folicular y la concentración de progesterona plasmática en vacas lecheras con baja condición corporal.....</i>	50
3.2.1 Población en estudio .....	50
3.2.2 Diseño experimental .....	50
3.2.3 Muestreo de sangre para determinación de progesterona plasmática.....	52
3.2.4 Ultrasonografía de ovarios y diagnóstico de preñez .....	52
3.2.5 Análisis estadístico .....	53
3.3 Estudio 3: <i>Efectos de la presincronización con un dispositivo intravaginal de 1,9 g de progesterona por 9 días previo al Ovsynch más progesterona sobre la preñez en vacas lecheras con baja condición corporal .....</i>	53
3.3.1 Población en estudio .....	53
3.3.2 Diseño experimental .....	54
3.3.3 Ultrasonografía de ovarios y diagnóstico de preñez .....	55
3.3.4 Análisis estadístico .....	55
<b>4. Resultados .....</b>	<b>57</b>
4.1 Estudio 1: <i>Evaluación del tratamiento con un dispositivo intravaginal de 3,0 g de progesterona antes y durante el Ovsynch sobre el crecimiento folicular y la concentración de progesterona plasmática en vacas lecheras con baja condición corporal .....</i>	58
4.2 Estudio 2: <i>Evaluación de la aplicación de GnRH o BE al inicio de un protocolo de sincronización de la ovulación con un dispositivo intravaginal de 1,9 o 3,0 g de progesterona sobre el crecimiento folicular y la concentración de progesterona plasmática en vacas lecheras con baja condición corporal.....</i>	61
4.3 Estudio 3: <i>Efectos de la presincronización con un dispositivo intravaginal de 1,9 g de progesterona por 9 días previo al Ovsynch más progesterona sobre la preñez en vacas lecheras con baja condición corporal .....</i>	64
<b>5. Discusión.....</b>	<b>67</b>

5.1 Estudio 1: <i>Evaluación del tratamiento con un dispositivo intravaginal de 3,0 g de progesterona antes y durante el Ovsynch sobre el crecimiento folicular y la concentración de progesterona plasmática en vacas lecheras con baja condición corporal</i> .....	68
5.2 Estudio 2: <i>Evaluación de la aplicación de GnRH o BE al inicio de un protocolo de sincronización de la ovulación con un dispositivo intravaginal de 1,9 o 3,0 g de progesterona sobre el crecimiento folicular y la concentración de progesterona plasmática en vacas lecheras con baja condición corporal</i> .....	73
5.3 Estudio 3: <i>Efectos de la presincronización con un dispositivo intravaginal de 1,9 g de progesterona por 9 días previo al Ovsynch más progesterona sobre la preñez en vacas lecheras con baja condición corporal</i> .....	76
<b>6. Conclusión</b> .....	<b>81</b>
<b>7. Bibliografía</b> .....	<b>84</b>
<b>8. Publicaciones</b> .....	<b>101</b>

# INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Promedio $\pm$ EE de peso corporal, días en lactancia, CC y producción de leche en el Grupo Presynch Progesterona y Presynch Control. ....	58
<b>Tabla 2:</b> Promedio $\pm$ EE de peso corporal, días en lactancia, producción de leche, CC, y porcentaje de vacas primíparas y en anestro en los diferentes grupos experimentales. ....	62
<b>Tabla 3:</b> Promedio $\pm$ EE de días en lactancia, producción de leche, CC, y porcentaje de vacas primíparas y sin CL al día -12 en el grupo Presynch Control y Presynch Progesterona. ....	65
<b>Tabla 4:</b> Número de vacas preñadas a los 32 días de gestación, RR ajustada con un 95 % de confianza para el intervalo y los valores P para el efecto del grupo de estudio, número de partos y presencia/ausencia de CL al día -12 junto a su interacción. ....	65
<b>Tabla 5:</b> Coeficientes del modelo de regresión logística sobre la preñez a los 32 días de gestación basado en manifestación de celo a la IATF y la presencia de CL al día - 12 por tratamiento de presincronización al día - 12. ....	66

# INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Dinámica de desarrollo folicular ovárico y secreción de gonadotropinas durante el ciclo estral de dos y tres ondas foliculares en bovinos. ....	5
<b>Figura 2:</b> Esquema de desarrollo del FD de la primera onda folicular durante el posparto en vacas lecheras, su relación con las hormonas reproductivas y el balance energético.....	23
<b>Figura 3:</b> Diseño experimental estudio 1.....	47
<b>Figura 4:</b> Diseño experimental estudio 2.....	51
<b>Figura 5:</b> Diseño experimental estudio 3.....	55
<b>Figura 6:</b> Concentración de progesterona plasmática en vacas presincronizadas con un DI de 3 g de P4 (Grupo presynch progesterona) y en vacas control no tratadas (Grupo presynch control) entre el día -12 y -3.....	59
<b>Figura 7:</b> Concentración de progesterona plasmática desde día 0 hasta día 17 en vacas del grupo Ovsynch control y Ovsynch progesterona .....	60
<b>Figura 8:</b> Efecto de la concentración de progesterona plasmática sobre el crecimiento del folículo dominante preovulatorio durante el protocolo Ovsynch.....	61
<b>Figura 9:</b> Concentración de progesterona plasmática entre el día 0 y 7 para vacas tratadas con GnRH o benzoato de estradiol al inicio del protocolo de sincronización ..	63
<b>Figura 10:</b> Tamaño del folículo dominante durante los 3 a 10 días de tratamiento en vacas lecheras que recibieron GnRH o BE al inicio del protocolo para controlar el reinicio de la onda folicular. ....	64



## ABREVIATURAS UTILIZADAS

<b>AMPc</b>	Adenosin monofosfato cíclico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>BE</b>	Benzoato de estradiol
<b>BEN</b>	Balance energético negativo
<b>BHBA</b>	Acido $\beta$ hidroxibutirato
<b>CC</b>	Condición corporal
<b>CE</b>	Cipionato de estradiol
<b>CL</b>	Cuerpo lúteo
<b>DI</b>	Dispositivo intravaginal
<b>E2</b>	Estradiol
<b>FD</b>	Folículo dominante
<b>FPO</b>	Folículo preovulatorio
<b>FSH</b>	Hormona folículo estimulante
<b>GnRH</b>	Hormona liberadora de gonadotrofinas
<b>IATF</b>	Inseminación artificial a tiempo fijo
<b>IFN<math>\tau</math></b>	Interferón Tau
<b>IGF-I</b>	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>NEFA</b>	Ácidos grasos no esterificados
<b>P4</b>	Progesterona
<b>PE</b>	Pérdida embrionaria

<b>PGF2<math>\alpha</math></b>	Prostaglandina F2 $\alpha$
<b>TC</b>	Tasa de concepción
<b>TDC</b>	Tasa de detección de celo
<b>TP</b>	Tasa de preñez
<b>VE</b>	Valerato de estradiol

## RESUMEN

La falla en la emergencia sincrónica de una nueva onda folicular y el crecimiento del folículo dominante en presencia de bajas concentraciones de progesterona plasmática durante los protocolos de sincronización de la ovulación reducen la fertilidad en vacas lecheras. El objetivo de esta tesis fue evaluar los efectos de diferentes tratamientos con dispositivos intravaginales de progesterona (DI) antes y durante protocolos de sincronización de la ovulación iniciados con acetato de busarelina (GnRH) o benzoato de estradiol (BE) sobre el crecimiento folicular, la concentración de progesterona plasmática y la fertilidad en vacas lecheras con baja condición corporal. En el primer estudio, vacas primíparas sin cuerpo lúteo al día -12 recibieron un DI de 3,0 g de progesterona (n=15) o permanecieron como control no tratado (n=13). El día -3 se retiraron los DI y se administró 2 dosis de PG2 $\alpha$  a intervalo de 12 horas. El día 0, las vacas iniciaron un Ovsynch 56 con (n=14) o sin un DI de 3,0 g de progesterona (n=14). En el segundo estudio, 40 vacas se asignaron a un protocolo de sincronización al día 0 con 10  $\mu$ g de GnRH o 2 mg de BE más un DI de 1,9 o 3,0 g de progesterona. El día 7 se retiraron los DI y se aplicó doble dosis de PG2 $\alpha$  separadas por 24 horas. A las 56 horas de retirado los DI se aplicó 10  $\mu$ g de GnRH y se inseminaron a tiempo fijo 16 horas después. En el tercer estudio, las vacas recibieron un DI de 1,9 g de progesterona al día -12 (n=148) por 9 días o permanecieron como controles sin tratar (n=151). El día -3 se retiró el DI al grupo tratado y se aplicó doble dosis de PG2 $\alpha$  a intervalo de 24 horas. El día 0, las 299 vacas iniciaron un Ovsynch 56 con un DI de 1,9 g de progesterona. La concentración promedio de progesterona plasmática entre el día -12 y 0 fue mayor en vacas presincronizadas ( $2,14 \pm 0,37$  ng/mL) que en las control ( $0,99 \pm 0,39$  ng/mL) pero no modificó el tamaño del folículo dominante ni la respuesta ovulatoria a la primera GnRH del Ovsynch. El DI de 3,0 g incrementó la concentración promedio de progesterona plasmática durante el Ovsynch ( $2,39 \pm 0,15$  ng/mL vs.  $0,85 \pm 0,09$  ng/mL) y redujo el tamaño promedio del folículo preovulatorio ( $10,92 \pm 0,40$  mm vs.  $11,39 \pm 0,39$  mm). Sin embargo, la concentración de progesterona plasmática y el tamaño del folículo dominante fueron similares usando un DI de 1,9 g o 3,0 g durante el tratamiento. Por otro lado, la GnRH al inicio del protocolo de sincronización aumentó el tamaño del folículo preovulatorio a la inseminación en relación al BE ( $17,57 \pm 0,96$  mm vs.  $12,86 \pm 0,79$  mm). El tratamiento con progesterona previo al Ovsynch mejoró la

concepción a los 32 días de gestación en vacas sin cuerpo lúteo al inicio de la presincronización. Sin embargo, la tasa de concepción fue similar entre vacas presincronizadas con progesterona y control que presentaron cuerpo lúteo al comienzo del tratamiento. No se observaron diferencias entre el DI de 1,9 g y el de 3,0 g pero la GnRH sería más eficiente para sincronizar la onda folicular e incrementar la concentración de progesterona que el BE.

# ABSTRACT

Failure of a synchronous emergence of a new follicular wave and grow of the dominant follicle in the presence of low plasma progesterone concentrations during ovulation synchronization protocols reduces fertility in dairy cows. The objective of this thesis was to evaluate the effects of different treatments with progesterone intravaginal device (ID) before and during ovulation synchronization protocols initiated with either buserelin acetate (GnRH) or estradiol benzoate (EB) on follicular growth, plasma progesterone concentration and fertility in dairy cows with low body condition. In the first study, primiparous cows without corpus luteum at day -12 received a 3.0 g progesterone ID (n = 15) or remained as untreated controls (n = 13). On day -3, the ID were removed and two doses of PG2 $\alpha$  were administered 12 h apart. On day 0, cows were enrolled in an Ovsynch 56 with (n = 14) or without (n = 14) a 3.0 g progesterone ID. In the second study, 40 cows were assigned at day 0 to a synchronization protocol with 10  $\mu$ g of GnRH or 2 mg of EB and a 1.9 or 3.0 g progesterone ID. On day 7, the ID were removed and two doses of PG2 $\alpha$  were applied 24 h apart. The cows received 10  $\mu$ g of GnRH 56 h after removal ID and were inseminated at a fixed time 16 h later. In the third study, cows received a 1.9 g of progesterone ID on day -12 (n = 148) for 9 days or remained as untreated controls (n = 151). On day -3, the ID was removed in the treated group and two doses of PG2 $\alpha$  were applied at interval of 24 h. On day 0, the 299 cows started an Ovsynch 56 with a 1.9 g of progesterone ID. The mean plasma progesterone concentration between day -12 and 0 was higher in presynch cows ( $2.14 \pm 0.37$  ng/mL) than in control cows ( $0.99 \pm 0.39$  ng/mL) but it did not change the size of the dominant follicle and the ovulatory response to the first GnRH of the Ovsynch. The 3.0 g progesterone ID increased the mean plasma progesterone concentration during Ovsynch ( $2.39 \pm 0.15$  ng/mL vs.  $0.85 \pm 0.09$  ng/mL) and reduced the mean size of the preovulatory follicle ( $10.92 \pm 0.40$  mm vs.  $11.39 \pm 0.39$  mm). However, plasma progesterone concentration and dominant follicle size were similar using an ID of 1.9 g or 3.0 g during the treatment. Nevertheless, the GnRH at the beginning of the synchronization protocol increased the size of the preovulatory follicle at insemination in relation to EB ( $17.57 \pm 0.96$  mm vs.  $12.86 \pm 0.79$  mm). Progesterone treatment before to Ovsynch improved conception at 32 days in cows without corpus luteum at the beginning of presynchronization. However, the conception rate was similar between

progesterone presynchronized and control cows that began treatment with corpus luteum. No differences between the DI of 1.9 g and 3.0 g of progesterone were observed, but the GnRH would be more efficient to synchronize the follicular wave and increase the concentration of progesterone than the EB.

# **1. Introducción**

## **1.1 Ciclo estral bovino**

La hembra bovina púber es poliéstrica anual con ciclos reproductivos cada  $21 \pm 3$  días, que surge de promediar los ciclos de 2 y 3 ondas de crecimiento folicular. El estro es la primera etapa del ciclo estral, se inicia al día cero con el pico preovulatorio de LH, dura de 6 a 24 horas y se caracteriza por la conducta y receptividad sexual que permite el apareamiento. El metaestro se extiende desde segundo hasta el quinto día, en esta etapa se produce la ovulación a las 25 - 27 horas de iniciado el celo y comienza el proceso de luteinización de las células foliculares que da origen al cuerpo lúteo (CL). El diestro es la etapa más larga del ciclo estral (10 a 14 días), caracterizada por la presencia de un CL funcional que secreta cantidades crecientes de progesterona (P4) hasta que se produce la luteolisis. Por último, el periodo comprendido entre la regresión del CL y el comienzo del estro se denomina proestro, este tiene una duración de 2 a 4 días y se caracteriza por la disminución de las concentraciones plasmáticas de P4, con el consecuente incremento de los niveles de estradiol (E2) secretados por los folículos en crecimiento (Senger, 2003).

### **1.1.1 Ondas foliculares y control neuroendócrino del crecimiento folicular**

Se denomina dinámica folicular al proceso continuo de crecimiento y regresión folicular que ocurre a lo largo de todo el ciclo estral y conduce al desarrollo del folículo preovulatorio (FPO) (Lucy et al., 1992). Este proceso involucra tres etapas: la emergencia o reclusión de un grupo de folículos terciarios antrales de 1 a 4 mm, la selección o desviación cuando un folículo alcanza los 8,5 a 10 mm y la dominancia seguida por la ovulación o la atresia (Lucy et al., 1992). La comprensión de estos procesos fue posible con la aparición de la ultrasonografía en la década del 80 (Singh et al., 2003).

El 90 a 95 % de los bovinos presenta 2 o 3 ondas foliculares durante el ciclo estral (Savio et al., 1990b; Sirois y Fortune, 1988). En vacas Holstein, se asume como más común el patrón de 2 ondas (78,6 %) seguido por el de tres (14,3 %) y cuatro (7,1 %) ondas, respectivamente (Endo et al., 2012; Sartori et al., 2004), si bien hay quienes han propuesto la existencia de 3 ondas foliculares como la más frecuente (Savio et al., 1990b). En general, el FPO de vacas con ciclos de 3 ondas muestra un patrón de crecimiento lineal, mientras que en los ciclos de 2 ondas se presenta un crecimiento más



lento, gradual y a veces irregular (Savio et al., 1990b). Por el contrario, en vaquillonas predomina el desarrollo de 3 ondas foliculares que emergen a los días 2, 11 y 16 del ciclo, respectivamente (Savio et al., 1988; Sirois y Fortune, 1988).

La secreción de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) durante el ciclo estral es controlada por dos áreas separadas en el hipotálamo, el centro tónico y el centro cíclico. El centro tónico es el responsable de la secreción basal de GnRH durante todo el ciclo estral, la frecuencia y amplitud de los pulsos de liberación dependen de los niveles circulantes de P4, ocurren cada 4 a 8 horas en la fase luteal y entre 1,5 a 2 horas en la fase folicular. Por el contrario, el centro cíclico secreta grandes cantidades de GnRH en pulsos de alta frecuencia y amplitud durante un corto período de tiempo. Esto desencadena el pico preovulatorio de hormona luteinizante (LH) en respuesta a la retroalimentación positiva generada por el E2 luego de la luteolisis (Senger, 2003).

El inicio de cada onda folicular es precedido por un pico de hormona folículo estimulante (FSH). El incremento en la concentración de FSH, coincidente con el pico preovulatorio de LH, produce la emergencia de la primera onda folicular (Adams et al., 1992) que se detecta por ecografía transrectal en promedio al cuarto día del ciclo estral (Savio et al., 1988). La segunda onda emerge entre el día 9 y 10 en vacas con ciclos de 2 ondas y entre el día 8 y 9 en las que tienen ciclos de 3 ondas (Adams et al., 2008; Sartori et al., 2004), consecuencia de un aumento de FSH que comienza 2 días antes (Adams et al., 1992). El inicio de la fase de regresión del folículo dominante (FD) de la primera onda y el día que el FD de la segunda onda alcanza su mayor diámetro, se retrasa 2 días en el patrón de 2 ondas en comparación con el de 3 ondas (Jaiswal et al., 2009). En los ciclos con 3 ondas foliculares, la última onda aparece al día 15 o 16 del ciclo estral (Ginther et al., 1989; Sartori et al., 2004).

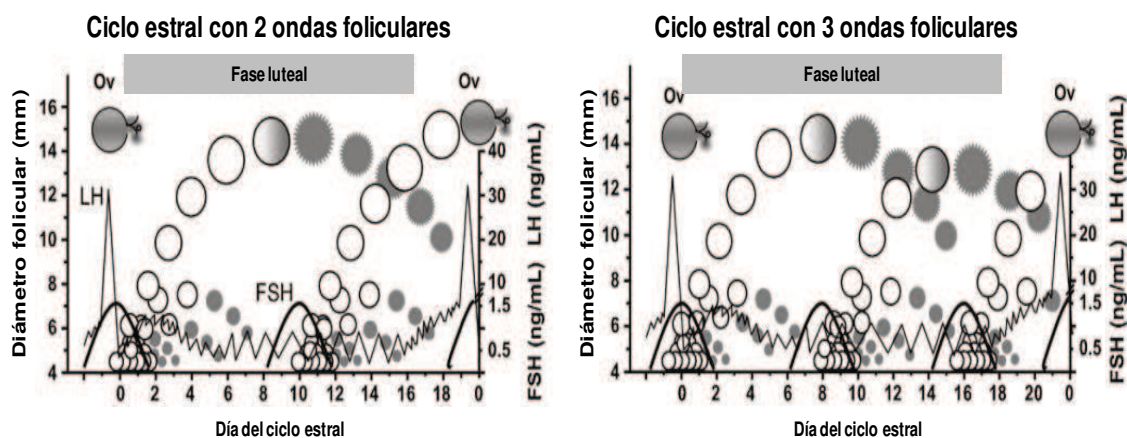
La vida media de un FD en el ciclo estral es de 5 a 7 días (Lucy et al., 1992). La divergencia en la tasa de crecimiento entre el FD y el subordinado comienza al día 2,8 y termina al cuarto día con la desviación o selección cuando el FD llega a 8,5 mm de diámetro y el subordinado no supera los 7,2 mm (Ginther et al., 1996). En los folículos subordinados, entre el tercer y quinto día de la onda folicular, aumenta la concentración de activina y disminuye la secreción de E2 y la cantidad de receptores de FSH. La alta concentración de activina podría disminuir, de forma directa, la producción de andrógenos en las células de la teca (Roche, 1996). La secreción de inhibina por los

folículos de diferentes tamaños (Kulick et al., 1999) y de E2 cuando el folículo alcanza los 6 mm producen una retroalimentación negativa sobre la FSH a nivel de la hipófisis, que hace descender su concentración plasmática a niveles basales por 3 o 4 días hasta que emerge una nueva onda folicular (Adams et al., 1992; Ginther et al., 1996). La liberación y biodisponibilidad de FSH está influenciada por productos foliculares como el E2, que ejerce una potente acción inhibitoria sobre su secreción y otros factores presentes en los folículos en crecimiento como el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-I) y la inhibina (Singh et al., 1999). Además, en los folículos inmaduros, la alta concentración del factor inhibidor tisular de metaloproteinasas inhibe la escisión proteolítica del IGF-I unido a proteínas. Esto limita la biodisponibilidad de IGF-I e impide su sinergismo con LH en las células de la teca para promover la producción de andrógenos y con la FSH en las células de la granulosa para estimular la actividad de la aromatasa (Ginther et al., 1996).

Por otra parte, cuando se produce la desviación, en el FD se mantiene la cantidad de receptores de FSH pero aumentan los de LH, originando un incremento en la producción de E2 e inhibina (Ginther et al., 1996; Savio et al., 1993a). Los receptores para FSH solo están presentes en las células de la granulosa, mientras que los receptores de LH se encuentran en las células de la granulosa y de la teca. El FD adquiere más receptores de LH en sus células de la granulosa que sus subordinados y, por lo tanto, puede cambiar su dependencia de gonadotropina a LH durante el nadir de FSH para seguir creciendo, mientras los subordinados regresan (Adams et al., 2008).

En el FD se produce una disminución en la producción del inhibidor tisular de la metaloproteína y un aumento de la disponibilidad de IGF-I y de la relación inhibina: activina en el fluido folicular, que actúa sobre las células de la teca estimuladas por LH para aumentar la producción de andrógenos (Findlay, 1993). La producción de inhibina es estimulada por los esteroides y por la FSH, ésta tiene efectos autócrinos y parácrinos que aumentan la síntesis de andrógenos en células de la teca (Roche, 1996). Este mecanismo se origina por la aparición de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) en los receptores de LH de las células de la granulosa del FD, que aumenta la producción de adenosin monofosfato cíclico (AMPc) involucrado en la activación de la enzima aromatasa que convierte los andrógenos en estrógenos cuando se produce la selección y el FD alcanza los 8,5 mm de diámetro. Estas altas cantidades de andrógenos son

continuamente transferidas a las células de la granulosa para ser aromatizadas. La aromataza se estimula a través de la alta sensibilidad de células de granulosa a la FSH (McNatty y Henderson, 1987) y por los efectos amplificadores del IGF-I sobre la acción de la FSH. La alta producción de andrógenos por la teca y la actividad de la aromataza en las células de la granulosa, explican la elevada producción de E2 por parte del FD. Como consecuencia, sigue creciendo y se produce un incremento de la frecuencia pulsátil de LH a un pulso/hora aproximadamente (20 a 25 pulsos/24 horas) hasta inducir el pico preovulatorio de LH (Rahe et al., 1980), que termina con la ovulación en el metaestro a las 25 a 27 horas de iniciado el estro (Figura 1).



**Figura 1:** Dinámica de desarrollo folicular ovárico y secreción de gonadotropinas durante el ciclo estral de dos y tres ondas foliculares en bovinos. Los folículos dominantes y subordinados se indican como círculos abiertos (viables) o sombreados (atrésicos). Un incremento en la concentración circulante de FSH (línea gruesa) precede a la aparición de cada onda. El aumento en la concentración circulante de LH en pulsos de alta frecuencia (línea delgada) precede a la ovulación resultado de la disminución en la concentración de progesterona por la luteolisis. (Adaptado de: Adams et al., 2008).

El final de la fase de dominancia de la onda folicular no ovulatoria durante el diestro, es precedida por la pérdida de los receptores de FSH y LH, en conjunto con la disminución en la frecuencia pulsátil de LH y la capacidad para producir E2 y precursores de inhibina entre el quinto y octavo día (Rahe et al., 1980; Roche, 1996; Savio et al., 1993a; Senger, 2003). Sin embargo, estos FD pueden ovular si se induce la regresión del CL por la administración exógena de prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) (Kastelic et al., 1990a) o permanecer activo por 15 a 20 días cuando las vacas son tratadas con niveles de P4 inferiores a 2,0 ng/mL (Sirois y Fortune, 1990).

Desde el proestro hasta 3 días después del estro se evidencia edema e incremento de la vascularización en la lámina propia y endotelial del tejido conectivo, gránulos de glucógeno y de mucina en la superficie y en las células epiteliales glandulares

(Wordinger et al., 1972 ). En el estro hay edema endometrial, hiperemia y estimulación de la actividad mitótica por acción de los estrógenos en el epitelio glandular, en el epitelio de superficie y en el intersticio hasta el diestro temprano (día 6 después del celo), que es cuando los receptores de estrógeno disminuyen en el estroma compacto y glándulas endometriales sin alterarse su presencia en las glándulas profundas (Dellmann, 1994).

### **1.1.2 Formación del cuerpo lúteo y secreción de progesterona**

Luego de la ovulación aparece el cuerpo hemorrágico por la ruptura de los vasos sanguíneos de la pared folicular y se inicia el proceso de luteinización en las células de la granulosa y de la teca que da origen al CL (Senger, 2003). En el metaestro el edema disminuye, se produce colapso en algunos de los vasos congestivos de la mucosa y se presenta la metrorragia, consecuencia de la hemorragia microscópica de la zona funcional del endometrio que comienza poco antes de la ovulación y termina al segundo día del ciclo. Al principio del diestro, bajo influencia de la P4, el endometrio se transforma de proliferativo a secretor con crecimiento epitelial glandular y desarrollo de las ramificaciones (Dellmann, 1994). El material de secreción se acumula en la parte basal de las células epiteliales entre el día 0 y 8 del ciclo, mientras que el aumento en la densidad de los conductos glandulares se da entre los 8 y 16 días (Wang et al., 2007).

La P4 secretada por el CL se detecta en plasma a partir del tercer día del ciclo estral (Gomes et al., 1963). La concentración de P4 plasmática en vacas aumenta desde el día 3 hasta el día 10 del ciclo hasta alcanzar 4,5 a 5,0 ng/mL, se mantiene estable los próximos 7 días y, en caso de no quedar preñada, comienza a decrecer a partir del día 17 hasta retornar a valores menores a 0,5 ng/mL entre el día 20 y 21 (Sartori et al., 2004; Savio et al., 1990b). Esto demuestra que, la única diferencia en la concentración de P4 en los ciclos de diferente longitud está relacionada con el inicio de la luteolisis (Savio et al., 1990b).

Las vacas en lactancia con más de 80 días posparto desarrollan un CL de mayor diámetro que las vacas secas, con una menor concentración de P4 entre el cuarto y séptimo día del ciclo estral que, sin embargo, termina siendo similar entre ambas al final del diestro (Endo et al., 2012). Las vacas desarrollan mayor diámetro y volumen de tejido luteal que las vaquillonas, entre los 7 y 14 días del ciclo, debido a una correlación

positiva entre el volumen de tejido luteal y el tamaño del folículo ovulatorio (Jaiswal et al., 2009; Vasconcelos et al., 2001). Sin embargo, la concentración de P4 plasmática durante el diestro en vacas es menor que en vaquillonas ( $5,6 \pm 0,5$  vs.  $7,3 \pm 0,4$  ng/mL) (Sartori et al., 2004). Estas menores concentraciones circulantes de P4 y de E2 en vacas lecheras en lactancia, se deberían a una mayor tasa de metabolización hepática (Sangsritavong et al., 2002). El suministro de una ración totalmente mezclada una vez al día o cada 12 horas produce una reducción del 25 % en la concentración de P4 circulante en las 3 a 6 horas posteriores a la ingestión y un incremento en la frecuencia pulsátil de LH, estos efectos desaparecen cuando el alimento se suministra cada 6 horas (Vasconcelos et al., 2003). Por su parte, el tamaño del CL en vaquillonas Holstein con ciclos de 2 y 3 ondas foliculares es similar (Jaiswal et al., 2009; Sartori et al., 2004) y la concentración de P4 circulante no difiere hasta el día 14 del ciclo (Sartori et al., 2004).

### **1.1.3 Luteolisis**

En rumiantes, el momento de la luteolisis determina la longitud del ciclo estral y su prevención es requerida para el establecimiento de la preñez. La luteolisis ocurre en los últimos 3 días de la fase luteal (Senger, 2003), producto de la secreción de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  por el epitelio luminal endometrial (Mann et al., 1998; Wathes y Lamming, 1995) y glandular superficial. Este evento requiere que P4, E2 y oxitocina actúen a través de sus receptores (McCracken et al., 1999). La continua exposición del endometrio a la P4 ejerce una retroalimentación negativa sobre sus receptores en el epitelio luminal endometrial y epitelio glandular superficial al día 11 o 12 (Spencer et al., 2004). Además, la P4 suprime a través de sus receptores en el endometrio la síntesis de los receptores de estradiol  $\alpha$  e indirectamente a través de estos los de oxitocina por 8 a 10 días (Spencer et al., 2004), pero también se supone que ejerce una acción inhibitoria directa no genómica sobre los receptores de oxitocina (Grazzini et al., 1998).

Parecería que, la secreción espontánea de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , ocurre solamente después que el útero se encuentra bajo la influencia de la P4 por 10 a 14 días y la concentración circulante de E2 se incrementa por la maduración folicular (Silvia et al., 1991). El aumento de E2 proveniente del FD desencadena la aparición de los receptores de estrógenos  $\alpha$  en el epitelio luminal endometrial a los 14 - 16 días del ciclo estral y al día 18 en el estroma subepitelial, que llegan a su máxima expresión entre el día 1 y 3 del ciclo (Kimmins y

MacLaren, 2001). Esto es debido posiblemente a una retroalimentación positiva que ejerce el E2 sobre la expresión de sus propios receptores en las células endometriales (Ing y Tornesi, 1997).

Por su parte, los receptores de oxitocina aparecen al día 15 del ciclo en el endometrio y al día 17 en el miometrio (Jenner et al., 1991), pero alcanzan su máxima expresión en el estro cuando también se desarrollan en el epitelio glandular y en el estroma caruncular (Stevenson et al., 1994; Wathes y Hamon, 1993). Se encuentran en mayor proporción en el endometrio que en el miometrio, permanecen altos hasta el tercer y quinto día después del celo en el miometrio y endometrio respectivamente y vuelven a sus niveles basales en endometrio al noveno día del ciclo (Jenner et al., 1991). La disminución de la P4 es suficiente para iniciar la expresión de receptores endometriales de oxitocina, pero la administración de E2 en ese momento puede exacerbar ese efecto (Zhang et al., 1992). Una vez que se produce la luteolisis y sobreviene la ovulación hay una caída de los receptores de P4 en las regiones más próximas al epitelio luminal, pero se mantienen constantes en el estroma compacto y glándulas superficiales e intermedia en las glándulas profundas (Kimmins y MacLaren, 2001).

La presencia de los receptores de LH y su ARNm en el endometrio bovino aumentan entre los 15 y 17 días del ciclo (Freidman et al., 1995) aparentemente sin relación con el pico ovulatorio de LH que ocurre varios días después. Esta hormona, al igual que la FSH, induce un rápido aumento de segundos mensajeros asociados con el incremento de  $PGF2\alpha$  en el endometrio y  $PGE_2$  en el miometrio (Shemesh, 2001). Una vez que se inicia el mecanismo luteolítico, la cantidad de receptores de LH declina, indicando que la  $PGF2\alpha$  agota los sitios de unión endometrial de gonadotropinas en la fase folicular del ciclo. Al contrario de lo que ocurre en endometrio, los receptores de LH en la vena uterina aumentan en el proestro y participan en la luteolisis, porque incrementan el flujo sanguíneo en el sistema de contracorriente de la arteria uterina y vena ovárica a través de la  $PGE_2$  y aumenta la cantidad de  $PGF2\alpha$  que llega al CL (Shemesh, 2001).

La  $PGF2\alpha$  se libera de manera pulsátil cuando existe un pulso generador, señales que inicien cada episodio de secreción y un útero receptivo que responda. Esta receptividad incluye receptores para la señal del pulso generador, un sistema de señalización intracelular y enzimas que participen en la movilización y metabolismo del ácido

araquidónico, que es el precursor para la síntesis de prostaglandinas (Silvia et al., 1991). Alrededor de 5 pulsos de  $\text{PGF2}\alpha$  en 24 horas son requeridos para producir la luteolisis asociada a la rápida caída en la  $\text{P4}$  plasmática (Senger, 2003). El patrón pulsátil de secreción de  $\text{PGF2}\alpha$  por el endometrio se genera a partir de la liberación de oxitocina neurohipofisaria en respuesta a una baja en la  $\text{P4}$ , y al aumento de los receptores y niveles circulantes de  $\text{E2}$  (McCracken et al., 1996). Los bajos niveles de prostaglandinas secretados en respuesta a la oxitocina neurohipofisaria, “gatillan” la liberación adicional de oxitocina por el CL que estimula una mayor liberación de  $\text{PGF2}\alpha$ , iniciando una retroalimentación positiva entre ambas para inducir la luteolisis. La alta concentración de oxitocina luteal y de  $\text{PGF2}\alpha$  liberada en respuesta a esta, induce un transitorio efecto refractario uterino a la oxitocina y luteal a la  $\text{PGF2}\alpha$ , que bloquean esta retroalimentación positiva por 6 a 8 horas y explican la frecuencia pulsátil de secreción de  $\text{PGF2}\alpha$  (Silvia et al., 1991).

La  $\text{PGF2}\alpha$  secretada por el endometrio ingresa a la vena uterina y por un mecanismo vascular de intercambio en contracorriente pasa a la arteria ovárica (Hixon y Hansel, 1974). De esta forma ejerce un efecto luteolítico directo sobre el CL antes de entrar a la circulación sistémica, porque se desnaturaliza en un 65% al pasar por la circulación pulmonar (Davis et al., 1985). La unión de la  $\text{PGF2}\alpha$  a sus receptores en las células endoteliales vasculares y luteales conduce a la elevación del calcio intracelular y a la activación de la protein kinasa C que inhibe la síntesis de  $\text{P4}$  (Ishii y Sakamoto, 2001). La regresión del CL es funcional y luego estructural (McCracken et al., 1981). La concentración de  $\text{P4}$  plasmática disminuye significativamente a las 2 horas de inyectar la  $\text{PGF2}\alpha$ , mientras que la reducción del peso del CL se da a partir de las 12 horas (Shirasuna et al., 2012). El cese en la producción de  $\text{PGF2}\alpha$  se produce cuando la  $\text{P4}$  cae por debajo de 1,0 ng/mL, esto acarrea una disminución en la actividad enzimática y el  $\text{E2}$  ejerce un efecto inhibitorio sobre la enzima ciclooxigenasa 2 que interviene en la síntesis de  $\text{PGF2}\alpha$  (Xiao et al., 1998). Sin embargo, la  $\text{PGF2}\alpha$  sigue siendo secretada en varias series de pulsos de corta duración durante 2-3 días después de la luteolisis (Kindahl et al., 1981). La apoptosis del CL está mediada por macrófagos y otras células del sistema inmune a través de la liberación del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y otras citocinas (Benyo y Pate, 1992).

En vacas preñadas, el interferon tau ( $IFN\tau$ ) actúa de forma paracrina sobre el epitelio luminal endometrial y glandular superficial, suprimiendo la transcripción de los receptores de estradiol  $\alpha$  y oxitocina (Spencer y Bazer, 1996). Es producido durante la elongación del conceptus y se encarga de inhibir el desarrollo del mecanismo luteolítico endometrial en rumiantes (Spencer et al., 2004). En bovinos se secreta entre el día 12 y 25 de gestación, con un pico al día 15-16 (Farin et al., 1990). En vacas preñadas, al día 16 se suprime la liberación de  $PGF2\alpha$  y la expresión de receptores de oxitocina en el endometrio y al día 18 la unión de oxitocina a sus receptores es menor que en las vacas cíclicas (Jenner et al., 1991). No obstante, el embrión tendría un efecto directo sobre el patrón de expresión de receptores de estradiol  $\alpha$  e indirecto sobre los de oxitocina (Spencer et al., 2004). La presencia de receptores de P4 al día 16 se limita al estroma, miometrio y glándulas profundas (Robinson et al., 1999). La alta secreción de  $PGF2\alpha$  puede interferir en el reconocimiento de la preñez e incrementar la mortalidad embrionaria (Mann y Lamming, 1995). El  $IFN\tau$  produce inhibición en la secreción de  $PGF2\alpha$  debido a la creciente disponibilidad de ácido linoleico en vacas preñadas, que compite con el ácido araquidónico e inhibe la ciclooxigenasa 2 con la consecuente disminución en la producción de  $PGF2\alpha$  (Thatcher et al., 1995). Otro mecanismo de acción es cambiando la producción de  $PGF2\alpha$  a  $PGE_2$  en el endometrio, por regular negativamente las enzimas  $PGF$  sintasa y  $PGE$  9 ketoreductasa (Asselin y Fortier, 2000).

### **1.2 Reinicio de actividad ovárica posparto en vacas lecheras**

La reanudación temprana de la actividad ovárica posparto en rodeos lecheros es importante para lograr un intervalo parto-primer servicio de 55 días y un intervalo parto-concepción de 85 días que permita alcanzar un intervalo entre partos de 365 días. El intervalo entre partos resulta de una variación en los días abiertos, consecuencia del intervalo parto-primer ovulación (Rhodes et al., 2003), tasa de concepción a primer servicio (Xu et al., 1997) y parto-concepción (Dubuc et al., 2012).

El incremento en la concentración de FSH entre los 3 y 5 días posparto produce la emergencia de la primera onda de crecimiento folicular (Beam y Butler, 1997; Crowe et al., 1998). El primer FD en vacas lecheras se detecta en promedio a los 12 días posparto, este intervalo es más corto en las paridas en otoño (7 días) que en primavera (20 días) (Savio et al., 1990a). En vacas de razas para carne se observa entre los 10 y 15 días



dependiendo de la alta o baja condición corporal (CC) al parto (Murphy et al., 1990; Stagg et al., 1995). Este FD puede ovular, regresar y originar una nueva onda de crecimiento folicular o convertirse en un quiste folicular por una falla en la ovulación (Beam y Butler, 1997).

La ovulación del primer FD ocurre cuando el incremento en la concentración de IGF-1 e insulina mejoran la frecuencia pulsátil de LH produciendo un aumento suficiente de la producción de E2 para inducir el pico preovulatorio de LH (Butler, 1998; Crowe, 2008; Rhodes et al., 2003). La frecuencia pulsátil de LH requerida para inducir la ovulación es un pulso por hora (Crowe, 2008). La pulsatilidad se incrementa de 2 a 3 pulsos cada 6 horas a 1 pulso/hora cuando la concentración de E2 supera los 10 pg/mL coincidente con el desarrollo del FD. Este aumento en la frecuencia pulsátil de LH se acompaña de una reducción en la amplitud de los pulsos de 3-5 ng/mL a 2-3 ng/mL (Savio et al., 1990a).

En vacas lecheras Holstein y Jersey sin restricción alimentaria, la primera ovulación se produce, en promedio, a los 15 días posparto (Crowe, 2008; Fonseca et al., 1983). Este intervalo tiende a ser más corto y menos variable en las vacas paridas en otoño que en primavera (Savio et al., 1990a). En vacas de cría con buena CC al parto, la primera ovulación posparto se origina luego del desarrollo del FD de la tercera onda de crecimiento folicular y ocurre en promedio a los 35 días (Murphy et al., 1990), mientras que en vacas en anestro con restricción alimentaria se produce en promedio a la décima onda folicular, con un intervalo parto-primera ovulación más largo en relación a vacas sin restricción energética (Stagg et al., 1995).

La primera ovulación es silente en el 94 % de las vacas lecheras y en el 89 % de vacas para carne (Murphy et al., 1990; Savio et al., 1990a; Staples et al., 1990). Ésta es seguida por un ciclo estral de corta duración que promedia los 10 días (Fonseca et al., 1983; Staples et al., 1990). La causa sería una luteolisis temprana por una prematura liberación de PGF2 $\alpha$  uterina originada por una baja concentración de receptores de P4 y un mayor número de receptores de E2 y oxitocina en las células endometriales, que producen una retroalimentación positiva entre la oxitocina y la PGF2 $\alpha$  (Garverick et al., 1992; Peter et al., 1989; Zollers et al., 1993). La proporción de ciclos estrales cortos en vacas lecheras es alrededor del 28 % (Savio et al., 1990b), mientras que en vacas para

carne con cría varía del 78 al 82 % dependiendo de la alta o baja CC al parto (Murphy et al., 1990; Stagg et al., 1995).

La vaca anovulatoria, durante las primeras 3 semanas posparto, se caracteriza por ausencia de P4, baja concentración de IGF-I y una disminución en la frecuencia de pulsos de LH que reduce la producción de E2 (Beam y Butler, 1999; Rhodes et al., 2002). La activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal por factores estresantes e hipoglucemia, reduce la secreción pulsátil de GnRH/LH y limita el aporte de LH a los folículos, haciendo que crezcan más lento y por lo tanto disminuya la producción de E2 generando la atresia (Beam y Butler, 1999). Esto podría ser causado por una acción directa de la GnRH sobre la producción de sus propios receptores o indirectamente por una menor secreción de E2 que, a su vez, altera el equilibrio de los sistemas de control de la liberación de LH (Dobson y Smith, 2000).

El quiste folicular es una estructura dinámica, comúnmente múltiple, localizado en uno o ambos ovarios con un diámetro superior a 17 mm por más de 6 días, con pérdida de tono uterino y ausencia de tejido luteal (Bartolome et al., 2005; Salvetti et al., 2007; Silvia et al., 2002). Su prevalencia varía del 6 al 19 % y en el 66 % de los casos la concentración de P4 plasmática oscila entre 0,1 y 1,0 ng/mL. Esta concentración suprabasal de P4 origina una insensibilización del efecto estimulador del E2 sobre el centro cíclico de GnRH del hipotálamo que bloquea el pico preovulatorio de LH y la ovulación (Kim et al., 2003; Silvia et al., 2002). Por lo tanto, las vacas con quiste folicular presentan un aumento en la frecuencia pulsátil de LH y un retraso en la primera ovulación posparto (Savio et al., 1990a).

El reinicio de la ciclicidad posparto en vacas lecheras varía entre establecimientos (Santos et al., 2009), dependiendo del manejo sanitario y reproductivo adoptados por cada uno (Lucy, 2001; Westwood et al., 2002). La longitud del período de seca, los cambios en la CC, las patologías en el puerperio y el estado de salud en los primeros 30 días en lactancia, son factores de riesgo que afectan el reinicio de la actividad ovárica en el posparto (Opsomer et al., 2000). El retraso de la primera ovulación posparto es el mayor impedimento para inseminar vacas después de finalizado el periodo de espera voluntario (Rhodes et al., 2003). La presentación de anestro se asocia con un retraso en la inseminación a celo detectado y una disminución en la tasa de concepción (TC) (Walsh et al., 2007). Existe una asociación positiva entre el inicio precoz de ciclicidad y

la mejora en la TC (Villa-Godoy et al., 1988). El período de reinicio de la actividad ovárica se correlaciona positivamente con la pérdida de peso, la producción de leche en los primeros 30 días de lactancia y el período para la involución uterina e inversamente con el consumo de nutrientes digestibles y proteína cruda, aunque las afecciones puerperales también juegan un rol importante (El Din Zain et al., 1995). La primera ovulación en vacas con afecciones en el parto y posparto se retrasa 9 días respecto a los 22 días reportados en vacas con puerperio normal (El Din Zain et al., 1995; Fonseca et al., 1983).

El 44 al 50 % de las vacas presenta un ciclo ovárico posparto normal entre los 45 y 60 días en lactancia, mientras que el resto sufre un retraso en el reinicio de la ciclicidad ovárica posparto asociado principalmente a la CC y a sus cambios en el posparto (Gümen et al., 2003; Shrestha et al., 2005). La incidencia de anestro varía del 20 al 40 % entre los 40 y 65 días posparto (Cerri et al., 2004; Chebel et al., 2006; Santos et al., 2009; Thatcher y Wilcox, 1973), alcanza el 50 % cuando la CC es  $\leq 2,25$ , pero descende al 20 % cuando la CC es de 2,75 (Cerri et al., 2009a; Chebel et al., 2006; Gümen et al., 2003; Moreira et al., 2001; Santos et al., 2009). La pérdida de 1 punto o más de CC entre la tercera y novena semana posparto retrasa alrededor de 20 días la primera ovulación, incrementa la proporción de anestro (Santos et al., 2009; Shrestha et al., 2005), extiende el intervalo a primer servicio y reduce la TC a primer servicio (Domecq et al., 1997; Pryce et al., 2001). La incidencia de anovulación es mayor en primíparas que en multíparas, en vacas de menor producción en los primeros 90 días en lactancia, en paridas en invierno y primavera en relación a las de parto en otoño-verano y en aquellas con una CC  $\leq 2,75$  a la inseminación (Santos et al., 2009). El 79 % de las vacas anovulatorias con folículos de 9 a 14 mm presenta una CC  $\leq 2,50$  entre los 47 y 60 días posparto, mientras que en aquellas con folículos de 15 a 24 mm o mayores a 25 mm la CC es de 2,75 (Gümen et al., 2003). En sistemas free stall y tie stall la prevalencia de anovulación a los 60 días posparto es del 19,5 % con un rango del 5 al 45 % (Walsh et al., 2007), mientras que en sistemas pastoriles varía del 11 al 35 % (Rhodes et al., 2003). La merma en la TC varía de un 6 % en las que pierden menos de un punto de CC a un 15 % cuando la disminución es mayor a 1 punto (Santos et al., 2009). Este efecto se observa en multíparas, donde la preñez se reduce cerca de un 12 % y se extiende el intervalo a la concepción. Por el contrario, en primíparas la TC a primer

servicio es mayor que en multíparas, pero ésta no se diferencia entre las que mantienen o ganan CC respecto a las que pierden en los 30 días posparto (Middleton et al., 2019).

### **1.3 Patologías uterinas posparto y factores de riesgo asociados**

La involución uterina posparto implica la contracción física del miometrio, la necrosis y el desprendimiento de las carúnculas seguido por la regeneración del endometrio. Después de la pérdida del alantocorión, se produce la necrosis de las carúnculas uterinas que se eliminan 12 días después del parto. Inicialmente, se produce la regeneración del endometrio en las áreas intercarunculares seguido por el crecimiento centrípeto de las células sobre la carúncula. La regeneración epitelial se completa alrededor de los 25 días después del parto, pero en las capas más profundas de los tejidos finaliza entre la sexta y octava semana posparto (Sheldon et al., 2008).

El intervalo a la normal involución uterina se correlaciona positivamente con la edad, la producción láctea y el número de partos y de forma inversa con el total de nutrientes digeribles (El Din Zain et al., 1995). El cérvix involuciona más rápido que el útero (LeBlanc et al., 2002a). En vacas Holstein, primíparas y multíparas, ocurre en promedio a los 31 días posparto. Sin embargo, la involución de los cuernos uterinos al estado pre gestacional se retrasa 12 días en primíparas y en consecuencia, la primera ovulación ocurre 10 días después que en multíparas, pero el tamaño del folículo ovulatorio, la máxima concentración de E2 previo a la ovulación y el intervalo entre la primera y segunda ovulación es similar en ambas (Zhang et al., 2010). La involución uterina ocurre en el 80 % de los casos antes de los 35 días y en el 20 % restante después de los 36 días en lactancia (El Din Zain et al., 1995).

En rodeos de alta producción, la incidencia de patologías en el parto y posparto con la consecuente reducción de la fertilidad, varía entre los diferentes sistemas de producción, números de lactancias y épocas de partos y estaría asociado en mayor proporción a problemas de manejo (Grohn y Rajala-Schultz, 2000). Su aparición se acompaña de una disminución en la producción láctea (Chapinal et al., 2012a; Middleton et al., 2019), este efecto es más pronunciado en primíparas que multíparas (Chebel et al., 2004). Existe un efecto raza en la tasa de descarte general por muerte y/o venta, en vacas Holstein es mayor en sistemas confinados que pastoriles, mientras que en la raza Jersey

el porcentaje de descarte no difiere entre ambos tipos de sistemas (Washburn et al., 2002b).

La hipocalcemia subclínica seguida por la endometritis clínica y la mastitis son los desórdenes posparto más comunes en sistemas pastoriles, pero su presentación difiere entre razas (Ribeiro et al., 2013). Las concentraciones sanguíneas de calcio y ácidos grasos no esterificados (NEFA) se correlacionan negativamente y ambas están asociadas con la presentación de afecciones uterinas posparto (Ribeiro et al., 2013). La prevalencia de hipocalcemia subclínica al parto o en los 3 primeros días posparto se incrementa con el número de lactancias y puede alcanzar el 50 % (Reinhardt et al., 2011; Scandolo et al., 2016). Su presentación está asociada a una disminución en la concentración sérica de neutrófilos y a un aumento del riesgo de presentación de metritis puerperal (Martinez et al., 2012).

La metritis puerperal involucra la inflamación del endometrio, la submucosa y la muscular (BonDurant, 1999). Se define como una descarga uterina fétida, marrón rojiza y acuosa con un útero anormalmente agrandado, de pared engrosada y atónico al tacto rectal y signos de enfermedad sistémica como inapetencia/anorexia, disminución de la producción de leche y pirexia con más de 39,5 °C (Sheldon et al., 2006). Alrededor del 42 % de las vacas con metritis puerperal presenta una temperatura rectal superior a 39,5 °C al momento del diagnóstico, mientras que en el 58 % restante la fiebre puede estar ausente (Benzaquen et al., 2007). El parto de mellizos, la distocia, la cesárea, la higiene durante las maniobras obstétricas, la retención de placenta, la hipocalcemia, la cetosis y el desplazamiento de abomaso son factores que pueden favorecer el establecimiento de una infección uterina y desencadenar una metritis en los primeros 10 días posparto (Sheldon y Dobson, 2004). La incidencia en vacas lecheras varía del 18,5 (Drillich et al., 2001) al 40 % entre los 5 y 14 días posparto (Markusfeld, 1987) pero puede diagnosticarse hasta los 21 días en lactancia (Sheldon et al., 2006). En este periodo, un útero aumentado de tamaño con una secreción purulenta en vagina sin signos sistémicos puede clasificarse como una metritis clínica (Sheldon et al., 2006).

La endometritis clínica se define como la inflamación del endometrio con una descarga purulenta/mucopurulenta con olor o un diámetro cervical mayor a 7,5 cm sin signos sistémicos después de los 26 días posparto (LeBlanc et al., 2002a). La incidencia varía del 10 al 20 %, pero alrededor del 75 % cura espontáneamente antes de las 4 semanas

posparto (Gautam et al., 2010; LeBlanc et al., 2002b). El riesgo de exposición se incrementa un 50 % en vacas de 3 o más partos respecto a las de primera o segunda lactancia y su presentación se asocia al parto de mellizos, la retención de placenta y la metritis (LeBlanc et al., 2002a). El score de endometritis clínica es un indicador veterinario de presencia y crecimiento de bacterias patógenas que contaminan el lumen del útero en el posparto y sirve como pronóstico del tratamiento utilizado (Sheldon y Noakes, 1998). La tasa de curación dentro de las 2 semanas del tratamiento es del 44 % cuando la descarga vaginal es purulenta con olor fétido, pero llega al 78 % si el mucus solo tiene flóculos de pus (Sheldon y Dobson, 2004). La presentación de endometritis clínica después de los 27 días en lactancia reduce un 31 % la TC a primer servicio, un 20 % la tasa de preñez (TP) y extiende 32 días los días abiertos, mientras que la descarga de mucus claro con flóculos de pus no se relaciona con una reducción en la fertilidad (LeBlanc et al., 2002a).

Cuando la actividad ovárica se reinicia antes de la eliminación de la contaminación bacteriana se predispone al establecimiento de una piometra (Olson et al., 1984), que cursa sin manifestaciones clínicas salvo la anovulación con extensión de la fase luteal. Los partos distócicos, la retención de membranas fetales, la metritis y una descarga vaginal anormal son factores de riesgo que incrementan el riesgo de presentación de piometra en vacas multíparas (Opsomer et al., 2000).

Los agentes patógenos comúnmente asociados a estas infecciones clínicas no afectan la concentración plasmática de FSH ni la emergencia de la primera onda folicular, pero el FD crece más lento, es de menor diámetro y secreta menos cantidad de E2 entre los 15 y 16 días posparto, debido a una disminución en la concentración de LH que afecta la tasa de crecimiento folicular y la secreción de E2 después de la selección folicular (Sheldon et al., 2002). Las endotoxinas liberadas por los microorganismos generan un pico de cortisol, interrumpen el pico preovulatorio de E2 y retrasan o bloquean los pulsos y amplitud de la LH previo al celo, haciendo que el próximo ciclo sea más corto con niveles de P4 compatibles con una fase luteal corta (Battaglia et al., 2000). Las endotoxinas pueden suprimir la liberación pulsátil de LH a través de las citoquinas, impedir el pico de LH a nivel neuroendócrino, inhibir la secreción pulsátil de GnRH directamente a nivel hipotalámico o ejercer un efecto supresivo directo a nivel ovárico,

que perjudica el crecimiento folicular y/o inhibe la secreción de E2 en respuesta al estímulo gonadotrópico (Battaglia et al., 2000).

El parto de mellizos aumenta la posibilidad de presentación de distocia y desplazamiento de abomaso (Correa et al., 1993; Middleton et al., 2019). La probabilidad de partos distócicos es mayor en primíparas, mientras que la retención de membranas fetales, la metritis y los quistes ováricos son más comunes en multíparas (Grohn et al., 1990; Opsomer et al., 2000). La distocia y el aborto se asocian a la retención de membranas fetales y a la presentación de metritis (Correa et al., 1993; Grohn y Rajala-Schultz, 2000). La distocia y la metritis aumentan el riesgo de descarte al momento de su presentación o al final de la lactancia (Grohn y Rajala-Schultz, 2000). Las vacas de mayor producción en lactancias previas presentan mayor probabilidad de retención de placenta, celo silente, metritis, quistes ováricos y otros trastornos posparto en comparación a las de menor producción (Grohn et al., 1995). El riesgo de metritis, celo silente y quiste ovárico es mayor en vacas paridas en invierno que en verano (Grohn y Rajala-Schultz, 2000).

En vacas lecheras primíparas y multíparas existe relación entre la presentación de afecciones en el posparto y la pérdida de CC; animales que paren mellizos, padecen retención de membranas fetales, cetosis, desplazamiento de abomaso o metritis tienen mayor posibilidad de perder CC en el posparto (Middleton et al., 2019). La diferencia en CC de vacas Jersey en sistemas pastoriles o confinamiento es menos marcada que en Holstein, esto podría atribuirse al mayor consumo de energía de las Jersey en relación a su tamaño corporal y a la producción de leche (Washburn et al., 2002b).

La presentación de mastitis, laminitis, neumonía o de cetosis clínica en el primer mes posparto también se asocian a un retraso en el reinicio de la actividad ovárica posparto, debido a una reducción en el consumo de materia seca y al consecuente incremento en el balance energético negativo (BEN) con pérdida de CC (Opsomer et al., 2000). Los partos distócicos, de mellizos, la cetosis subclínica en la primer semana posparto y el desplazamiento de abomaso aumentan el riesgo de anovulación y extienden 30 días el intervalo parto-concepción (Walsh et al., 2007). La prevalencia de mellizos, mastitis (22 %) y cetosis subclínica (40,1 %) es mayor en vacas Holstein que en vacas cruzas Holstein\*Jersey o Jersey (Ribeiro et al., 2013).

La metritis, los problemas respiratorios y digestivos, la hipocalcemia y la elevada concentración de NEFA se asocian negativamente con el porcentaje de vacas cíclicas a los 49 días posparto e incrementan un 8,6 % el porcentaje de anovulación en vacas Holstein respecto a las cruas Holstein\*Jersey, sin encontrarse diferencias de las Jersey respecto a las 2 anteriores (Ribeiro et al., 2013). La hipocalcemia, los quistes ováricos y la laminitis causan estrés, aumentan los días a primer servicio, el número de servicios y reducen la concepción (Dobson y Smith, 2000).

La TC se reduce alrededor de un 15 % en vacas que tuvieron retención de placenta o metritis, un 21 % si desarrollaron quistes ováricos y un 8 % en vacas de más de 3 partos que presentaron afecciones posparto (Chebel et al., 2004; Grohn y Rajala-Schultz, 2000). Por el contrario, la probabilidad de concepción se incrementa 2,25 veces si no tuvieron hipocalcemia y 1,2 veces si no presentaron retención de membranas fetales (Chebel et al., 2004).

### **1.4 Balance energético negativo y su relación con la fisiología reproductiva**

El BEN resulta de un desequilibrio temporario entre el consumo de materia seca y el incremento de los requerimientos energéticos al inicio de la lactancia, se caracteriza por la movilización de lípidos y proteínas de reserva para hacer frente a esa mayor demanda de nutrientes (Sejrsen y Neimann-Sorensen, 1982). El balance energético se calcula restando a la energía neta de ingestión la energía requerida para mantenimiento y producción. En general comienza pocos días antes del parto, llega a su nadir entre los 10 a 12 días posparto y se hace cero o positivo alrededor de los 80 días en primíparas y/o múltiparas (Butler y Smith, 1989; Canfield y Butler, 1990; Villa-Godoy et al., 1988). Su severidad y duración se relaciona con el consumo de materia seca, su tasa de aumento en las primeras 6 semanas posparto, la CC al parto, el mérito genético y en menor medida con la producción de leche (Beam y Butler, 1997; Staples et al., 1990; Villa-Godoy et al., 1988). Un severo BEN podría demorar la normal recuperación uterina posparto debido a un mayor proceso inflamatorio que retrasa la eliminación de los patógenos puerperales (Wathes et al., 2007).

Los NEFA pueden ser oxidados a dióxido de carbono para producir energía, oxidarse parcialmente a acetato y cuerpos cetónicos para ser transportados y utilizados o pueden esterificarse a triglicéridos y almacenarse en el hígado. El aumento en las



concentraciones plasmáticas de NEFA comienza a los 10 días preparto, alcanza su máximo nivel en el parto y luego descienden pero permanecen en concentraciones más elevadas que las reportadas previo al parto (Grummer, 1995). Una concentración de NEFA superior a 600 mEq/L en la primera semana posparto se relaciona a una mayor pérdida de peso en las primeras 3 semanas en lactancia (Carvalho et al., 2014).

En primíparas y multíparas, las concentraciones de NEFA y ácido  $\beta$  hidroxibutirato (BHBA) se correlacionan de forma positiva desde una semana preparto hasta la cuarta semana posparto. A partir de este momento, el nivel de NEFA comienza a descender mientras que las concentraciones de BHBA continúan aumentando hasta la sexta semana. En vacas primíparas, la relación positiva entre NEFA y BHBA se establece antes del parto, sugiriendo que la movilización de tejidos comienza una semana previa al parto y el intervalo a la primera ovulación se relaciona con bajos niveles de BHBA en el preparto y con una alta concentración de los mismos 2 semanas después, como también a elevadas concentraciones circulantes de NEFA y una baja CC. Por el contrario, el intervalo a la primera ovulación en multíparas estaría relacionado a una alta concentración de leptina en el preparto, a un mayor pico de producción y a una baja CC en el posparto (Wathes et al., 2007).

La determinación de las concentraciones de NEFA y BHBA en el preparto y posparto son útiles para cuantificar la magnitud del BEN y determinar su asociación con la presentación de patologías posparto en los primeros 30 días en lactancia. Una concentración de NEFA superior a 0,27 mEq/L en los 14 días previos al parto y mayor a 0,57 mEq/L en las primeras 2 semanas en lactancia con niveles de BHBA por encima de 10 mg/dL, se asocia a un incremento del riesgo de presentación de desplazamiento de abomaso, cetosis clínica, retención de membranas fetales y/o metritis, reducción en la producción de leche y en la TP en los primeros 21 días luego de finalizado el periodo de espera voluntario (Ospina et al., 2010a, c). La TC disminuye entre el 13 y 19 % en los 70 días posteriores a finalizado el periodo de espera voluntario, cuando la concentración de NEFA y BHBA en el preparto y posparto superan los valores de referencia indicados y este efecto es más marcado en multíparas (Ospina et al., 2010b). El incremento sérico de BHBA en la semana previa a la fecha estimada de parto también se relaciona con una reducción en la producción láctea al inicio de la lactancia (Chapinal et al., 2012a; Chapinal et al., 2012b).

Un intervalo menor a 71 días entre el secado y la fecha estimada de parto no estaría asociado a un retraso en el reinicio de la ciclicidad posparto (Walsh et al., 2007). Sin embargo, cuando este intervalo es mayor a 77 días se reporta un retraso en el reinicio de la actividad ovárica posparto debido a un prolongado proceso anabólico preparto, una elevada CC al parto y un mayor descenso de la misma en los primeros 60 días en lactancia (Opsomer et al., 2000) causado por una disminución en el consumo.

El consumo de materia seca y energía comienza a declinar 3 semanas antes del parto pero el mayor descenso ocurre en la última semana de gestación (Grummer, 1995). En la primera semana posparto es menor al 2 % del peso vivo y luego comienza a aumentar hasta llegar al 3 % del peso vivo. Este nivel de ingestión se alcanza a los 25 días en vacas que comienzan a ciclar antes de los 60 días posparto o se retrasa hasta los 40 días en lactancia en animales que permanecen en anestro por un período de tiempo mayor (Staples et al., 1990).

La leptina es una hormona cuya concentración cae al final de la gestación y se mantiene en bajos niveles después del parto, provocando una merma en el consumo voluntario que disminuye la CC incluso cuando el balance energético ha mejorado. Esto ocurre sobre todo en multíparas cuyo pico de producción láctea es mayor y la CC se mantiene baja por más tiempo atrasando el intervalo a la primera ovulación (Ingvarsen y Boisclair, 2001). Del mismo modo, cuando se relaciona la producción en los primeros 90 días con el reinicio de ciclicidad, se observa que las vacas del menor cuartil de producción presentan menos posibilidad de ciclar respecto a las de los 3 cuartiles mayores (Santos et al., 2009; Staples et al., 1990).

Los cambios en la CC se correlacionan positivamente con el balance energético, por lo que su medición rutinaria en el posparto puede servir como un indicador indirecto del mismo (Ferguson, 1996). Un largo intervalo entre partos se asocia a un aumento de la CC al parto y a mayor pérdida de CC en los primeros 30 días en lactancia (Pryce et al., 2001). Este efecto es más manifiesto en primíparas y se relaciona con la producción láctea en ese período, donde vacas con mayor pico de producción sufren mayor pérdida de CC, lo mismo que sucede con los animales que paren en épocas con estrés térmico (Middleton et al., 2019) o reciben dietas bajas en concentrados (Pryce et al., 2001).

Las concentraciones plasmáticas de nitrógeno ureico y proteínas totales no se relacionan con el reinicio de ciclicidad posparto en las vacas lecheras (Butler, 1998). Por el contrario, el consumo de materia seca, los niveles de IGF-I y de BHBA, forma predominante de cuerpos cetónicos en sangre cuya concentración constituye un índice de oxidación de los ácidos grasos, parecen ser mejores indicadores del estado metabólico que la concentración de NEFA y de glucosa (Pushpakumara et al., 2003). Si bien las vacas que ovulan después de los 45 días posparto presentan concentraciones de NEFA numéricamente más elevadas entre las 3 y 5 semanas debido a una mayor movilización de reservas, estas no difieren significativamente de las reportadas en vacas que comienzan a ciclar antes de ese periodo (Shrestha et al., 2005).

La falta de un adecuado manejo en el preparto produce altas concentraciones circulantes de NEFA y niveles mínimos de glucosa, insulina e IGF-I en la primera semana posparto (Beam y Butler, 1997; Pushpakumara et al., 2003). Los bajos niveles de IGF-I e insulina junto a las elevadas concentraciones de BHBA se asocian a una disminución en el consumo de materia seca, una baja en la CC y un aumento en la pérdida de peso que afectan el desarrollo folicular, el reinicio de la actividad ovárica posparto y la concepción (Pushpakumara et al., 2003; Staples et al., 1990).

En los primeros 30 días posparto, los niveles de NEFA se correlacionan negativamente con los niveles de insulina y el balance energético diario, mientras que la insulina se correlaciona de forma positiva con la glucosa plasmática y, en menor medida, con el balance energético. Por su parte, la hormona del crecimiento se correlaciona negativamente con la concentración de glucosa e insulina (Beam y Butler, 1997).

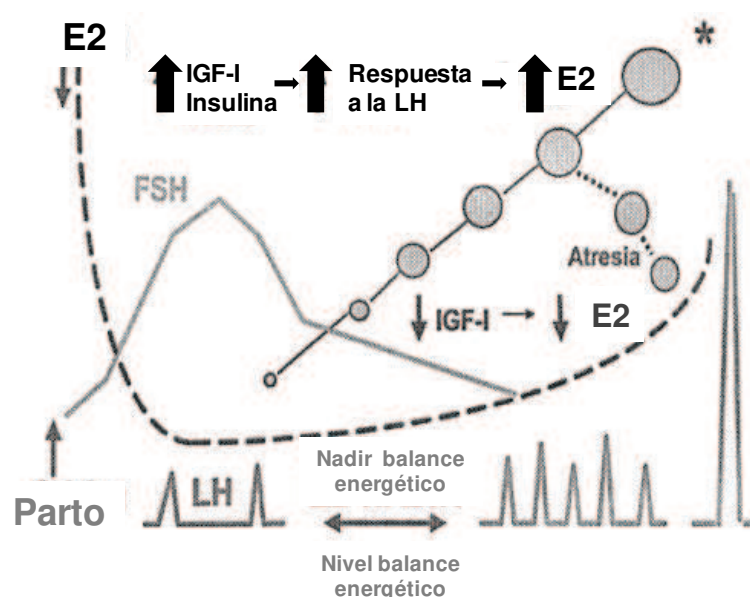
La insulina se mantiene baja en el preparto, asciende en el parto y luego vuelve a descender debido a una mayor demanda de glucosa para la producción de leche, su concentración está directamente correlacionada con el consumo de materia seca por lo que la glucosa disminuye hasta los 15 días posparto (Kawashima et al., 2012). Esta disminución en la concentración circulante de insulina en la gestación tardía se acompaña de un incremento en los niveles plasmáticos de la hormona del crecimiento, que alcanza su máximo nivel en el parto para estimular la lipólisis y la movilización grasa (Wathes et al., 2007). Sin embargo, durante el BEN en la lactancia temprana, el hígado se vuelve resistente a la hormona del crecimiento haciendo que los receptores de esta hormona disminuyen y en consecuencia se inhiba la acción estimulante de esta

hormona sobre la síntesis de IGF-I (Lucy et al., 2001). Por lo tanto, los niveles plasmáticos de IGF-I decrecen entre los 21 días preparto y las 3 semanas posparto a pesar del incremento en la hormona del crecimiento (Kawashima et al., 2007; Kawashima et al., 2012). La disminución de la leptina en el parto también se asocia a un incremento en las concentraciones de la hormona del crecimiento y a un descenso en los niveles plasmáticos de insulina e IGF-I (Block et al., 2003).

El aumento de la concentración de FSH entre los 3 a 5 días posparto produce la emergencia, el reclutamiento y la selección de la primera onda folicular a pesar de la existencia del BEN. Sin embargo, la primera ovulación puede retrasarse por una disminución en la concentración de IGF-I, el descenso del pico de E2 y la supresión de la secreción pulsátil de LH con la reducción de la sensibilidad ovárica al estímulo de LH (Beam y Butler, 1997). La liberación de  $\beta$  endorfinas en la lactancia temprana estimula el apetito y el consumo, pero inhibe la secreción hipotalámica de GnRH, la liberación hipofisiaria de LH o ambas. La liberación de GnRH y, en consecuencia la secreción pulsátil de LH, también pueden disminuir por la baja concentración de insulina y la circulación de cuerpos cetónicos producto de la movilización grasa (Butler y Smith, 1989). Por lo tanto, la frecuencia de pulsos de LH es significativamente menor en vacas que desarrollan un FD no ovulatorio respecto a aquellas en las cuales el crecimiento folicular es seguido por la ovulación debido a la disminución en la ingestión de energía (Beam y Butler, 1997) o por la presencia del ternero, el reflejo de succión y sus estímulos relacionados en vacas de cría (Butler y Smith, 1989). La secreción pulsátil de LH es de baja frecuencia y alta amplitud hasta alcanzar el nadir del balance energético, después se incrementa la frecuencia pulsátil y la concentración media de LH, lo que determina el intervalo a la primera ovulación (Canfield y Butler, 1990) (Figura 2).

Los días al nadir del BEN están relacionados con los días a la primera ovulación que ocurre, en promedio, a los 30 días postparto, con un rango de 7 a 42 días cuando el balance es todavía negativo pero se aproxima a cero (Butler y Smith, 1989; Staples et al., 1990). La capacidad del FD para producir suficiente E2 y ovular depende de la disponibilidad de insulina e IGF-I (Beam y Butler, 1999). Esta situación se asocia a una mejor CC en relación a las anovulatorias, a mayores niveles de glucosa con un incremento en las concentraciones de IGF-I previo al pico de E2 y a un aumento en los niveles de insulina durante y después del pico de E2 que garantizan la maduración del

FD para ovular (Kawashima et al., 2007). El IGF-I actúa en sinergismo con la FSH en la etapa de maduración folicular, amplificando la señal endócrina de la FSH para estimular la esteroidogénesis y la proliferación de las células de la teca (Spicer y Stewart, 1996) y de la granulosa (Spicer et al., 1993). La concentración plasmática de IGF-I está directamente relacionada a la producción de E2 folicular, por lo que el crecimiento folicular se ve afectado durante el BEN (Butler, 2000). La incorporación de niveles moderados de grasa en la dieta posparto es una alternativa que puede utilizarse para incrementar los niveles plasmáticos de IGF-I y con ello la producción de E2 por parte del FD (Beam y Butler, 1997). Por su parte la insulina ejerce un efecto similar al IGF-I sobre la esteroidogénesis, pero además, facilita la mitosis y la diferenciación celular (Spicer et al., 1993). Esto demuestra que el IGF-I y la insulina son “señales metabólicas” esenciales para la reanudación de la función ovárica posparto en vacas lecheras de alta producción (Kawashima et al., 2007). En vacas que ovulan el primer FD, la misma ocurre en promedio a los 17 días posparto, como consecuencia de un pico de E2 que comienza a los 16 días posparto y desencadena el pico preovulatorio de LH entre 14 y 28 horas después (Kawashima et al., 2007) (Figura 2).



**Figura 2:** Esquema de desarrollo del FD de la primera onda folicular durante el posparto en vacas lecheras, su relación con las hormonas reproductivas y el balance energético. El folículo de la primera onda folicular puede ovular o atresarse. La frecuencia pulsátil de LH depende de los días al nadir del balance energético negativo y en menor medida de la severidad del mismo. Las flechas hacia arriba indican el incremento en la concentración de IGF-I e insulina que inducen una mayor respuesta a la LH y un aumento en la producción de E2 por el FD (Adaptado de: Butler, 2000).

La duración de la fase luteal no varía en los primeros ciclos posparto, no se asocia al balance energético ni al consumo de materia seca. En el primer ciclo estral los niveles plasmáticos de P4 no se afectan por la magnitud del balance energético debido a la limitada funcionalidad del CL (Staples et al., 1990; Villa-Godoy et al., 1988). En cambio, durante el segundo y tercer ciclo, vacas con un nadir más intenso al BEN (3,1 a 6 Mcal) y más temprano en el posparto, alcanzan una menor concentración de P4 plasmática respecto a los animales con un menor BEN en los primeros 9 días en lactancia. Esto es consecuencia de un CL de igual duración pero con una menor función luteal debido a una menor actividad secretora, a un menor desarrollo luteal o a una combinación de ambas (Villa-Godoy et al., 1988).

### **1.5 Cambios en la eficiencia reproductiva y su asociación con la aparición de los protocolos de sincronización de celo y ovulación**

A mediados la década del 80 se observó un aumento en los días a primer servicio, en los días abiertos y en la cantidad de servicios por concepción en rodeos Holstein y Jersey (Lucy, 2001; Washburn et al., 2002a). La TC pasó del 52-53 % a un 33-35 % (Washburn et al., 2002a). En los últimos 20 años el aumento de tamaño de las explotaciones lecheras y de la producción de leche por vaca redujo la tasa de detección de celo (TDC) a menos del 50 % (Senger, 1994; Washburn et al., 2002a). La duración del estro se redujo de 14 horas aproximadamente en vacas con una producción de 25 a 30 L/día a menos de 6 horas en aquellas que producen más de 40 L/día (Lopez et al., 2004). Esta diferencia de horas podría estar asociada a disminuciones en las concentraciones séricas de E2 durante el proestro y a una rápida caída de su concentración luego del pico preovulatorio de LH en las vacas de mayor producción, debido a un mayor metabolismo hepático (Wiltbank et al., 2006).

Para mejorar la TDC y optimizar la mano de obra, se desarrollaron métodos complementarios de diferentes costos, exactitud y precisión tales como pinturas, tizas, dispositivos laminares y Kamar<sup>®</sup> que se colocan en la base de la cola para identificar la hembra en celo, como también otros sistemas de mayor complejidad como los podómetros y collares (Crowe et al., 2018).

En consecuencia, esta disminución en la TC y en la TDC motivó a cambios en el manejo reproductivo de las explotaciones lecheras tendientes a mejorar su eficiencia.

Parte de estos cambios iniciales consistieron en la aparición de los protocolos para sincronizar celos en animales cíclicos con CL, basados en la aplicación de una dosis de PGF2 $\alpha$  (Lauderdale et al., 1974) o dos dosis a intervalo de 11 a 14 días (Roche, 1976), hasta protocolos de sincronización de la ovulación que combinan diferentes hormonas reproductivas prescindiendo de la detección de celo (Pursley et al., 1995; Vasconcelos et al., 1999).

Los protocolos de sincronización de la ovulación debieran cumplir las siguientes premisas básicas: atresia u ovulación del FD con el reinicio de una nueva onda folicular, que ese crecimiento folicular ocurra en presencia de elevadas concentraciones de P4 plasmática, que se produzca una adecuada luteolisis y que la inseminación a tiempo fijo (IATF) se realice alrededor del momento de la ovulación del FD. Estos programas de IATF se basan en la utilización de un dispositivo intravaginal (DI) impregnado con P4, GnRH, benzoato de estradiol (BE), cipionato de estradiol (CE) y PGF2 $\alpha$ . La normativa vigente en Estados Unidos y Canadá solo permite utilizar los DI, la GnRH y la PGF2 $\alpha$  (Bisinotto et al., 2015b) mientras que en países sudamericanos, Nueva Zelanda y Australia se autoriza, además, el uso de diferentes sales de E2 como el benzoato y el cipionato (Souza et al., 2005).

### **1.6 Sincronización de celos con PGF2 $\alpha$**

El uso de PGF2 $\alpha$  para sincronizar celo requiere la presencia de un CL en uno de los ovarios y de personal capacitado para detectar celo (Kaneda et al., 1981). La expresión de celo y ovulación ocurre dentro de los 7 días posteriores a su aplicación en el 50 % de las hembras tratadas, donde el 88 % de las vacas que manifiestan celo lo hacen entre el segundo y cuarto día con un pico de respuesta al día 3 (Lauderdale et al., 1974). La variación en el tiempo de ovulación depende de la etapa de crecimiento en que se encuentre el FPO al inyectar la PGF2 $\alpha$ ; cuando el FD está desarrollado y es funcional, el intervalo a la expresión de celo es menor en comparación a cuando se encuentra en etapas tempranas de desarrollo (Stevenson et al., 1984). Con la aplicación de dos dosis de PGF2 $\alpha$  a intervalos de 13 días, la proporción de hembras que entran en celo se incrementa al 80 % (Xu et al., 1997). El estado del ciclo estral en que es aplicada la PGF2 $\alpha$  afecta el porcentaje de animales que manifiestan celo y la concepción; vacas que se encuentran entre el día 5 y 9 del ciclo (etapa temprana) responden en menor proporción con una menor concepción en relación a aquellas que se encuentran entre el

día 10 a 13 (etapa media) o entre el día 14 a 19 (etapa tardía) (Xu et al., 1997). Es así que, el efecto luteolítico de la  $PGF2\alpha$  no solo varía con la etapa del ciclo estral en que es aplicada, sino que también requiere de personal capacitado para una correcta detección de celo (Kaneda et al., 1981) y no puede ser utilizada en vacas en anestro o ciclando sin CL susceptible (Roche, 1976). Esta situación dio lugar al desarrollo de protocolos de sincronización de la ovulación para prescindir de la detección de celos.

### **1.7 Protocolos de sincronización de la ovulación**

El control coordinado del desarrollo folicular en vacas lecheras es crítico para lograr una ovulación sincronizada que se vea reflejada en una mayor TC (Bello et al., 2006). Existen dos tipos de protocolos de sincronización de la ovulación que son utilizados con mayor frecuencia en los establecimientos lecheros; uno denominado Ovsynch, que combina GnRH y  $PGF2\alpha$  (Pursley et al., 1995), utilizado principalmente en el norte de América (Caraviello et al., 2006) y los que utilizan una combinación de estrógenos, DI de P4 y  $PGF2\alpha$  que se emplean en países sudamericanos (Baruselli et al., 2012; Bó et al., 2013; Bo et al., 2005). Independientemente del protocolo utilizado, existen etapas críticas comunes que deben ser consideradas y optimizadas en ambos protocolos; la emergencia sincrónica de un FD (Bello et al., 2006; Melo et al., 2018; Vasconcelos et al., 1999) en presencia de elevadas concentraciones de P4 (Bisinotto et al., 2015b; Bisinotto et al., 2013), una adecuada luteolisis del CL previo a la inseminación (Barletta et al., 2018; Fricke et al., 2016; Santos et al., 2010), que el FPO alcance un tamaño adecuado a la inseminación (Pereira et al., 2013a) y que la tasa de ovulación sea elevada (Bello et al., 2006).

#### **1.7.1 Protocolo Ovsynch**

El protocolo Ovsynch fue el primer tratamiento de sincronización de ovulación que empleó el uso combinado de GnRH y  $PGF2\alpha$  en vacas lecheras, permitiendo inseminar a tiempo fijo, eliminando la necesidad de detectar celo (Pursley et al., 1995). Consiste en una primera inyección intramuscular de 100  $\mu$ g de GnRH al día 0, seguido por la administración de 25 mg de  $PGF2\alpha$  al día 7. A las 48 horas se aplica una segunda dosis de 100  $\mu$ g de GnRH y a las 24 horas posteriores se realiza la IATF (Pursley et al., 1995). Las diferentes investigaciones realizadas, permitieron dilucidar la fisiología hormonal del protocolo (Bello et al., 2006; Bisinotto et al., 2013; Vasconcelos et al.,



1999) adoptando las mejores estrategias para optimizar la concepción (Barletta et al., 2018; Bisinotto et al., 2015a; Herlihy et al., 2012a; Kawate et al., 2004; Santos et al., 2010). El Ovsynch 56 es una alternativa del tratamiento original en el cual la segunda GnRH se aplica a las 56 horas posteriores a la PGF2 $\alpha$  y se insemina a tiempo fijo 16 horas después (Brusveen et al., 2008).

Las premisas que debiera cumplir el Ovsynch se basan en: a) inducir la ovulación del FD y la formación de un CL con la GnRH inicial (Giordano et al., 2013; Pursley et al., 1995), b) garantizar el reinicio y crecimiento de un folículo en presencia de adecuados niveles de P4 por un CL funcional (Stevenson, 2016), c) inducir una luteolisis completa en respuesta a la PGF2 $\alpha$  (Brusveen et al., 2009), y d) provocar la ovulación del FPO en respuesta a segunda GnRH (Pursley et al., 1998; Stevenson, 2016).

#### **1.7.1.1 Respuesta ovulatoria a la primera GnRH del protocolo Ovsynch**

El objetivo de la primera GnRH es inducir la ovulación del FD ovárico al inicio del tratamiento (Macmillan y Thatcher, 1991; Pursley et al., 1995). Una elevada tasa ovulatoria inicial permitiría lograr una mayor concentración de P4 al momento de la PGF2 $\alpha$ , generaría un FPO de menor tamaño, evitaría ovulaciones anticipadas antes de la segunda GnRH e incrementaría la tasa de sincronización y de preñez (Vasconcelos et al., 1999). La inyección de GnRH en presencia de un folículo mayor a 10 mm produce una concentración máxima de LH cercana a los 20 ng/mL a las 2 horas de su aplicación (McDougall et al., 1995; Picard-Hagen et al., 2015), que desencadena la ovulación luego de 24 a 32 horas (Pursley et al., 1995). Esto produce la emergencia de una nueva onda folicular en promedio a los 2,5 días con un rango de 2 a 4 días (Pursley et al., 1995). En vacas cíclicas, la falta de sincronización folicular y/o luteal durante el Ovsynch incrementa el porcentaje de animales que expresan celo antes de los 17 días de la IATF y reduce la concepción (Cordoba y Fricke, 2002).

El estado de desarrollo de la onda folicular al comienzo del protocolo influye en la respuesta a la primera GnRH (Bello et al., 2006). La respuesta ovulatoria en vacas lecheras es en promedio del 64 % y varía según la etapa del ciclo estral en que se inicia el protocolo, siendo del 23 % cuando se inicia en metaestro, del 96 % entre los 5 y 9 días del ciclo, del 54 % entre el día 10 y 16 del ciclo y del 77 % entre los 17 y 21 días del ciclo (Vasconcelos et al., 1999). La baja respuesta ovulatoria en el metaestro se

debería a la falta de expresión de receptores de LH en las células de la granulosa ya que el folículo se encuentra en la etapa previa a la desviación folicular (Ginther et al., 1996). A partir del cuarto día el FD alcanza la etapa de selección con un tamaño aproximado de 8,5 mm (Ginther et al., 1996). Después de la desviación, el FD adquiere más receptores de LH en sus células de la granulosa (Adams et al., 2008). La baja respuesta ovulatoria observada entre los días 10 y 16 del ciclo estaría asociada a la pérdida de dominancia del FD por la pérdida de receptores de FSH y de LH y a una disminución en la producción de estrógenos, consecuencia de una menor frecuencia pulsátil de LH (Rahe et al., 1980; Savio et al., 1993a) o bien por la emergencia de la segunda onda folicular entre el día 8 y 11 en vacas con 2 ondas foliculares (Adams et al., 2008; Sartori et al., 2004). Por último la respuesta ovulatoria observada entre los 17 y 21 días del ciclo variaría en función de la emergencia de una nueva onda folicular al día 15 o 16 en las vacas con 3 ondas de crecimiento folicular (Ginther et al., 1989; Sartori et al., 2004; Savio et al., 1988; Sirois y Fortune, 1988). Además, cuando se aplica la primera GnRH en vacas en proestro la ovulación genera la emergencia de una nueva onda folicular que crece con bajos niveles de P4 provocando un descenso en la tasa de sincronización del protocolo con un FPO de mayor tamaño que se asocian a menor TC (Denicol et al., 2012).

La aplicación de una dosis de 200 µg de gonadorelina al comienzo del Ovsynch aumenta un 10 % la respuesta ovulatoria en vacas en diestro debido a una mayor liberación de LH inducida por la GnRH respecto a la administración de 100 µg (Giordano et al., 2013). La dosis de GnRH se relaciona de forma cuadrática con la posibilidad de ovulación, donde la ovulación para ambas dosis es mayor para folículos de 16 a 18 mm (Giordano et al., 2013). La respuesta ovulatoria en vacas es mayor que en vaquillonas debido a que estas últimas presentan un mayor recambio de ondas foliculares lo que incrementa la posibilidad de inyectar la GnRH en ausencia de un FD mayor a 10 mm (Pursley et al., 1995). Se ha reportado diferencias en la concentración promedio y máxima de LH entre análogos de GnRH, donde la lecirelina y la buserelina presentan mayores niveles de LH en relación a la gonadorelina (Picard-Hagen et al., 2015). Esto podría ser causado por una prolongada acción de la lecirelina o buserelina en relación a la gonadorelina (Chenault et al., 1990; Nawito et al., 1977). No obstante, la respuesta ovulatoria, el reinicio de una nueva onda folicular y los niveles de P4

plasmática serían similares entre los análogos (Picard-Hagen et al., 2015), por lo que las diferencias detectadas entre análogos carecerían de significancia biológica. En vacas anovulatorias, la ovulación a la primera GnRH del Ovsynch puede alcanzar el 88 % (Gümen et al., 2003), permitiendo sacar las hembras de esta condición anovular, sin embargo, la probabilidad de preñez se ve disminuida en 6 puntos porcentuales (29,7 % vs. 35,9 %) y el intervalo de concepción se incrementa en 30 días (156 días vs. 126 días) en relación a vacas cíclicas (Walsh et al., 2007).

#### **1.7.1.2 Concentración plasmática de P4 de origen endógena y/o exógena durante el crecimiento folicular**

La determinación de las concentraciones plasmáticas de P4 puede utilizarse para determinar el estado del ciclo estral al inicio del Ovsynch, la respuesta a la primera GnRH y la luteolisis en respuesta a la PGF2 $\alpha$  del protocolo (Cordoba y Fricke, 2002). La prevalencia de anovulación en vacas lecheras es del 19,5 %, con rangos del 5 al 45 % entre rodeos (Walsh et al., 2007), donde la TC del Ovsynch a primer servicio en vacas anovulatorias es del 9 % (Gümen et al., 2003). Vacas anovulatorias que desarrollan un FD de la primera onda durante el Ovsynch presentan una concentración de P4 plasmática inferior a 2,0 ng/mL en los 7 días de tratamiento y un FD de mayor diámetro que resulta en menor preñez (Denicol et al., 2012) y mayor porcentaje de pérdida embrionaria (PE) en relación a vacas que ovulan un folículo de la segunda onda (Bisinotto et al., 2010). La baja concentración de P4 incrementa la incidencia de codominancia folicular y las ovulaciones múltiples (Sartori et al., 2004; Stagg et al., 1995), aumentando al 50 % la proporción de dobles ovulaciones en respuesta a la GnRH inicial y/o final del Ovsynch, generando a su vez incrementos en la PE antes de los 60 días de gestación (Martins et al., 2018). La doble ovulación en ambas GnRH del Ovsynch se presenta con mayor frecuencia en vacas de alta producción (Fricke y Wiltbank, 1999; Lopez et al., 2005a) que inician el protocolo en proestro (sin CL) o son anovulatorias (Galvao y Santos, 2010; Herlihy et al., 2012b; Stevenson et al., 2012). El mayor tamaño del FPO en vacas con ovulación simple es consecuencia de una mayor tasa de crecimiento folicular provocado por el incremento en la concentración de LH y E2 en respuesta a niveles de P4 plasmática inferiores a 2,0 ng/mL (Cerri et al., 2011a) asociado a una reducción en la concentración de inhibina previo a la desviación folicular (Kulick et al., 2001; Lopez et al., 2005b). En estas situaciones se producen

incrementos en la expresión endometrial de receptores de estrógeno  $\alpha$  lo que aumenta la liberación endometrial de  $\text{PGF2}\alpha$ , aumentando el riesgo de fase luteal corta (Cerri et al., 2011a).

La inserción de un CIDR<sup>®</sup> de 1,38 g en vacas Holstein de alta producción y Jersey produce una concentración de P4 entre 1,0 y 1,4 ng/mL en las primeras 24 horas para luego descender a niveles subluteales ( $< 1,0$  ng/mL) a partir del segundo día de tratamiento (Cerri et al., 2009a; Moraes et al., 2016). Esto es insuficiente para lograr una alta fertilidad en vacas sin CL al inicio del Ovsynch (Bisinotto et al., 2013). Además se ha demostrado que alrededor de un 20 % de los animales ovula en las 24 horas posteriores a la inserción del DI porque el pico preovulatorio de LH se inicia antes que comience el aumento en la concentración plasmática de P4 (Cerri et al., 2009a). La menor concentración de P4 plasmática en vacas lecheras de alta producción estaría determinado por la superficie de contacto del dispositivo con la mucosa vaginal (Rathbone et al., 2002) y también se debería a un elevado flujo sanguíneo hepático con aumento del metabolismo esteroide que surge en respuesta al incremento de consumo para hacer frente a los requerimientos de energía en la lactancia temprana (Sangsritavong et al., 2002).

Existe una correlación positiva entre una concentración de P4 superior a 2,0 ng/mL durante el crecimiento folicular y la preñez (Denicol et al., 2012). La inserción de 2 DI en vacas sin CL al inicio del Ovsynch de 5 o 7 días produce niveles de P4 promedio entre 2,0 y 3,0 ng/mL durante el tratamiento con un FPO de menor tamaño que permite alcanzar una TC similar a la reportada en vacas en diestro (Bisinotto et al., 2015a; Bisinotto et al., 2013; Denicol et al., 2012). La concentración de P4 se incrementa de forma lineal con el número de DI utilizados durante el protocolo (Lima et al., 2009), pero la concepción en vacas que llegan a una concentración de 2,0 a 3,0 ng/mL durante la sincronización no se diferencia respecto a las que superan los 3,0 ng/mL (Bisinotto et al., 2015a).

### **1.7.1.3 Inducción de una luteolisis completa en respuesta a la $\text{PGF2}\alpha$**

La  $\text{PGF2}\alpha$  al día 7 se aplica para inducir la luteolisis de todos los CL, ya sea el accesorio formado a partir del folículo que ovuló en respuesta a la primera GnRH o del CL presente en las vacas que se encuentran en metaestro o diestro al comienzo del

tratamiento (Pursley et al., 1995). El porcentaje de animales con luteolisis completa al aplicar la PGF2 $\alpha$  está alrededor del 80 % y ocurre cuando la concentración de P4 es < 0,5 ng/mL a las 56 horas posteriores a la aplicación de la PGF2 $\alpha$ . Se considera que existe un retraso en la luteolisis cuando la concentración desciende a < 0,5 ng/mL a las 96 horas mientras que se asume que la luteolisis es incompleta cuando la P4 en ese momento se encuentra entre 0,5 y 1,0 ng/mL (Martins et al., 2011). El tratamiento con doble dosis de PGF2 $\alpha$  separadas por 24 horas en el Ovsynch incrementa al 94 - 96 % la proporción de vacas que experimentan regresión luteal completa (Barletta et al., 2018; Borchardt et al., 2018; Brusveen et al., 2009; Wiltbank et al., 2015) y alrededor del 5 % la TC (Borchardt et al., 2018). Cuando el intervalo entre la primera GnRH del Ovsynch y la PGF2 $\alpha$  se reduce de 7 a 5 días para disminuir la dominancia folicular, también se requiere la inyección de doble dosis de PGF2 $\alpha$  para inducir niveles aceptables de luteolisis y lograr concepciones superiores a las reportadas con el Cosynch 72 (Santos et al., 2010).

#### **1.7.1.4 Relación entre la concentración de P4 y la respuesta ovulatoria a la segunda GnRH del protocolo Ovsynch**

La concentración de P4 previa y a las 48 horas posteriores a la PGF2 $\alpha$  y la ovulación a la segunda GnRH serían los responsables del 78 % de la variación en la concepción, ya que indican la sincronización de la ovulación del protocolo, mientras que el 22 % restante dependería de los niveles de P4 plasmática a la primera GnRH, el tamaño del FPO, la CC y el número de lactancias (Stevenson, 2016). Una concentración de P4 plasmática > 1,0 ng/mL a la segunda GnRH es indicativo de ausencia de luteolisis y falla en la concepción (Martins et al., 2011). Esto ocurre, en general, en hembras que inician el protocolo en metaestro o diestro temprano y en proestro. En el caso del metaestro o diestro temprano, se produciría la ovulación a la primera GnRH pero el CL accesorio no es sensible a la PGF2 $\alpha$ , mientras que en las vacas que se encuentran en proestro, no responden a la primera GnRH pero ovulan antes de la segunda GnRH debido a la luteolisis espontánea del CL antes de aplicar la PGF2 $\alpha$  (Cordoba y Fricke, 2002).

Por el contrario, una concentración de P4 plasmática < 1,0 ng/mL a la segunda GnRH permite alcanzar una concepción del 39 al 43 % en vacas en diestro y en vacas en proestro que sincronizaron la función folicular y luteal, mientras que desciende a un 14

% en aquellas hembras en proestro que no respondieron a la primera GnRH pero ovularon de manera espontánea a la segunda GnRH (Cordoba y Fricke, 2002). Concentraciones de P4 < 0,4 ng/mL al momento de la segunda GnRH se asocian a un pico preovulatorio de LH superior a 5 ng/mL en el 90 % de los casos (Giordano et al., 2012a) y a un aumento del 50 % en la TC (Brusveen et al., 2009).

Vacas que inician el protocolo en diestro (día 5 a 13) presentan un folículo menor a 15 mm a la PGF2 $\alpha$  e inferior a 18 mm a la segunda GnRH, esto se asocia a un incremento en la TP a la IATF (Vasconcelos et al., 1999). El tamaño folicular a la última GnRH del Ovsynch se relaciona de manera cuadrática con la probabilidad de preñez, la concepción es alrededor del 45 % para folículos de 16 mm pero desciende al 15 % cuando son menores a 12 mm o mayores a 20 mm (Bello et al., 2006). Existe una correlación positiva entre el tamaño folicular a la PGF2 $\alpha$  y a la segunda GnRH, así como del tamaño del FPO con el diámetro del CL a los 7 y 14 días posteriores a la inseminación (Vasconcelos et al., 2001). El momento de inseminación después de la última GnRH del Ovsynch se relaciona de forma cuadrática con la preñez, donde la mayor fertilidad se consigue cuando se insemina a las 16 horas de su aplicación y la PE es mayor si la inseminación se retrasa hasta las 32 horas (Pursley et al., 1998). El 33 a 48 % de los animales manifiesta celo después de la segunda GnRH (Bisinotto et al., 2013; Perry et al., 2014) asociado a un aumento de las concentraciones de E2 que comienza a las 6 horas de inyectar la PGF2 $\alpha$  y se mantiene hasta las 40 a 50 horas posteriores (Herlihy et al., 2012a; Perry et al., 2014). La concentración máxima de E2 en animales que manifiestan celo se relaciona de forma directa con el tamaño del FPO (Perry et al., 2014). La capacidad de los folículos para producir mayor cantidad de E2 y expresar celo podría deberse a un incremento de la sensibilidad pituitaria a la GnRH o en sus receptores cuando disminuye la concentración de P4 luego de colocar la PGF2 $\alpha$  (Chabbert-Buffeta et al., 2000). La concentración de E2 aumenta más rápido luego de retirar el DI en vacas que fueron tratadas con P4 exógena durante el Ovsynch pero la segunda GnRH produce una rápida caída de la secreción de E2, que disminuye la concentración del pico preovulatorio de E2 y provoca la ovulación en promedio a las 84 horas de colocar la PGF2 $\alpha$ , con un menor rango de tiempo que las 100 horas reportadas en los animales que no reciben la última GnRH y son inseminados a celo detectado (Herlihy et al., 2012a). La concepción aumenta un 10 a 15 % en vacas que expresan

celo al finalizar el Ovsynch de 5 o 7 días (Bisinotto et al., 2015a; Bisinotto et al., 2013; Santos et al., 2010).

Esta relación cuadrática entre la concentración de P4 a la segunda GnRH y la preñez también se observa al momento de la inseminación, ya que la preñez supera el 50 % cuando la P4 está por debajo de 0,26 ng/mL, mientras que la concepción disminuye de forma gradual a partir de los 0,5 ng/mL hasta llegar a ser nula cuando la P4 se encuentra por encima de los 0,8 ng/mL (Colazo et al., 2017).

### **1.7.2 Protocolos de presincronización para mejorar la eficiencia del protocolo Ovsynch**

La presincronización ovárica (Bello et al., 2006; Moreira et al., 2001) antes del Ovsynch mejora la TC (Herlihy et al., 2012b). Con el tiempo se fueron desarrollando diferentes protocolos de presincronización tendientes a mejorar la eficiencia del Ovsynch. Estos tienen como objetivos incrementar la respuesta ovulatoria a la primera GnRH, asegurar altas concentraciones de P4 durante el protocolo para que se desarrolle un folículo con mayor potencial de fertilidad y aumentar tanto el porcentaje de animales con luteolisis completa a la PGF2 $\alpha$  como la ovulación a la última GnRH. En algunos tratamientos se fueron acortando la duración de los protocolos, se trató de disminuir la cantidad de aplicaciones y la mano de obra necesaria para ejecutarlos a fin de asegurar el correcto seguimiento de los mismos e incrementar la fertilidad. No obstante, en otro tipo de presincronizaciones se requieren entre 27 días (Doble Ovsynch) a 36 días (Presynch-Ovsynch) de tratamiento y el empleo sistemático de GnRH y PGF2 $\alpha$  (Herlihy et al., 2012b; Souza et al., 2008). Los costos substanciales de tiempo, drogas y percepciones públicas por el uso rutinario de hormonas, determinan que su uso sea cuestionado en los rodeos lecheros de Europa (Crowe et al., 2018).

Un tratamiento de presincronización sencillo consiste en colocar una dosis de PGF2 $\alpha$  seguida 2 días después por una aplicación de GnRH y el inicio del Ovsynch a los 6 días (G6G). Este produce una tasa de ovulación a la primera GnRH cercana al 85 % e incrementa a más del 92 % la respuesta a la PGF2 $\alpha$  (Bello et al., 2006). La aplicación de una dosis de GnRH 7 días antes de iniciar el Ovsynch incrementa un 15 a 20 % la proporción de vacas con CL y con una concentración de P4 > 1,0 ng/mL al comienzo del protocolo (Bruno et al., 2014). Para simplificar el tratamiento y la mano de obra se

diseñó un protocolo donde la  $\text{PGF2}\alpha$  y la GnRH de la presincronización se aplican en el mismo momento, es decir 7 días antes de comenzar el Ovsynch (Yousuf et al., 2016). Con este protocolo se alcanza una TC similar a la obtenida con el G6G, a pesar de la mayor luteolisis completa y respuesta a la GnRH de la presincronización con menor dispersión de la ovulación observada en el G6G.

También se describió un protocolo que consiste en la aplicación de una  $\text{PGF2}\alpha$  14 días antes de iniciar el G6G (PG6G) o G7G (PG7G) (Dirandeh et al., 2015). Con este tratamiento se incrementa en un 15 a 20 % la proporción de animales con  $\text{P4} > 1,0$  ng/mL a la primera GnRH del Ovsynch y a la  $\text{PGF2}\alpha$  y se lograría un aumento del 10 % en la respuesta ovulatoria a la primera GnRH respecto al G6G o G7G. Si bien los autores observaron una tendencia en la concepción a favor de las PG6G y PG7G en relación a las G6G y G7G, la supervivencia embrionaria se incrementa en un 5 a 10 %.

Otra alternativa de presincronización consiste en inyectar una  $\text{PGF2}\alpha$  y 3 días después una dosis de GnRH para iniciar el Ovsynch a los 10 días posteriores a la GnRH (Stevenson et al., 2012). Con este protocolo se logró una tasa de ovulación a la GnRH de la presincronización del 80 a 90 %, donde el 94 % de animales presentó un CL con una concentración de  $\text{P4} > 1,0$  ng/mL al comienzo del Ovsynch, similar a lo reportado con el G6G (Bello et al., 2006). Esto representa un incremento en la ovulación del 27 % respecto a las que son presincronizadas 10 días antes con doble dosis de  $\text{PGF2}\alpha$  separadas por 14 días (Stevenson et al., 2012). La aplicación de una GnRH exógena en presencia de  $\text{P4} < 1,0$  ng/mL induce en el 70 % de los casos un pico preovulatorio de LH en menor tiempo y de mayor concentración en relación al incremento espontáneo de LH producido luego de aplicar la segunda  $\text{PGF2}\alpha$ , incrementando la respuesta ovulatoria de un 20 a 30 % (Pulley et al., 2015).

La TC del Ovsynch a primer servicio en vacas anovulatorias es del 24 - 30 % si se presincronizan con 2 dosis de  $\text{PGF2}\alpha$  separadas por 14 días (Bisinotto et al., 2010; Denicol et al., 2012; Santos et al., 2009). La inserción de un CIDR<sup>®</sup> de 1,38 g por 6 o 7 días durante la presincronización con doble dosis de  $\text{PGF2}\alpha$  a intervalo de 14 días permite reiniciar la actividad ovárica posparto en menos del 50 % de los animales diagnosticados en anestro, sin embargo, la respuesta es inferior en las vacas que pierden más de un punto de CC en los primeros 50 días posparto (Cerri et al., 2009a; Chebel et al., 2006). La presincronización con 2 dosis de  $\text{PGF2}\alpha$  separadas por 14 días incrementa



la proporción de animales ciclando que inician el Ovsynch en diestro temprano o medio luego de 10 a 14 días (Galvao y Santos, 2010; Moreira et al., 2001; Stevenson et al., 2012) y en consecuencia la fertilidad, no obstante, es ineficiente en vacas anovulatorias (Moreira et al., 2001). En vacas ciclando presincronizadas con doble dosis de  $\text{PGF2}\alpha$ , la concepción a primer servicio con el Ovsynch-56 puede llegar al 38 % mientras que con el Cosynch-48 o Cosynch-72 no supera el 30 % (Brusveen et al., 2008). Esta mejora en la concepción se relacionaría con una optimización del tiempo entre el pico preovulatorio de LH en respuesta a la GnRH (Giordano et al., 2012a; Picard-Hagen et al., 2015), ya que la ovulación se produciría en promedio 24 horas después (Walker et al., 1996); periodo necesario para la capacitación y transporte espermático luego de la inseminación (Hunter y Wilmut, 1983).

El doble Ovsynch fue diseñado para inducir la ovulación en animales anovulatorios previos al Ovsynch y aumentar la proporción de hembras que inician el protocolo de IATF en el período óptimo del ciclo estral (día 5 a 9) (Souza et al., 2008). La tasa de sincronización del doble Ovsynch supera a la del Ovsynch tradicional, ya que la primera GnRH del tratamiento mejora la sincronización folicular, asegura la presencia de un CL en más del 90 % de los casos y duplica el porcentaje de vacas con una concentración de P4 entre 1,0 y 3,0 ng/mL a la primera GnRH del segundo Ovsynch (Giordano et al., 2012b) respecto a las presincronizadas con doble dosis de  $\text{PGF2}\alpha$  separadas por 14 días (Herlihy et al., 2012b; Souza et al., 2008). El 75 % de los animales tratados con doble Ovsynch presenta niveles de P4 superiores a 3,0 ng/mL a la  $\text{PGF2}\alpha$  en comparación con solo el 50 % reportado en las hembras presincronizadas con doble  $\text{PGF2}\alpha$  (Souza et al., 2008). De esta manera es posible reducir la proporción de hembras que sufren regresión luteal espontánea antes de la última GnRH del Ovsynch o luteolisis incompleta (Giordano et al., 2012b).

En vacas presincronizadas con doble Ovsynch, la respuesta ovulatoria a la primera GnRH del Ovsynch está asociada a la concentración de P4 al momento de su aplicación; la ovulación es del 60 % cuando la P4 es menor a 1,0 ng/mL y se reduce al 15 % cuando es superior a 3,5 ng/mL. En las vacas que tienen baja P4 al comenzar el segundo Ovsynch se observa un incremento en la preñez (30 %) mientras que este beneficio no se observa en vacas que presentan P4 entre 1,0 y 3,5 ng/mL, donde su concepción es superior al 40 % independientemente de la respuesta a la GnRH inicial del protocolo

(Giordano et al., 2012b). La liberación de LH inducida por la inyección de GnRH se relaciona de forma inversa con la concentración previa de P4 y de forma directa con el E2 secretado por el FD. Si bien la liberación de LH inducida por la GnRH disminuye en vacas en metaestro o diestro temprano con una concentración de P4 entre los 0,53 a 2,40 ng/mL respecto a vacas en proestro o estro con niveles de P4 por debajo de 0,45 ng/mL, el porcentaje de ovulación solo se reduce cuando existe un CL maduro y la P4 supera los 2,66 ng/mL. Esta última condición se debe a un efecto directo de la P4 sobre la LH o a una disminución de los receptores de GnRH en la hipófisis que reduce el pico de GnRH. Cuando la concentración de P4 plasmática es menor a 1,7 ng/mL y los folículos son mayores a 13,5 mm, la concentración de E2 supera los 4,0 pg/mL produciendo un aumento en la liberación de LH en respuesta a la GnRH con respuestas ovulatorias superiores al 80 % (Stevenson y Pulley, 2016). Los folículos reiniciados son de menor tamaño a la segunda GnRH y crecen en presencia de altas concentraciones de P4 en relación a aquellos que reciben doble PGF2 $\alpha$  durante la presincronización (Ayres et al., 2013; Souza et al., 2008).

La aplicación de doble dosis de PGF2 $\alpha$  al finalizar el doble Ovsynch produce una tasa de sincronización cercana al 90 % y un FPO de menor tamaño porque la concentración de P4 supera los 4,0 ng/mL durante el tratamiento (Fricke et al., 2016). La preñez puede llegar a un 49 % en promedio, mientras que en la presincronización con doble PGF2 $\alpha$  más Ovsynch alcanza el 41 % (Souza et al., 2008). La concepción a primer servicio aumenta un 10 a 11 % en vacas tratadas con el doble Ovsynch cuando se la compara con una presincronización de 21 días basada en la aplicación de una GnRH seguida por una PGF2 $\alpha$ , a los 7 días y otra doble dosis a los 14 y 15 días después con inseminación a celo detectado (Santos et al., 2017). Esta diferencia en fertilidad podría adjudicarse a una mayor concentración de P4 durante el crecimiento folicular en el doble Ovsynch y a una inseminación más precisa en relación al momento de ovulación. La preñez con el doble Ovsynch se relaciona de forma lineal con una concentración de P4 plasmática mayor a 2,0 ng/mL a los 11 días de la inseminación (Herlihy et al., 2012b).

La concepción a primer servicio con el doble Ovsynch es mayor en primíparas (Giordano et al., 2013; Herlihy et al., 2012b) y en animales con una CC  $\geq$  2,75 (Carvalho et al., 2014; Santos et al., 2017; Souza et al., 2008). En vacas con una CC  $\leq$  2,50, el doble Ovsynch reduce la proporción de anovulación y aumenta la concentración

de P4 plasmática a la primera GnRH del Ovsynch en relación a las presincronizadas con doble PGF2 $\alpha$ , lo cual equipara la TC a primer servicio en vacas de baja y alta CC tratadas con doble Ovsynch (Herlihy et al., 2012b). El diámetro del FPO está asociado con la CC (Madureira et al., 2019). La TC en vacas de CC > 2,50 es del 34 % y se reduce al 18 % cuando es < 2,50 (Moreira et al., 2000b). La TC en vacas con una CC  $\geq$  2,50 aumenta un 10 % respecto a aquellas con una condición < 2,50 (Herlihy et al., 2012b). El efecto de la CC sobre la TP también se observa en vacas que comienzan el Ovsynch a los 14 días de haber sido presincronizadas con doble dosis de PGF2 $\alpha$  (Galvao y Santos, 2010). La pérdida de CC durante los primeros 21 días en lactancia y/o una CC  $\leq$  2,50 al momento de la inseminación, se asocian a una reducción en la concepción del 10 a 15 % y a un intervalo parto-concepción alrededor de 30 días mayor, que se incrementa de 113 días a 146 días (Carvalho et al., 2014; Santos et al., 2017).

Por otra parte, se ha descrito recientemente que vacas cruzas Holstein-Gir en diferentes etapas del ciclo estral presincronizadas con un DI por 10 días antes del Ovsynch presentan un tamaño folicular al comienzo del protocolo, una respuesta ovulatoria a la primera GnRH y una concentración de P4 a la PGF2 $\alpha$  similar a la observada en las tratadas con doble Ovsynch (Silva et al., 2018).

### **1.8 Protocolos de sincronización a base de estrógenos y progesterona**

En Sudamérica los protocolos de sincronización de la ovulación que más se utilizan son a base de P4 impregnada en un DI, PGF2 $\alpha$  y sales de E2 que se emplean a la inserción y al momento del retiro de los DI sin una sincronización previa (Bó et al., 2013). La combinación de P4 y E2 permite una mejor sincronización de la onda folicular (Bo et al., 1994). En general estos protocolos consisten en la inserción de un DI con P4 y la aplicación de BE al inicio del tratamiento en vacas en diferentes estados del ciclo estral. Entre el séptimo u octavo día se retiran los DI y se aplica una dosis de PGF2 $\alpha$  para producir la regresión del CL en conjunto con una dosis de CE (Pereira et al., 2013b) o una dosis de BE a las 24 horas posteriores para inducir la ovulación (Cavalieri et al., 2007). La IATF se realiza a partir de las 52 a 54 horas de retirado los DI.

El E2 se aplica al inicio del protocolo para inducir la regresión del FD (Bo et al., 1994) con la consiguiente emergencia de una nueva onda folicular entre el cuarto y quinto día (Kim et al., 2005), no obstante, este reinicio de onda es muy variable (Burke et al.,

2003). Las sales de E2 empleadas son valerato de estradiol (VE), 17  $\beta$  estradiol, BE y CE (Bo et al., 1994; Burke et al., 2000; Souza et al., 2005), donde la concentración plasmática de 17  $\beta$  estradiol depende del tipo y dosis de E2 utilizado (Burke et al., 2000; Souza et al., 2005).

El VE incrementa la concentración de E2 durante 5 días generando un efecto supresivo prolongado sobre la liberación de FSH que retrasa la emergencia de una nueva onda folicular, sobre todo cuando el FD está en la etapa media o tardía de crecimiento folicular (Bo et al., 1993). El tratamiento combinado de 17  $\beta$  estradiol y P4 produce un incremento en la concentración de E2 antes de las 6 horas (Bo et al., 2000; Souza et al., 2005) y una marcada disminución de la FSH, suprimiendo el desarrollo folicular en alrededor del 80 % de los animales dentro de las 24 horas. Esto produce la regresión folicular y genera, a partir del tercer día, un nuevo incremento en la concentración de FSH que finaliza con la emergencia de una nueva onda folicular a los 4 o 5 días con intervalos menos variable (Bo et al., 1994). En términos generales, la FSH comienza a aumentar cuando los niveles de E2 descienden y alcanza su concentración máxima 15 horas antes de la emergencia de la onda folicular, independientemente de la dosis de E2 utilizada (Burke et al., 2003). Cuando el 17  $\beta$  estradiol se aplica sin P4, se origina una supresión incompleta del FD que retrasa el aumento de la FSH y en consecuencia la aparición de la nueva onda folicular (Bo et al., 1994). El 17  $\beta$  estradiol produce un mayor pico de E2, en un menor intervalo de tiempo y con un retorno anticipado a los niveles basales si se lo compara con BE y CE (Souza et al., 2005). Por el contrario, con 1 mg de BE se necesitan 16 horas para alcanzar una concentración máxima de 9,6 pg/mL mientras que con la misma dosis de CE se llega a una menor concentración máxima (3,4 pg/mL) a las 30 horas de su aplicación (Souza et al., 2005).

La inyección intramuscular de 5 o 10 mg de BE provoca un mayor pico de E2 con el consiguiente mayor descenso en la concentración circulante de FSH ocasionado por un retorno más lento a los niveles basales de E2 en relación a la aplicación de dosis  $\leq 2,5$  mg de BE (Rourke et al., 2000). Cuando la dosis de BE se incrementa de 2 a 4 mg se retrasa el reinicio de la onda folicular y el tiempo requerido para detectar la máxima concentración de FSH pasa de 80 a 91 horas en promedio (Burke et al., 2003).

No obstante, en la actualidad los E2 de mayor empleo son el BE y CE (Pereira et al., 2013a; Pereira et al., 2013b; Vasconcelos et al., 2011). El uso de CE como inductor de la ovulación al momento del retiro de los DI simplifica el manejo al evitar un encierro adicional que requería el BE, sin afectar la concepción (Sales et al., 2012).

Un análisis FODA (Fortalezas, Oportunidades, Debilidades y Amenazas) señala que dos de las principales debilidades que presenta la IATF a base de E2, es la variabilidad en la respuesta de preñez obtenida, determinada por las diferencias entre los resultados esperados y los logrados y el conocimiento requerido por el grupo que la ejecuta (Marcantonio, 2018). Fallas y dispersión en el reinicio de la nueva onda folicular, crecimiento folicular con bajas concentraciones de P4, incompleta luteolisis luego de la aplicación de PGF2 $\alpha$ , dispersión en el tamaño del FD, el momento de ovulación y fallas en la ovulación son algunas de las falencias que presenta este protocolo (Kim et al., 2005; Melo et al., 2018; Monteiro Jr. et al., 2015; Pereira et al., 2013b; Pereira et al., 2017; Pfeifer et al., 2009; Sales et al., 2012).

Existen diversos reportes que tratan de optimizar los protocolos de sincronización a base de E2 y P4 variando la dosis inicial de BE (Day et al., 2000; Monteiro Jr. et al., 2015) o combinando BE con GnRH (Pereira et al., 2015) para mejorar la emergencia de una nueva onda folicular e incrementar la concentración de P4. La aplicación de 2 mg de BE al inicio de un protocolo en vacas lecheras incrementa la sincronización de celo y la TC respecto al tratamiento con 1 mg de BE (Day et al., 2000). Por otra parte, la aplicación de 3 mg de BE al inicio del protocolo, no modifica el porcentaje de animales que reinician una nueva onda folicular, ni el día de emergencia, de desviación y tamaño folicular a la desviación y/o ovulación con respecto al empleo de 2 mg de BE, pero es capaz de reducir en un 35 % (19,8 % vs. 55,3 %) la proporción de animales que presentan CL al momento del retiro del DI (Monteiro Jr. et al., 2015). Si bien la regresión luteal se presenta durante todo el tratamiento, lo hace en mayor proporción durante los primeros 3 días del protocolo en las vacas que no ovularon a la presincronización con GnRH o tienen un FD de 7 días al aplicar el BE (Monteiro Jr. et al., 2015). Niveles de P4 inferiores a 2,0 ng/mL durante el crecimiento folicular producen un aumento en la frecuencia pulsátil de LH y en las concentraciones circulantes de E2, originando el desarrollo de un folículo persistente (Savio et al., 1993a; Savio et al., 1993b; Wehrman et al., 1993). Esa elevada secreción de E2 por

parte del folículo persistente continúa luego de retirar el DI y, en consecuencia, el pico preovulatorio de LH y la ovulación se anticipan (Roberson et al., 1989). Alrededor del 70 % de las vacas presentan emergencia de una nueva onda folicular entre el día 1 y 6 del tratamiento (Monteiro Jr. et al., 2015), es decir, que el 30 % restante de las hembras fallan en el reinicio de una nueva onda folicular originando folículos persistentes al momento de la IATF, asociados a una baja concentración de P4 plasmática durante el crecimiento folicular que aumenta la frecuencia pulsátil de LH y prolonga el periodo de dominancia folicular con la consecuente disminución de la fertilidad (Bo et al., 1995; Bo et al., 1993; Bo et al., 1994). Vacas que son sincronizadas durante el protocolo presentan una excelente fertilidad a la IATF (~60 %), mientras que vacas que no son sincronizadas presentan una fertilidad muy baja (~15,7 %) (Monteiro Jr. et al., 2015). Reportes recientes indican que entre el 55 al 65 % de las vacas que comienzan un protocolo de sincronización con CL, mantienen esa misma estructura 7 días después al momento del retiro de los DI (Melo et al., 2018; Monteiro Jr. et al., 2015). Además, se reporta que los niveles plasmáticos de P4 descienden a partir del tercer día de iniciado el tratamiento con un DI de P4 y BE (Burke et al., 1999; Monteiro Jr. et al., 2015).

Las concentraciones de P4 plasmáticas en hembras que reciben un DI de P4, demuestran que, en general, aumentan en las primeras horas posteriores a la inserción, para luego ir disminuyendo con el transcurso de los días (Calder et al., 1999; Rathbonea et al., 1998). Sin embargo, las concentraciones plasmáticas de P4 en vacas lecheras de alta producción alcanzan niveles subluteales (<1,0 ng/mL) luego del segundo día de tratamiento (Cerri et al., 2009a). Es así como este incremento marginal de P4 es insuficiente para lograr una alta fertilidad en vacas que inician protocolos sin un CL (Bisinotto et al., 2013). La incorporación de 2 DI durante el protocolo de sincronización en vacas sin CL permite incrementar la concentración de P4 a valores similares de diestro, influenciando la tasa de crecimiento del folículo ovulatorio y reestableciendo la concepción a valores similares que vacas en diestro (Bisinotto et al., 2013). El desarrollo de un FD en situaciones de baja concentración de P4 incrementa los pulsos de LH, el diámetro del FPO y la concentración de E2 y el tamaño del CL posterior (Abreu et al., 2018; Stevenson y Lamb, 2016), incrementando la doble ovulación y las PE (Martins et al., 2018). A su vez, la TC en vacas lecheras es mayor cuando la concentración de P4 al día de la aplicación de PGF2 $\alpha$  es superior a 1,0 ng/mL (Bello et

al., 2006; Stevenson y Lamb, 2016). Independientemente del tratamiento de sincronización utilizado, la concentración de P4 durante el desarrollo folicular es mayor en vacas que resultaron preñadas comparadas con las vacías (Monteiro Jr. et al., 2015). Vacas sincronizadas con un protocolo Cosynch de 5 días presentan una concentración de P4 plasmática de 2,66 ng/mL al retiro de los DI, mientras que en las vacas sincronizadas con P4 y BE es de 1,66 ng/mL (Pereira et al., 2013a). Con la inserción de 2 DI (CIDR 1,9 g) durante un protocolo iniciado con BE en vacas sin CL con una CC < 2,75, se obtuvieron concentraciones de P4 cercanas a los 2,2 ng/mL al momento del retiro de los DI al día 7 y se logró incrementar en un 8 % la TC (Pereira et al., 2017).

El tratamiento con GnRH al comienzo de un protocolo con DI produce la emergencia de una nueva onda folicular entre el segundo y cuarto día mientras que en aquellas tratadas con BE la emergencia folicular se observa entre el cuarto a quinto día (rango de 2 a 7 días). Esto genera una mayor dispersión, un menor periodo de dominancia folicular y un incremento en la proporción de animales con FPO chicos (<13 mm) reduciendo la tasa de sincronización y de concepción (Kim et al., 2005). La respuesta a la GnRH genera una dominancia de 3 a 6 días mientras que con el BE este período se reduce a 1 - 4 días generando un FPO de menor tamaño que puede afectar la fertilidad (Melo et al., 2016).

Animales sincronizados con Ovsynch o un Cosynch 5 días presentan mayor concentración promedio de P4 plasmática al retirar el DI que las tratadas con BE y P4 exógena al comienzo (Melo et al., 2016; Pereira et al., 2013a; Vasconcelos et al., 2011). Esto se debe a la formación de un CL accesorio en respuesta a la GnRH que incrementa alrededor de un 15 % la presencia de CL al momento del retiro del DI y a un menor porcentaje de regresión luteal durante el tratamiento en relación a los animales tratados al comienzo con BE (Melo et al., 2016). La preñez es del 36 % cuando existe un CL al inicio y al retiro del DI, mientras que es  $\leq 20$  % cuando el CL se encuentra solo a la inserción o al retiro o está ausente (Melo et al., 2016).

La aplicación combinada de GnRH con BE al comienzo del tratamiento incrementa la proporción de vacas que ovulan y la concentración de P4 plasmática al momento de la PGF2 $\alpha$  en relación a las tratadas solo con BE. Si bien este efecto es independiente de la concentración de P4 plasmática al inicio de la sincronización, es mayor en animales que al comienzo del tratamiento presentan una concentración de P4 < 3,0 ng/mL (Pereira et

al., 2015). Con esta combinación de hormonas al comienzo del protocolo, el 25 % de las hembras no reinician una nueva onda folicular y en consecuencia ovulan folículos persistentes (Melo et al., 2018). En los protocolos que combinan GnRH y BE más un DI, la intensidad de expresión de celo se incrementa en vacas con una CC  $\geq 2,75$  y en las que ovulan al finalizar el tratamiento y se relaciona de forma directa con la concepción y de manera inversa con la PE (Madureira et al., 2019). La ovulación en respuesta al CE en vacas tratadas con GnRH y BE al comienzo es elevada (~ 90 %) y es independiente de la concentración de P4 al inicio del tratamiento, mientras que en los protocolos iniciados solo con BE, la tasa de sincronización depende de la concentración de P4 al momento de su aplicación (Pereira et al., 2015).

La ovulación en respuesta a una presincronización con una GnRH aplicada 3 o 7 días antes de comenzar el protocolo con BE permite que el crecimiento folicular se produzca con concentraciones de P4 cercanas a 2,5 ng/mL durante los 7 días y tiende a reducir el día de emergencia folicular en las vacas que responden a la sincronización del BE (Monteiro Jr. et al., 2015). La similar TC reportada en el Cosynch 5 días y en el protocolo con BE, se debería al similar período de dominancia folicular logrado entre tratamientos (Pereira et al., 2013a).

La aplicación de la PGF2 $\alpha$  un día previo al retiro de los dispositivos (día 7) en protocolos de sincronización con BE y P4 por 8 días, incrementa un 12 % la preñez por un aumento en el porcentaje de animales que presentan una concentración de P4 inferior a 0,09 ng/mL al momento de la inseminación (Pereira et al., 2013b). Las vacas que no ovulan en respuesta al BE aplicado al final del protocolo, en general, presentan bajos niveles de E2 con una elevada concentración de FSH durante el tratamiento, lo que genera un folículo inmaduro de menor tamaño incapaz de responder al incremento preovulatorio de LH inducido por la inyección de BE (Cavaliere et al., 2003).



## **2. Objetivos**

### **2.1 Hipótesis general**

Diferentes tratamientos con progesterona administrada mediante un dispositivo intravaginal en combinación con GnRH mejoran la fertilidad de vacas en lactancia con baja condición corporal.

### **2.2 Hipótesis específicas**

- La presincronización con un dispositivo intravaginal con alta progesterona por 9 días incrementa la respuesta ovulatoria a la administración de GnRH, mejora el crecimiento folicular y aumenta la fertilidad en vacas con baja condición corporal sincronizadas con el protocolo Ovsynch.
- La administración de GnRH y la incorporación de un dispositivo intravaginal con mayor cantidad de progesterona al inicio de un protocolo de sincronización de la ovulación mejoran el crecimiento folicular e incrementan la fertilidad en vacas con baja condición corporal.

### **2.3 Objetivos**

- Evaluar el impacto de un tratamiento de presincronización con alta progesterona por 9 días previo al inicio de un protocolo de sincronización de la ovulación sobre el crecimiento folicular y la fertilidad en vacas con baja condición corporal
- Comparar el efecto de la administración de GnRH o benzoato de estradiol en combinación con dispositivos intravaginales de diferentes cantidades de progesterona al inicio de un protocolo de sincronización de la ovulación sobre el crecimiento folicular y la fertilidad en vacas con baja condición corporal.

# **3. Materiales y Métodos**

**3.1 Estudio 1:** *Evaluación del tratamiento con un dispositivo intravaginal de 3,0 g de progesterona antes y durante el Ovsynch sobre el crecimiento folicular y la concentración de progesterona plasmática en vacas lecheras con baja condición corporal*

### **3.1.1 Población en estudio**

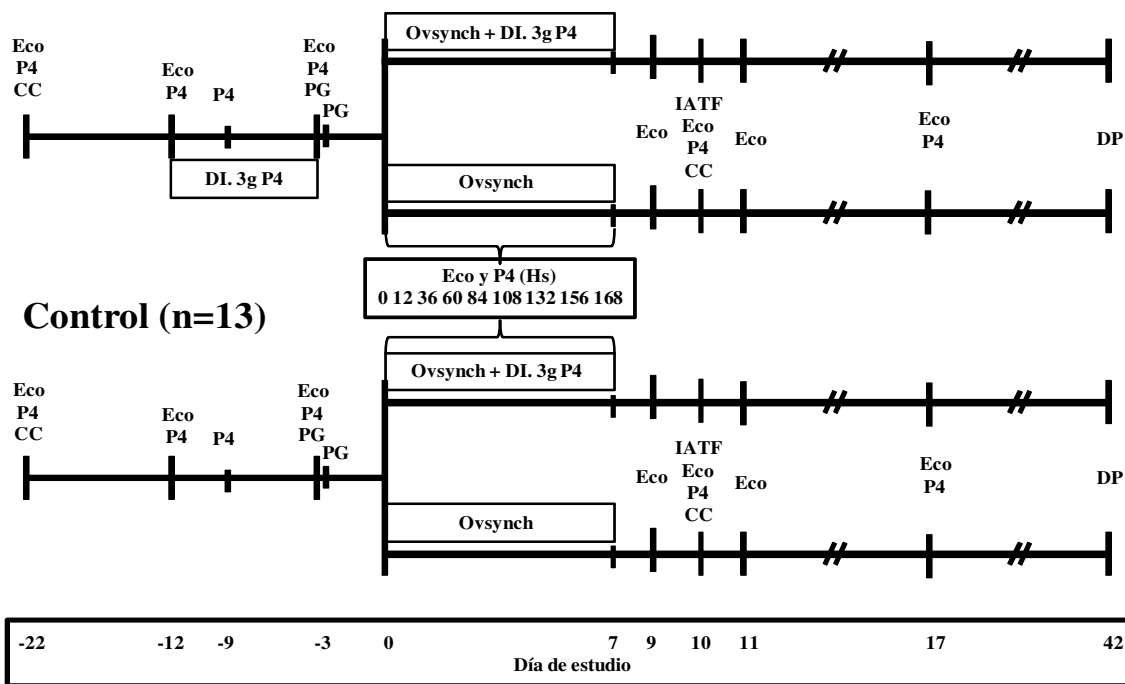
Este estudio se realizó en un tambo comercial de 1200 vacas en ordeño ubicado en González Moreno, provincia de Buenos Aires, Argentina (35°29'18,5" S; 63°15'56,3"W), desde el 8/1/14 al 13/3/14. Las vacas se alojaron en corrales secos y se ordeñaron 3 veces por día. Se alimentaron con una ración totalmente mezclada (TMR) compuesta por silo de maíz, semilla de algodón, harina de soja, AminMax (proteína bypass), alfalfa fresca picada, maíz molido, mezcla mineral y agua *ad libitum* para cubrir los requerimientos de vacas en lactancia Holstein de 650 Kg con una lactancia promedio de 9760 Kg (NRC 2001). Se registró fecha al parto, CC en la escala de 1 a 5 (Ferguson et al., 1994) al comenzar el tratamiento y al momento de la inseminación y producción láctea individual (L/día) mensual por control lechero. Todos los procedimientos se realizaron según protocolo N° 207/15 aprobado por el Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

### **3.1.2 Diseño experimental**

Se utilizaron 28 vacas primíparas Holstein de  $604,1 \pm 22,6$  Kg de peso corporal, con una CC de  $2,5 \pm 0,2$ ,  $50,9 \pm 7,3$  días en lactancia y una producción láctea de  $38,3 \pm 4,3$  Lts/día. Se asignaron al azar en un diseño experimental completamente aleatorizado con un arreglo factorial 2 x 2 bloqueado por peso corporal, días en lactancia, producción de leche y CC. A los 61 días posparto (día -12) se les insertó un DI de 3,0 g de P4 (DI experimental sobre un polímero de silicona, Elastec S.R.L, Argentina) por 9 días al Grupo Presynch Progesterona (n = 15) y el resto quedó como controles no tratados (Grupo Presynch Control, n = 13). El día -3 se retiraron los DI al Grupo Presynch Progesterona y se aplicó a todos los animales doble dosis de 25 mg de PGF2 $\alpha$  (5 mL intramuscular de Lutalyse<sup>®</sup> solución estéril, dinoprost trometamina, Pfizer Animal Argentina) a intervalo de 12 horas. El día 0 todas las vacas se trataron con 10  $\mu$ g de Acetato de Buserelina (análogo de GnRH) (2,5 mL intramuscular de Receptal<sup>®</sup>, MSD

Salud Animal, Argentina) y se asignaron al azar a dos nuevos grupos: vacas que recibieron un nuevo DI por 7 días (Grupo Ovsynch Progesterona, n = 14) o vacas no tratadas con P4 como control (Grupo Ovsynch Control, n = 14). El día 7 se retiró el DI al Grupo Ovsynch Progesterona y se aplicó, a todas las vacas, 2 dosis de 25 mg de PGF2 $\alpha$  separadas por 12 horas. Una segunda dosis de 10  $\mu$ g de GnRH se aplicó a todos los animales a las 56 horas de haber aplicado la primer PGF2 $\alpha$  y se inseminaron a tiempo fijo (IATF) a las 16 horas de la GnRH (día 10) con un mismo semen de probada fertilidad (Figura 3). Del día -22 al 10 se observó una vez por día la pintura en la base de la cola y se determinó celo por remoción total de la misma.

**Tratamiento (n=15)**



**Figura 3:** Diseño experimental estudio 1. Las vacas se asignaron aleatoriamente al día -12 a una presincronización con un dispositivo intravaginal de 3,0 g de progesterona (DI. 3g P4) o a permanecer como controles no tratados por 9 días. Al día -3 se retiraron los DI. 3g P4 y se aplicaron dos dosis de PGF2 $\alpha$ , separadas por 12 hs. Al día 0 se reasignaron a un protocolo Ovsynch (10  $\mu$ g de GnRH seguido 7 días después por dos dosis de PGF2 $\alpha$  a intervalo de 12 hs y una segunda dosis de 10  $\mu$ g de GnRH 56 hs después) u Ovsynch + DI. 3g P4 entre el día 0 y 7. A las 56 horas de retirar los DI se colocó una dosis de 10  $\mu$ g de GnRH para inseminar a tiempo fijo (IATF) 16 horas más tarde. El diagnóstico de preñez se realizó por ultrasonografía a los 32 días de la inseminación. Eco = Ecografía, P4 = Muestra de sangre para determinar concentración de progesterona, CC = Condición corporal, IATF = Inseminación artificial a tiempo fijo, DP = Diagnóstico de preñez.

**3.1.3 Muestreo de sangre para determinación de progesterona plasmática, glucosa, IGF-1 y BHB**

Se extrajeron 7-8 mL de sangre por punción de la vena o arteria coccígea media utilizando tubos Vacutainer® con K2E (EDTA) como anticoagulante para determinar la concentración plasmática de P4 al día -22, -12, -9, -3, con cada ecografía entre el día 0 y 7, a la IATF (día 10) y 7 días después de la inseminación (día 17) para confirmar la ovulación (Figura 3). Las muestras se colocaron en hielo molido inmediatamente después de su recolección, se centrifugaron a 1100 g por 20 minutos y se conservaron a -20 °C hasta que se analizaron las concentraciones plasmáticas de P4 por radioinmunoanálisis (RIA). Las determinaciones de P4 plasmática se realizaron en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de la República en Montevideo, Uruguay, utilizando una fase sólida directa RIA (Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Los Angeles, CA, EE.UU.). El RIA tuvo una sensibilidad de 0,083 ng/mL con un coeficiente de variación intransayo para los controles bajo (0,92 ng/mL), medio (2,89 ng/mL) y alto (9,9 ng/mL) de 12,1 %, 7,52 % y 5,99 %, respectivamente.

Para asegurar la homogeneidad de los grupos se evaluó el estado metabólico y fisiológico de las vacas. Se tomaron muestras de sangre entera por punción de la vena o arteria coccígea mediana para determinar los niveles de BHB al día -12 y 0 y los niveles de glucosa al día -3. Una fracción de las muestras del día -12 se centrifugó a 1100 g durante 20 minutos y el suero se almacenó a -20°C hasta que se analizaron para IGF-1. Las concentraciones de IGF-1 se determinaron en el Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay utilizando un kit comercial de radioinmunoanálisis (RIA) (IGF1-133 RIACT Cis Bio International, GIF-SUR-YETTE CEDEX, Francia; Adrien et al., 2012). La sensibilidad del ensayo fue de 0,38 ng/mL. Los coeficientes de variación (CV) intraensayo para el control bajo (35 ng/mL) y el control alto (458 ng/mL) fueron 14,12 % y 13,44 %, respectivamente. Las concentraciones de glucosa al día -3 y de BHB al día -12 y 0 en sangre total se determinaron usando un sistema portátil de medidor de glucosa/cetona (FreeStyleOptium Blood Glucose Monitoring System, Abbott Diabetes Care, Alameda, California, EE. UU.) de acuerdo con las pautas de funcionamiento del fabricante. Los reactivos de control de calidad se corrieron diariamente antes de analizar cualquier muestra (Voyvoda y Erdogan, 2010).

#### **3.1.4 Ultrasonografía de ovarios y diagnóstico de preñez**

Se realizaron ecografías transrectales del tracto genital y ovarios a la totalidad de los animales en estudio al día -22, al día -12 cuando se inició la presincronización con/sin DI de P4 y al día -3 cuando se retiraron los DI al Grupo Presynch Progesterona y se aplicó la primera dosis de PGF2 $\alpha$ . Luego se hicieron ecografías al iniciar el Ovsynch al día 0 y se repitieron cada 24 horas entre el día 0,5 y el día 7. Una nueva ecografía se realizó al día 9 cuando se aplicó la segunda GnRH, al día 10 con a la IATF, 37 horas después de esta y por último al día 17 (Figura 3). Se realizó un mapa ovárico por vaca donde se registraron el diámetro y la posición de folículos  $\geq 5$  mm y CL. Para ello se utilizó un ecógrafo portátil con un transductor de 5 MHz (HONDA, HS 101 Vet, Japan). Las vacas con un folículo  $\geq 10$  mm de diámetro al día 0 que presentaron un nuevo CL en el mismo ovario 7 días después se consideró que ovularon en respuesta a la primera GnRH. La ovulación a la segunda GnRH se definió como la desaparición de uno o más folículos  $\geq 10$  mm de diámetro dentro de las 37 horas de administrada la GnRH y confirmado por la presencia de un CL en el mismo lugar y una concentración de P4  $\geq 1,0$  ng/mL a los 7 días de la IATF. El diagnóstico de preñez se realizó por ecografía transrectal a los 32 días de gestación (Pierson y Ginther, 1984).

#### 3.1.5 Análisis estadístico

Las comparaciones basales entre grupos para peso corporal (Kg), BHB (mmol/L), glucosa (mg/dL) e IGF-1 (ng/mL) se realizaron con análisis de la varianza Proc GLM y con diferencia por pares de Pdiff y para CC con Proc Genmod (SAS System<sup>®</sup>, SAS Inst. Inc., Cary, NC, EE. UU.). El efecto del grupo de presincronización (Grupo Presynch Progesterona, n = 15 vs. Grupo Presynch Control, n = 13), el día experimental y su interacción sobre las concentraciones de P4 plasmática (ng/mL) durante la presincronización (día -12 y 0), y el tamaño del FD (mm) antes de iniciar el Ovsynch (día -12 y -3) se evaluó mediante análisis de la varianza para medidas repetidas con Proc Mixed (SAS System<sup>®</sup>). El efecto del grupo de presincronización sobre la ovulación a la primera GnRH (Si vs. No) se evaluó mediante la prueba exacta de Fisher utilizando Proc Freq (SAS System<sup>®</sup>). El efecto de los grupos de presincronización, grupos de sincronización (Grupo Ovsynch Progesterona, n = 14 vs. Grupo Ovsynch Control, n = 14), el día experimental y las interacciones sobre la concentración de P4 plasmática (ng/mL) y el tamaño del FD (mm) durante el Ovsynch se evaluó mediante análisis de la varianza con Proc Mixed para medidas repetidas (SAS System<sup>®</sup>). El efecto de los

grupos de presincronización, los grupos de sincronización y la interacción sobre la ovulación a la segunda GnRH (Si vs. No) y la preñez a los 32 días de la IATF se evaluó mediante la prueba exacta de Fisher utilizando Proc Freq (SAS System®). Los resultados de las variables con distribución continua se presentan como promedio  $\pm$  error estándar. Se consideraron diferencias significativas si  $P \leq 0,05$  y tendencia cuando  $P \leq 0,10$ .

**3.2 Estudio 2:** *Evaluación de la aplicación de GnRH o BE al inicio de un protocolo de sincronización de la ovulación con un dispositivo intravaginal de 1,9 o 3,0 g de progesterona sobre el crecimiento folicular y la concentración de progesterona plasmática en vacas lecheras con baja condición corporal*

#### **3.2.1 Población en estudio**

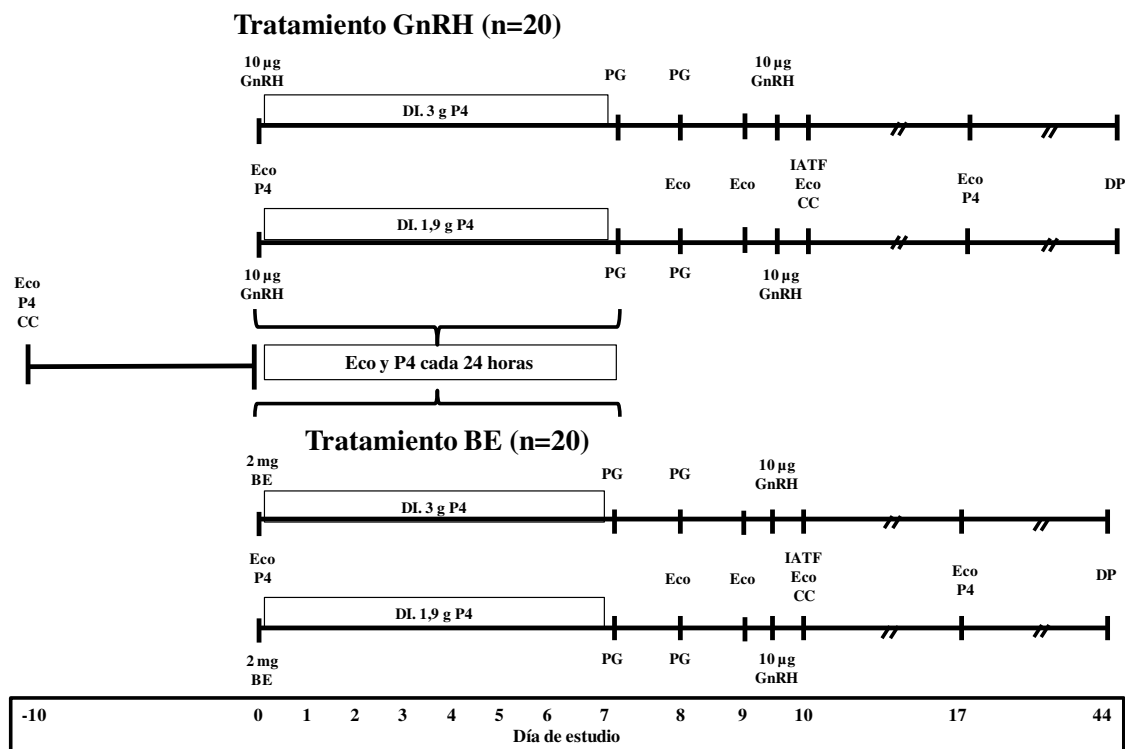
Este estudio se realizó en un tambo comercial de 1200 vacas en ordeño localizado en Gonzales Moreno, provincia de Buenos Aires (35°29'18,5" S; 63°15'56,3"W), desde el 14/10/15 al 7/12/15. Las vacas se alojaron en corrales secos y se ordeñaron 3 veces por día. Se alimentaron con una ración totalmente mezclada (TMR) compuesta por maíz molido, semilla de algodón, cáscara de soja, harina de soja, proteína comercial by pass (Aminmax, GEPSA Feeds, Argentina), alfalfa fresca, silo de maíz y suplemento vitamínico/mineral para satisfacer los requerimientos establecidos por el Sistema Neto de Carbohidratos y Proteínas de Cornell (Van Amburgh et al., 2015) para una vaca Holstein en lactancia de 648 Kg y una producción láctea promedio de 9769 Kg. Se registró fecha al parto, número de lactancias, CC en la escala de 1 a 5 (Ferguson et al., 1994) al comenzar el tratamiento y al momento de la inseminación y producción láctea individual (L/día) mensual por control lechero. Todos los procedimientos se realizaron según protocolo N° 207/15 aprobado por el Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

#### **3.2.2 Diseño experimental**

En este estudio se utilizaron 40 vacas Holstein (17 primíparas y 23 multíparas) de  $633,7 \pm 52,3$  Kg de peso corporal,  $2,1 \pm 1,2$  lactancias,  $56,0 \pm 8,9$  días posparto,  $2,4 \pm 0,3$  de CC y una producción de  $42,8 \pm 9,9$  Lts/día. Se asignaron al azar a cuatro grupos experimentales en un diseño experimental completamente aleatorizado con un arreglo



factorial 2 x 2 bloqueado por número de partos, días en lactancia, ciclicidad, CC, producción de leche y peso corporal. El día 0, la mitad de los animales (n=20) recibió una dosis de 10 µg de Acetato de Buserelina (2,5 mL intramuscular de Receptal<sup>®</sup>, MSD Salud Animal, Argentina) más la inserción de un DI de 3,0 g de P4 (Dispositivo test n = 10) o de 1,9 g (Dispositivo control n = 10) mientras que al resto (n = 20) se le aplicó 2 mg de BE (2 mL intramuscular de Benzoato de Estradiol Syntex<sup>®</sup>, Syntex S.A, Argentina) más el DI de 3,0 g (n = 10) o de 1,9 g (n = 10). El día 7 se retiraron los DI y se aplicó doble dosis de 25 mg de PGF2α (5 mL intramuscular de Lutalyse<sup>®</sup> solución estéril, dinoprost trometamina, Zoetis, Argentina) a intervalo de 24 horas. La segunda aplicación de 10 µg de Acetato de Buserelina se realizó a las 56 horas de retirado los DI y se inseminaron a tiempo fijo 16 horas después con un mismo toro de probada fertilidad (Figura 4). Del día -10 al 10 se observó 2 veces por día (AM-PM) la pintura en la base de la cola y se determinó celo por remoción total de la misma. La CC (Ferguson et al., 1994) se determinó al día -10 y a la IATF para verificar si los animales mantuvieron, mejoraron o perdieron estado durante el estudio.



**Figura 4:** Diseño experimental estudio 2. Las vacas fueron asignadas a un tratamiento con BE o con GnRH. El primero consistió en: Día 0: aplicación de 10 µg de GnRH + un DI de 3 o 1,9 g de P4, Día 7: retiro del DI + 2 dosis de PGF2α a intervalo de 24 horas. A las 56 horas de retirar los DI se colocó una dosis de 10 µg de GnRH para inseminar a tiempo fijo (IATF) 16 horas más

tarde. El segundo tratamiento solo difirió del anterior en la colocación de 2 mg de BE al día 0. Eco = Ecografía, P4 = Muestra de sangre para determinar la concentración de progesterona, CC = Condición corporal, DP = Diagnóstico de preñez.

#### **3.2.3 Muestreo de sangre para determinación de progesterona plasmática**

Se tomaron muestras de sangre por punción de la vena o arteria coccígea utilizando tubos Vacutainer® con K2E (EDTA) como anticoagulante para determinar la concentración plasmática de P4 al día -10, cada 24 horas entre el día 0 y el retiro de los DI al día 7 y por último 7 días después de la inseminación (día 17) para confirmar la ovulación. Inmediatamente después de la recolección se colocaron en hielo molido y se centrifugaron a 1100 g por 20 minutos para conservarse a -20 °C hasta que se realizó la determinación de P4. Las concentraciones plasmáticas de P4 y las ecografías del día -10 y 0 se utilizaron para caracterizar la etapa del ciclo estral de los animales al comenzar el estudio. Se consideró que las vacas reanudaron la actividad ovárica posparto si la P4 fue  $\geq 1,0$  ng/mL en al menos una muestra con un CL detectable a la ecografía, mientras que estaban en anestro si ambas muestras reportaban valores  $< 1,0$  ng/mL sin CL y con útero flácido en los dos exámenes ecográficos. Las determinaciones de P4 plasmática se realizaron por RIA en fase sólida utilizando kits de MP (MP BIOMEDICALS, INC. Solon, OH 44139 USA) en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. La concentración mínima detectable del ensayo fue de 0,06 ng/mL y 0,03 ng/mL en la primera y segunda corrida respectivamente. Los coeficientes de variación intraensayo para el control bajo (1,0 ng/mL), medio (5,0 ng/mL) y alto (10,0 ng/mL) fueron 17,64 %, 16,42 % y 14,84 % respectivamente. El coeficiente de variación interensayo para los mismos controles fueron 19,35 %, 11,36 % y 9,91 % respectivamente.

#### **3.2.4 Ultrasonografía de ovarios y diagnóstico de preñez**

Las ecografías del tracto genital se realizaron con un ecógrafo portátil con un transductor de 5 MHz (HONDA, HS 101 Vet, Japan) al día -10, 0, luego cada 24 horas hasta el día 10 y por último a los 7 días de la IATF para confirmar la ovulación. Se realizó un mapa ovárico por vaca donde se registraron el diámetro y la posición de folículos  $\geq 5$  mm y CL. En vacas que iniciaron el protocolo de sincronización con GnRH se consideró que ovularon en respuesta a la primera GnRH del tratamiento si un folículo  $\geq 10$  mm que estaba presente al momento de su aplicación fue reemplazado 7

días después con un CL en el ovario ipsilateral. El día de la aparición de una nueva onda folicular en vacas que comenzaron el tratamiento con BE se definió como el día en que el FD fue identificado retrospectivamente con un diámetro de 4 a 5 mm (Ginther et al., 1989; Knopf et al., 1989). La ovulación a la segunda GnRH se definió como la desaparición de uno o más folículos  $\geq 10$  mm dentro de las 40 horas de administrada la GnRH y confirmada 7 días después de la inseminación por la presencia de CL y niveles de P4  $\geq 1,0$  ng/mL. El diagnóstico de preñez se realizó por ecografía transrectal a los 34 días de gestación (Pierson y Ginther, 1984).

#### **3.2.5 Análisis estadístico**

Las comparaciones basales entre grupos para peso corporal (Kg), días en lactancia, producción de leche (L/día) y CC se realizaron con análisis de la varianza Proc GLM (SAS System®, SAS Inst. Inc., Cary, NC, EE.UU.). La proporción de vacas por número de partos (Primíparas/Múltiparas) y ciclicidad (Anestro vs. Ciclando) se compararon por la prueba de Chi-Cuadrado (Proc FREQ, Sistema SAS). Las variables independientes fueron la hormona colocada al inicio de la sincronización (BE vs. GnRH), el DI de P4 (1.9 vs. 3 g) y el día experimental. Las variables dependientes fueron la concentración de P4 plasmática entre el día 0 y el día 7, el tamaño del FD (mm) entre el día 3 y 10, la ovulación a la segunda GnRH (Si vs. No) y preñez a los 34 de la IATF (Si vs. No). El efecto de variables independientes incluyendo las interacciones sobre las concentraciones de P4 plasmáticas y el crecimiento folicular se evaluaron utilizando un modelo mixto ANOVA para medidas repetidas (Proc MIXED, Sistema SAS). El efecto de variables independientes con sus interacciones sobre la ovulación a la segunda GnRH y la preñez a la IATF se analizaron mediante regresión logística múltiple (Proc Logistic of SAS System) utilizando el procedimiento de eliminación desde atrás (Agresti, 1996). Los resultados de las variables con distribución continua se presentan como promedio  $\pm$  error estándar. Se consideraron diferencias significativas si  $P \leq 0,05$  y tendencia cuando  $P \leq 0,10$ .

**3.3 Estudio 3:** *Efectos de la presincronización con un dispositivo intravaginal de 1,9 g de progesterona por 9 días previo al Ovsynch más progesterona sobre la preñez en vacas lecheras con baja condición corporal*

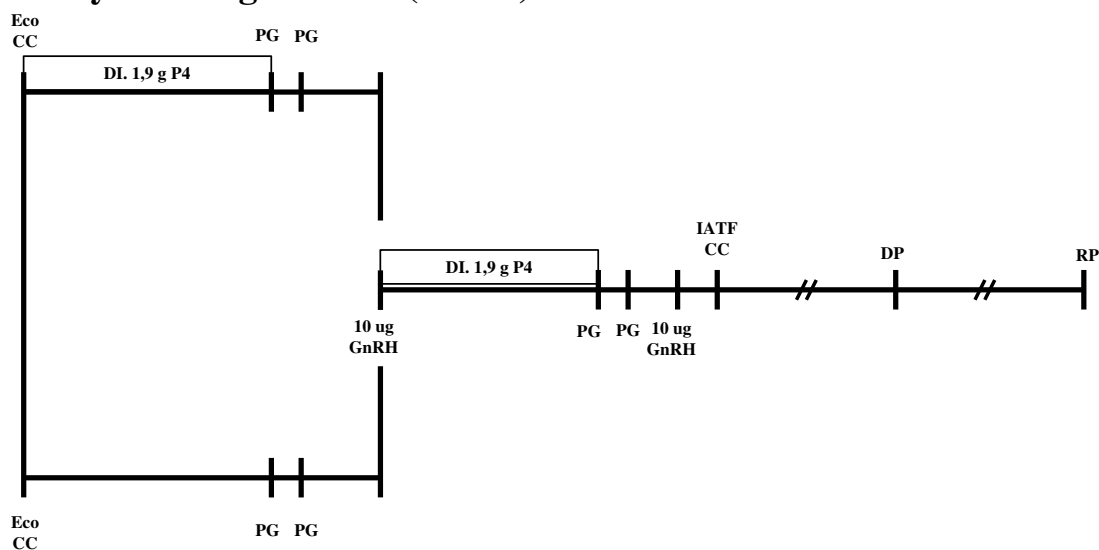
#### **3.3.1 Población en estudio**

Este estudio se realizó en un tambo comercial de 1200 vacas en lactancia con 3 ordeñes por día ubicado en el noroeste de la provincia de Buenos Aires (35°29'18,5" S; 63°15'56,3"W), desde el 27/10/17 al 23/2/18 y del 20/7/18 al 27/12/18. Los animales se alojaron en corrales secos y se les suministró, 3 veces por día, una ración totalmente mezclada (TMR) para cubrir los requerimientos de vacas en lactancia Holstein de 650 Kg y una producción de 55 litros/día al 3,5 % de grasa (NRC 2001). Se registró fecha al parto, número de lactancias, CC en la escala de 1 a 5 (Ferguson et al., 1994) al comenzar el tratamiento y al momento de la inseminación y producción láctea individual (L/día) mensual por control lechero. Todos los procedimientos se realizaron según protocolo N° 207/15 aprobado por el Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

#### **3.3.2 Diseño experimental**

Se utilizaron 299 vacas Holstein (123 Primíparas y 176 multíparas) de  $1,9 \pm 1,1$  lactancias,  $45,1 \pm 9,5$  días posparto,  $41,3 \pm 10,4$  L/día de producción y  $2,5 \pm 0,3$  de CC. Se asignaron semanalmente al azar a uno de los 2 grupos experimentales bloqueando por número de lactancias, días posparto, producción de leche, CC y presencia de CL al inicio de la presincronización. El día -12, un grupo de 148 vacas (Grupo Presynch Progesterona) recibió un tratamiento de presincronización con un DI de 1,9 g de P4 por 9 días mientras que el resto (n = 151) permaneció como controles no tratados (Grupo Presynch Control). El día -3 se retiró el DI al Grupo Presynch Progesterona y se aplicó a los animales de ambos grupos doble dosis de 25 mg de PGF2 $\alpha$  (5 mL intramuscular de Lutalyse<sup>®</sup> solución estéril, dinoprost trometamina, Pfizer Animal Argentina) con un intervalo de 24 horas. El día 0, todas las vacas (n=299) iniciaron un protocolo Ovsynch + Progesterona que consistió en la aplicación de un nuevo DI de 1,9 g de P4 y una dosis de 10  $\mu$ g de Acetato de Buserelina (2,5 mL intramuscular de Receptal<sup>®</sup>, MSD Salud Animal, Argentina). Al día 7 se retiraron los DI y se colocaron 2 dosis de 25 mg de PGF2 $\alpha$  (Lutalyse<sup>®</sup> solución estéril, dinoprost trometamina, Pfizer Animal Argentina) separadas por 24 horas. La segunda dosis de 10  $\mu$ g de Acetato de Buserelina se aplicó a las 56 horas de haber retirado los DI para inseminarlas a tiempo fijo 16 horas después. Al momento de la inseminación se determinó la presencia de celo por remoción total de la pintura en la base de la cola (Figura 5).

### Presynch Progesterona (n=148)



### Presynch Control (n=151)



**Figura 5:** Diseño experimental estudio 3. El día -12 se colocó a 148 vacas un dispositivo intravaginal de 1,9 g de P4 (DI. 1,9 g P4) por 9 días (Presynch Progesterona) mientras que el resto (n=151) quedó como control no tratadas (Presynch Control). El día -3 se retiró el DI al Grupo Presynch Progesterona y se aplicó 2 dosis de PGF $_{2\alpha}$  separadas por 24 horas. Al día 0 todos los animales comenzaron un protocolo de sincronización Ovsynch + P4 que consistió en la colocación de un nuevo DI. 1,9 g P4 + 10 µg de GnRH. Día 7: retiro del DI + 2 dosis de PGF $_{2\alpha}$  separadas por 24 horas. A las 56 horas de retirados los DI se colocó una dosis de 10 µg de GnRH para inseminar a tiempo fijo 16 horas más tarde. Eco= Ecografía, CC= Condición Corporal, IATF= Inseminación Artificial a Tiempo Fijo, DP= Diagnóstico de Preñez, RP= Reconfirmación de Preñez.

#### 3.3.3 Ultrasonografía de ovarios y diagnóstico de preñez

Se realizó ecografía transrectal del tracto genital a todos los animales en estudio al día -12 para registrar la presencia/ausencia de CL, los folículos ováricos mayores a 5 mm y las características del útero. Para ello se utilizó un ecógrafo portátil con un transductor de 5 MHz (HONDA, HS 101 Vet, Japan). El diagnóstico de preñez se realizó por ecografía transrectal a los 32 y 62 días desde la inseminación (Kastelic et al., 1990b).

#### 3.3.4 Análisis estadístico

El tamaño de la muestra para detectar una diferencia del 15 % en la TC entre grupos se estimó considerando una potencia del 80 % y un nivel de significancia del 0,05 (Campbell et al., 1995). Las comparaciones basales entre grupos para producción de leche y días en lactancia se realizaron con análisis de la varianza utilizando Pro GLM y

diferencia por pares de Pdiff y para CC, lactancias y CL al día -12 con Pro Genmod (SAS System<sup>®</sup>, SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). El efecto del grupo (Grupo Presynch Progesterona vs. Grupo Presynch Control), lactancia (Primíparas vs. Multíparas), presencia de CL al día -12 (Si vs. No) y manifestación de celo a la inseminación (Celo vs. No celo) junto a sus interacciones bidireccionales sobre la preñez a los 32 y 62 días de la IATF se evaluó usando regresión logística múltiple (Pro Genmod, SAS System<sup>®</sup>). Se consideraron diferencias significativas si  $P \leq 0,05$  y tendencia cuando  $P \leq 0,10$ .

# **4. Resultados**

**4.1 Estudio 1:** *Evaluación del tratamiento con un dispositivo intravaginal de 3,0 g de progesterona antes y durante el Ovsynch sobre el crecimiento folicular y la concentración de progesterona plasmática en vacas lecheras con baja condición corporal*

En la Tabla 1 se presenta el peso al parto, los días en lactancia, la CC y la producción de leche en vacas del Grupo Presynch Progesterona y Presynch Control. Al comienzo del estudio no se detectaron diferencias significativas en el peso al parto, días en lactancia, CC y producción de leche entre los tratamientos (Tabla 1).

**Tabla 1:** Promedio  $\pm$  EE de peso corporal, días en lactancia, CC y producción de leche en el Grupo Presynch Progesterona y Presynch Control.

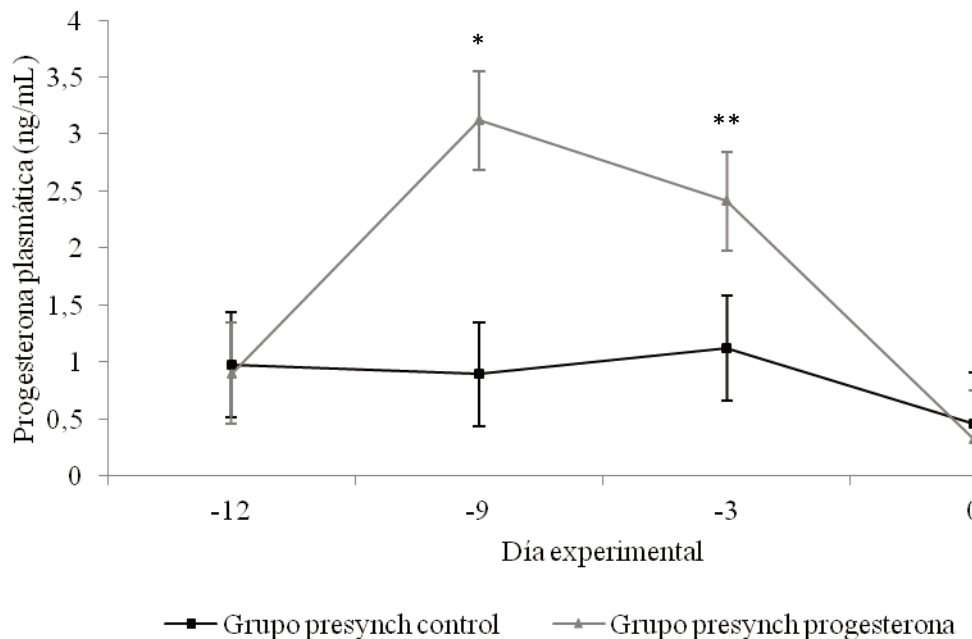
Variable	Presynch Progesterona (n = 15)	Presynch Control (n = 13)	P valor
Peso corporal (kg)	600,5 $\pm$ 20,9	603,9 $\pm$ 16,9	0,66
Días en lactancia	51,0 $\pm$ 7,8	52,2 $\pm$ 5,7	0,92
CC (1-5)	2,57 $\pm$ 0,20	2,50 $\pm$ 0,15	0,42
Producción de leche (L/día)	37,4 $\pm$ 3,9	37,7 $\pm$ 4,0	0,98

La concentración de glucosa en sangre al día -3 fue 71,20  $\pm$  1,79 mg/dL en el Grupo Presynch Progesterona y 70,00  $\pm$  1,53 mg/dL en el Grupo Presynch Control (P = 0,60). La concentración de BHB en vacas del Grupo Presynch Progesterona al día -12 y 0 fue 0,62  $\pm$  0,04 y 0,47  $\pm$  0,04 mmol/L y en vacas del Grupo Presynch Control fue de 0,50  $\pm$  0,04 y 0,47  $\pm$  0,04 mmol/L, respectivamente (Día P = 0,02; grupo presincronización P = 0,23; grupo presincronización por día P = 0,11). La concentración de IGF-I en suero al día -12 también fue similar entre grupos (P = 0,15), alcanzó 86,7  $\pm$  8,04 ng/mL en el Presynch Progesterona y 71,1  $\pm$  6,41 ng/mL en el Presynch Control. El 85,7 % de las vacas (24/28) no presentaron cuerpo luteo al día -22 y -12 y la concentración de P4 fue  $\leq$  1,0 ng/mL en ambas muestras. No obstante, en el 92,8 % de los animales (26/28) no se detectó cuerpo lúteo al día -12.

Se detectó una interacción significativa entre el grupo de presincronización y el día para la concentración de P4 plasmática entre el día -12 y 0 (P = 0,03). La concentración de P4 plasmática fue mayor para vacas del Grupo Presynch Progesterona (2,14  $\pm$  0,37 ng/mL) en relación a las vacas del Grupo Presynch Control (0,99  $\pm$  0,39 ng/mL). La



concentración de P4 plasmática en el Grupo Presynch Progesterona alcanzó un máximo de  $3,12 \pm 0,43$  ng/mL al día -9 para luego descender a  $2,46 \pm 0,43$  ng/mL previo al retiro del DI al día -3. Por el contrario, la P4 plasmática en el Grupo Presynch Control se mantuvo alrededor de 1,0 ng/mL durante los 9 días (Figure 6).



**Figura 6:** Concentración de progesterona plasmática en vacas presincronizadas con un DI de 3 g de P4 (Grupo presynch progesterona) y en vacas control no tratadas (Grupo presynch control) entre el día -12 y -3. El día -3 las vacas recibieron doble dosis de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  separadas por 12 horas y el día 0 iniciaron un protocolo Ovsynch. Efecto del grupo de presincronización ( $P = 0,04$ ), día ( $P = 0,04$ ) y grupo de presincronización por día ( $P = 0,03$ ). \* $P < 0,001$ ; \*\* $P < 0,05$ .

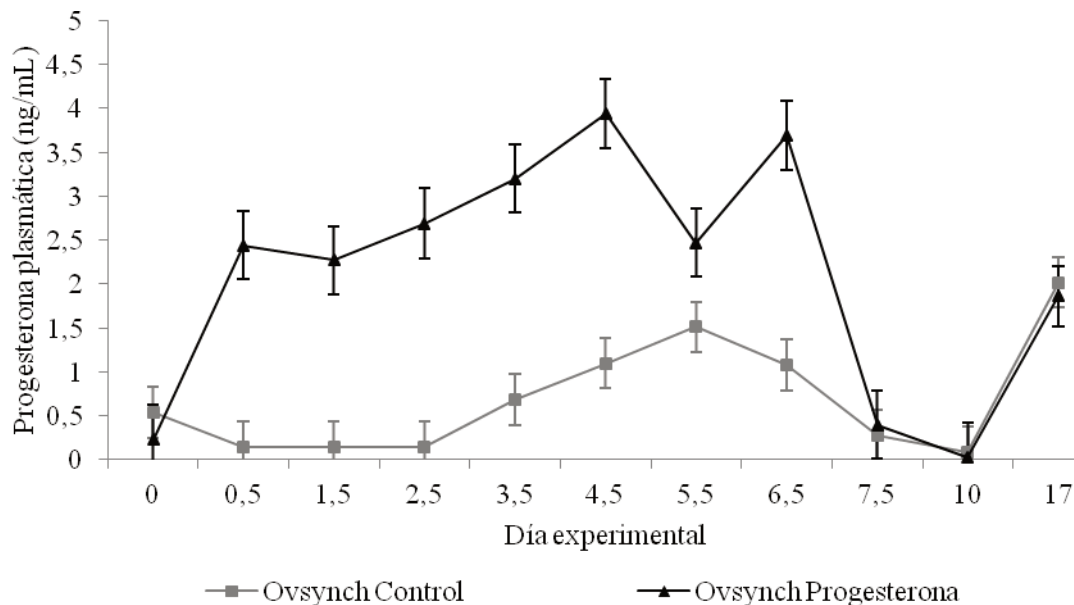
Al inicio de la presincronización al día -12, el 39,3 % de las vacas presentaron folículos entre 9 y 14 mm, el 57,1 % folículos de 15 a 24 mm y el 3,6 % restante folículos mayores a 25 mm. La CC promedio fue de 2,45 (rango 2,25 a 2,75) en las vacas con folículos de 9 a 14 mm y de 2,6 (rango 2,5 a 2,75) en aquellas con folículos entre 15 y 24 mm.

El tamaño del FD al día -12 y -3 para vacas del Grupo Presynch Progesterona fue  $14,8 \pm 1,04$  y  $14,3 \pm 1,04$  mm y para vacas del Grupo Presynch Control fue  $15,0 \pm 1,08$  y  $14,5 \pm 1,08$  mm, respectivamente (Grupo presincronización  $P = 0,87$ ; Día  $P = 0,38$ ; grupo presincronización por día  $P = 0,99$ ). En estos 9 días de tratamiento no se detectaron ovulaciones en ninguno de los grupos.

La respuesta ovulatoria a la primera GnRH del protocolo fue del 80,0 % (12/15) en vacas del Grupo Presynch Progesterona y del 69,2 % (9/13) en animales del Grupo Presynch Control ( $P = 0,67$ ).

No hubo efecto del grupo de presincronización ( $P = 0,22$ ) ni interacción con el grupo de sincronización ( $P = 0,92$ ) sobre la concentración de P4 plasmática entre el día 0 y 17.

La concentración promedio de P4 plasmática durante los 7 días de tratamiento fue mayor ( $P < 0,0001$ ) en el Grupo Ovsynch Progesterona ( $2,39 \pm 0,15$  ng/mL) respecto al Grupo Ovsynch Control ( $0,85 \pm 0,09$  ng/mL) (Figura 7).



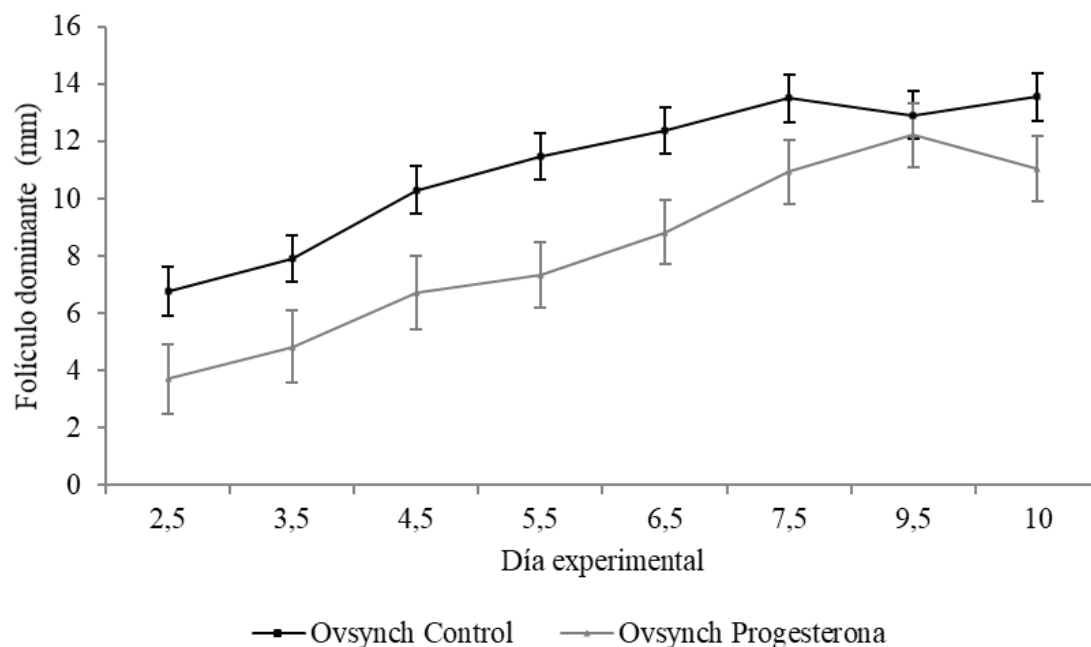
**Figura 7:** Concentración de progesterona plasmática desde día 0 hasta día 17 en vacas del grupo Ovsynch control y Ovsynch progesterona ( $P = 0,0001$ ).

En el Grupo Ovsynch Progesterona, la concentración de P4 se incrementó a 2,44 ng/mL en las 12 horas posteriores a la inserción del DI para alcanzar los 3,5 ng/mL a los cuatro días y medio y mantenerse en valores superiores a los 2,5 ng/mL durante todo el protocolo. Por el contrario, en el Grupo Ovsynch Control la concentración de P4 se mantuvo por debajo de 0,68 ng/mL los primeros 3 días y medio, aumentó a 1,1 ng/mL al día 4,5 y alcanzó una concentración máxima de 1,51 ng/mL a los 5,5 días para terminar con 1,08 ng/mL al día 6,5.

La concentración de P4 en ambos grupos estuvo por debajo de 0,4 ng/mL a las 12 horas de haber aplicado la primera PGF $2\alpha$  y continuó descendiendo hasta llegar a 0,1 ng/mL en la inseminación. Al día 17 (7 días después de la IATF), la P4 plasmática fue de 2,02 ng/mL en el Grupo Ovsynch Control y de 1,86 ng/mL en el Ovsynch Progesterona ( $P = 0,62$ ).

No se detectó efecto del grupo de presincronización ( $P = 0,83$ ) ni interacción con el grupo de sincronización ( $P = 0,14$ ) sobre el crecimiento folicular entre los días 0 y 10.

No obstante, se detectó una interacción grupo de sincronización por día ( $P = 0,02$ ) sobre el crecimiento del FPO entre el día 2,5 y la inseminación al día 10 (Figura 8). El FPO se diferenció entre tratamientos desde el día 2,5 hasta el día 7,5 y al día 10. El FPO en el Grupo Ovsynch Progesterona ( $10,92 \pm 0,40$  mm) fue de menor tamaño promedio que en el Ovsynch Control ( $11,39 \pm 0,39$  mm).



**Figura 8:** Efecto de la concentración de progesterona plasmática sobre el crecimiento del folículo dominante preovulatorio durante el protocolo Ovsynch. Grupo de sincronización ( $P = 0,42$ ), día ( $P < 0,0001$ ) y grupo de sincronización por día ( $P = 0,02$ ).

No se reportó efecto del grupo de presincronización ( $P = 0,15$ ) ni del grupo de sincronización ( $P = 0,54$ ) sobre la respuesta ovulatoria a la segunda GnRH del tratamiento. La tasa de ovulación a la segunda GnRH del Ovsynch fue del 85,7 % (12/14) en vacas del Grupo Ovsynch Control y del 92,8 % (13/14) en vacas del Grupo Ovsynch Progesterona.

Una vaca del Grupo Ovsynch Control se vendió entre la IATF y el diagnóstico de preñez. El grupo de presincronización ( $P = 0,61$ ) y de sincronización ( $P = 0,14$ ) tampoco tuvieron efecto sobre la preñez a los 32 días. La preñez a los 32 días de la inseminación fue del 23,1 % (3/13) para el Grupo Ovsynch Control y del 50,0 % (7/14) para el Ovsynch Progesterona.

**4.2 Estudio 2:** Evaluación de la aplicación de GnRH o BE al inicio de un protocolo de sincronización de la ovulación con un dispositivo intravaginal de 1,9 o 3,0 g de

*progesterona sobre el crecimiento folicular y la concentración de progesterona plasmática en vacas lecheras con baja condición corporal*

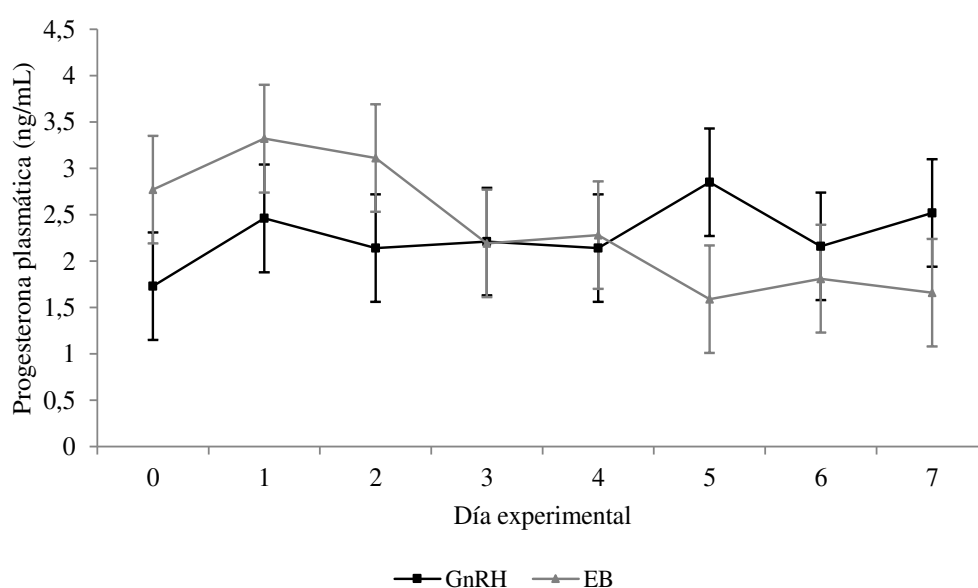
En la Tabla 2 se presenta el peso corporal, los días en lactancia, la producción de leche, la CC y la proporción de vacas primíparas y en anestro en los diferentes grupos experimentales. Al comienzo del estudio no se detectaron diferencias significativas en el peso corporal, días en lactancia, producción de leche, CC ni en el porcentaje de vacas primíparas y en anestro entre tratamientos (Tabla 2).

**Tabla 2:** Promedio  $\pm$  EE de peso corporal, días en lactancia, producción de leche, CC, y porcentaje de vacas primíparas y en anestro en los diferentes grupos experimentales.

Variable	BE+1,9 g P4 (n = 10)	BE+3 g P4 (n = 10)	GnRH+1,9 g P4 (n = 10)	GnRH+3 g P4 (n = 10)	P valor
Peso corporal (kg)	636,3 $\pm$ 51,5	617,5 $\pm$ 45,1	629,5 $\pm$ 41,8	651,4 $\pm$ 69,0	0,54
Días en lactancia	56,0 $\pm$ 8,8	57,8 $\pm$ 7,7	55,6 $\pm$ 11,0	54,5 $\pm$ 8,9	0,88
Producción de leche (L/día)	44,7 $\pm$ 11,2	41,9 $\pm$ 8,4	41,9 $\pm$ 8,5	42,7 $\pm$ 12,0	0,91
CC (1-5)	2,45 $\pm$ 0,28	2,45 $\pm$ 0,86	2,48 $\pm$ 0,22	2,40 $\pm$ 0,29	0,93
Vacas primíparas (%)	40	40	40	50	0,95
Vacas en anestro (%)	40	60	50	60	0,77

La respuesta ovulatoria a la primera GnRH del protocolo fue del 45 % (9/20) y la tasa de recambio folicular en vacas tratadas con BE fue del 70 % (14/20; P = 0,11). La nueva onda folicular en el 78,5 % de las vacas que respondieron al BE, se detectó entre los 3 y 5 días de iniciado el tratamiento. No hubo efecto del DI (P = 0,77), de la hormona aplicada al inicio del protocolo de sincronización (P = 0,92) y del día (P = 0,24) sobre la concentración de P4 plasmática entre el día 0 y 7 de tratamiento. Tampoco se detectó interacción del DI y día (P = 0,43), del DI y la hormona colocada al inicio del tratamiento (P = 0,54) ni de estas tres variables (P = 0,41) sobre los niveles de P4 plasmática del día 0 al 7. Sin embargo, se observó una interacción de la hormona aplicada al inicio de la sincronización por día (P = 0,02) sobre la concentración de P4 plasmática entre el día 0 y 7 (Figura 9). La concentración de P4 en las vacas tratadas con GnRH fue menor desde el inicio del tratamiento hasta el día 2, para luego

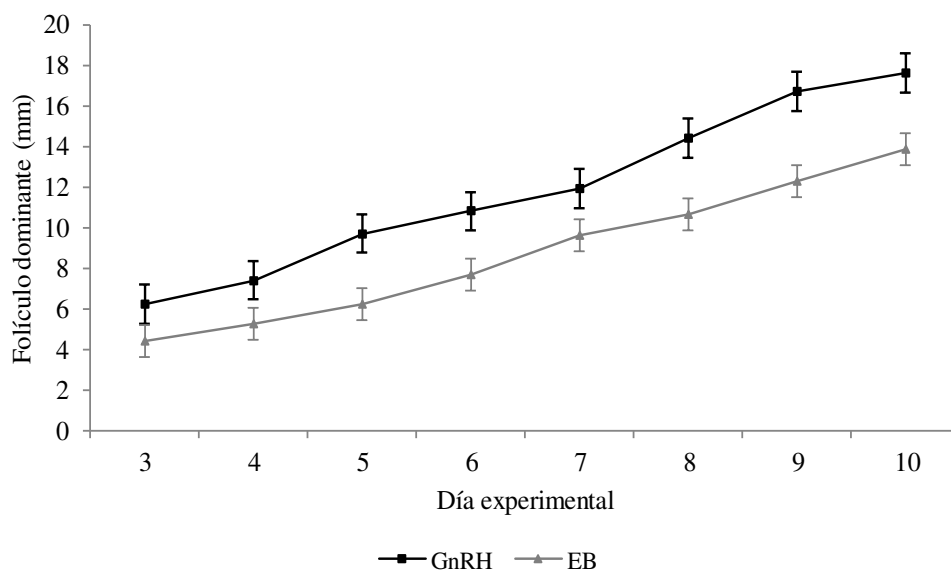
diferenciarse estadísticamente al día 5 en relación a las tratadas con BE. A partir de ese momento, las diferencias numéricas observadas a favor de las GnRH fueron similares respecto al grupo BE. La proporción de vacas con CL al día 0 fue del 40 % (8/20) en el grupo GnRH y del 45 % (9/20) en el grupo BE ( $P = 0,75$ ). Al momento de la  $PGF2\alpha$  del protocolo, el 55 % (11/20) de las tratadas con GnRH presentaron un CL mientras que solo el 20 % (4/20) de las tratadas con BE exhibieron un CL ( $P = 0,05$ ). Por lo tanto, el 55% (5/9) de las vacas tratadas con BE que iniciaron el protocolo con CL experimentaron regresión luteal entre el día 0 y 7 en comparación al 12,5 % (1/8) observado en las tratadas con GnRH al comienzo ( $P = 0,06$ ).



**Figura 9:** Concentración de progesterona plasmática entre el día 0 y 7 para vacas tratadas con GnRH o benzoato de estradiol al inicio del protocolo de sincronización. Grupo hormona por día ( $P = 0,02$ ).

No se detectó efecto del DI ( $P = 0,90$ ), interacción DI por día ( $P = 0,60$ ), hormona por día ( $P = 0,12$ ) ni interacción de estas tres variables ( $P = 0,99$ ) sobre el tamaño del FD durante los 3 a 10 días de tratamiento. No obstante, hubo un efecto del día ( $P < 0,0001$ ) y de la hormona utilizada para reiniciar la onda folicular ( $P = 0,003$ ) donde el tamaño promedio del FD durante los 7 días en vacas tratadas con GnRH fue de  $11,85 \pm 0,79$  mm y en vacas sincronizadas con BE fue de  $8,75 \pm 0,65$  mm (Figura 10). El FPO a la IATF en vacas que iniciaron el protocolo con GnRH ( $17,57 \pm 0,96$  mm) fue de mayor tamaño ( $P = 0,0001$ ) en relación a vacas tratadas con BE ( $13,86 \pm 0,79$

mm).



**Figura 10:** Tamaño del folículo dominante durante los 3 a 10 días de tratamiento en vacas lecheras que recibieron GnRH o BE al inicio del protocolo para controlar el reinicio de la onda folicular. Día ( $P < 0,0001$ ), hormona para controlar la onda folicular ( $P = 0,003$ ).

No hubo efecto del DI ( $P = 0,61$ ), de la hormona para sincronizar la onda folicular ( $P = 0,11$ ) ni de su interacción ( $P = 0,31$ ) sobre la respuesta ovulatoria a la segunda GnRH. La tasa de ovulación a la segunda GnRH fue del 90% (18/20) en vacas que recibieron GnRH al inicio y del 70% (14/20) en vacas tratadas con EB. El DI ( $P = 0,65$ ), la hormona para sincronizar la onda folicular ( $P = 0,65$ ) y su interacción ( $P = 0,31$ ) no afectaron la preñez a los 34 días de la inseminación. La concepción fue del 20% (4/20) en las vacas que iniciaron el protocolo con GnRH y en vacas tratadas con BE (4/20).

#### **4.3 Estudio 3:** *Efectos de la presincronización con un dispositivo intravaginal de 1,9 g de progesterona por 9 días previo al Ovsynch más progesterona sobre la preñez en vacas lecheras con baja condición corporal*

En la Tabla 3 se presenta los días en lactancia, la producción de leche, la CC y la proporción de vacas primíparas y sin CL al día -12 en el Grupo Presynch Control y Presynch Progesterona. Al comienzo del estudio no se detectaron diferencias significativas en los días en lactancia, producción de leche, CC ni en el porcentaje de vacas primíparas y sin CL al día -12 entre tratamientos (Tabla 3). Sin embargo, el 62,6

% (77/123) de primíparas que iniciaron la presincronización sin CL fue mayor al 50% (88/176) observado en multíparas (P = 0,03).

**Tabla 3:** Promedio  $\pm$  EE de días en lactancia, producción de leche, CC, y porcentaje de vacas primíparas y sin CL al día -12 en el grupo Presynch Control y Presynch Progesterona.

Variable	Presynch Control (n = 151)	Presynch Progesterona (n = 148)	P valor
Días en lactancia	45,1 $\pm$ 0,8	45,2 $\pm$ 0,8	0,94
Producción de leche (L/día)	41,1 $\pm$ 0,8	41,5 $\pm$ 0,9	0,75
CC (1-5)	2,46 $\pm$ 0,02	2,46 $\pm$ 0,02	0,90
Vacas primíparas (%)	42,4	39,9	0,65
Vacas sin CL día -12 (%)	50,3	39,2	0,20

En la Tabla 4 se presenta el número de vacas preñadas a los 32 días de gestación, la razón de riesgo (RR) ajustada con un 95 % de confianza para el intervalo y los valores P para el efecto del grupo de estudio, número de partos y presencia/ausencia de CL al día -12 junto a la interacción CL al día -12 por grupo de estudio.

**Tabla 4:** Número de vacas preñadas a los 32 días de gestación, RR ajustada con un 95 % de confianza para el intervalo y los valores P para el efecto del grupo de estudio, número de partos y presencia/ausencia de CL al día -12 junto a su interacción.

Variable	Preñez por AI % (n)	AOR	95 % CI	P valor
Grupo				0,18
Presynch Control	30,5 (46/151)	Referencia	Referencia	
Presynch Progesterona	33,1 (49/148)	1,84	0,75-4,50	
Categoría				0,82
Primíparas	33,3 (41/123)	Referencia	Referencia	
Multíparas	30,7 (54/176)	0,92	0,45-1,87	
CL al día - 12				0,75
No	26,1 (43/165)	Referencia	Referencia	
Si	38,8 (52/134)	1,12	0,55-2,28	
CL al día- 12 por grupo				0,04
No/Presynch Control	18,7 (14/75)	Referencia	Referencia	
No/Presynch Progesterona	32,2 (29/90)	2,07	0,99-4,29	
Si/Presynch Control	42,1 (32/76)	3,16	1,51-6,62	
Si/Presynch Progesterona	34,5 (20/58)	2,29	1,03-5,07	

La preñez a los 32 días de la IATF fue 30,5 % (46/151) en vacas del Grupo Presynch Control y 33,1% (49/148) en el Presynch Progesterona ( $P = 0,18$ ). En primíparas fue el 33,3% (41/123) y en multíparas el 30,7 % (54/176) ( $P = 0,82$ ). No se detectó interacción entre grupos y categoría sobre la preñez a la IATF ( $P = 0,65$ ). Sin embargo, la concepción a los 32 días de gestación se comportó diferente según la presencia de CL al día -12 y el tratamiento aplicado ( $P = 0,04$ ). En vacas sin CL al día -12 la preñez fue mayor en el Grupo Presynch Progesterona (32,2 %) comparada con el Presynch Control (18,7 %). En cambio, en vacas que iniciaron el tratamiento con CL, la concepción fue del 34,5 % en el Grupo Presynch Progesterona y del 42,1 % en el Grupo Presynch Control.

En la Tabla 5 se presentan los coeficientes del modelo de regresión logística sobre la preñez a los 32 días de gestación basado en manifestación de celo a la IATF y la presencia de CL al día - 12 por tratamiento de presincronización al día - 12.

**Tabla 5:** Coeficientes del modelo de regresión logística sobre la preñez a los 32 días de gestación basado en manifestación de celo a la IATF y la presencia de CL al día - 12 por tratamiento de presincronización al día - 12.

Variable	Preñez d 32		
	Coefficiente	Error estándar	P valor
CL al día - 12	2,63	0,79	0,001
Tratamiento de presincronización	- 0,33	0,56	0,56
Manifestación de celo a la IATF	- 0,78	1,05	0,45
CL al día - 12 por tratamiento de presincronización	1,96	0,97	0,04
CL al día - 12 por manifestación de celo a la IATF	2,34	0,93	0,01
Tratamiento de presincronización por manifestación de celo a la IATF	0,88	0,94	0,35
CL al día - 12 por tratamiento de presincronización por manifestación de celo a la IATF	0,86	1,20	0,47

No se detectó interacción entre la presencia de CL al día - 12, el tratamiento de presincronización y la manifestación de celo a la IATF ( $P = 0,47$ ) ni del tratamiento de presincronización por manifestación de celo a la inseminación sobre la preñez ( $P =$



0,35). Sin embargo, existió una interacción de la presencia de CL por tratamiento de presincronización al día -12 ( $P = 0,04$ ) y de la presencia de CL al día -12 por la manifestación de celo a la IATF sobre la preñez a los 32 días de gestación ( $P = 0,01$ ). Debido que la preñez a los 62 días no varió en forma significativa ( $P > 0,05$ ) respecto a la del día 32 para los tratamientos evaluados solo se informó esta última. La TC de vacas sin CL al inicio del protocolo que no manifestaron celo al momento de la inseminación fue menor en el grupo Presynch Control (4,8%) y Presynch Progesterona (20,3%) en relación al resto de los tratamientos.

# **5. Discusión**

**5.1 Estudio 1:** *Evaluación del tratamiento con un dispositivo intravaginal de 3,0 g de progesterona antes y durante el Ovsynch sobre el crecimiento folicular y la concentración de progesterona plasmática en vacas lecheras con baja condición corporal*

En vacas en lactancia con baja CC, la inserción de un DI de 3,0 g de P4 por 9 días previo al Ovsynch incrementó la concentración de P4 plasmática sin afectar el tamaño del FD. Además, este tratamiento de presincronización tampoco incrementó la respuesta ovulatoria a la primera GnRH del Ovsynch. El tratamiento con un DI de 3,0 g de P4 durante el Ovsynch incrementó la concentración de P4 y redujo el tamaño del FPO sin incrementar la respuesta ovulatoria a la segunda GnRH del protocolo. A pesar del reducido número de animales en estudio, los grupos fueron comparables y correctamente aleatorizados porque no se detectaron diferencias significativas entre ellos en el peso corporal al parto, en la CC, en los días en lactancia y en la producción de leche ni en concentración de BHB, glucosa e IGF-I.

Al inicio de la presincronización la mayoría de las vacas presentaron una concentración de P4  $\leq 1,0$  ng/mL en ausencia de CL. El 90,9 % (10/11) de las vacas con folículos de 9 a 14 mm tuvieron una CC  $\leq 2,50$ , esto es superior al 79 % reportado en vacas anovulatorias en un estudio previo (Gümen et al., 2003). Existe una correlación negativa entre la incidencia de anovulación y la CC en vacas entre los 47 y 60 días posparto (Gümen et al., 2003). La anovulación con crecimiento folicular que no alcanza el tamaño ovulatorio ocurre durante el balance energético negativo y se caracteriza por la supresión de los pulsos de LH debido a la baja producción de E2 en el posparto de vacas lecheras (Wiltbank et al., 2002). La administración de P4 en vacas lecheras durante el posparto puede contribuir a restablecer la retroalimentación positiva del E2 sobre el aumento de GnRH/LH para desencadenar la ovulación (Gümen y Wiltbank, 2002).

El uso de un DI de 3,0 g de P4 en el Grupo Presynch Progesterona incrementó la concentración promedio de P4 en 1,15 ng/mL en relación al Grupo Presynch Control durante los 9 días. Las concentraciones de P4 alcanzadas en el Grupo Presynch Progesterona fueron similares a los 2,17 ng/mL de P4 reportados en vacas Jersey tratadas con 2 DI de 1,9 g (Moraes et al., 2016), superiores a los niveles alcanzados en vacas anovulatorias que recibieron un DI de 1,38 g (Cerri et al., 2009a) e inferiores a las reportadas en vacas Holstein sin CL tratadas con 2 DI de 1,38 g (Bisinotto et al., 2015a;

Bisinotto et al., 2013). No obstante, la mayor concentración de P4 reportada por estos autores (Bisinotto et al., 2015a; Bisinotto et al., 2013) estaría asociada a la P4 endógena producida en respuesta a la ovulación de la primera GnRH del Ovsynch. La concentración de P4 aumenta linealmente al incrementar el número de DI que se insertan en vacas en diestro durante el protocolo de sincronización (Lima et al., 2009). La inserción del DI de 3,0 g de P4 durante la presincronización permitiría alcanzar concentraciones de P4 plasmática similares a las obtenidas con el uso de 2 DI.

En el Grupo Presynch Control la concentración de P4 fue inferior a 1,1 ng/mL en los 9 días. No obstante, estos niveles subluteales de P4 serían capaces de inhibir el pico de GnRH que desencadenaría el pico preovulatorio de LH (Kim et al., 2003). Durante el tratamiento no se registraron ovulaciones en los grupos Presynch Progesterona y Presynch Control. El tratamiento con un implante de P4 por 9 días incrementa el peso de los folículos, la cantidad de receptores de LH en las células de la teca y de la granulosa y la concentración de E2 en el fluido folicular (Inskoop et al., 1988).

Una concentración de P4 menor a 2,0 ng/mL resulta en un incremento de la concentración basal de LH, un mayor desarrollo del FD y mayor concentración de E2 (Cerri et al., 2011b). Se ha descrito que en las vacas con 1,3 ng/mL de P4 se incrementa la frecuencia pulsátil de LH y la concentración de E2 (Bergfeld et al., 1996). Por lo tanto, las concentraciones plasmáticas de P4 alcanzadas en el estudio se encontrarían dentro del umbral que incrementaría las concentraciones de E2 y el tamaño del FD al finalizar el presynch al día -3. No obstante, el tamaño del FD al día -12 y -3 fue similar entre grupos, coincidente con lo reportado por otros autores (Bisinotto et al., 2015a). Si el FD es mantenido por un periodo prolongado de tiempo con una inducción artificial de la fase luteal usando bajos niveles de P4, en ausencia de CL, se observa un incremento en la frecuencia de pulsos de LH sin afectar la amplitud de los mismos; concentraciones de P4 de 2,0 ng/mL producen persistencia folicular (Sirois y Fortune, 1990). Es posible que los 7 días que transcurren entre la primera GnRH y la inyección de PG2 $\alpha$  durante el Ovsynch permitan a las vacas sin CL suplementadas con P4 exógena continuar su desarrollo folicular mientras que los folículos de las vacas controles alcancen una fase estática (Bisinotto et al., 2015a).

La concentración de P4 plasmática al aplicar la primera GnRH del Ovsynch al día 0 fue inferior a 0,5 ng/mL en ambos grupos. Vacas con una concentración de P4 menor a 1,0

ng/mL presentan una mayor secreción y pico de LH luego de aplicar una dosis de GnRH (Giordano et al., 2012a).

La respuesta ovulatoria fue del 80 % en el Grupo Presynch Progesterona y del 69 % en el Presynch Control. La tasa de ovulación en vacas sin CL varía entre el 62 % y 88 % (Bisinotto et al., 2015a; Bisinotto et al., 2013; Gümen et al., 2003; Stevenson et al., 2008). Similar a nuestros resultados, la inserción de un CIDR en los últimos 7 días de un presynch iniciado a los 49 días posparto en una población con el 40 % de vacas no cíclicas tampoco aumentó la respuesta ovulatoria a la primera GnRH del Ovsynch (57,9 % y 64,1 % para las vacas tratadas y 72,3 % para controles) iniciado 13 días después (Chebel et al., 2006). La tasa de ovulación reportada a la primera GnRH en vacas no presincronizadas es del 54 % (Bello et al., 2006) y del 62 % (Galvao y Santos, 2010; Gümen et al., 2003). La respuesta ovulatoria a la primera GnRH promedia el 64 %, variando según la etapa del ciclo estral (Vasconcelos et al., 1999) y el estado de desarrollo de la onda folicular al comienzo del protocolo (Bello et al., 2006). La respuesta ovulatoria a la primera GnRH es clave para el reinicio sincrónico de una nueva onda folicular (Kim et al., 2005; Pursley et al., 1995), eliminando el riesgo de un folículo persistente a la segunda GnRH, asegurando elevados niveles de P4 a la PGF2 $\alpha$  (Moreira et al., 2000a; Vasconcelos et al., 1999), mejorando la respuesta luteolítica a la PGF2 $\alpha$  (Bello et al., 2006) e incrementando la TC (Chebel et al., 2006; Stevenson et al., 2008).

En Grupo Ovsynch Control la concentración promedio de P4 entre la primera GnRH y la PGF2 $\alpha$  fue similar a los 0,92 ng/mL reportados en vacas Holstein anovulatorias (Bisinotto et al., 2015a). El incremento en la concentración de P4 del Grupo Ovsynch Control a partir del cuarto día estaría asociado a la formación de un CL en respuesta a la primera GnRH (Bello et al., 2006; Kim et al., 2005).

En el Grupo Ovsynch Progesterona, la concentración de P4 fue similar a los valores reportados en vacas Holstein sin CL que inician un Ovsynch de 5 o 7 días con 2 CIDR de 1,38 g (Bisinotto et al., 2015a; Bisinotto et al., 2013) y en vacas Jersey en proestro tratadas con 2 CIDR (Moraes et al., 2016). Una concentración superior a 2,0 ng/mL durante el crecimiento folicular tiende a incrementar la preñez (Bisinotto et al., 2015a; Stevenson y Lamb, 2016) y a reducir la incidencia de fases luteales cortas en el próximo ciclo estral (Bisinotto et al., 2013; Silvia et al., 1991).

La concentración de P4 en ambos grupos fue inferior a 0,4 ng/mL y 0,1 ng/mL a las 12 horas de la primera PGF2 $\alpha$  y al momento de la inseminación, respectivamente. Esto es similar a lo reportado en trabajos previos (Herlihy et al., 2012a). Concentraciones de P4 menores a 0,4 ng/mL a la segunda GnRH del Ovsynch están asociadas a un incremento del 50 % en la TC (Brusveen et al., 2009). Con el tratamiento de 2 dosis de PGF2 $\alpha$  separadas por 8 a 24 horas se incrementa la proporción de vacas que experimentan regresión luteal completa con niveles de P4 menores a 0,4 ng/mL (Brusveen et al., 2009; Nascimento et al., 2014; Ribeiro et al., 2012; Santos et al., 2010; Wiltbank et al., 2015).

El menor tamaño folicular en el Grupo Ovsynch Progesterona en relación al Ovsynch Control es coincidente con el menor tamaño del FD reportado en vacas suplementadas con P4 exógena durante el Ovsynch (Bisinotto et al., 2010; Bisinotto et al., 2013; Cerri et al., 2011b; Denicol et al., 2012). Existe una correlación negativa entre el tamaño folicular y la concentración de P4 durante el protocolo de sincronización (Denicol et al., 2012). Niveles de P4 inferiores a 2,0 ng/mL incrementan la concentración basal de LH (Cerri et al., 2011b) y la producción de E2 (Bergfeld et al., 1996; Cerri et al., 2011c) generando un folículo de mayor tamaño asociado a menor fertilidad (Inskeep, 2004; Savio et al., 1993b; Vasconcelos et al., 1999).

No obstante, el tamaño folicular en el presente trabajo fue entre 3 a 7 mm inferior a los reportados al momento de aplicar la PGF2 $\alpha$  (Denicol et al., 2012), a la segunda GnRH (Cerri et al., 2011b) y a la inseminación (Bisinotto et al., 2013). El menor tamaño folicular podría estar asociado a diferencias en la CC de las vacas; en este estudio la CC es  $< 2,75$  mientras que en los mencionados anteriormente es  $\geq 2,75$ . Una baja CC a los 50 días posparto podría estar asociada a mayor movilización energética y un desbalance hormonal a nivel hipotalamo-hipofisis-ovario (Roche et al., 2009). La reducción en la secreción pulsátil de GnRH/LH por acciones a nivel del hipotálamo y la hipófisis limita el aporte de LH a los folículos, lo que implica una disminución en la producción de E2 y un menor crecimiento folicular (Dobson y Smith, 2000). Vacas con menor CC tienen menor tamaño folicular y mayor probabilidad de ser anovulatorias (Gümen et al., 2003) lo que reduce la TC en vacas sincronizadas con Ovsynch (Moreira et al., 2000b). Por cada unidad de incremento en la CC para el rango de 1,25 a 3,25 se incrementa un  $48 \pm 10$  % la ciclicidad y un  $20 \pm 10$  % el porcentaje de vacas que presentan elevada concentración de P4 a la PGF2 $\alpha$  del Ovsynch (El-Zarkouny et al., 2004).

En el presente trabajo no se detectó diferencias significativas en la tasa de ovulación a la segunda GnRH del Ovsynch porque el tamaño de la muestra fue calculado para evaluar la dinámica folicular y la concentración de P4 durante los tratamientos. Los valores obtenidos en ambos grupos variaron entre el 85,7 % y el 92,8 %, similar a lo informado en vacas que responden a la segunda GnRH del protocolo con P4 exógena (Bisinotto et al., 2015a; Cerri et al., 2011c) o endógena (Bello et al., 2006). Es posible lograr un incremento del 7 % en la ovulación a la segunda GnRH cuando las vacas son tratadas con un Ovsynch con P4 (Galvao y Santos, 2010). Para obtener una elevada respuesta ovulatoria a la segunda GnRH del protocolo, la concentración de P4 debe ser inferior a 0,2 ng/mL. Esto permite un incremento en la magnitud del pico de LH (Giordano et al., 2012a).

Luego de la inseminación, la concentración de P4 asciende de 0,8 ng/mL a 1,6 ng/mL entre el segundo y cuarto día posovulación (Endo et al., 2012). Independientemente del tratamiento de sincronización utilizado en el presente trabajo, la concentración de P4 a la semana de inseminación fue cercana a los 2,0 ng/mL, similar a lo reportado por otros autores (Bisinotto et al., 2013; Cerri et al., 2011b; Cerri et al., 2011c; Lima et al., 2009; Shaham-Albalancy et al., 2001). Existen reportes que indican que en vacas en lactancia, la concentración de P4 entre el día 8 y 14 del ciclo estral alcanza 4,6 a 5,8 ng/mL y luego se mantiene estable hasta el inicio de la luteolisis (Endo et al., 2012; Sartori et al., 2004; Savio et al., 1990b).

La preñez no difirió entre vacas del Grupo Ovsynch Control y Ovsynch Progesterona. Estos resultados deben interpretarse con precaución porque el tamaño de la muestra en este estudio no fue calculado para evaluar la respuesta de variables binomiales. Existe una asociación cuadrática entre el tamaño folicular a la segunda GnRH y la preñez a tiempo fijo (Bello et al., 2006). Las vacas anovulatorias y/o cíclicas cuyo crecimiento folicular se produce en presencia de baja concentración de P4 presentan menor fertilidad (Bisinotto et al., 2010; Denicol et al., 2012). Existen experimentos que indican que una concentración mínima de 2,0 ng/mL de P4 durante el crecimiento folicular es necesario para sostener una alta fertilidad en vacas lecheras (Stevenson y Lamb, 2016).

La presincronización por 9 días con el DI de 3,0 g de P4 permitió alcanzar una concentración de P4 plasmática superior a 2,0 ng/mL en vacas lecheras con baja CC que iniciaron el tratamiento sin CL. Sin embargo, esto no afectó el tamaño del FD ni produjo un incremento de la respuesta ovulatoria a la primera GnRH del Ovsynch. Por

otro lado, la inserción de este DI durante el Ovsynch también originó un aumento de la concentración de P4 a la PG2 $\alpha$  del protocolo y redujo el tamaño del FPO a la IATF en relación a vacas que no recibieron P4 exógena durante el tratamiento de sincronización. A partir de estos resultados y tratando de alcanzar altos niveles de P4 durante el desarrollo del FD, se diseñó el próximo estudio para evaluar el efecto de la GnRH o el BE en combinación con un DI de 1,9 o 3,0 g de P4 al inicio de un protocolo de sincronización de la ovulación sobre los niveles de P4 plasmática y el crecimiento folicular.

**5.2 Estudio 2:** *Evaluación de la aplicación de GnRH o BE al inicio de un protocolo de sincronización de la ovulación con un dispositivo intravaginal de 1,9 o 3,0 g de progesterona sobre el crecimiento folicular y la concentración de progesterona plasmática en vacas lecheras con baja condición corporal*

En vacas lecheras de alta producción con baja CC, la aplicación de GnRH al inicio del tratamiento incrementó la concentración de P4 plasmática al momento de la aplicación de la PGF2 $\alpha$  del protocolo en relación a vacas tratadas con BE, independientemente de la cantidad de P4 del DI utilizado. Esto coincide con lo reportado en vacas lecheras que iniciaron el protocolo con GnRH o con BE y un DI de 1,9 g con similares (Kim et al., 2005) o mayores días en lactancia (Melo et al., 2016; Vasconcelos et al., 2011). Algunos autores evaluaron la concentración de P4 al inicio y al día 7 cuando aplicaron la doble dosis de PGF2 $\alpha$  (Melo et al., 2016), otros al colocar la PGF2 $\alpha$  del protocolo (Vasconcelos et al., 2011), mientras que otros lo hicieron todos los días (Kim et al., 2005) como en el presente trabajo.

En vacas tratadas con BE al inicio, la concentración de P4 desciende a partir del segundo día de tratamiento, similar a lo reportado por otros autores (Kim et al., 2005), hasta alcanzar una concentración cercana a 2,0 ng/mL al retiro del DI al día 7, en coincidencia con lo informado en trabajos previos (Melo et al., 2016; Pereira et al., 2013a; Pereira et al., 2017). Esta disminución en la P4 plasmática estaría asociada a la menor liberación de P4 del DI durante la sincronización (Rathbonea et al., 1998) y a un incremento en el porcentaje de animales que experimentan regresión luteal durante el protocolo (Melo et al., 2016; Pereira et al., 2013a). La regresión luteal, en vacas tratadas con BE al inicio del protocolo, puede ocurrir durante los 7 días de tratamiento y se produciría en aquellas hembras que ingresan en diestro tardío (Monteiro Jr. et al., 2015).



La aplicación exógena de BE a partir del día 13 del ciclo estral produce una mayor secreción de  $\text{PGF2}\alpha$  uterina que promovería el inicio de la regresión luteal (Araujo et al., 2009).

La concentración de P4 en vacas sincronizadas con un Cosynch de 5 días fue mayor en relación a vacas tratadas con BE y DI por 7 días y sería atribuible a un incremento en la respuesta ovulatoria a la primera GnRH y a una menor duración de tratamiento con P4 exógena (Pereira et al., 2013a). La ovulación a la primera GnRH del protocolo Ovsynch produce CL accesorios originando un mayor aporte endógeno de P4 al momento de la  $\text{PGF2}\alpha$  (Bello et al., 2006; Kim et al., 2005; Pereira et al., 2013a), con la consecuente reducción en el porcentaje de animales que experimentan regresión luteal (Melo et al., 2016). La concentración de P4 plasmática al momento de la  $\text{PGF2}\alpha$  en las vacas tratadas con GnRH coincide con lo reportado en otros trabajos (Kim et al., 2005; Melo et al., 2016; Vasconcelos et al., 2011). La mayor proporción de animales con un CL al momento de la  $\text{PGF2}\alpha$  en vacas tratadas con GnRH se debería a la mayor respuesta ovulatoria en relación a las vacas tratadas con BE, similar a lo reportado en otros trabajos (Melo et al., 2016).

Este es el primer trabajo que evalúa la inserción de un DI con 3,0 g de P4 durante un protocolo de sincronización de la ovulación en vacas lecheras de baja CC con el objetivo de incrementar la concentración de P4 plasmática y compararlo con la cinética de un DI de 1,9 g (CIDR). El DI de 3,0 g no incrementó la concentración plasmática de P4 en relación a un CIDR de 1,9 g. No se detectó interacción entre el DI y la hormona colocada al inicio del tratamiento para controlar la onda folicular. En vacas lecheras sin CL, el tratamiento con un CIDR resultó en una concentración promedio de P4 plasmática cercana a 0,8 ng/mL durante los 7 días de tratamiento (Cerri et al., 2009a; Moraes et al., 2016). En el Ovsynch, la inserción de 2 CIDR en vacas anovulatorias sin CL (Bisinotto et al., 2015a; Bisinotto et al., 2013) o en vacas que ovularon el FD de la primera onda folicular al finalizar el tratamiento (Denicol et al., 2012), incrementó la concentración promedio de P4 plasmática durante el protocolo y la fertilidad. Por el contrario, la inserción de 2 CIDR en un protocolo que utilizó BE para reiniciar la onda folicular y CE para inducir la ovulación, también incrementó la concentración de P4 respecto al uso de un solo CIDR, pero no tuvo efecto sobre el tamaño del FPO, la tasa de sincronización y la preñez (Pereira et al., 2017). Esta diferencia en la concentración de P4 alcanzada con uno y dos CIDR en los diferentes tratamientos, afirma que la P4

aumenta linealmente al incrementar el número de DI usados durante el protocolo de sincronización (Lima et al., 2009). En consecuencia podría deducirse que, la superficie de contacto del DI con la mucosa vaginal sería la responsable del aumento en la absorción de P4 durante el tratamiento y no la cantidad de P4 contenida en el mismo.

La proporción de hembras que reiniciaron una nueva onda folicular en las vacas tratadas con BE fue del 70 %, similar a lo reportado en otros trabajos (Kim et al., 2005), pero es menor al 80 a 85 % informado en vacas con una CC > 2,75 y 130 días en lactancia (Souza et al., 2009) o presincronizadas con GnRH (Monteiro Jr. et al., 2015). Entre un 20 a 30 % de los animales no responde al BE (Melo et al., 2016; Monteiro Jr. et al., 2015) debido a una insuficiente supresión de la FSH y LH que producen el empleo combinado de P4 y BE (Bo et al., 1995; Bo et al., 1994). El tratamiento con E2 y P4 exógena produce la emergencia de una nueva onda folicular independientemente del estado de desarrollo del FD al inicio del protocolo (Bo et al., 1995). Se ha demostrado que, la aparición de una nueva onda folicular en hembras tratadas con BE, ocurre en promedio a los 4 días, pero esta emergencia folicular tiende a adelantarse un 1 día en vacas con una producción mayor a 35 L/día en relación a vacas que producen menos de 25 L/día; sin afectar el día de la desviación, el tamaño folicular a la inseminación ni el día de la ovulación (Monteiro Jr. et al., 2015; Souza et al., 2009).

El diametro del FD durante el protocolo fue mayor en vacas tratadas con GnRH en relación a vacas tratadas con BE, pero no tuvo efecto sobre la ovulación a la segunda GnRH y la TC. La emergencia de la onda folicular en vacas que ovulan a la primera GnRH ocurre en promedio a los 2 días (Pursley et al., 1995), mientras que en vacas que responden al BE sucede a los 3,5 días con un rango de 2 a 7 días (Bo et al., 1995; Bo et al., 1994; Monteiro Jr. et al., 2015; Souza et al., 2009). Esa menor dispersión en la aparición de una nueva onda folicular en respuesta a la GnRH incrementa el período de dominancia folicular y, en consecuencia, el tamaño del FPO en relación al tratamiento con BE (Kim et al., 2005; Melo et al., 2016). No obstante, otra causa del mayor tamaño folicular en estas vacas podría estar relacionada con la baja respuesta ovulatoria a la primera GnRH en las vacas no presincronizadas (Pursley et al., 1995). Esto genera folículos a la IATF con un periodo de dominancia mayor a 6 días que reducen la fertilidad y la calidad embrionaria (Cerri et al., 2009b). El mayor tamaño folicular a la IATF en el grupo GnRH en relación al grupo BE coincide con lo reportado en trabajos previos (Kim et al., 2005; Melo et al., 2016).

En el presente trabajo no se detectó diferencias significativas en la tasa de ovulación a la segunda GnRH ni en la TC entre tratamientos, porque el tamaño de la muestra se calculó para evaluar la asociación entre variables continuas. Por lo tanto, los resultados de variables binomiales deben interpretarse con precaución. La TC también fue similar entre grupos y no fue afectada por el DI ni por la hormona aplicada al comienzo del protocolo. Esta TC fue similar a la reportada en vacas que no reiniciaron una nueva onda folicular en respuesta al BE (Monteiro Jr. et al., 2015) o a la GnRH (Gümen et al., 2003) colocada al inicio del protocolo. La baja preñez en esas vacas también podría explicarse por otros factores, como la CC al inicio el tratamiento (Madureira et al., 2019; Santos et al., 2009; Souza et al., 2009), la proporción de vacas anovulatorias (Santos et al., 2009), la exposición a altas temperaturas antes (Chebel et al., 2006) o durante el protocolo y en los días posteriores a la inseminación (Pereira et al., 2013a; Vasconcelos et al., 2011), los días en lactancia y la alta producción de leche.

En vacas lecheras de alta producción con baja CC, el uso de un DI con 3,0 g de P4 en un protocolo de sincronización iniciado con GnRH o BE no modificó la concentración de P4 plasmática ni el crecimiento folicular durante el tratamiento. Sin embargo, la aplicación de GnRH al inicio del protocolo incrementó el tamaño del FPO a la inseminación en relación al tratamiento inicial con BE.

### **5.3 Estudio 3:** *Efectos de la presincronización con un dispositivo intravaginal de 1,9 g de progesterona por 9 días previo al Ovsynch más progesterona sobre la preñez en vacas lecheras con baja condición corporal*

El aumento en las concentración de P4 en respuesta al uso del DI durante la presincronización y el efecto de la GnRH con el DI sobre los niveles de P4 plasmática durante el Ovsynch y el tamaño del FPO a la IATF son resultados que se destacan de los estudios anteriores. Estos dieron lugar a evaluar el efecto de la presincronización con un DI sobre la fertilidad de vacas con baja CC tratadas, a primer servicio, con un Ovsynch más P4.

La proporción de vacas anovulatorias en este estudio fue similar al 40 % observado en vacas a los 35 días posparto (Chebel et al., 2006) y al 44 % en vacas entre los 57 y 77 días posparto (El Din Zain et al., 1995) pero mayor al 20 a 30 % reportado en vacas con 45 a 70 días en lactancia (Bisinotto et al., 2015a; Bisinotto et al., 2010; Denicol et al., 2012; Gümen et al., 2003; Stevenson et al., 2008). El tratamiento con P4 previo al

Ovsynch + DI solo incrementó la preñez en vacas sin CL al día -12, mientras que en vacas con CL no modificó la concepción. Alrededor del 50 % de las vacas sin CL que reciben un DI en los últimos 6 o 7 días de una presincronización con 2 dosis de PGF2 $\alpha$  a intervalo de 14 días reinician ciclicidad cuando el Ovsynch comienza luego de 12 o 13 días (Cerri et al., 2009a; Chebel et al., 2006). Además, la inserción de un DI antes o durante el protocolo de sincronización tiende a disminuir un 8 a 10 % la proporción de animales que presenta ciclos estrales menores a 17 días luego de la IATF (Bisinotto et al., 2013; Cerri et al., 2009a; Lima et al., 2009). La preñez tuvo una variación del 30 al 35 %, similar a lo reportado en grupos que recibieron un presynch con P4 (Bicalho et al., 2007; Cerri et al., 2009a; Chebel et al., 2006). El incremento en la concepción de vacas anovulatorias tratadas con un DI se debería a un aumento en la tasa de sincronización como consecuencia de una mayor respuesta ovulatoria a la primera GnRH y una reducción en el porcentaje de animales que ovulan antes de la inseminación (Colazo et al., 2013).

La preñez de vacas cíclicas fue mayor que en anovulatorias asociado a una mayor concentración de P4 durante el desarrollo del FD, porque vacas inducidas a ovular el FD de la primera onda folicular suplementadas con P4 exógena tuvieron similar preñez que vacas inducidas a ovular el FD de la segunda onda (Denicol et al., 2012; El-Zarkouny et al., 2004). La inclusión de un DI durante el Ovsynch en vacas en anestro aumenta la concepción del protocolo y la supervivencia embrionaria del protocolo por incrementar la concentración de P4 plasmática durante el protocolo (El-Zarkouny et al., 2004; Melendez et al., 2006). El incremento de preñez observado en vacas sin CL al inicio del tratamiento y suplementadas con P4 estaría asociado a una mayor respuesta ovulatoria a la primera GnRH en relación a vacas que inician el protocolo con CL en cualquier etapa del ciclo estral (Bisinotto et al., 2015a; Bisinotto et al., 2010; Vasconcelos et al., 1999). La mayor proporción de vacas con folículos mayores a 10 mm a la primera GnRH, la menor dispersión en la ovulación previo a la IATF, la mayor concepción en las vacas que no presentan un nuevo CL al momento de la PGF2 $\alpha$  y en las que no manifiestan celo previo a la IATF explicarían la mejora en la fertilidad observada en vacas sin CL y suplementadas con P4 exógena al inicio del tratamiento (Bisinotto et al., 2015a). El 22 % de la variación en el diámetro folicular a la IATF sería explicado por la magnitud de los efectos relativos de la tasa de desarrollo folicular, la concentración de P4 plasmática al momento de la PGF2 $\alpha$  del protocolo, la ciclicidad, los días posparto y el peso vivo

(Atkins et al., 2013). Trabajos recientes en vacas lecheras demostraron que existe menor riesgo de ovulación a la primera GnRH en vacas con concentraciones de P4 entre 3,0 y 4,5 ng/mL asociado a un menor pico de LH (Bello et al., 2006; Giordano et al., 2012a; Pulley et al., 2015; Stevenson y Pulley, 2016). La presencia de un CL disminuye la respuesta ovulatoria de la GnRH por una inhibición en pico de LH, independientemente del tamaño folicular y la concentración de E2 (Stevenson y Pulley, 2016). La ovulación a la primera GnRH del Ovsynch afecta la respuesta luteal y folicular a la PGF2 $\alpha$  y a la segunda GnRH mejorando la tasa de sincronización del protocolo (Bello et al., 2006). Además, en vacas sin CL suplementadas con P4 se describe una menor proporción de luteolisis prematura y de ciclos estrales cortos (Bisinotto et al., 2013; Cerri et al., 2009a; Chebel et al., 2006; Lima et al., 2009). La mayor concentración de P4 plasmática durante el protocolo de sincronización reduce la expresión de receptores de estradiol  $\alpha$  y de oxitocina en el endometrio a los 12 días de la inseminación y la posterior secreción prematura de PGF2 $\alpha$  (Cerri et al., 2011a; Inskeep, 2004).

La concepción de 18,7 % en el Grupo Presynch Control sin CL al día -12 es similar al 22,5 % reportado en vacas que ovulan su primer FD (Denicol et al., 2012). El crecimiento de la primera onda folicular durante el Ovsynch ocurre en concentraciones subluteales de P4 (Bisinotto et al., 2015a; Bisinotto et al., 2010; Denicol et al., 2012). Vacas con baja concentración de P4 a la primera GnRH y a la PGF2 $\alpha$  del Ovsynch presentan menor concepción comparado con vacas que inician el protocolo en diestro temprano (El-Zarkouny et al., 2004). Hembras con concentraciones de P4 subnormales (2,14 ng/mL) presentan una mayor frecuencia de pulsos y una menor amplitud de LH durante la fase luteal del ciclo estral; luego de retirar la fuente exógena de P4 presentan una mayor concentración de E2 con un anticipado inicio del pico preovulatorio de LH (Roberson et al., 1989). El incremento de la frecuencia de pulsos de LH (20 a 25 pulsos/24 h) observado en vacas con concentraciones subnormales de P4 es más característico de un patrón de secreción de LH durante la fase folicular del ciclo estral de vacas cíclicas (Roberson et al., 1989).

Independientemente de los grupos, las vacas que manifestaron celo al momento de la IATF presentaron mayor TC en relación a las que no lo hicieron, mientras que la TC se vio afectada en las hembras no detectadas en celo del grupo No CL/presynch control. Las vacas que manifiestan celo se caracterizan por presentar un mayor FPO y una mayor concentración de E2 en relación a vacas que no lo manifiestan (Perry y Perry,

2008). El tamaño del FPO no influye sobre la concentración sérica de E2 en las vacas que manifiestan celo (Perry et al., 2005). Mayor concentración de E2 sérico e incrementos en la TP fueron observados en vaquillonas y en vacas que manifiestan celo dentro de las 24 horas de la IATF en relación a hembras que no exhiben celo (Perry et al., 2005; Perry et al., 2007). Las concentraciones de E2 modifican las características de la concentración de LH durante las 6 horas posteriores a la GnRH del Ovsynch, incrementando la tasa de ovulación y de concepción (Stevenson y Pulley, 2016). Estos autores resaltan que vacas con mayor concentración de E2 presentan una mayor concentración de LH al pico luego de la administración de GnRH y mayor incidencia de ovulación. Esa mayor ovulación se produce en un intervalo de tiempo menos variable lo que optimiza el momento a la IATF (Herlihy et al., 2012a). En ovinos, tratados con un inhibidor de la aromatasas no esteroidea, se observó que una disminución en la concentración de E2, antes de inducir la ovulación, no altera la fase luteal siguiente pero sí modifica el perfil de las gonadotropinas (FSH) y retrasa la producción de P4 por varios días por parte del CL (Benoit et al., 1992). Por lo tanto, las vacas que exhibieron celo pueden haber alcanzado concentraciones de E2 necesarias para preparar adecuadamente la luteinización de las células foliculares, independientemente del tamaño folicular. El E2 y la  $PGF2\alpha$  incrementan las contracciones uterinas y el número de espermatozoides en el tracto genital de la hembra (Hawk, 1983). A las 48 horas de la  $PGF2\alpha$ , coincidente con la aplicación de GnRH, las hembras que manifiestan celo presentan además, una disminución del pH uterino en relación a las que no lo manifiestan. El pH uterino decrece durante el celo (Elrod y Butler, 1993), alcanzando su menor valor al inicio, para luego incrementar y retornar a valores basales (6,8 a 7,0) a las 12 horas de iniciado el celo (Perry y Perry, 2008). En bovinos la motilidad del esperma se ve inhibida por un inhibidor dependiente de pH que se localizaría en el fluido del epidídimo caudal. El efecto del pH no es directo sobre el esperma, pero sería mediado por un factor de quietud u actividad localizado en el epidídimo caudal (Acott y Carr, 1984). Una disminución en el pH uterino al inicio del celo puede inicialmente disminuir la motilidad espermática para luego incrementar su longevidad.

La adición de P4 exógena durante una presincronización previa al protocolo Ovsynch con P4 no mejoró la fertilidad de vacas lecheras con baja CC. Sin embargo, en vacas que no presentaron un CL 12 días previos al inicio del Ovsynch más DI, incrementó la preñez en relación a vacas sin CL no suplementadas, alcanzado similar TC a las

hembras que presentan un CL al inicio de la presincronización. Este efecto del tratamiento con P4 previo al Ovsynch sobre la fertilidad podría ser el resultado de un estímulo sobre el eje hipotálamo/hipofisiario/ovárico que influiría en la concentración de P4 plasmática y en el desarrollo e intercambio folicular durante el protocolo de sincronización.

# **6. Conclusión**



La presincronización por 9 días con un DI de 3,0 g de P4 en vacas lecheras con baja CC incrementó la concentración de P4 plasmática durante el tratamiento. Esto no afectó el tamaño del FD ni la respuesta ovulatoria a la primera GnRH del Ovsynch. Las vacas tratadas con este DI durante el Ovsynch presentaron un aumento de la concentración de P4 plasmática al aplicar la PGF2 $\alpha$  del protocolo que redujo el tamaño del folículo preovulatorio. Sin embargo, la respuesta ovulatoria a la segunda GnRH del protocolo fue similar entre tratamientos.

Por su parte, la inserción del DI de 3,0 g de P4 al inicio de un protocolo de sincronización de la ovulación con GnRH o BE, no modificó la concentración de P4 plasmática ni el tamaño del FPO en relación a la utilización de un DI de 1,9 g. No obstante, la aplicación de GnRH al comienzo del protocolo aumentó el tamaño del FPO al momento de la inseminación a tiempo fijo cuando se comparó con vacas que iniciaron el mismo tratamiento con BE.

Por último, el tratamiento con P4 previo al Ovsynch no mejoró la preñez a los 32 días de la inseminación en vacas lecheras de alta producción con baja CC. Sin embargo, esta presincronización con P4 exógena en vacas sin CL al inicio del tratamiento incrementó la preñez en relación a las vacas que no fueron suplementadas antes del Ovsynch más DI, permitiendo que alcancen una concepción similar a la obtenida en animales que comenzaron la presincronización con CL.

Por lo tanto, la presincronización con P4 no incrementó la fertilidad en vacas lecheras con baja CC. Tampoco se observaron diferencias entre el DI de 1,9 g y el de 3,0 g de P4 pero la aplicación de GnRH al inicio del protocolo de sincronización, sería más eficiente para sincronizar la onda folicular e incrementar la concentración de P4 durante el tratamiento que el BE.

La relación entre el estado metabólico y la involución uterina en vacas lecheras es compleja y requiere un adecuado manejo en el periodo de transición. Por su parte, los diferentes protocolos de sincronización de la ovulación, al finalizar el periodo de espera voluntario, arrojan resultados variables dependiendo, principalmente, del estado fisiológico de las vacas al comenzar el tratamiento. Por ello, para incrementar la fertilidad en vacas lecheras de alta producción, debemos centrarnos en mejorar la salud y la CC en el posparto y en implementar estrategias que permitan el control coordinado

del desarrollo folicular en presencia de adecuados niveles de P4 para que se produzca una ovulación sincronizada al finalizar el protocolo. La GnRH en combinación con DI de P4 sería una alternativa eficiente para mejorar la fertilidad.

# **7. Bibliografía**

- Abreu FM, Coutinho da Silva MA, Cruppe LH, Mussard ML, Bridges GA, Harstine BR, Smith GW, Geary TW, Day ML. 2018. Role of progesterone concentrations during early follicular development in beef cattle: I. Characteristics of LH secretion and oocyte quality. *Anim. Reprod. Sci.* 196, 59-68.
- Acott TS, Carr DW. 1984. Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: II. Interaction of pH and a quiescence factor. *Biol. Reprod.* 30, 926-935.
- Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH, Ginther OJ. 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 94, 177-188.
- Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Malhi P. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 69, 72-80.
- Agresti A, 1996, An introduction to categorical data analysis, 1st Edition. John Wiley & Sons, Inc, New York.
- Araujo RR, Ginther OJ, Ferreira JC, Palhao MM, Beg MA, Wiltbank MC. 2009. Role of Follicular Estradiol-17beta in Timing of Luteolysis in Heifers. *Biol. Reprod.* 81, 426–437.
- Asselin E, Fortier MA. 2000. Detection and regulation of the messenger for a putative bovine endometrial 9-keto-prostaglandin E2 reductase: effect of oxytocin and nterferon-tau. *Biol. Reprod.* 62, 125-131.
- Atkins JA, Smith MF, Mac Neil MD, Jinks EM, Abreu FM, Alexander LJ, Geary TW. 2013. Pregnancy establishment and maintenance in cattle. *J. Anim. Sci.* 91, 722-733.
- Ayres H, Ferreira RM, Cunha AP, Araújo RR, Wiltbank MC. 2013. Double-Ovsynch in high-producing dairy cows: Effects on progesterone concentrations and ovulation to GnRH treatments. *Theriogenology* 79, 159-164.
- Barletta RV, Carvalho PD, Santos VG, Melo LF, Consentini CE, Netto AS, Fricke PM. 2018. Effect of dose and timing of prostaglandin F2 $\alpha$  treatments during a Resynch protocol on luteal regression and fertility to timed artificial insemination in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 101, 1730-1736.
- Bartolome JA, Thatcher WW, Melendez P, Risco CA, Archbald LF. 2005. Strategies for the diagnosis and treatment of ovarian cysts in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227, 1409-1414.
- Baruselli PS, Sales JNS, Sala RV, Vieira LM, Sá Filho MF. 2012. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. *Anim. Reprod.* 9, 139-152.
- Battaglia DF, Krasa HB, Padmanabhan V, Viguie C, Karsch FJ. 2000. Endocrine alterations that underlie endotoxin-induced disruption of the follicular phase in ewes. *Biol. Reprod.* 62, 45-53.
- Beam SW, Butler WR. 1997. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol. Reprod.* 56, 133-142.
- Beam SW, Butler ST. 1999. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *J. Reprod. Fertil. Suppl* 54, 411-424.
- Bello NM, Steibel JP, Pursley JR. 2006. Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of Ovsynch in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89, 3413-3424.
- Benoit AM, Inskeep EK, Dail RA. 1992. Effect of a nonsteroidal aromatase inhibitor on in vitro and in vivo secretion of estradiol and on the estrous cycle in ewes. *Domest. Anim. Endocrinol.* 9, 313-327.
- Benyo DF, Pate JL. 1992. Tumor necrosis factor-alpha alters bovine luteal cell synthetic capacity and viability. *Endocrinology* 130, 854-860.
- Benzaquen ME, Risco CA, Archbald LF, Melendez P, Thatcher MJ, Thatcher WW. 2007. Rectal Temperature, calving-related factors, and the Incidence of puerperal metritis in postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 2804–2814.

- Bergfeld EGM, Kojima FN, Cupp AS, Wehrman ME, Peters KE, Mariscal V, Sanchez T, Kinder JE. 1996. Changing Dose of Progesterone Results in Sudden Changes in Frequency of Luteinizing Hormone Pulses and Secretion of 17 $\beta$ -Estradiol in Bovine Females. *Biol. Reprod.* 54, 546-553.
- Bicalho R, C, Cheong SH, Warnick LD, Guard CL. 2007. Evaluation of Progesterone Supplementation in a Prostaglandin F $_{2\alpha}$ -Based Presynchronization Protocol Before Timed Insemination. *J. Dairy Sci.* 90, 1193-1200.
- Bisinotto RS, Chebel RC, Santos JEP. 2010. Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93, 3578-3587.
- Bisinotto RS, Ribeiro ES, Lima FS, Martinez N, Greco LF, Barbosa LFSP, Bueno PP, Scagion LFS, Thatcher WW, Santos JEP. 2013. Targeted progesterone supplementation improves fertility in lactating dairy cows without a corpus luteum at the initiation of the timed artificial insemination protocol. *J. Dairy Sci.* 96, 2214-2225.
- Bisinotto RS, Castro LO, Pansani MB, Narciso CD, Martinez N, Sinedino LDP, Pinto TLC, Burgwal NSVd, Bosman HM, Surjus RS, Thatcher WW, Santos JEP. 2015a. Progesterone supplementation to lactating dairy cows without a corpus luteum at initiation of the Ovsynch protocol. *J. Dairy Sci.* 98, 2515-2528.
- Bisinotto RS, Lean IJ, Thatcher WW, Santos JEP. 2015b. Meta-analysis of progesterone supplementation during timed artificial insemination programs in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98, 2472-2487.
- Block SS, Rhoads RP, Bauman DE, Ehrhardt RA, Mc Guire MA, Crooker BA, Griinari JM, Mackle TR, Weber W-J, Van Amburgh ME, Boisclair YR. 2003. Demonstration of role for insulin in the regulation of leptin in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86, 3508-3515.
- Bo GA, Adams GP, Nasser LF, Pierson RA, Mapletoft RJ. 1993. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. *Theriogenology* 40, 225-239.
- Bo GA, Adams GP, Pierson RA, Tribulo HE, Caccia M, Mapletoft RJ. 1994. Follicular wave dynamics after estradiol-17 $\beta$  treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology* 41, 1555-1569.
- Bo GA, Adams GP, Caccia M, Martinez M, Pierson RA, Mapletoft RJ. 1995. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 39, 193-204.
- Bo GA, Bergfeld DR, Brogliatti GM, Pierson RA, Adams GP, Mapletoft RJ. 2000. Local versus systemic effects of exogenous estradiol-17 $\beta$  on ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen implants. *Anim. Reprod. Sci.* 59, 141-157.
- Bo GA, Cutaia L, Chesta P, Balla E, Picinato D, Peres L, Maraña D, Avilés M, Menchaca A, Veneranda G, Baruselli PS. 2005. Implementación de programas de inseminación artificial en rodeos de cría de Argentina. VI Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina,, 97-128.
- Bó GA, Baruselli PS, Mapletoft RJ. 2013. Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. *Anim. Reprod.* 10, 137-142.
- BonDurant RH. 1999. Inflammation in the bovine reproductive tract. *J. Dairy Sci.* 82 (Supl. 2), 101-110.
- Borchardt S, Pohl A, Carvalho PD, Fricke PM, Heuwieser W. 2018. Short communication: Effect of adding a second prostaglandin F $_{2\alpha}$  injection during the Ovsynch protocol on luteal regression and fertility in lactating dairy cows: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 101, 1-6.
- Bruno RGS, Moraes JGN, Hernández-Rivera JAH, Lager KJ, Silva PRB, Scanavez ALA, Mendonça LGD, Chebel RC, Bilby TR. 2014. Effect of an Ovsynch56 protocol initiated at different intervals after insemination with or without a presynchronizing injection of gonadotropin-releasing hormone on fertility in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97, 185-194.

- Brusveen DJ, Cunha AP, Silva CD, Cunha PM, Sterry RA, Silva EPB, Guenther JN, Wiltbank MC. 2008. Altering the time of the second gonadotropin-releasing hormone injection and artificial insemination (AI) during Ovsynch affects pregnancies per AI in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91, 1044-1052.
- Brusveen DJ, Souza AH, Wiltbank MC. 2009. Effects of additional prostaglandin F2 $\alpha$  and estradiol-17 $\beta$  during Ovsynch in lactating dairy cows *J. Dairy Sci.* 92, 1412-1422.
- Burke CR, Boland MP, Macmillan KL. 1999. Ovarian response to progesterone and oestradiol benzoate administered intravaginally during dioestrus in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 55, 23-33.
- Burke CR, Day ML, Bunt CR, Macmillan KL. 2000. Use of a small dose of estradiol benzoate during diestrus to synchronize development of the ovulatory follicle in cattle. *J. Anim. Sci.* 78, 145-151.
- Burke CR, Mussarda ML, Gassera CL, Gruma DE, Day ML. 2003. Estradiol benzoate delays new follicular wave emergence in a dose-dependent manner after ablation of the dominant ovarian follicle in cattle. *Theriogenology* 60, 647-658.
- Butler WR, Smith RD. 1989. Interrelationship between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 72, 767-783.
- Butler WR. 1998. Review: effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 81, 2533-2539.
- Butler WR. 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 449-457.
- Calder MD, Salfen BE, Bao B, Youngquist RS, Garverick HA. 1999. Administration of progesterone to cows with ovarian follicular cysts results in a reduction in mean LH and LH pulse frequency and Initiates ovulatory follicular growth. *J. Anim. Sci.* 77, 3037-3042.
- Campbell MJ, Julious SA, Altman DG. 1995. Estimating sample sizes for binary, ordered categorical, and continuous outcomes in two group comparisons. *BMJ* 311, 1145-1148.
- Canfield RW, Butler WR. 1990. Energy balance and pulsatile LH secretion in early postpartum dairy cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 7, 323-330.
- Caraviello DZ, Weigel KA, Fricke PM, Wiltbank MC, Florent MJ, Cook NB, Nordlund KV, Zwald NR, Rawson CL. 2006. Survey of management practices on reproductive performance of dairy cattle on large US commercial farms. *J. Dairy Sci.* 89, 4723-4735.
- Carvalho PD, Souza AH, Amundson MC, Hackbart KS, Fuenzalida MJ, Herlihy MM, Ayres H, Dresch AR, Vieira LM, Guenther JN, Grummer RR, Fricke PM, Shaver RD, Wiltbank MC. 2014. Relationships between fertility and postpartum changes in body condition and body weight in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97, 3666-3683.
- Cavalieri J, Hepworth G, Parker KI, Wright PJ, Macmillan KL. 2003. Effect of treatment with progesterone and oestradiol when starting treatment with an intravaginal progesterone releasing insert on ovarian follicular development and hormonal concentrations in Holstein cows. *Anim. Reprod. Sci.* 76, 177-193.
- Cavalieri J, Hepworth G, Smart VM, Ryan M, Macmillan KL. 2007. Reproductive performance of lactating dairy cows and heifers resynchronized for a second insemination with an intravaginal progesterone-releasing device for 7 or 8 d with estradiol benzoate injected at the time of device insertion and 24 h after removal. *Theriogenology* 67, 824-834.
- Cerri RLA, Santos JEP, Juchem SO, Galvao KN, Chebel RC. 2004. Timed Artificial Insemination with Estradiol Cypionate or Insemination at Estrus in High-Producing Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 87, 3704-3715.
- Cerri RLA, Rutigliano HM, Bruno RGS, Santos JEP. 2009a. Progesterone concentration, follicular development and induction of cyclicity in dairy cows receiving intravaginal progesterone inserts. *Anim. Reprod. Sci.* 110, 56-70.
- Cerri RLA, Rutigliano HM, Chebel RC, Santos JEP. 2009b. Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows. *Reproduction* 137, 813-823.

- Cerri RLA, Chebel RC, Rivera F, Narciso CD, Oliveira RA, Amstalden M, Baez-Sandoval GM, Oliveira LJ, Thatcher WW, Santos JEP. 2011a. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and uterine responses. *J. Dairy Sci.* 94, 3352-3365.
- Cerri RLA, Chebel RC, Rivera F, Narciso CD, Oliveira RA, Amstalden M, Baez-Sandoval GM, Oliveira LJ, Thatcher WW, Santos JEP. 2011b. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and uterine responses. *J. Dairy Sci.* 94, 3352-3365.
- Cerri RLA, Chebel RC, Rivera F, Narciso CD, Oliveira RA, Thatcher WW, Santos JEP. 2011c. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: I. Ovarian and embryonic responses. *J. Dairy Sci.* 94, 3342-3351.
- Colazo MG, Dourey A, Rajamahendran R, Ambrose DJ. 2013. Progesterone supplementation before timed AI increased ovulation synchrony and pregnancy per AI, and supplementation after timed AI reduced pregnancy losses in lactating dairy cows. *Theriogenology* 79, 833-841.
- Colazo MG, López Helguera I, Behrouzi A, Ambrose DJ, Mapletoft RJ. 2017. Relationship between circulating progesterone at timed-AI and fertility in dairy cows subjected to GnRH-based protocols. *Theriogenology* 94, 15-20.
- Cordoba MC, Fricke PM. 2002. Initiation of the breeding season in a grazing-based dairy by synchronization of ovulation. *J. Dairy Sci.* 85, 1752-1763.
- Correa MT, Erb H, Scarlett J. 1993. Path Analysis for Seven Postpartum Disorders of Holstein Cows. *J. Dairy Sci.* 76, 1305-1312.
- Crowe MA, Padmanabhan V, Mihm M, Beitins IZ, Roche F. 1998. Resumption of Follicular Waves in Beef Cows Is Not Associated with Periparturient Changes in Follicle-Stimulating Hormone Heterogeneity Despite Major Changes in Steroid and Luteinizing Hormone Concentrations. *Biol. Reprod.* 58, 1445-1450.
- Crowe MA, 2008. Resumption of Ovarian Cyclicity in Post-partum Beef and Dairy Cows. *Reprod. Domest. Anim.* 43 (Suppl. 5), 20-28.
- Crowe MA, Hostens M, Opsomer G. 2018. Reproductive management in dairy cows the future. *Ir. Vet. J.* 71, 1-13.
- Chabbert-Buffeta N, Skinner DC, Caraty A, Bouchard P. 2000. Neuroendocrine effects of progesterone. *Steroids* 65, 613-620.
- Chapinal N, Carson ME, LeBlanc SJ, Leslie KE, Godden S, Capel M, Santos JEP, Overton MW, Duffield TF. 2012a. The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance. *J. Dairy Sci.* 95, 1301-1309.
- Chapinal N, LeBlanc SJ, Carson ME, Leslie KE, Godden S, Capel M, Santos JEP. 2012b. Herd-level association of serum metabolites in the transition period with disease, milk production, and early lactation reproductive performance. *J. Dairy Sci.* 95, 5676-5682.
- Chebel RC, Santos JEP, Reynolds JP, Cerri RLA, Juchem SO, Overton M. 2004. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 84, 239-255.
- Chebel RC, Santos JEP, Cerri RLA, Rutigliano HM, Bruno RGS. 2006. Reproduction in Dairy Cows Following Progesterone Insert Presynchronization and Resynchronization Protocols. *J. Dairy Sci.* 89, 4205-4219.
- Chenault JR, Kratzer DD, Rzepkowski RA, M.C. G. 1990. LH and FSH response of Holstein heifers to fertirelin acetate, gonadorelin and buserelin. *Theriogenology* 34, 81-98.
- Davis AJ, Fleet IR, Hansford PA, Harrison FA, Walker FMM. 1985. Pulmonary metabolism of prostaglandin F2a in the conscious non-pregnant cow. *J. Physiol. (Lond.)* 358, 107.
- Day ML, Burke CR, Taufa VK, Day AM, Macmillan KL. 2000. The strategic use of estradiol to enhance fertility and submission rates of progestin-based estrus synchronization programs in dairy herds. *J. Anim. Sci.* 78, 523-529.
- Dellmann HD, 1994, *Histología veterinaria*, Segunda Edition. Ed. Acribia S.A.

- Denicol AC, Lopes G, Mendonça LGD, Rivera FA, Guagnini F, Perez RV, Lima JR, Bruno RGS, Santos JEP, Chebel RC. 2012. Low progesterone concentration during the development of the first follicular wave reduces pregnancy per insemination of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95, 1794-1806.
- Dirandeh E, Roodbari AR, Gholizadeh M, Deldar H, Masoumi R, Kazemifard M, Colazo MG. 2015. Administration of prostaglandin F2 $\alpha$  14 d before initiating a G6G or a G7G timed artificial insemination protocol increased circulating progesterone prior to artificial insemination and reduced pregnancy loss in multiparous Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 98, 1-8.
- Dobson H, Smith RF. 2000. What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 743-752.
- Domecq JJ, Skidmore AL, Lloyd JW, Kaneene JB. 1997. Relationship between body condition score and conception at first artificial insemination in a large dairy herd of high yielding holstein cows. *J. Dairy Sci.* 80, 113-120.
- Drillich M, Beetz O, Pfutzner A, Sabin M, Sabin HJ, Kutzer P, Nattermann H, Heuwieser W. 2001. Evaluation of a systemic antibiotic treatment of toxic puerperal metritis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84, 2010-2017.
- Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, LeBlanc SJ. 2012. Risk factors and effects of postpartum anovulation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95, 1845-1854.
- El-Zarkouny SZ, Cartmill JA, Hensley BA, Stevenson JS. 2004. Pregnancy in dairy cows after synchronized ovulation regimens with or without presynchronization and progesterone. *J. Dairy Sci.* 84, 1024-1037.
- El Din Zain A, Nakao T, Abdel Raouf M, Moriyoshi M, Kawataa K, Moritsu Y. 1995. Factors in the resumption of ovarian activity and uterine involution in postpartum dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 38, 203-214.
- Elrod CC, Butler WR. 1993. Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *J. Anim. Sci.* 71, 694-701.
- Endo N, Nagaia K, Tanakaa T, Kamomaea H. 2012. Comparison between lactating and non-lactating dairy cows on follicular growth and corpus luteum development and endocrine patterns of ovarian steroids and luteinizing hormone in the estrous cycles. *Anim. Reprod. Sci.* 134, 112-118.
- Farin CE, Imakawa K, Hansen TR, McDonnell JJ, Murphy CN, Farin PW, Roberts RM. 1990. Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. *Biol. Reprod.* 43, 210-218.
- Ferguson JD, Galligan DT, Thomsen N. 1994. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 77, 2695-2703.
- Ferguson JD. 1996. Diet, production and reproduction in dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 59, 173-184.
- Fonseca FA, Britt JH, McDaniel BT, Wilk JC, Rakes AH. 1983. Reproductive traits of holsteins and jersey. Effects of age, milk yield, and clinical abnormalities on involution of cervix and uterus, Ovulation, estrous cycles, detection of estrus, conception rate and days open. *J. Dairy Sci.* 66, 1128-1147.
- Freidman S, Gurevich M, Shemesh M. 1995. Bovine cyclic endometrium contains high-affinity LH/hCG binding sites. *Biol. Reprod.* 52, 1020-1026.
- Fricke PM, Wiltbank MC. 1999. Effect of milk production on the incidence of double ovulation in dairy cows. *Theriogenology* 52, 1333-1343.
- Fricke PM, Carvalho PD, Lucy MC, Curran F, Herlihy MM, Waters SS, Larkin JA, Crowe MA, Butler ST. 2016. Effect of manipulating progesterone before timed artificial insemination on reproductive and endocrine parameters in seasonal-calving, pasture-based Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 99, 6780-6792.
- Galvao KN, Santos JEP. 2010. Factors affecting synchronization and conception rate after the ovsynch protocol in lactating holstein cows. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 439-446.



- Garverick HA, Zollers WG, Smith MF. 1992. Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. *Anim. Reprod. Sci.* 28, 111-124.
- Gautam G, Nakao T, Koike K, Long ST, Yusuf M, Ranasinghe RM, Hayashi A. 2010. Spontaneous recovery or persistence of postpartum endometritis and risk factors for its persistence in Holstein cows. *Theriogenology* 73, 168-179.
- Ginther OJ, L. Kastelic, Knopf L. 1989. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine oestrus cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 20, 187-200.
- Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 55, 1187-1194.
- Giordano JO, Fricke PM, Guenther JN, Lopes Jr. G, Herlihy MM, Nascimento AB, Wiltbank MC. 2012a. Effect of progesterone on magnitude of the luteinizing hormone surge induced by two different doses of gonadotropin-releasing hormone in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95, 3781-3793.
- Giordano JO, Wiltbank MC, Guenther JN, Pawlisch R, Bas S, Cunha AP, Fricke PM. 2012b. Increased fertility in lactating dairy cows resynchronized with Double-Ovsynch compared with Ovsynch initiated 32 d after timed artificial insemination. *J. Dairy Sci.* 95, 639-653.
- Giordano JO, Wiltbank MC, Fricke PM, Bas S, Pawlisch R, Guenther JN, Nascimento AB. 2013. Effect of increasing GnRH and PGF2a dose during Double-Ovsynch on ovulatory response, luteal regression, and fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology* 80, 773-783.
- Gomes WR, Estergreen VL, Frost OL, Erb RE. 1963. Progestin levels in jugular and ovarian venous blood, corpora lutea and ovaries of the non pregnant bovine. *J. Dairy Sci.* 46, 553-558.
- Grazzini E, Guillon G, Mouillac B, Zingg HH. 1998. Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. *Nature* 392, 509-512.
- Grohn YT, Erb HN, McCulloch CE, Saloniemi HS. 1990. Epidemiology of reproductive disorders in dairy cattle: associations among host characteristics, disease and production. *Prev. Vet. Med.* 8, 25-39.
- Grohn YT, Eicker SW, Hertl JA. 1995. The association between previous 305-day milk yield and disease in New York State dairy cows. *J. Dairy Sci.* 78, 1693-1702.
- Grohn YT, Rajala-Schultz PJ. 2000. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 605-614.
- Grummer RR. 1995. Impact of changes in organic nutrient metabolic on feeding the transition dairy cow. *J. Anim. Sci.* 73, 2820-2833.
- Gümen A, Wiltbank MC. 2002. An alteration in the hypothalamic action of estradiol due to lack of progesterone exposure can cause follicular cysts in cattle. *Biol. Reprod.* 66 1689-1695.
- Gümen A, Guenther JN, Wiltbank MC. 2003. Follicular size and response to Ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovular lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86, 3184-3194.
- Hawk HW. 1983. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. *J. Dairy Sci.* 66, 2645-2660.
- Herlihy MM, Crowe MA, Diskin MG, Butler ST. 2012a. Effects of synchronization treatments on ovarian follicular dynamics, corpus luteum growth, and circulating steroid hormone concentrations in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95, 743-754.
- Herlihy MM, Giordano JO, Souza AH, Ayres H, Ferreira RM, Keskin A, Nascimento AB, Guenther JN, Gaska JM, Kacuba SJ, Crowe MA, Butler ST, Wiltbank MC. 2012b. Presynchronization with Double-Ovsynch improves fertility at first postpartum artificial insemination in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95, 7003-7014.
- Hixon J, Hansel W. 1974. Preferential transfer of prostaglandin F2a to the ipsilateral ovarian artery following intrauterine administration in cattle. *Biol. Reprod.* 11, 543-552.

- Hunter RHF, Wilmut I. 1983. The rate of functional sperm transport into the oviducts of mated cow. *Anim. Reprod. Sci.* 5, 167-173.
- Ing NH, Tornesi MB. 1997. Estradiol up regulate estrogen receptor and progesterone receptor gene expression in specific ovine uterine cells. *Biol. Reprod.* 56, 1205-1215.
- Ingvartsen KL, Boisclair YR. 2001. Leptin and the regulation of food intake, energy homeostasis and immunity with special focus on periparturient ruminants. *Domest. Anim. Endocrinol.* 21, 215-250.
- Inskeep EK, Braden TD, Lewis PE, Garcia-Winder M, Niswender GD. 1988. Receptors for luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in largest follicles of postpartum beef cows. *Biol. Reprod.* 38, 587-591.
- Inskeep EK. 2004. Preovulatory, postovulatory and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cows. *J. Anim. Sci.* 82, E-Suppl E24-E39.
- Ishii Y, Sakamoto K. 2001. Suppression of protein kinase C signaling by the novel isoform for bovine PGF(2alpha) receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 1-8.
- Jaiswal RS, Singh J, Marshall L, Adams. GD. 2009. Repeatability of 2-wave and 3-wave patterns of ovarian follicular development during the bovine estrous cycle. *Theriogenology* 72, 81-90.
- Jenner LJ, Parkinson TJ, Lamming GE. 1991. Uterine oxytocin receptor in cyclic and pregnant cows. *J. Reprod. Fertil.* 91, 49-58.
- Kaneda Y, Domeki I, Kamone H, Nakahara A. 1981. Synchronization of estrus with prostaglandin F2 in cattle. *Jpn. Agric. Res. Q.* 15, 137-143.
- Kastelic JP, Knopf L, Ginther J. 1990a. Effect of day of prostaglandin F2a treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 23, 169.
- Kastelic JP, Pierson RA, Ginther OJ. 1990b. Ultrasonic morphology of corpora lutea and central luteal cavities during the estrous cycle and early pregnancy in heifers. *Theriogenology* 34, 487-498.
- Kawashima C, Fukihara S, Maeda M, Kaneko E, Amaya Montoya C, Matsui M, Shimizu T, Matsunaga N, Kida K, Miyake Y, Schams D, Miyamoto A. 2007. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. *Reproduction* 133, 155-163.
- Kawashima C, Matsui M, Shimizu T, Kida K, Miyamoto T. 2012. Nutricional factors that regulate ovulation of the dominant follicle during the first follicular wave postpartum in high producing dairy cows. *J. Reprod. Fertil.* 58, 10-16.
- Kawate N, Itamib T, Choushib T, Saitohc T, Wadac T, Matsuokac K, Uenakad K, Tanakad N, Yamanakaa A, Sakasea M, Tamadaa H, Inabae T, Sawada T. 2004. Improved conception in timed-artificial insemination using a progesterone-releasing intravaginal device and Ovsynch protocol in postpartum suckled Japanese Black beef cows. *Theriogenology*, 399-406.
- Kim S, Tanaka T, Kamomae H. 2003. Different effects of subnormal levels of progesterone on the pulsatile and surge mode secretion of luteinizing hormone in ovariectomized goats. *Biol. Reprod.* 69, 141-145.
- Kim UH, Suh GH, Nam HW, Kang HG, Kim IH. 2005. Follicular wave emergence, luteal function and synchrony of ovulation following GnRH or estradiol benzoate in a CIDR-treated, lactating Holstein cows. *Theriogenology* 63, 260-268.
- Kimmins S, MacLaren LA. 2001. Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta* 22, 742-748.
- Kindahl H, Lindell JO, Edqvist LE. 1981. Release of prostaglandin F2 during the oestrous cycle. *Acta Vet. Scand.* 77, 143-158.
- Knopf L, Kastelic JP, Schallenberger E, Ginther OJ. 1989. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of twowave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Domest. Anim. Endocrinol.* 6, 111-119.

- Kulick LJ, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ. 1999. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology* 52, 913-921.
- Kulick LJ, Bergflet DR, Kot K, Ginther OJ. 2001. Follicular selection in cattle: Follicle deviation and codominance within sequential waves. *Biol. Reprod.* 65, 839-846.
- Lauderdale JW, Seguin BE, Stellflug JN, Chenault JR, Thatcher WW, Vincent CK, Loyancano AF. 1974. Fertility of cattle following PGF<sub>2</sub> $\alpha$  injection. *J. Anim. Sci.* 38, 964-967.
- LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, Johnson WH. 2002a. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its Impact on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85, 2223-2236.
- LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, Johnson WH. 2002b. The effect of treatment of clinical endometritis on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85, 2237-2249.
- Lima JR, Rivera FA, Narciso CD, Oliveira R, Chebel RC, Santos JEP. 2009. Effect of increasing amounts of supplemental progesterone in a timed artificial insemination protocol on fertility of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92, 5436-5446.
- Lopez H, Satter LD, Wiltbank MC. 2004. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 81, 209-223.
- Lopez H, Caraviello DZ, Satter LD, Fricke PM, Wiltbank MC. 2005a. Relationship between level of milk production and multiple ovulations in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88, 2783-2793.
- Lopez H, Sartori R, Wiltbank MC. 2005b. Reproductive hormones and follicular growth during development of one or multiple dominant follicles in cattle. *Biol. Reprod.* 72, 788-795.
- Lucy MC, Savio JD, Badinga L, De La Sota RL, Thatchers WW. 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J. Anim. Sci.* 70, 3615-3626.
- Lucy MC. 2001. Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where Will It End? *J. Dairy Sci.* 84, 1277-1293.
- Lucy MC, Jiang H, Kobayashi Y. 2001. Changes in the somatotrophic axis associated with the initiation of lactation. *J. Dairy Sci.* 84, 113-119.
- Macmillan KL, Thatcher WW. 1991. Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol. Reprod.* 45, 883-889.
- Madureira AML, Polsky LB, Burnett TA, Silper BF, Soriano S, Sica AF, Pohler KG, Vasconcelos JLM, Cerri RLA. 2019. Intensity of estrus following an estradiol-progesterone-based ovulation synchronization protocol influences fertility outcomes. *J. Dairy Sci.* 102, 1-11.
- Mann GE, Lamming GE. 1995. Progesterone inhibition of the development of the luteolytic signal in cows. *J. Reprod. Fertil.* 104, 1-5.
- Mann GE, Lamming GE, Payne JH. 1998. Role of early luteal phase progesterone in control of the timing of the luteolytic signal in cows. *J. Reprod. Fertil.* 113, 47-51.
- Marcantonio S. 2018. Análisis FODA de la IATF en los rodeos de cría. In TAURUS - AÑO 18 N° 69.
- Markusfeld O. 1987. Periparturient traits in seven high dairy herds. Incidence rates, association with parity, and interrelationships among traits. *J. Dairy Sci.* 70, 158-166.
- Martinez N, Risco CA, Lima FS, Bisinotto RS, Greco LF, Ribeiro ES, Maunsell F, Galvão K, Santos JEP. 2012. Evaluation of periparturient calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. *J. Dairy Sci.* 95, 7158-7172.
- Martins JP, Policelli RK, Neuder LM, Raphael W, Pursley JR. 2011. Effects of cloprostenol sodium at final prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  of Ovsynch on complete luteolysis and pregnancy per artificial insemination in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94, 2815-2824.
- Martins JPN, Wang D, Mu N, Rossi GF, Martini AP, Martins VR, Pursley JR. 2018. Level of circulating concentrations of progesterone during ovulatory follicle development affects timing of pregnancy loss in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101, 1-21.

- McCracken JA, Schramm W, Barcikowski B, Jr WL. 1981. The identification of prostaglandin F2 alpha as a uterine luteolytic hormone and the hormonal control of its synthesis. *Acta Vet. Scand Suppl.* 77, 71-88.
- McCracken JA, Custer EE, Eldering JA, Robinson AG. 1996. The central oxytocin pulse generator: a pacemaker for the ovarian cycle. *Acta Neurobiol. Exp* 56, 819-832.
- McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC. 1999. Luteolysis: A Neuroendocrine-Mediated Event. *Physiol. Rev.* 79, 263-323.
- McDougall S, Williamson NB, Macmillan KL. 1995. GnRH induces ovulation of a dominant follicle in primiparous dairy cows undergoing anovulatory follicle turnover. *Anim. Reprod. Sci.* 39, 205-214.
- Melendez P, Gonzalez G, Aguilar E, Loera O, Risco C, Archbald LF. 2006. Comparison of two estrus-synchronization protocols and timed artificial insemination in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89, 4567-4572.
- Melo LF, Monteiro Jr. PLJ, Surjus RS, Drum JN, Wiltbank MC, Sartori R. 2016. Progesterone-based fixed-time artificial insemination protocols for dairy cows: Gonadotropin-releasing hormone versus estradiol benzoate at initiation and estradiol cypionate versus estradiol benzoate at the end. *J. Dairy Sci.* 99, 9227-9237.
- Melo LF, Monteiro Jr. PLJ, Nascimento AB, Drum JN, Spies C, Prata AB, Wiltbank MC, Sartori R. 2018. Follicular dynamics, circulating progesterone, and fertility in Holstein cows synchronized with reused intravaginal progesterone implants that were sanitized by autoclave or chemical disinfection. *J. Dairy Sci.* 101, 1-14.
- Middleton EL, Minela T, Pursley JR. 2019. The high-fertility cycle: How timely pregnancies in one lactation may lead to less body condition loss, fewer health issues, greater fertility, and reduced early pregnancy losses in the next lactation. *J. Dairy Sci.* 102, 1-11.
- Monteiro Jr. PLJ, Borsato M, Silva FLM, Prata AB, Wiltbank MC, Sartori R. 2015. Increasing estradiol benzoate, pretreatment with gonadotropin-releasing hormone, and impediments for successful estradiol-based fixed-time artificial insemination protocols in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 98, 3826-3839.
- Moraes JGN, Silva PRB, Bortoletto N, Scanavez ALA, Chebel RC. 2016. Short communication: Plasma progesterone concentration and ovarian dynamics of lactating Jersey cows treated with 1 or 2 intravaginal progesterone inserts. *J. Dairy Sci.* 99, 2353-2357.
- Moreira F, Orlandi C, Risco CA, Mattos R, Lopes F, Thatcher WW. 2001. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84, 1646-1659.
- Moreira F, De la Sota RL, Diaz T, Thatcher WW. 2000a. Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. *J. Anim. Sci.* 78, 1568-1576.
- Moreira F, Risco C, Pires MFA, Ambrose JD, Drost M, DeLorenzo M, Thatcher WW. 2000b. Effect of body condition score on reproductive efficiency of lactating dairy cows receiving a timed insemination. *Theriogenology* 53, 1305-1319.
- Murphy MG, Boland MP, Roche JF. 1990. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. *J. Reprod. Fertil.* 90, 523-533.
- Nascimento AB, Souza AH, Keskin A, Sartori R, Wiltbank MC. 2014. Lack of complete regression of the Day 5 corpus luteum after one or two doses of PGF2 $\alpha$  in nonlactating Holstein cows. *Theriogenology* 81, 389-395.
- Nawito M, Schallenberger E, Schams D. 1977. Release of lutropin (LH) and follitropin (FSH) in cattle after administration of a new gonadoliberin (GnRH) analog in comparison with the gonadoliberin decapeptide. *Theriogenology* 7, 277-291.
- Olson JD, Ball L, Mortimer RG, Farin PW, Adney WS, Huffman EM. 1984. Aspects of bacteriology and endocrinology of cows with pyometra and retained foetal membranes. *Am. J. Vet. Res.* 45, 2251-2255.

- Opsomer G, Grohn YT, Hertl J, Coryn M, Deluyker H, Kruif Ad. 2000. Risk factors for postpartum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: Afield study. *Theriogenology* 53, 841-857.
- Ospina PA, Nydam DV, Stokol T, Overton TR. 2010a. Association between the proportion of sampled transition cows with increased nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate and disease incidence, pregnancy rate, and milk production at the herd level. *J. Dairy Sci.* 93, 3595-3301.
- Ospina PA, Nydam DV, Stokol T, Overton TR. 2010b. Associations of elevated nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. *J. Dairy Sci.* 93, 1596-1603.
- Ospina PA, Nydam DV, Stokol T, Overton TR. 2010c. Evaluation of nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *J. Dairy Sci.* 93, 546-554.
- Pereira MHC, Rodrigues ADP, Martins T, Oliveira WVC, Silveira PSA, Wiltbank MC. 2013a. Timed artificial insemination programs during the summer in lactating dairy cows: Comparison of the 5-d Cosynch protocol with an estrogen/progesterone-based protocol. *J. Dairy Sci.* 96, 6904-6914.
- Pereira MHC, Sanches CP, Guida TG, Rodrigues ADP, Aragon FL, Veras MB, Borges PT, Wiltbank MC, Vasconcelos JLM. 2013b. Timing of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  treatment in an estrogen-based protocol for timed artificial insemination or timed embryo transfer in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96, 2837-2846.
- Pereira MHC, Wiltbank MC, Barbosa LFSP, Costa Jr. WM, Carvalho MAP, Vasconcelos JLM. 2015. Effect of adding a gonadotropin-releasing-hormone treatment at the beginning and a second prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  treatment at the end of an estradiol-based protocol for timed artificial insemination in lactating dairy cows during cool or hot seasons of the year. *J. Dairy Sci.* 98, 1-13.
- Pereira MHC, Sanches Jr CP, Guida TG, Wiltbank MC, Vasconcelos JLM. 2017. Comparison of fertility following use of one versus two intravaginal progesterone inserts in dairy cows without a CL during a synchronization protocol before timed AI or timed embryo transfer. *Theriogenology* 89, 72-78.
- Perry GA, Smith MF, Lucy MC, Green JA, Parks TE, Macneil MD, Roberts AJ, Geary TW. 2005. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 5268-5273.
- Perry GA, Smith MF, Roberts AJ, MacNeil MD, Geary TW. 2007. Relationship between size of ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 85, 684-689.
- Perry GA, Perry BL. 2008. Effects of standing estrus and supplemental estradiol on changes in uterine pH during a fixed-time artificial insemination protocol. *J. Anim. Sci.* 86, 2928-2935.
- Perry GA, Swanson OL, Larimore EL, Perry BL, Djira GD, Cushman RA. 2014. Relationship of follicle size and concentrations of estradiol among cows exhibiting or not exhibiting estrus during a fixed-time AI protocol. *Domest. Anim. Endocrinol.* 48, 15-20.
- Peter AT, W.T.K. Bosu, R.M. Liptrap, Cummings E. 1989. Temporal changes in serum prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  and oxytocin in dairy cows with short luteal phases after the first postpartum ovulation. *Theriogenology* 32, 277-284.
- Pfeifer LFM, Mapletoft RJ, Kastelic JP, Small JA, Adams GP, Dionello NJ, Singh J. 2009. Effects of low versus physiologic plasma progesterone concentrations on ovarian follicular development and fertility in beef cattle. *Theriogenology* 72, 1237-1250.
- Picard-Hagen N, Lhermie G, Florentin S, Merle D, Frein P, Gayrard V. 2015. Effect of gonadorelin, lecorelin, and buserelin on LH surge, ovulation, and progesterone in cattle. *Theriogenology* 84, 177-183.
- Pierson RA, Ginther OJ. 1984. Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology* 21, 495-504.

- Pryce JE, Coffey MP, Simm G. 2001. The relationship between body condition score and reproductive performance. *J. Dairy Sci.* 84, 1508-1515.
- Pulley SL, Keisler DH, Stevenson JS. 2015. Concentrations of luteinizing hormone and ovulatory responses in dairy cows before timed artificial insemination. *J. Dairy Sci.* 98, 1-14.
- Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 $\alpha$  and GnRH. *Theriogenology* 44, 915-923.
- Pursley JR, Silcox RW, Wiltbank SC. 1998. Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81, 2139-2144.
- Pushpakumara PGA, Gardner NH, Reynolds CK, Beever DE, Wathes DC. 2003. Relationships between transition period diet, metabolic parameters and fertility in lactating dairy cows. *Theriogenology* 60, 1165-1185.
- Rahe CH, Owens RE, Fleeger LH, Newton H, J., Harms PJ. 1980. Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon period of the estrous cycle. *Endocrinology* 107, 498-503.
- Rathbone MJ, Macmillan KL, K. I, Burggraaf S, Bunt CR. 1998. Review: Fertility regulation in cattle. *J. Control. Release* 54, 117-148.
- Rathbone MJ, Bunt CR, Ogle CR, Burggraaf S, Macmillan KL, Pickering K. 2002. Development of an injection molded poly( $\epsilon$ -caprolactone) intravaginal insert for the delivery of progesterone to cattle. *J. Control. Release* 85, 61-71.
- Reinhardt TA, Lippolis JD, McCluskey BJ, Goff JP, Horst RL. 2011. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *Vet. J.* 188, 122-124.
- Rhodes FM, Burke CR, Clark BA, Dayb ML, Macmillan KL. 2002. Effect of treatment with progesterone and oestradiol benzoate on ovarian follicular turnover in postpartum anoestrous cows and cows which have resumed oestrous cycles. *Anim. Reprod. Sci.* 69, 139-150.
- Rhodes FM, McDougall S, Burke CR, Verkerk GA, Macmillan KL. 2003. Invited review: treatment of cows with an extended postpartum anoestrous interval. *J. Dairy Sci.* 86, 1876-1894.
- Ribeiro ES, Bisinotto RS, Favoreto MG, Martins LT, Cerri RL, Silvestre FT, Greco LF, Thatcher WW, Santos JE. 2012. Fertility in dairy cows following presynchronization and administering twice the luteolytic dose of prostaglandin F2 $\alpha$  as one or two injections in the 5-day timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* 78, 273-284.
- Ribeiro ES, Lima FS, Greco LF, Bisinotto RS, Monteiro APA, Favoreto M, Ayres H, Marsola RS, Martinez N, Thatcher WW, Santos JEP. 2013. Prevalence of periparturient diseases and effects on fertility of seasonally calving grazing dairy cows supplemented with concentrates. *J. Dairy Sci.* 96, 5682-5697.
- Roberson MS, Wolfe MW, Stumpf TT, Kittok RJ, Kinder JE. 1989. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. *Biol. Reprod.* 41, 997-1003.
- Robinson RS, Mann GE, Lamming GE, Wathes DC. 1999. The effect of pregnancy on the expression of uterine oxytocin, oestrogen and progesterone receptors during early pregnancy in the cow. *J. Endocrinol.* 160, 21-33.
- Roche JF. 1976. Fertility in cows after treatment with a prostaglandin analogue with or without progesterone. *J. Reprod. Fertil.* 46, 341-345.
- Roche JF. 1996. Control and regulation of folliculogenesis – a symposium in perspective. *R. Reprod.* 1, 19-27.
- Roche JR, Friggens NC, Kay JK, Fisher MW, Stafford KJ, Berry DP. 2009. Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *J. Dairy Sci.* 92, 5769-5801.

- Rourke MO, Diskin MG, Sreenan JM, Roche JF. 2000. The effect of dose and route of oestradiol benzoate administration on plasma concentrations of oestradiol and FSH in long-term ovariectomised heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 59, 1-12.
- Sales JNS, Carvalho JBP, Crepaldi GA, Cipriano RS, Jacomini JO, Maio JRG, Souza JC, Nogueira GP, Baruselli PS. 2012. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* 78, 510-516.
- Salveti NR, Rey F, Ortega HH. 2007. Enfermedad quística ovárica bovina. *Revista FAVE-Ciencias Veterinarias* 6, 1-2.
- Sangsrivong S, Combs DK, Sartori R, Wiltbank MC. 2002. High feed intake increases blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 $\beta$  in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85, 2831-2842.
- Santos JEP, Rutigliano HM, Filho MFS. 2009. Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 110, 207-221.
- Santos JEP, Narciso CD, Rivera F, Thatcher WW, Chebel RC. 2010. Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed artificial insemination protocol on reproduction of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93, 2976-2988.
- Santos VG, Carvalho PD, Maia C, Carneiro B, Valenza A, Fricke PM. 2017. Fertility of lactating Holstein cows submitted to a Double-Ovsynch protocol and timed artificial insemination versus artificial insemination after synchronization of estrus at a similar day in milk range. *J. Dairy Sci.* 100, 1-11.
- Sartori R, Haughian JM, Shaver RD, Rosa GJM, Wiltbank MC. 2004. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of holstein heifers and lactating cows. *J. Dairy Sci.* 87, 095-920.
- Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF. 1988. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil.* 83, 663-671.
- Savio JD, Boland MP, Hynes N, Roche JF. 1990a. Resumption of follicular activity in the early post-partum period of dairy cows. *J. Reprod. Fertil.* 88, 569-579.
- Savio JD, Boland MP, Roche JF. 1990b. Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in post-partum dairy cows. *J. Reprod. Fertil.* 88, 581-591.
- Savio JD, Thatcher WW, Badinga L, De la Sota RL, Wolfenson D. 1993a. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *J. Reprod. Fertil.* 97, 197-203.
- Savio JD, Thatcher WW, Morris GR, Entwistle K, Drost M, Mattiacci MR. 1993b. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 98, 77-84.
- Scandolo D, Scandolo DG, Cuatrín A, Maciel M. 2016. Prevalencia de hipocalcemia subclínica en vacas lecheras. 39<sup>a</sup> Congreso Argentino de Producción Animal.
- Sejrsen K, Neimann-Sorensen A. 1982. Nutritional physiology and feeding of the cow around parturition. Factors influencing fertility in the postpartum cow. *Topics Vet. Med. Anim. Sci* 20, 325.
- Senger PL. 1994. The estrus detection problem: new concepts, technologies, and possibilities. *J. Dairy Sci.* 77, 2745.
- Senger PL, 2003, Pathways to pregnancy and parturition, Second revised Edition.
- Shaham-Albalancy A, Folman Y, Kaim M, Rosenberg M, Wolfenson D. 2001. Delayed effect of low progesterone concentrations on bovine uterine PGF<sub>2a</sub> secretion in the subsequent oestrous cycle. *Reproduction* 122, 643-648.
- Sheldon IM, Noakes DE. 1998. Comparison of three treatments for bovine endometritis. *Vet. Rec.* 142, 575-579.
- Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Pfeiffer DU, Dobson H. 2002. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction* 123, 837-845.

- Sheldon IM, Dobson H. 2004. Postpartum uterine health in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 295-306.
- Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 65, 1516-1530.
- Sheldon IM, Williams EJ, Miller ANA, Nash DM, Herath S. 2008. Uterine diseases in cattle after parturition. *Vet. J.* 176, 115-121.
- Shemesh M. 2001. Actions of gonadotrophins on the uterus. *Reproduction* 121, 835-842.
- Shirasuna K, Akabanea Y, Beindorff N, Nagaia K, Sasakic M, Shimizua T, Bollweinb H, Meidand R, Miyamotoa A. 2012. Expression of prostaglandin F2 (PGF2) receptor and its isoforms in the bovine corpus luteum during the estrous cycle and PGF2-induced luteolysis. *Domest. Anim. Endocrinol.* 43, 227-238.
- Shrestha HK, Nakaob T, Suzukic T, Akitad M, Higaki T. 2005. Relationships between body condition score, body weight, and some nutritional parameters in plasma and resumption of ovarian cyclicity postpartum during pre-service period in high-producing dairy cows in a subtropical region in Japan. *Theriogenology* 64, 855-866.
- Silva LACL, Simões LMS, Bottino MP, Santos APC, Santos G, Martinez IYH, Souza JC, Baruselli PS, Sales JNS. 2018. Presynchronization by induction of a largest follicle using a progesterone device in GnRH-based-ovulation synchronization protocol in crossbred dairy cows. *Theriogenology* 119, 233-237.
- Silvia WJ, Lewis GS, Cracken JAM, Thatcher WW, Wilson LJ. 1991. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F2 during luteolysis in ruminants. *Biol. Reprod.* 45, 655-663.
- Silvia WJ, Hatler TB, Nugent AM, Fonseca LFLd. 2002. Ovarian follicular cysts in dairy cows: An abnormality in folliculogenesis. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23, 167-177.
- Singh J, Brogliatti GM, Christensen CR, Adams GP. 1999. Active immunization against follistatin and its effect on FSH, follicle development and superovulation in heifers. *Theriogenology* 52, 49-66.
- Singh J, Adams GP, Pierson RA. 2003. Promise of new imaging technologies for assessing ovarian function. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 371-399.
- Sirois J, Fortune JE. 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real time ultrasonography. *Biol. Reprod.* 39, 308-317.
- Sirois J, Fortune JE. 1990. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: A model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology* 127, 916.
- Souza AH, Cunha AP, Caraviello DZ, Wiltbank MC. 2005. Profiles of circulating estradiol-17 $\beta$  after different estrogen treatments in lactating dairy cows. *Anim. Reprod.* 2, 224-232.
- Souza AH, Ayres H, Ferreira RM, Wiltbank MC. 2008. A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology* 70, 208-215.
- Souza AH, Viechnieski S, Lima FA, Silva FF, Araújo R, Bó GA, Wiltbank MC, Baruselli PS. 2009. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology* 72, 10-21.
- Spencer TE, Bazer FW. 1996. Ovine interferon tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. *Endocrinology* 137.
- Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW. 2004. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Biol. Reprod.* 71, 2-10.
- Spicer LJ, Alpizar E, Echterkamp SE. 1993. Effects of insulin, insulinlike growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in vitro. *J. Anim. Sci.* 71, 1232-1241.
- Spicer LJ, Stewart RE. 1996. Interactions among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin, and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cell numbers and steroidogenesis of bovine thecal cells: role of IGF-I receptors. *Biol. Reprod.* 54, 255-263.



- Stagg K, Diskin MG, Sreenan JM, Roche JF. 1995. Follicular development in long-term anoestrous suckler beef cows fed two levels of energy postpartum. *Anim. Reprod. Sci.* 38, 49-61.
- Staples CR, Thatcher WW, Clark JH. 1990. Relationship between ovarian activity and energy status during the early postpartum period of high producing dairy cows. *J. Anim. Sci.* 73, 938-947.
- Stevenson JS, Schmidt MK, Call EP. 1984. Stage of Estrous Cycle, Time of Insemination, and Seasonal Effects on Estrus and Fertility of Holstein Heifers After Prostaglandin F2 $\alpha$ . *J. Dairy Sci.* 67, 1798-1805.
- Stevenson JS, Tenhouse DE, Krisher RL, Lamb GC, Larson JE, Dahlen CR, Pursley JR, Bello NM, Fricke PM, Wiltbank MC, Brusveen DJ, Burkhart M, Youngquist RS, Garverick HA. 2008. Detection of anovulation by heatmount detectors and transrectal ultrasonography before treatment with progesterone in a timed insemination protocol. *J. Dairy Sci.* 91, 2901-2915.
- Stevenson JS, Pulley SL, Mellieon Jr HL. 2012. Prostaglandin and gonadotropin-releasing hormone administration improve progesterone status, luteal number, and proportion of ovular and anovular dairy cows with corpora lutea before a timed artificial insemination program. *J. Dairy Sci.* 95, 1831-1844.
- Stevenson JS. 2016. Physiological predictors of ovulation and pregnancy risk in a fixed-time artificial insemination program. *J. Dairy Sci.* 99, 1-16.
- Stevenson JS, Lamb GC. 2016. Contrasting effects of progesterone on fertility of dairy and beef cows. *J. Dairy Sci.* 99, 5951-5964.
- Stevenson JS, Pulley SL. 2016. Feedback effects of estradiol and progesterone on ovulation and fertility of dairy cows after gonadotropin-releasing hormone-induced release of luteinizing hormone. *J. Dairy Sci.* 99, 3003-3015.
- Stevenson KR, Riley PR, Stewart HJ, Flint APF, Wathes DC. 1994. Localization of oxytocin receptor mRNA in the ovine uterus during the oestrous cycle and early pregnancy. *J. Mol. Endocrinol.* 12, 93-105.
- Thatcher WW, Wilcox CJ. 1973. Estrus as an indicator of reproductive status in the dairy cow. *J. Dairy Sci.* 56, 608-610.
- Thatcher WW, Meyer MD, Danet-Desnoyers G. 1995. Maternal recognition of pregnancy. *J. Reprod. Fertil. Suppl* 49, 15-28.
- Van Amburgh ME, Collao-Saenz EA, Higgs R, Ross DA, Recktenwald EB, Raffrenato E, Chase LE, Overton TR, Mills JK, Foskolos A. 2015. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System: updates to the model and evaluation of version 6.5. *J. Dairy Sci.* 98, 6361-6380.
- Vasconcelos JLM, Silcox RW, Rosa GJM, Pursley JR, Wiltbank MC. 1999. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 52, 1067-1078.
- Vasconcelos JLM, R. Sartori, H. N. Oliveira, J. G. Guenther, Wiltbank MC. 2001. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 56, 307-314.
- Vasconcelos JLM, Sangsritavong S, Tsai SJ, Wiltbank MC. 2003. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. *Theriogenology* 60, 795-807.
- Vasconcelos JLM, Jardina DTG, Sá Filho OG, Aragon FL, Veras MB. 2011. Comparison of progesterone-based protocols with gonadotropin-releasing hormone or estradiol benzoate for timed artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows. *Theriogenology* 75, 1153-1160.
- Villa-Godoy A, Hughes TL, Emery RS, Chapin LT, Fogwell RL. 1988. Association between energy balance and luteal function in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 71.
- Voyvoda H, Erdogan H. 2010. Use of a hand-held meter for detecting subclinical ketosis in dairy cows. *Res Vet Sci* 89, 344-355.

- Walker WL, Nebel RL, Mc Gilliard ML. 1996. Time of ovulation relative to mounting activity in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 79, 1555-1561.
- Walsh RB, Kelton DF, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, LeBlanc SJ. 2007. Prevalence and risk factors for postpartum anovulatory condition in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 315-324.
- Wang CK, Robinson RS, Flint APF, Mann GE. 2007. Quantitative analysis of changes in endometrial gland morphology during the bovine oestrous cycle and their association with progesterone levels. *Reproduction* 134, 365-371.
- Washburn SP, Silvia WJ, Brown CH, McDaniel BT, McAllister AJ. 2002a. Trends in reproductive performance in southeastern Holstein and Jersey DHI Herds. *J. Dairy Sci.* 85, 244-251.
- Washburn SP, White SL, Green JTJ, Benson GA. 2002b. Reproduction, mastitis, and body condition of seasonally calved Holstein and Jersey cows in confinement or pasture systems. *J. Dairy Sci.* 85, 105-111.
- Wathes DC, Hamon M. 1993. Localisation of oestradiol, progesterone and oxytocin receptors in the uterus during the oestrous cycle and early pregnancy of the ewe. *J. Endocrinol.* 138, 479-491.
- Wathes DC, Lamming GE. 1995. The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. *J. Reprod. Fertil.* 49, 214-220.
- Wathes DC, Cheng Z, Bourne N, Taylor VJ, M.P. C, Brotherstone S. 2007. Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the inter-relationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period. *Domest. Anim. Endocrinol.* 83, 203-225.
- Wehrman ME, Roberson MS, Cupp AS, Kojima FN, Stumpf TT. 1993. Increasing exogenous progesterone during synchronization of estrus decreases endogenous 17 $\beta$ -estradiol and increases conception in cows. *Biol. Reprod.* 49, 214-220.
- Westwood CT, Lean IJ, Garvin JK. 2002. Factors influencing fertility of Holstein dairy cows: a multivariate description. *J. Dairy Sci.* 85, 3225-3237.
- Wiltbank MC, Gümen A, Sartori R. 2002. Physiological classification of anovulatory condition in cattle. *Theriogenology* 57, 21-52.
- Wiltbank MC, Lopez H, Sartori R, Sangsritavong S, Gumen A. 2006. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology* 65, 17-29.
- Wiltbank MC, Giovanni MB, F. C, Barletta RV, Trayford CR, Joseph RT. 2015. Effect of a second treatment with prostaglandin F $2\alpha$  during the Ovsynch protocol on luteolysis and pregnancy in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98, 8644-8654.
- Wordinger RJ, Dickey JF, Hill JRJ. 1972 Influence of undernutrition on the histology and histochemistry of the bovine endometrium. *J. Anim. Sci.* 34, 453-459.
- Xiao C, Liu JM, Sirois J, Goff AK. 1998. Regulation of cyclooxygenase-2 and prostaglandin F synthase gene expression by steroid hormones and interferon-t in bovine uterine endometrial cells. *Endocrinology* 139, 2293-2299.
- Xu ZZ, Burton LJ, Macmillan KL. 1997. Reproductive performance of lactating dairy cows following estrus synchronization regimens with PGF $2\alpha$  and progesterone. *Theriogenology* 47, 687-701.
- Yousuf MR, Martins JPN, Ahmad N, Nobis K, Pursley JR. 2016. Presynchronization of lactating dairy cows with PGF $2\alpha$  and GnRH simultaneously, 7 days before Ovsynch have similar outcomes compared to G6G. *Theriogenology* 86, 1607-1614.
- Zhang J, Weston PG, Hixon JE. 1992. Role of progesterone and oestradiol in the regulation of uterine oxytocin receptors in ewes. *J. Reprod. Fertil.* 94, 395-404.
- Zhang J, Deng LX, Zhang HL, Hua GH, Han L, Zhu Y, Meng XJ, Yang LG. 2010. Effects of parity on uterine involution and resumption of ovarian activities in postpartum Chinese Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93, 1979-1986.

Zollers WG, H. A. Garverick, M. F. Smith, R. J. Moffatt, Salfen BE, Youngquist RS. 1993. Concentrations of progesterone and oxytocin receptors in endometrium of postpartum cows expected to have a short or normal oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil.* 97, 329-337.

# **8. Publicaciones**

