

## USO DEL PROTOCOLO OVSYNCH EN VAQUILLONAS LECHERAS CON O SIN CUERPO LÚTEO FUNCIONAL AL INICIO DEL TRATAMIENTO

Use of the Ovsynch protocol in dairy heifers with or without a functional corpus luteum at the initiation of treatment.

**M.V. Calá<sup>1</sup>, S.S. Callejas<sup>2</sup>, R.C. Catalano<sup>2</sup>, C.A. Ersinger<sup>2</sup>**

Área de Reproducción, Núcleo de Investigación FISFARVET. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNCPBA. Campus Universitario (7000) Tandil. Buenos Aires, Argentina. TE. 54 2293 422357 / 426667

<sup>1</sup> Becaria de Perfeccionamiento de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Prov. de Buenos Aires

<sup>2</sup> Docente Área de Reproducción

Correspondencia a: [callejas@vet.unicen.edu.ar](mailto:callejas@vet.unicen.edu.ar)

### RESUMEN

Con el objetivo de comparar la respuesta ovárica y el porcentaje de preñez de vaquillonas lecheras que recibieron dos tratamientos con doble dosis de prostaglandina, separadas por 11 días, para generar presencia o ausencia de cuerpo lúteo funcional al inicio del protocolo Ovsynch., 22 vaquillonas Holando Argentino fueron distribuidas en dos grupos para recibir dos dosis de 750 µg de tiaprost, los días -22 y -11 (grupo CLF+, n=11) o los días -14 y -3 (grupo CLF-, n=11). La presencia o no de cuerpo lúteo funcional fue confirmada por ecografía y medición de progesterona plasmática, con lo cual dos vaquillonas CLF+ y una CLF- fueron eliminadas. El día 0 ambos grupos recibieron 8 mg de buserelina; el día 7, 750 mg de tiaprost y el día 9, 8 mg de buserelina. El servicio se realizó por inseminación artificial a tiempo fijo a las 15 horas post-tratamiento. El porcentaje de animales con un folículo  $\geq 8$  mm al día 0 y su tamaño fueron similares entre grupos ( $P>0,05$ ). Estos folículos ovularon (94,1%) o se luteinizaron (5,9%) luego de la primera inyección de buserelina ( $P>0,05$ ). El porcentaje de animales con cuerpo lúteo funcional al día 7 fue de 100% y 90%, para CLF+ y CLF- ( $P>0,05$ ), mientras que la concentración de progesterona de los mismos fue superior en CLF+ ( $3,5 \pm 0,7$  vs  $2,2 \pm 1,2$  ng/ml;  $P<0,01$ ). Los porcentajes de luteólisis fueron del 100% ( $P>0,05$ ). El diámetro del folículo dominante fue superior en CLF-, tanto al día 7 ( $P=0,05$ ) como al día 9 ( $P<0,01$ ); en tanto que su porcentaje de ovulación luego de la segunda inyección de buserelina no difirió entre grupos (88,9% y 100%;  $P>0,05$ ). Los porcentajes de preñez fueron similares entre grupos (66,7% y 70%;  $P>0,05$ ). En conclusión, la utilización de

dos tratamientos con doble dosis de prostaglandina separadas por 11 días, para generar presencia (11 días post-segunda PGF2 $\alpha$ ) o ausencia (3 días post-segunda PGF2 $\alpha$ ) de cuerpo lúteo funcional al inicio del protocolo Ovsynch en vaquillonas lecheras produce respuestas ováricas similares (ovulación, sincronización de la fase luteal y luteólisis), lo que explicaría la similitud entre los porcentajes de preñez de ambos grupos.

**Palabras clave:** Ovsynch, vaquillonas lecheras, cuerpo lúteo, progesterona, folículo

## ABSTRACT

With the objective of compare ovarian response and pregnancy rates in dairy heifers that received two presynchronisation treatments with prostaglandines to induce presence (CLF+) or absence (CLF-) of a functional corpus luteum at the initiation of the Ovsynch protocol, 22 Holando Argentino heifers were assigned randomly to receive two injection of 750  $\mu$ g of tiaprost, at days -22 and -11 (CLF+ group, n=11) or at days -14 and -3 (CLF- group, n=11). Presence or absence of a functional corpus luteum was confirmed by ultrasonography and measurement of plasma progesterone concentrations, therefore two CLF+ and one CLF- heifers were dropped from the experiment. At day 0 both groups received 8 mg of buserelin; at day 7, 750 mg of tiaprost and at day 9, 8 mg of buserelin. Heifers were bred by fixed-time artificial insemination 15 hours after treatment. Percentage of animals with a  $\geq$  8 mm follicle at day 0 and its diameter were similar between groups ( $P>0.05$ ). Following first buserelin injection ovulation occurred in 94.1% and luteinization in 5.9% of these follicles ( $P>0.05$ ). Percentages of animals with a functional corpus luteum at day 7 were similar between groups (100% and 90%, for CLF+ and CLF-, respectively;  $P>0.05$ ) while its progesterone concentrations were greater in CLF+ ( $3.5 \pm 0.7$  vs  $2.2 \pm 1.2$  ng/ml;  $P<0.01$ ). Percentages of luteolysis were 100% ( $P>0.05$ ). Dominant follicle diameter was greater in CLF- so much at day 7 ( $P=0.05$ ) as at day 9 ( $P<0.01$ ); its percentage of ovulation after second buserelin injection was not different among groups (88.9% and 100%;  $P>0.05$ ). Pregnancy rates were similar between groups (66.7% and 70%;  $P>0.05$ ). In conclusion, used of two presynchronisation treatments with prostaglandines to induce presence (11 days post-second PGF2 $\alpha$ ) or absence (3 days post-second PGF2 $\alpha$ ) of a functional corpus luteum at the initiation of the Ovsynch protocol produces similar ovarian response (ovulation, luteal phase synchronisation and luteolysis), what would explain similarity between pregnancy rates obtained in both groups.

**Key words:** Ovsynch, dairy heifers, corpus luteum, progesterone, follicle

## INTRODUCCIÓN

Se ha demostrado que para controlar el ciclo estral, no sólo es necesario manipular la vida del cuerpo lúteo sino también la dinámica folicular (Thatcher et al. 1989; Twagiramungu et al. 1992). En función de esto, ha surgido un método de control del ciclo estral basado en el uso combinado de análogos sintéticos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y de la prostaglandina F2a (PGF2a) asociado a una inseminación artificial a tiempo fijo (IATF; Pursley et al. 1994; Silcox et al. 1995; Twagiramungu et al. 1995) denominado Ovsynch (Pursley et al. 1997).

La aplicación del método Ovsynch en vaquillonas lecheras ha producido resultados variables (Pursley et al. 1997; Callejas et al. 1999; Calá et al. 2000 a; Stevenson et al. 2000; Callejas et al. 2001) atribuidos fundamentalmente a fallas en el control del desarrollo luteal (Pursley et al. 1997; Callejas et al. 1999; Calá et al. 2001) y a características propias de la dinámica folicular de las vaquillonas (Pursley et al. 1995; Silcox et al. 1995; Pursley et al. 1997), lo que genera la necesidad de profundizar en el estudio de esta técnica a fin de aportar conocimientos que permitan mejorar su eficiencia.

En un trabajo propio (Calá et al. 2001) se observó que el porcentaje de preñez de las

vaquillonas que tenían un cuerpo lúteo funcional (niveles de progesterona plasmática  $\geq 1$  ng/ml) al comenzar el tratamiento Ovsynch (35,7%) fue significativamente inferior al de aquéllas que no presentaban tal estructura (niveles de progesterona plasmática  $< 1$  ng/ml; 85,7%). En función de esto, se ha diseñado un estudio con el objetivo de comparar la respuesta ovárica y el porcentaje de preñez de vaquillonas lecheras que recibieron dos tratamientos con doble dosis de prostaglandinas, de modo que uno de ellos genere presencia y el otro ausencia de cuerpo lúteo funcional al inicio del protocolo Ovsynch.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en un establecimiento lechero del partido de Tandil, perteneciente a la Cuenca Mar y Sierras, Buenos Aires, Argentina.

Se utilizaron 22 vaquillonas Holando Argentino de 24-27 meses de edad, en óptimas condiciones sanitarias, libres de brucelosis y tuberculosis, y con una condición corporal de  $7,4 \pm 0,3$  ( $\bar{x} \pm$  d.e.) basada en una escala de 1 a 9 (1: muy flaca; 9: excesivamente gorda; Richards et al. 1986). Durante el transcurso del trabajo los animales se manejaron con el mayor cuidado

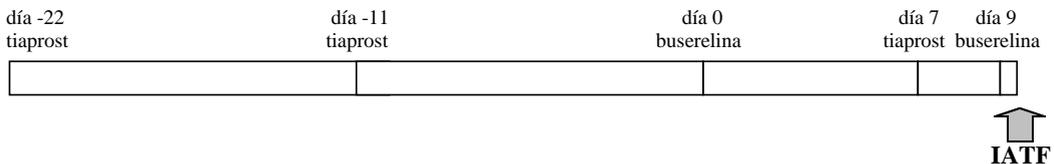
posible y permanecieron en un potrero de pradera artificial y oferta de agua *ad libitum*.

Las vaquillonas fueron distribuidas en forma aleatoria a los siguientes grupos experimentales, para provocar presencia (CLF+) o ausencia (CLF-) de cuerpo lúteo funcional al inicio del tratamiento Ovsynch (día 0):

- Grupo CLF+ (n=11): recibieron dos dosis de 750  $\mu$ g de tiaprost (Iliren<sup>®</sup>, Intervet Argentina S.A.) separadas por 11 días (los días -22 y -11), en forma subcutánea. El día 0 se les administró 8  $\mu$ g de buserelina (Receptal<sup>®</sup>, Intervet Argentina S.A.), intramuscular. Siete días posteriores se les inyectó 750  $\mu$ g de tiaprost y 48 horas más tarde 8  $\mu$ g de buserelina (Figura N° 1).
- Grupo CLF- (n=11): recibieron dos dosis de 750  $\mu$ g de tiaprost separadas por 11 días (los días -14 y -3), en forma subcutánea. El día 0 se les administró 8  $\mu$ g de buserelina, intramuscular. Siete días posteriores se les inyectó 750  $\mu$ g de tiaprost y 48 horas más tarde 8  $\mu$ g de buserelina (Figura N° 1).

El criterio para confirmar la pertenencia de las vaquillonas a cada uno de los grupos experimentales se basó tanto en el estudio ecográfico como en los niveles de progesterona en plasma presentes al día 0. Así, todos los animales del

### Grupo CLF+:



### Grupo CLF-:

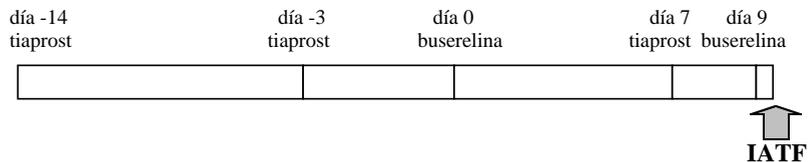


Figura N° 1: Tratamientos que se aplicaron en ambos grupos experimentales.

grupo CLF+ debieron presentar un cuerpo lúteo observado por ecografía y concentraciones de progesterona plasmática  $\geq 1$  ng/ml, en tanto que el grupo CLF- se caracterizó por ausencia de estructura luteal a la ecografía y niveles de progesterona  $< 1$  ng/ml, al día 0.

Se realizó detección de celos dos veces por día (cada 10-12 horas), durante una hora en cada turno, a partir del día 8 hasta el día 10. Se consideró que el animal estaba en celo cuando permaneció inmóvil al ser montado por otro.

El servicio se realizó por IATF a las 15 horas luego de administrar la segunda inyección de buserelina en ambos grupos y estuvo a cargo de un solo técnico inseminador, utilizando semen congelado en pajuelas de 0,5 ml provenientes de un toro de fertilidad probada.

El diagnóstico de gestación se realizó al día 60 mediante palpación a través del recto.

Se realizaron estudios ecográficos de los ovarios en los días 0, 3, 7, 9 y 11 mediante el uso de un ecógrafo SonoVet 900 (Medison Co., Ltd.) provisto de un transductor rectal multifrecuencia LV 4-7 (5,0 MHz/65 mm). Cada uno de los ovarios fue examinado para determinar la presencia de cuerpo lúteo y del folículo de mayor tamaño (folículo dominante). La medida de los folículos fue determinada considerando el diámetro en los esféricos y el promedio entre el diámetro mayor y el perpendicular a éste, en los folículos de forma irregular. La ovulación fue determinada por la desaparición (de un examen al otro) de un folículo previamente identificado con un tamaño  $\geq 8$  mm y, en el caso de ovulación luego de la primera inyección de buserelina, fue confirmada ecográficamente por la aparición de un cuerpo lúteo. Este tamaño folicular se consideró en base a lo informado por Martínez et al. (1999) quienes lo definieron como folículo potencialmente ovulatorio. Se consideró luteinización del folículo al observarse en el interior del mismo un material que le confiere un aspecto "borroso".

Se tomaron muestras de sangre los días 0, 7 y 10, por punción de la vena yugular. Las mis-

mas se recogieron en tubos con heparina y se centrifugaron antes de la hora de extraídas. El plasma obtenido se conservó a  $-20^{\circ}$  C hasta el momento de realizar la medición de progesterona, la cual se llevó a cabo mediante radioinmunoanálisis en fase sólida (ImmoChem<sup>TM</sup> ICN Pharmaceuticals, Inc. Costa Mesa, CA 92626) utilizando  $^{125}$ I como trazador radiactivo. La sensibilidad de la técnica fue de 0,15 ng/ml y los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron de 10,8% y 11,1%, respectivamente. Se consideró que el cuerpo lúteo observado a la ecografía era funcional cuando los niveles de progesterona en plasma fueron  $\geq 1$  ng/ml. La ocurrencia de luteólisis en respuesta al tiaprost se determinó cuando niveles de progesterona en plasma  $\geq 1$  ng/ml al día 7 disminuyeron a valores  $< 1$  ng/ml en el muestreo siguiente.

Se evaluaron los siguientes parámetros:

- Porcentaje de animales con un folículo  $\geq 8$  mm al día 0 y diámetro del mismo.
- Porcentajes de ovulación y luteinización luego de la primera inyección de buserelina.
- Porcentaje de animales con cuerpo lúteo funcional al día 7 (sincronización de la fase luteal).
- Concentración de progesterona plasmática (ng/ml) de los animales con cuerpo lúteo funcional al día 7.
- Porcentaje de luteólisis.
- Porcentaje de celo entre los días 8 y 10.
- Diámetro del folículo de mayor tamaño presente al día 7 (mm).
- Porcentaje de animales con un folículo  $\geq 8$  mm al día 9 y diámetro del mismo (mm).
- Tasa de crecimiento del folículo de mayor tamaño entre los días 7 y 9 (mm/día).
- Porcentaje de ovulación del folículo dominante presente al día 9.
- Porcentaje de preñez al primer servicio.

El análisis estadístico se realizó mediante el procedimiento CATMOD para las variables discretas y el procedimiento GLM para las variables continuas, ambos pertenecientes al paquete estadístico SAS (1989). El nivel de confianza se

estableció en 95% ( $\alpha=0,05$ ). Tres vaquillonas (dos del grupo CLF+ y una del CLF-) fueron eliminadas para el análisis de los resultados por no haber presentado los niveles de progesterona y estructuras ováricas correspondientes al grupo al cual pertenecían al momento de iniciar el tratamiento Ovsynch. Así, el grupo CLF+ quedó constituido por 9 vaquillonas y el CLF- por 10 vaquillonas. En una vaquillona perteneciente al grupo CLF+ no pudo obtenerse el diámetro del folículo al día 7 por problemas ocurridos durante el estudio ecográfico. Además, el porcentaje de preñez se relacionó con el tamaño del folículo al día 9, para lo cual las vaquillonas fueron divididas en dos grupos según tuvieran un folículo  $\leq$  o  $>$  a 11 mm, analizando los efectos grupo (presencia o ausencia de cuerpo lúteo funcional al inicio del tratamiento Ovsynch), tamaño folicular e interacción grupo x tamaño folicular. De igual modo se procedió para relacionar el porcentaje de preñez con la presencia de celo, formándose dos grupos según hayan sido o no detectadas en celo.

## RESULTADOS

Tanto el porcentaje de animales con un folículo  $\geq$  8 mm al día 0 (100% y 80%) como el tamaño promedio del mismo ( $13,2 \pm 1,2$  y  $12,1 \pm 1,9$ ;  $\bar{x} \pm$  d.e.) fueron similares entre los grupos CLF+ y CLF-, respectivamente ( $P>0,05$ ). Los porcentajes de ovulación y luteinización de dicho folículo, luego de la primera inyección de buserelina, no presentaron diferencias entre grupos ( $P>0,05$ ; Figura N° 2).

El porcentaje de animales con cuerpo lúteo funcional al día 7 fue similar entre grupos ( $P>0,05$ ; Cuadro N° 1); en tanto que la concentración de progesterona plasmática de los mismos fue significativamente superior en las vaquillonas del grupo CLF+ ( $3,5 \pm 0,7$  vs  $2,2 \pm 1,2$  ng/ml de plasma,  $\bar{x} \pm$  d.e., para CLF+ y CLF-, respectivamente;  $P<0,01$ ).

Los porcentajes de luteólisis y de celo no difirieron entre grupos ( $P>0,05$ ; Cuadro N°1). La presentación de celos se distribuyó entre las 36 y 63 horas post-PGF2a ( $P>0,05$ ).

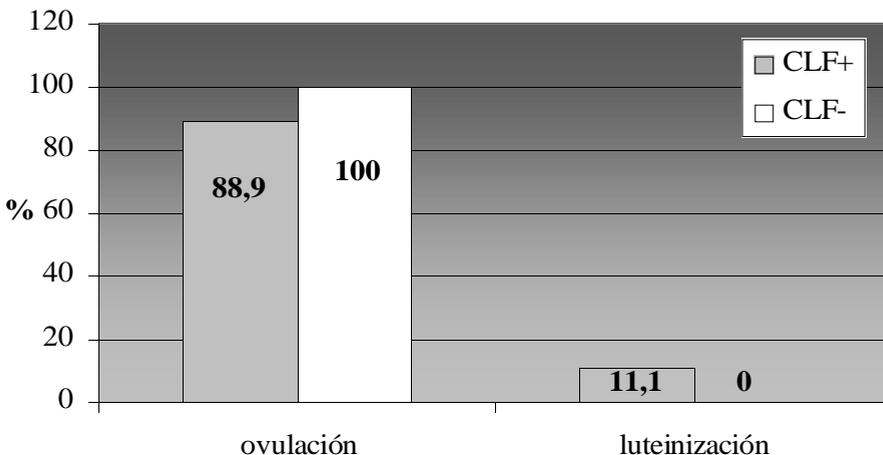


Figura N° 2: Porcentajes de ovulación y luteinización del folículo de mayor tamaño ( $\geq$  8 mm) presente al momento de la primera inyección de buserelina en vaquillonas lecheras con (CLF+) o sin (CLF-) cuerpo lúteo funcional al inicio del protocolo Ovsynch.

**Cuadro N°1: Parámetros reproductivos de vaquillonas Holando Argentino con (CLF+) o sin (CLF-) cuerpo lúteo funcional al inicio del protocolo Ovsynch**

Parámetro	CLF+	CLF-	P
% de vaquillonas con CL funcional al día 7	100% (9/9)*	90% (9/10)	>0,05
% de luteólisis	100% (9/9)	100% (9/9)	>0,05
% de celo	44,4% (4/9)	80% (8/10)	>0,05
Tamaño del folículo al día 7 ( $\bar{x} \pm d.e.$ )	10 $\pm$ 2,2 mm	11,8 $\pm$ 1,5 mm	=0,05
Tamaño del folículo al día 9 ( $\bar{x} \pm d.e.$ )	10,3 $\pm$ 2,7 mm	13,9 $\pm$ 1,7 mm	<0,01
Tasa de crecimiento del folículo entre los días 7 y 9 ( $\bar{x} \pm d.e.$ )	0,25 $\pm$ 0,8 mm/día	1,05 $\pm$ 0,9 mm/día	=0,07
% de ovulación a la segunda inyección de buserelina	88,9% (8/9)	100% (10/10)	>0,05
% de preñez	66,7% (6/9)	70% (7/10)	>0,05

\*: Valores entre paréntesis indican número de animales.

El diámetro promedio del folículo dominante fue superior en el grupo CLF- respecto de CLF+ tanto al día 7 ( $P=0,05$ ; Cuadro N° 1) como al día 9 ( $P<0,01$ ; Cuadro N°1), este último presentó en todos los casos un diámetro  $\geq 8$  mm.

La tasa de crecimiento del folículo de mayor tamaño entre los días 7 y 9 tendió a ser mayor en el grupo CLF- ( $P=0,07$ ; Cuadro N° 1).

El porcentaje de ovulación del folículo dominante presente al día 9 fue similar entre grupos ( $P>0,05$ ; Cuadro N° 1).

El porcentaje de preñez fue similar entre grupos ( $P>0,05$ ; Cuadro N° 1). Si se considera la totalidad de los animales tratados en este estudio, dicho porcentaje tampoco difirió estadísticamente (54,5 y 72,7% para CLF+ y CLF-, respectivamente,  $P>0,05$ ).

Al relacionar el tamaño del folículo al día 9 con la fertilidad se observó que las vaquillonas con folículos  $\leq 11$  mm tendieron a presentar un menor porcentaje de preñez (33,3%) que aquellas con folículos  $> 11$  mm (84,6%;  $P=0,10$ ), sin existir un efecto grupo ni interacción grupo x tamaño folicular ( $P>0,05$ ).

Cuando se relacionaron los resultados de preñez con la presencia de celos se observó un

efecto significativo del celo (donde los animales que presentaron celo tuvieron un mayor porcentaje de preñez —91,7%— respecto de los que no —28,6%—;  $P<0,05$ ), en tanto que no existió un efecto grupo ( $P>0,05$ ) ni interacción grupo x celo ( $P>0,05$ ).

## DISCUSIÓN

Para analizar los altos porcentajes de ovulación registrados luego de la primera administración de buserelina debe considerarse que, de acuerdo al tratamiento realizado con prostaglandinas, los animales del grupo CLF+ se encontrarían mayoritariamente entre los días 4 y 9 del ciclo estral y los del grupo CLF- entre los días 17 y 1. De este modo, las vaquillonas CLF+ presentarían un folículo dominante de la primera onda folicular, en crecimiento o iniciando la fase de meseta lo que le confiere una alta capacidad de responder con ovulación a la inyección de GnRH (Silcox et al. 1993). Resultados similares obtuvieron Vasconcelos et al. (1999) al tratar vacas lecheras entre los días 5 y 9 del ciclo (96% de ovulación). En el caso del folículo presente en las vaquillonas del grupo CLF-, correspondería a la última onda de crecimiento

folicular encontrándose en condiciones de ovular al momento de aplicar la GnRH, lo que podría compararse con el 100% de ovulación observado por Moreira et al. (2000) al inyectar buserelina en el día 18 del ciclo estral, en vaquillonas lecheras.

Es importante considerar que cuando la GnRH ha sido inyectada en vaquillonas en días desconocidos del ciclo, el porcentaje de ovulación registrado fue sólo del 54% (Pursley et al. 1995). Esta diferencia con lo observado en el presente estudio se debería a la presencia de vaquillonas en las que aún no se ha producido el proceso de desviación folicular, mediante el cual un folículo adquiere dominancia y expresa los receptores para LH que le permitirían responder con ovulación a la administración de GnRH (Ginther, 2000; Ginther et al. 2001). Este sería el caso de animales que se encuentran en los primeros días del ciclo o entre los días 10 y 16 (Vasconcelos et al. 1999; Moreira et al. 2000).

En el 20% de las vaquillonas CLF- no se registró un folículo  $\geq 8$  mm al día 0 lo que, considerando el momento del ciclo en que se encontrarían al inicio del tratamiento y la presencia de un cuerpo lúteo funcional al día 7, permite inferir que ya habría ocurrido la ovulación previo a la administración del análogo de GnRH.

Con respecto al porcentaje de luteinización, observado únicamente en el grupo CLF+, coincide con el informado por Colazo et al. (1999) en vacas cíclicas con cría al pie.

El porcentaje de animales con cuerpo lúteo funcional al día 7 resultó semejante al obtenido en otro estudio, en el que se realizó el tratamiento en vaquillonas en días desconocidos del ciclo y utilizando diferentes dosis de buserelina (Calá et al. 2002). No obstante, en otros trabajos se ha observado entre 59,5 y 81,8% de sincronización de la fase luteal aplicando el método Ovsynch (Pursley et al. 1997; Callejas et al. 1999; Calá et al. 2000 a; Calá et al. 2001). Esta variabilidad en la eficiencia del método para controlar el desarrollo luteal de los anima-

les tratados no parece estar asociada a la dosis de GnRH utilizada (Calá et al. 2001 y en prensa) ni, de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, a la presencia o no de cuerpo lúteo funcional al inicio del tratamiento. Sin embargo, existen ejemplos en los que se ha podido inferir el origen de la falta de sincronización de la fase luteal. Tal es el caso de Moreira et al. (2000) quienes observaron luteólisis prematura (previo a la administración de la PGF<sub>2a</sub>) en vaquillonas tratadas con Ovsynch el día 15 del ciclo estral, probablemente a causa de la liberación de prostaglandina endógena, la que habría actuado tanto sobre el cuerpo lúteo original como sobre el inducido por la inyección de GnRH. Por otro lado, en el presente estudio una vaquillona perteneciente al grupo CLF-, si bien había ovulado luego de la primera administración de buserelina, presentó bajos niveles de progesterona al día 7, por lo que se deduce que el cuerpo lúteo inducido sería de vida media corta. En consecuencia, estas posibles causas de fallas en el control del desarrollo luteal requerirán de nuevas investigaciones a fin de evaluar su impacto cuando el tratamiento se aplica sobre un mayor número de animales.

La mayor concentración de progesterona plasmática de los animales con cuerpo lúteo funcional al día 7 observada en las vaquillonas del grupo CLF+ puede explicarse considerando que las mismas presentaron, al día 7, el cuerpo lúteo original más el accesorio (8/9) o un folículo luteinizado (1/9), mientras que en el grupo CLF- sólo se encontró presente el cuerpo lúteo resultante de la ovulación, ya sea previa (2/10) o posterior (8/10) a la inyección de buserelina. Estos resultados se asemejan a lo observado por Twagiramungu et al. (1994) en vacas para carne cíclicas, quienes atribuyeron los aumentos de progesterona tanto a la producida por el cuerpo lúteo original, como por el inducido o por una combinación de ambos.

El 100% de respuesta al agente luteolítico es coincidente con lo observado en otros estudios, en los que se aplicó el método Ovsynch en

vaquillonas en días desconocidos del ciclo (Callejas et al. 1999; Calá et al. 2000 a; Calá et al. 2001 y en prensa). No obstante, estos resultados difieren de lo señalado por algunos investigadores. Tal es el caso de Twagiramungu et al. (1994), quienes observaron en un grupo de vacas (una con cuerpo lúteo accesorio y tres con el cuerpo lúteo original más el accesorio) la ocurrencia de luteólisis incompleta, habiendo aplicado la prostaglandina 6 días luego de la inyección de buserelina. Moreira et al. (2000) también detectaron fallas en la luteólisis en vaquillonas tratadas el día 18 del ciclo, es decir que al momento de administrar la PGF<sub>2a</sub> presentaban sólo el cuerpo lúteo accesorio, el que de acuerdo a los autores, aún no sería sensible al agente luteolítico. Por lo expuesto, no resulta posible explicar estas diferencias entre estudios, generándose la necesidad de determinar con exactitud cuáles son los factores que ocasionan esta respuesta y la forma de controlarlos.

Con respecto a la manifestación de celos entre los días 8 y 10, el porcentaje observado supera levemente al rango obtenido en otros trabajos (de 26,1 a 54,5%; Callejas et al. 1999; Calá et al. 2000 a; Stevenson et al. 2000; Calá et al. 2001 y en prensa), confirmándose la existencia de variabilidad, que estaría determinada por el grado de desarrollo del nuevo folículo dominante y su capacidad de secretar estradiol.

De acuerdo al estudio realizado por Callejas et al. (2002), el aumento en los niveles de progesterona plasmática produce una menor tasa de crecimiento del folículo dominante y un menor tamaño del mismo. Por lo tanto, se puede inferir que las diferencias observadas en el diámetro del folículo de mayor tamaño de ambos grupos experimentales, tanto al día 7 como al día 9, se deberían a los efectos de las mayores concentraciones de progesterona generadas durante el tratamiento en las vaquillonas del grupo CLF+. Estos resultados coinciden con lo observado por Vasconcelos et al. (1999) en vacas

lecheras y Twagiramungu et al. (1994) en vacas cíclicas de aptitud cárnica.

Por otra parte, la tendencia a presentar una mayor tasa de crecimiento del folículo de mayor tamaño en el grupo CLF- difiere de lo señalado en el estudio de Twagiramungu et al. (1994) donde la tasa de crecimiento del folículo luego de la inyección de cloprostenol fue similar en las vacas con y sin cuerpo lúteo funcional al inicio del tratamiento. De acuerdo a lo observado, los folículos del grupo CLF+ experimentaron una detención del crecimiento, es decir que al momento de inyectar la prostaglandina habrían iniciado su fase de meseta, lo que resulta difícil de explicar considerando que todos provienen de una nueva onda de crecimiento folicular generada luego de la inyección de buserelina y en todas las vaquillonas se produjo luteólisis completa en respuesta al tiaprost.

La respuesta ovulatoria a la segunda inyección de buserelina coincide con lo observado por Moreira et al. (2000) en vaquillonas y Vasconcelos et al. (1999) en vacas lecheras.

El porcentaje de preñez obtenido se aproxima al límite superior del rango informado en estudios previos utilizando el protocolo Ovsynch en vaquillonas en días desconocidos del ciclo (entre 35,1 y 71,4%; Pursley et al. 1997; Callejas et al. 1999; Calá et al. 2000 a; Stevenson et al. 2000; Calá et al. 2001 y en prensa; Cavestany et al. 2002).

Por otra parte, el hecho de que no existan diferencias en los resultados de preñez cuando se consideran todos los animales tratados, resulta de importancia desde el punto de vista práctico, indicando que tanto 11 como 3 días posteriores a un tratamiento con doble dosis de prostaglandina separadas por 11 días, son momentos adecuados para el inicio del protocolo Ovsynch.

La similitud entre los porcentajes de preñez de ambos grupos experimentales difiere de lo observado por Calá et al. (2001), donde los mejores resultados se obtuvieron en los animales sin cuerpo lúteo funcional al inicio del tratamiento. Es probable que, en dicho estudio y

dentro del grupo con cuerpo lúteo funcional, se hayan encontrado presentes vaquillonas del día 15 del ciclo, las cuales de acuerdo a lo postulado por Moreira et al. (2000) podrían presentar una respuesta deficiente al tratamiento Ovsynch y afectar negativamente los resultados de preñez. En el presente trabajo, no existirían vaquillonas con estas características debido a los tratamientos con prostaglandinas aplicados previo al método Ovsynch.

En un estudio reciente, realizado en vacas lecheras tratadas con Ovsynch (Vasconcelos et al. 2001), se informó que la ovulación de un folículo más pequeño (11,5 mm) resultó en un cuerpo lúteo de menor tamaño y menores concentraciones de progesterona post-tratamiento, como así también en un porcentaje de preñez inferior respecto del grupo control (folículo de 14,5 mm). Estos autores plantearon que la reducción de la fertilidad se produciría fundamentalmente a causa de los bajos niveles de progesterona, los que alterarían el desarrollo del nuevo embrión. La existencia de una relación positiva entre niveles de progesterona post-IA y preñez también ha sido observada por Butler et al. (1996). En consecuencia, estas consideraciones permitirían inferir que el bajo porcentaje de preñez obtenido en las vaquillonas con folículos  $\leq 11$  mm sería producto de la formación de un cuerpo lúteo de menor funcionalidad.

Con respecto a la relación entre manifestación de celos y porcentaje de preñez, probablemente el menor diámetro del folículo presente al día 9 registrado en las vaquillonas no detectadas en celo (9,6 vs 13,7 mm) haya generado este resultado, como fue discutido anteriormente. En otros estudios se han obtenido porcentajes de preñez de entre 50 y 83,3% en vaquillonas que presentaron celo y entre 16,7 y 66,7% en las que el celo no fue detectado (Callejas et al. 1999; Calá et al. 2000 b y datos inéditos). Si bien algunos investigadores han informado similitud entre los porcentajes de preñez de los animales con y sin manifestación de celo (Roy y Twagiramungu, 1997; Calá et al. 2000 b), la

variabilidad mencionada, a la que se suma lo observado en el presente estudio, requerirá de nuevas investigaciones.

## CONCLUSIÓN

La utilización de dos tratamientos con doble dosis de prostaglandina separadas por 11 días, para generar presencia (11 días post-segunda PGF2a) o ausencia (3 días post-segunda PGF2a) de cuerpo lúteo funcional al inicio del protocolo Ovsynch en vaquillonas lecheras produce respuestas ováricas similares en cuanto a ovulación luego de la primera y segunda inyección de buserelina, sincronización de la fase luteal y luteólisis, lo que explicaría la similitud entre los porcentajes de preñez de ambos grupos. Se requerirá de nuevos estudios para evaluar la influencia de los niveles de progesterona en plasma generados durante el tratamiento y el tamaño del folículo dominante al día 9 sobre los porcentajes de preñez.

## BIBLIOGRAFÍA

- Butler W.R., Calaman J.J., Beam S.W. 1996. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 74: 858-865.
- Calá M., Callejas S., Catalano R., Ersinger C., Cabodevila J., Teruel M. 2000 a. Control del ciclo estral e inseminación artificial sistemática en vaquillonas lecheras tratadas con buserelina y tiaprost. *Therios* 29: 21-25.
- Calá M., Callejas S., Catalano R., Ersinger C. 2000 b. Efectos de la administración de Buserelina sobre el control del ciclo estral y porcentaje de preñez en vaquillonas lecheras. Uso de diferentes dosis en el tratamiento Ovsynch. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 20 (Supl. 1): 273.
- Calá M.V., Callejas S.S., Catalano R.C., Ersinger C. 2001. Uso de diferentes dosis de buserelina en vaquillonas lecheras tratadas con el método Ovsynch. *InVet* 3: 39-47.

- Calá M.V., Callejas S.S., Catalano R.C., Ersinger C. 2002. Aplicación del protocolo Ovsynch con diferentes dosis de busarelina en vaquillonas lecheras. *Agro-Ciencia (Chile) - En prensa-*
- Callejas S., Ersinger C., Cabodevila J., Catalano R., Teruel M., Calá M. 1999. Uso de análogos sintéticos de la Hormona Liberadora de Gonadotrofinas y de la Prostaglandina F2a para realizar una Inseminación Artificial Sistemática. *Taurus* 1: 4-8.
- Callejas S., Ersinger C., Cabodevila J., Catalano R., Teruel M. 2001. Control del ciclo estral en vaquillonas Holando Argentino: uso de GnRH y PGF2a. Resúmenes IV Simposio Internacional de Reproducción Animal. Huerta Grande, Córdoba, Argentina, p 240.
- Callejas S., Alberio R., Cabodevila J., Dulout F., Aller J., Catalano R. 2002. Evaluación de la administración de diferentes dosis de progesterona para controlar la onda de crecimiento folicular en vacas cíclicas. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 22 (Supl. 1): 285.
- Cavestany D., Negrin N., Negrin R., Groth F. 2002. Response of beef heifers and non-suckling beef cows to different oestrous synchronization protocols. *Anim. Sci.* 74: 547-552.
- Colazo M.G., Illuminati H., Schmidt E., Bartolomé J., Bo G.A. 1999. Control del ciclo estral con un agonista de GnRH y PGF en vacas de carne con cría al pie. Resúmenes III Simposio Internacional de Reproducción Animal, Villa Carlos Paz, Argentina, p 190.
- Ginther O.J. 2000. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim. Reprod. Sci.* 61:60-79.
- Ginther O.J., Beg M.A., Bergfelt D.R., Donadeu F.X., Kot K. 2001. Follicle selection in monovular species. *Biol. Reprod.* 65: 638-647.
- Martinez M. F., Adams G. P., Bergfelt D. R., Kastelic J. P., Mapletoft R. J. 1999. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 57: 23-33.
- Moreira F., de la Sota R. L., Díaz T., Thatcher W. W. 2000. 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.
- Pursley J. R., Mee M. O., Brown M. D., Wiltbank M. C. 1994. Synchronization of ovulation in dairy cattle using GnRH and PGF2a. *J. Dairy Sci.* 77 (Suppl. 1): 230.
- Pursley J.R., Mee M.O., Wiltbank M.C. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2a and GnRH. *Theriogenology* 44: 915-923.
- Pursley J. R., Wiltbank M. C., Stevenson J. S., Ottobre J. S., Garverick H. A., Anderson L. L. 1997. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J. Dairy Sci.* 80: 295-300.
- Richards M.W., Spitzer J.C., Warner M.B. 1986. Effect of varying levels of postpartum nutrition and body condition at calving on subsequent reproductive performance in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 62: 300-306.
- Roy G.L., Twagiramungu H. 1997. Relationship between onset of estrus, time of GnRH administration and time of AI after Prostaglandin-induced luteolysis in cattle. *Theriogenology* 47: 150.
- SAS Institute Inc., SAS/STAT<sup>®</sup>, 1989. User's Guide, Versión 6, Fourth Edition, Volumen 2, Cary, NC; SAS Institute Inc., p 846.
- Silcox R.W., Powel K.L., Kiser T.E. 1993. Ability of dominant follicles (DF) to respond to exogenous GnRH administration is dependent on their stage of development. *J. Anim. Sci.* 71 (Suppl. 1): 219.
- Silcox R.W., Powell K.L., Pursley J.R., Wiltbank M.C. 1995. Use of GnRH to synchronize ovulation in Holstein cows and heifers treated with GnRH and Prostaglandin. *Theriogenology* 43: 325.

- Stevenson J.S., Smith J.F., Hawkins D.E. 2000. Reproductive outcomes for dairy heifers treated with combinations of Prostaglandin F2a, Norgestomet, and Gonadotropin-Releasing Hormone. *J. Dairy Sci.* 83: 2008-2015.
- Thatcher W.W., Macmillan K.L., Hansen P.J., Drost M. 1989. Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology* 31: 149-164.
- Twagiramungu H., Guilbault L.A., Proulx J., Villeneuve P., Dufour J.J. 1992. Influence of an agonist of Gonadotropin-Releasing Hormone (Buserelin) on estrus synchronization and fertility in beef cows. *J. Anim. Sci.* 70: 1904-1910.
- Twagiramungu H., Guilbault L.A., Proulx J.G., Dufour J.J. 1994. Influence of corpus luteum and induced ovulation on ovarian follicular dynamics in postpartum cyclic cows treated with Buserelin and Cloprostenol. *J. Anim. Sci.* 72: 1796-1805.
- Twagiramungu H., Roy G.L., Laverdière G., Dufour J.J. 1995. Fixed-time insemination in cattle after synchronization of estrus and ovulation with GnRH and Prostaglandin. *Theriogenology* 43: 341.
- Vasconcelos J.L.M., Silcox R.W., Rosa G.J.M., Pursley J.R., Wiltbank M.C. 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 J.L.M., Sartori R., Oliveira H.N., Guenther J.G., Wiltbank M.C. 2001. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 56: 307-314.

