



**UNIVERSIDAD DE CHILE**



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE GONADOTROFINA  
CORIÓNICA EQUINA EN EL DIESTRO SOBRE LA  
ACTIVIDAD LUTEAL EN VACAS LECHERAS DE ALTA  
PRODUCCIÓN**

**GABRIELLA VERENA GONELLA SCHLÖR**

Memoria para optar al  
Título Profesional de  
Médico Veterinario  
Departamento de  
Fomento de la  
Producción Animal

**SANTIAGO, CHILE  
2010**

A mis padres; por su eterno apoyo y motivación, por hacerme la persona que soy, por dejarme conocer tantas cosas lindas en la vida que hoy son tan importantes y me definen. Por enseñarme a no rendirme jamás. Por representar los pilares y las vigas.

A Oliver, por disipar las sombras y la oscuridad. Por el camino recorrido y el que se asoma. Por mostrarme que todo se puede, que no existen tales cosas como las locuras. Por enseñarme la bondad y el amor incondicional.

# ÍNDICE

Resumen	5
Abstract	8
Introducción	10
Revisión bibliográfica	12
Importancia económica de la fertilidad y las pérdidas embrionarias en rebaños lecheros	12
Patrones hormonales de la vaca lechera durante el inicio de la preñez y pérdida de la gestación	13
Inicio de la gestación y el rol de la progesterona	15
Mecanismos de acción de la progesterona	17
Estrategias para favorecer la mantención de la gestación temprana	19
• Progesterona exógena	20
○ Efecto de la suplementación de progsterona en el período entre la fase luteal temprana y media	21
○ Efecto de la suplementación de prgesterona en la fase luteal tardía	21
○ Efecto de la suplementación de progesterona según nivel de concentración sistémica de progesterona	22
• Sustancias estimuladoras de la función luteal	23
• Gonadotrofina coriónica equina (eCG)	26
Utilidad práctica y económica del uso de sustancias luteinizantes durante el período embrionario temprano	28

Hipótesis	30
Objetivo general	30
Objetivos específicos	30
Material y métodos	31
Resultados y discusión	36
1. Número de cuerpos lúteos	36
2. Diferencia de volumen luteal	38
3. Concentraciones de progesterona sérica	43
Implicancias	51
Conclusiones	53
Bibliografía	54

## RESUMEN

El aumento en la producción lechera se ha asociado a un progresivo descenso en el rendimiento reproductivo de los rebaños. La mortalidad embrionaria en este tipo de sistemas es particularmente alta. Una estrategia para mejorar la sobrevivencia embrionaria es aumentar los niveles de progesterona, ya sea a través de la administración de fuentes exógenas de progesterona o indirectamente a través de la administración de hormonas luteinizante. Los resultados de estas estrategias han sido inconsistentes. La administración de gonadotropina coriónica equina (eCG) en el diestro a vaquillas de carne ha mostrado aumentar los niveles de progesterona sérica y la fertilidad. No es claro si este efecto puede lograrse en vacas lecheras en lactancia

Este estudio tuvo como objetivo determinar los efectos de la administración de eCG en el diestro sobre la actividad luteal en vacas lecheras de alta producción. Para esto, se eligieron 50 vacas Holstein lactantes de segunda o más lactancias, pertenecientes a una lechería de alta producción de la Comuna de Curacaví, en la Región Metropolitana. Siete días después de la inseminación se realizó ultrasonografía transrectal a los ovarios para determinar el número de cuerpos lúteos y sus medidas con el fin de obtener el volumen luteal, y se tomó una muestra de sangre para la posterior determinación de progesterona sérica. Inmediatamente después, la mitad de las vacas recibió 500 UI de eCG (2,5 mL IM de Folligon®, Schering Plough-Intervet) mientras que a la otra mitad se le administró 2,5 mL IM de solución salina. Siete días después se realizó el mismo procedimiento en ambos grupos. El análisis de la información se realizó utilizando el programa estadístico SAS. El eventual cambio en el número de cuerpos lúteos entre el día 7 y 14 en animales tratados y controles se analizó por una regresión de Poisson. La diferencia en el volumen luteal en el periodo en estudio se determinó por pruebas de t. Las concentraciones de progesterona fueron analizadas a través de un análisis de varianza para medidas repetidas,

considerando los efectos de tratamiento, número de la lactancia, producción de leche el día de la inseminación y producción acumulada al día 60 de lactancia.

No se observaron diferencias significativas en el número de cuerpos lúteos entre el día 7 y 14 en vacas controles y tratadas. En las controles, tres vacas tenían 2 cuerpos lúteos al inicio del estudio, número que se mantuvo al día 14. En las tratadas hubo una vaca con dos cuerpos lúteos al día 7, lo que aumentó a 3 vacas el día 14 ( $p=0,30$ )

El volumen luteal total inicial (día 7) fue de  $13,91\pm 3,77 \text{ cm}^3$  en el grupo control y de  $12,18\pm 3,97 \text{ cm}^3$  en el grupo tratado. El día 14, los volúmenes luteales fueron  $16,04\pm 3,8 \text{ cm}^3$  y  $16,01\pm 4,06 \text{ cm}^3$  para vacas controles y tratadas, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en el cambio de volumen luteal entre el día 7 y 14 en vacas controles y tratadas. Sin embargo, al estudiar la interacción entre tratamiento y número de lactancia se observó un aumento significativo en el volumen luteal en vacas tratadas de segunda lactancia ( $p=0,05$ ).

Las concentraciones séricas de progesterona no fueron afectadas por el tratamiento. Las concentraciones iniciales fueron de  $4,16\pm 3,92 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  para vacas controles y de  $3,26\pm 0,79 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  para las tratadas ( $p=0,28$ ). El día 14 las concentraciones fueron de  $6,05\pm 3,72 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  y de  $6,29\pm 2,42 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  para controles y tratadas, respectivamente. No se observaron efectos significativos del número de la lactancia ni de la producción de leche.

En general, la administración de eCG 7 días después de la inseminación no indujo un mayor volumen luteal o mayores concentraciones de progesterona. Esta inconsistencia con resultados anteriores puede deberse a que el tratamiento es menos efectivo en vacas Holstein lactantes de alta producción en comparación a vaquillas de carne. La alta producción de leche y el consiguiente mayor flujo sanguíneo hepático contribuyen a una mayor metabolización de los esteroides ováricos. Si bien en general hubo una tendencia a un aumento en el volumen luteal en vacas tratadas con eCG, el que fue significativo en vacas de segunda

lactancia, esto no se vio reflejado en mayores concentraciones de progesterona, debido probablemente a una mayor metabolización del esteroide.

## **ABSTRACT**

The continued increase in milk production has been associated with a progressive decrease in the reproductive performance of the herds. Under intensive management, embryo mortality is particularly high. One strategy to improve embryo survival is increasing progesterone levels, either through the administration of exogenous progesterone or indirectly by the administration of luteinizing hormones. The outcomes of these strategies are inconsistent. Administration of equine chorionic gonadotropin (eCG) at diestrus in beef heifers has shown to increase serum progesterone concentrations and fertility. It is not clear if this effect can be obtained in lactating dairy cows.

The aim of this study was to determine the effects of eCG administration at diestrus on luteal activity in high-producing dairy cows. Fifty lactating Holstein cows, in second or more lactation, from a dairy farm located in Curacavi County, Metropolitan Region, were chosen. Seven days after insemination the ovaries were examined by transrectal ultrasonography in order to determine the number and of corpora lutea. Corpora lutea were also measured to determine luteal tissue volume and a blood sample was collected to subsequent progesterone determination. Immediately after, half of the cows received 500 IU eCG (2.5 mL IM Folligon®, Schering Plough-Intervet) while the other half received 2.5 mL IM saline solution. The same procedure was repeated 7 days after in both groups. Data analysis was performed by using SAS statistical package. Change in the number of corpora lutea between days 7 and 14 was analyzed by Poisson regression. Differences in luteal volume in the study period were determined by t tests. Progesterone concentrations were analyzed by a repeated measures analysis of variance, considering the main effects of treatment, parity, milk production at insemination day and cumulated milk production at 60 days in milk.

No significant differences were observed in the number of corpora lutea between days 7 and 14 in control and treated cows. Within control cows, 3 of them had 2

corpora lutea at the beginning of the study, which was the same at day 14. In eCG-treated cows, there was one cow with 2 corpora lutea at day 7 and 3 cows at day 14 ( $p=0.30$ ).

The initial total luteal volume (day 7) was  $13.91\pm 3.77 \text{ cm}^3$  in the control group and  $12.18\pm 3.97 \text{ cm}^3$  in the treated group. At day 14, luteal volumes were  $16.04\pm 3.8 \text{ cm}^3$  and  $16.01\pm 4.06 \text{ cm}^3$  for control and treated cows, respectively. No significant differences in the change of luteal volume between control and treated cows were observed. However, the interaction between treatment and parity had a significant effect, where treated cows in second lactation showed a higher luteal volume ( $p=0.05$ ).

Serum progesterone concentrations were not affected by the treatment. Initial concentrations were  $4.16\pm 3.92 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  for control cows and  $3.26\pm 0.79 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  for treated cows ( $p=0.28$ ). At day 14, progesterone concentrations were  $6.05\pm 3.72 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  and  $6.29\pm 2.42 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  for control and treated cows, respectively. No significant effects of parity and milk production on progesterone concentrations were observed.

Generally, eCG administration 7 days after insemination did not affect luteal volume or progesterone concentrations in Holstein cows. This inconsistency with previous results can be due to this treatment is less effective in high-producing lactating Holstein cows as compared to beef heifers. High milk production and the resulting higher blood flow to the liver produce a greater metabolization of ovarian steroids, namely progesterone. A tendency towards a higher luteal volume in eCG-treated cows was observed, which was significant in second lactation cows. However, this increase was not followed by an increase in progesterone concentrations, probably due to a greater steroid metabolization.

## INTRODUCCIÓN

El aumento observado en la producción de leche en sistemas de producción intensivos, basados en vacas de elevado rendimiento lácteo, ha sido asociado en diversos estudios a una disminución en la fertilidad de los rebaños. La baja fertilidad es uno de los principales problemas reportados en los planteles de alta producción, ya que afecta directamente la producción de leche y la disponibilidad de hembras de reemplazo y, consiguientemente, el éxito económico de la empresa.

Para enfrentar estos problemas y mejorar la fertilidad de los rebaños lecheros se han desarrollado diversas estrategias. Entre éstas, por ejemplo, existen programas para facilitar e incluso obviar la detección de celos, lográndose así inseminar una mayor proporción de vacas. Un problema reproductivo particularmente importante es la alta presencia de mortalidad embrionaria temprana en las vacas inseminadas. Se han descrito varios factores relacionados con la mortalidad embrionaria, siendo uno de los principales la alta tasa de metabolización de esteroides sexuales en el hígado de la vaca de alta producción, lo que lleva a una disminución de las concentraciones sanguíneas de progesterona.

Existen pocas estrategias enfocadas a mejorar la sobrevivencia del embrión. Una de ellas es proporcionar fuentes adicionales de progesterona, ya sea exógena a través de implantes, o endógena a través del uso de hormonas luteinizantes como GnRH o hCG, al inicio de la fase luteal. Sin embargo, el efecto de estas intervenciones sobre la fertilidad no ha sido consistente.

La gonadotropina coriónica equina (eCG) es una hormona con un efecto paradójico, ya que en el bovino tiene acción principalmente de tipo FSH; es decir, estimula el crecimiento folicular, pero además tiene acción de LH, causando luteinización u ovulación de los folículos. La eCG ha sido usada para estimular el

crecimiento del (los) folículo (s) preovulatorio (s), y generar superovulación. Hasta ahora, no se ha utilizado rutinariamente como estimulador de la función luteal.

Se dispone de una cantidad limitada de estudios experimentales, donde se ha evaluado la acción de la eCG como agente luteotrófico en vacas. En estos trabajos se ha observado que al administrar 500 UI de la hormona en el diestro temprano (día 5) se obtienen tendencias de aumento en los niveles séricos de progesterona, número de cuerpos lúteos y fertilidad a la inseminación artificial (IA).

Estas investigaciones se han hecho en vaquillas, de razas de doble propósito y con un número muy bajo de animales. En consecuencia, no es claro si sus resultados son extrapolables a vacas lactantes de alta producción.

Por estas razones se llevó a cabo este estudio, en que se pretende evaluar el efecto de la administración de eCG posterior a la inseminación sobre las concentraciones séricas de progesterona en vacas Holstein de alta producción.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Importancia Económica de la Fertilidad y Pérdidas Embrionarias en Rebaños Lecheros

La eficiencia reproductiva representa un impacto mayor en el retorno económico de la industria lechera. Estimaciones recientes indican que el valor promedio de una preñez es de alrededor de USD 278, en rebaños de alta producción lechera en los Estados Unidos de América, mientras que el costo de una pérdida en la gestación, es decir de un caso de aborto o mortalidad embrionaria, es sustancialmente mayor, alcanzando valores de hasta USD 555. A medida que mejora la eficiencia reproductiva, disminuyen los días en leche del rebaño, es decir, se posee un rebaño con un menor promedio de días postparto, y un mayor porcentaje de las vacas se encuentran en la etapa temprana de la lactancia, lo que incrementa la producción diaria promedio. Mediante análisis de sensibilidad, se ha demostrado que una mayor probabilidad de preñez, una mayor persistencia de la producción láctea y un menor costo de reemplazo de vaquillas, disminuyen el valor promedio de una gestación (De Vries, 2006).

La mortalidad embrionaria en rebaños de vacas productoras de leche es un impedimento importante para lograr una eficiencia reproductiva adecuada. La ultrasonografía ha posibilitado un diagnóstico certero de la gestación en períodos tan tempranos como el día 25 posterior a la IA, facilitando el estudio de la mortalidad embrionaria/fetal a partir de este momento. En la mayoría de los rebaños lecheros, la tasa de concepción cambia de un 50% cuando el diagnóstico de gestación se realiza el día 28 a un 30% al diagnosticar el día 50 posterior a la inseminación artificial, pese a que las tasas de fertilización en vacas lecheras son de un 76% en promedio (Santos *et al.*, 2004). En vaquillas, sólo un 55% de las inseminaciones resultaron en el establecimiento y mantención de la preñez a término, a pesar de tener tasas de fertilización de 90-95% (Diskin *et al.*, 2006). Esta información ha permitido una estimación de pérdida de preñeces desde la inseminación hasta el parto cercana a un 60% (Santos *et al.*, 2004).

## **Patrones Hormonales de la Vaca Lechera durante el Inicio de la Preñez y Pérdida de la Gestación**

Uno de los principales problemas en los sistemas de producción lechera es la baja fertilidad de los rebaños, evidenciada entre otras cosas por un aumento en el número de servicios para lograr una preñez (Thatcher *et al.*, 2006). Las tasas de fertilización en bovinos generalmente son altas, variando entre 80 y 90% (Diskin y Morris, 2008). Sin embargo, la tasa de mortalidad embrionaria puede ser muy elevada, lo que explicaría la baja fertilidad constatada en algunos rebaños.

La mortalidad embrionaria se refiere a las pérdidas embrionarias ocurridas durante el período comprendido desde la fertilización hasta el momento en el que se completa la etapa de diferenciación. Esto último ocurre en la vaca el día 45 aproximadamente (Committee on Bovine Reproductive Nomenclature, 1972).

Las pérdidas embrionarias parecen ser más elevadas durante los primeros 20 días de gestación, con el mayor porcentaje de ellas (70-80%), concentrado entre los días 8 y 16 de gestación (Sreenan *et al.*, 2001; Diskin y Morris, 2008). Esta cifra se ha incrementado persistentemente en los últimos años, aumentando desde valores de aproximadamente 28% de mortalidad embrionaria en 1980, hasta valores cercanos a un 43% o incluso mayores, el año 2006 (Beltman *et al.*, 2009). La principal causa que explicaría los altos valores de mortalidad embrionaria en vacas lecheras de alta producción, sería el menor nivel circulante de hormonas esteroidales, particularmente progesterona, debido a un mayor metabolismo de ellas producto de una alta tasa metabólica (Sangsrivong *et al.*, 2002; Perry y Perry, 2009).

La progesterona es la hormona esencial en el establecimiento y la mantención de la preñez (Spencer y Bazer, 2002). La pérdida embrionaria temprana está fuertemente ligada a la alta tasa metabólica de las vacas de alta producción, lo que genera una rápida metabolización de esteroides, especialmente de

progesterona, por parte del hígado. Varios estudios en vacas lecheras han demostrado que las concentraciones periféricas, tanto de progesterona como de estradiol, disminuyen al aumentar la ingesta de alimentos, debido a un incremento en la tasa metabólica de los esteroides, que está relacionada con el flujo sanguíneo hepático (Larson *et al.*, 1997; Sangsritavong *et al.*, 2002). Así también, pareciera que el flujo sanguíneo hepático se mantiene elevado en vacas de alta producción, lo que resultaría en menores concentraciones periféricas de progesterona, aumentando el riesgo de muerte embrionaria (Morris y Diskin, 2007). Se ha observado un aumento agudo del flujo sanguíneo y de la tasa de *clearance* metabólico para progesterona y estradiol, en vacas lecheras lactantes y no lactantes que son alimentadas por sobre sus requerimientos de mantención. Un mayor consumo de alimento reduce la progesterona sérica durante la fase luteal o durante el tratamiento con progesterona exógena. Además, este factor limitante es más importante en vacas lecheras que en vacas de carne (Rhinehart *et al.*, 2009). Esto último se explica por su situación de lactantes y más aún por su condición genética, la que las predispone a alta producción láctea.

Las tasas de pérdida embrionaria y muerte fetal alcanzan valores de aproximadamente 40% para vacas de mediana producción, comparado con un 56% observado en vacas de alta producción (Stronge *et al.*, 2005). Así, este factor limitante de la fertilidad es más importante en vacas de alta producción lechera que en vacas de medianos y bajos niveles productivos. La concentración periférica de progesterona durante la gestación temprana tiene un efecto significativo sobre la sobrevivencia del embrión (Beltman *et al.*, 2009). Se ha observado una relación positiva entre la concentración de progesterona en la leche durante los días 5, 6 y 7 post IA, así como del nivel de cambio en la concentración de progesterona entre los días 4 y 7 post IA, con la tasa de supervivencia embrionaria. Estos mismos datos muestran que el 75% de las vacas lecheras poseen una concentración de progesterona adecuada para la concepción al días 5, un 72% al día 6 y sólo un 56% de las vacas lecheras poseen una concentración de progesterona adecuada para la concepción al 7 postinseminación (Stronge *et al.*, 2005). Así, de estos resultados se desprende que bajos niveles de progesterona los días 5 a 7

posteriores a la inseminación se asocian con menores niveles de fertilidad en vacas lecheras.

Bajas concentraciones de progesterona el día 5 post ovulación (Shelton *et al.*, 1990; Larson *et al.*, 1997) o un retraso en el ascenso normal de la progesterona entre los días 4 y 5 posteriores a la ovulación (Larson *et al.*, 1997; Starbuck *et al.*, 2001), se han asociado a una reducción en las tasas de preñez. Por otra parte, las concentraciones sistémicas de progesterona muy altas o muy bajas, tanto durante el ciclo previo como en el posterior a la inseminación, están relacionadas negativamente con la tasa de supervivencia embrionaria (Morris y Diskin, 2007).

De acuerdo a los antecedentes expuestos, existe evidencia de que en los días 5, 6 y 7 post IA, una proporción importante de las vacas presentan concentraciones de progesterona debajo del óptimo (Stronge *et al.*, 2005).

En conclusión, podría afirmarse que tanto concentraciones de progesterona menores como superiores al óptimo son perjudiciales para la fertilidad, al igual que una inadecuada tasa de aumento de sus concentraciones entre los días 4 y 7 post IA. Estos factores se asocian de manera negativa con la supervivencia embrionaria. Sin embargo, las concentraciones bajas de progesterona parecen ser el problema más comúnmente relacionado con la baja fertilidad en ganado bovino lechero (Stronge *et al.*, 2005). Ante esto, podría ser útil contar con mecanismos que permitan aumentar las posibilidades de tener altas concentraciones de progesterona en la gestación temprana, cuando el cuerpo lúteo es la única fuente de esta hormona.

### **Inicio de la Gestación y el Rol de la Progesterona**

Tras la ocurrencia de la fertilización en el oviducto el embrión sigue su camino hacia el útero, lugar al que llega con aproximadamente 8 a 16 células, alrededor del día 3 o 4 posterior a la fertilización. A partir del día 5 o 6 se inicia el proceso en

el que el embrión, ahora de unas 16 a 32 células, comienza a compactarse para formar la mórula (Morris y Diskin, 2007). Esta es la primera etapa crítica del desarrollo embrionario, y representa un paso esencial para la diferenciación y formación del blastocisto (Larue *et al.*, 1994). El día 8 comienza la formación del blastocele y la diferenciación de las ahora 120 células embrionarias en una masa celular interna, y el trofoectoderma), que darán origen al feto y a los tejidos placentarios, respectivamente. Luego, alrededor de los días 9 y 10, el blastocisto sale de la zona pelúcida. Hasta ese momento el embrión permanece relativamente estable en su forma esférica y tamaño; sin embargo, tras la formación del blastocisto y la ruptura de la zona pelúcida, siguiendo con el proceso de expansión, el embrión comienza a mutar desde su forma esférica a una ovoide, para finalmente tomar una forma elongada alrededor de los días 13 a 16. El diámetro embrionario también aumenta. A grandes rasgos, el embrión ha cursado unas 300 divisiones celulares, desde el estado de mórula a blastocisto el día 16. Hasta este momento, el embrión bovino es dependiente del ambiente oviductal y uterino para proveerse de un adecuado aporte de nutrientes, entre ellos, aminoácidos, iones, y factores de crecimiento, pero alrededor del día 19 comienza el proceso de implantación. Ésta se expresa con puntos de unión carúncula-cotiledón, detectables desde el día 21 aproximadamente, para completarse este proceso alrededor del día 42 (Morris y Diskin, 2007).

Conjuntamente con este rápido desarrollo, aumentan los requerimientos de sustratos energéticos por parte del embrión, especialmente de glucosa y aminoácidos, las unidades primarias de las proteínas y ácidos nucleicos, que el embrión desarrolla exponencialmente en este período (Morris y Diskin, 2007). Expresado en base a energía por unidad de proteína generada, la etapa previa al día 14 tiende a mostrar una mayor tasa de metabolismo embrionario que la de los embriones al día 15 o 16 (Morris *et al.*, 2002)

Así, se observa que coincidentemente con el período de mayor pérdida embrionaria, se encuentra el período de mayores cambios en el crecimiento y desarrollo embrionario, caracterizado por un aumento exponencial en el tamaño y

en el contenido de proteína y un *peak* aparente en la actividad de síntesis. Este período está también caracterizado por cambios críticos en la morfología embrionaria, en particular en las fases de compactación, formación del blastocisto y elongación (Morris y Diskin, 2007).

Tras la fertilización, aspectos como el desarrollo del cuerpo lúteo, el crecimiento folicular, y las concentraciones de progesterona y de estradiol, influyen en la sobrevivencia del embrión y la mantención del cuerpo lúteo. El desarrollo luteal resulta en la secreción de progesterona, la que favorece el desarrollo del embrión, la producción de interferón-tau (IFN-tau) y la inhibición de la cascada luteolítica (Bartolomé *et al.*, 2005). En general, las concentraciones altas de progesterona durante la etapa temprana de la gestación, se asocian a un mayor desarrollo embrionario, que, a su vez, lleva a incrementar los niveles de síntesis de IFN-tau y consecuentemente a un aumento en la tasa de preñez (Beltman *et al.*, 2009). Este mayor nivel de progesterona debe encontrarse siempre dentro de rangos normales, ya que, como fue mencionado, los niveles excesivos pueden ser también tan perjudiciales para la sobrevivencia del embrión.

### **Mecanismos de Acción de la Progesterona**

El reconocimiento materno de la preñez en el bovino es generado por un estímulo paracrino del embrión, que inhibe la liberación pulsátil de PGF2 $\alpha$  y asegura la mantención de un cuerpo lúteo funcional, que va a producir y liberar progesterona, hormona que a su vez va a favorecer la mantención del embrión ya presente (Hirako *et al.*, 1995). También se ha demostrado que la progesterona afecta de manera positiva el crecimiento y desarrollo del conceptus bovino (Diskin y Morris, 2008).

La progesterona, actuando a través de sus receptores y cofactores dirige las interacciones moleculares, bioquímicas y fisiológicas en el útero, que afectarán el crecimiento, desarrollo y viabilidad embrionaria (Spencer *et al.*, 2004). La acción de

la progesterona puede ser mediada tanto por un efecto directo como indirecto. Para que se produzca un efecto directo sobre el embrión, éste debe tener presentes los receptores para progesterona (PGRs). Hou y Gorski (1993) no detectaron PGRs en embriones de ratón hasta la etapa de blastocisto. Aparentemente, no hay reportes que muestren la expresión de PGRs en embriones bovinos en etapas tempranas. Además, hay poca o ninguna evidencia de algún efecto de la progesterona sobre embriones bovinos producidos *in-vitro*. La ruta más probable por la cual la progesterona afecte la supervivencia embrionaria es a través de un efecto indirecto en el útero (Morris y Diskin, 2007).

El efecto indirecto de la progesterona se genera como resultado de la unión de la hormona a los PGRs presentes en el estroma uterino o en el endometrio, lo que iniciaría una cascada de eventos, incluyendo cambios en la expresión de genes (y finalmente la expresión de proteínas) o cambios en la permeabilidad uterina a iones, aminoácidos o metabolitos del plasma, por medio de efectos no genéticos en el endometrio uterino (Morris y Diskin, 2007).

En el ganado bovino, se ha demostrado que la concentración sistémica de progesterona tiene un efecto en el volumen de las secreciones uterinas, la tasa de desarrollo del *conceptus*, la habilidad del embrión para producir la sustancia inhibidora de la luteolisis, el IFN-tau, y del desarrollo de la señal luteolítica, PGF2 $\alpha$  (McNeill *et al.*,2006). Los resultados obtenidos por Perry y Perry (2009), indican que las vacas con concentraciones de progesterona elevadas más tempranamente en el ciclo estral presentaron embriones más avanzados en su desarrollo. Estos embriones tuvieron una mayor capacidad de producir IFN-tau.

A la luz de estos antecedentes, varios estudios se han enfocado en proponer mecanismos que mantengan elevadas las concentraciones de progesterona sanguínea durante los primeros días después de la IA, con el fin de disminuir el porcentaje de mortalidad embrionaria temprana y consecuentemente lograr aumentar las tasas de concepción evaluadas al momento del diagnóstico de

preñez. Este objetivo se podría lograr administrando progesterona exógena, o estimulando al cuerpo lúteo para que se incremente la síntesis de progesterona.

No se ha observado un efecto beneficioso sobre la viabilidad del *conceptus* bovino, ni su tamaño, al suplementar progesterona desde el día 25. Sin embargo, cuando la suplementación se hace desde el día 3 posterior a la inseminación adelantada, se ha descrito un aumento en el tamaño del embrión al día 16. Ambas observaciones refuerzan la idea de que embriones de mayor tamaño alrededor de los días 13 y 15, podrían ser más efectivos en suprimir el mecanismo luteolítico (Beltman *et al.*, 2009).

Así, la progesterona podría ser crucial únicamente en potenciar el crecimiento embrionario para asegurar con esto la ocurrencia de una potente señal anti luteolítica (reconocimiento materno). Sin embargo, una vez que el reconocimiento materno ya ha ocurrido, la tasa de crecimiento embrionario es poco relevante en la mantención de la preñez (Beltman *et al.*, 2009).

Por lo tanto, cualquiera sea el mecanismo que aumente la concentración de progesterona, este aumento reforzaría la supresión de la actividad del miometrio, apoyando y estimulando con esto el desarrollo de la parte materna de la placenta, especialmente la función de las carúnculas, la secreción materna de nutrientes, factores de crecimiento y agentes inmunosupresores requeridos para un desarrollo embrionario/fetal exitoso y un reconocimiento de la preñez (López-Gatius *et al.*, 2004).

### **Estrategias para favorecer la Mantención de la Gestación Inicial**

Con el conocimiento de esta asociación entre mortalidad embrionaria y concentraciones bajas de progesterona, se han propuesto métodos que influyan sobre las concentraciones de esta hormona. Entre ellos se puede mencionar la administración de progesterona exógena, o el uso de sustancias luteinizantes o

estimuladoras del cuerpo lúteo, como hCG y GnRH, algunos días posterior a la IA, para lograr con ésto un aumento en la tasa de crecimiento del cuerpo lúteo (Perry y Perry, 2009) y/o la ovulación de un folículo dominante, con la consiguiente formación de un cuerpo lúteo accesorio (Stevenson *et al.*, 2007; Beltmann *et al.*, 2009). Estos métodos tienen como fin aumentar la concentración disponible de progesterona.

- Progesterona exógena:

La razón de la suplementación de progesterona en animales con bajas concentraciones post-ovulatorias de esta hormona, es crear o potenciar un ambiente embriotrófico que permita al embrión crecer, desarrollarse y sobrevivir, hasta que, por ejemplo, sea capaz de prevenir la luteólisis por medio de la síntesis y liberación de IFN-tau (Mann y Lamming, 2001).

La importancia de las concentraciones sistémicas de progesterona adecuadas durante el desarrollo embrionario temprano, es respaldada por varios estudios que incluyen la suplementación con progesterona exógena (Morris y Diskin, 2007). En general, los resultados entregados por estos estudios son comúnmente inconsistentes. Diskin y Sreenan (1980) efectuaron una revisión bibliográfica sobre los efectos diferenciales de la suplementación con progesterona en vacas con porcentajes de preñez bajos y normales, y el efecto del momento de la administración de progesterona sobre el resultado de la suplementación hormonal, en términos de tasas de preñez. Estos mismos autores, incluyeron en su revisión e hicieron referencia de trabajos anteriores de Herrik (1953), Dawson (1954) y Wiltbank *et al.* (1956), quienes que estudiaron los efectos de la suplementación intramuscular de progesterona en vacas con bajas tasas de preñez, los cuales mostraron un aumento consistente en las tasas de preñez tras la suplementación de progesterona, pero estos aumentos no fueron estadísticamente significativos en ninguno de los estudios (Morris y Diskin, 2007). Al analizar estos datos se obtuvo un aumento significativo en las tasas de preñez, desde un 23% en los animales control a un 42,5% en los grupos tratados (Morris y Diskin, 2007).

- Efecto de la suplementación de progesterona en el período entre la fase luteal temprana y la media:

La mayoría de los estudios en los que se administra progesterona entre los días 5 y 12 muestran incrementos de valores cercanos al 20% en las tasas de concepción, o incluso mayores. Por ejemplo, Johnson *et al.* (1958) administraron progesterona exógena por siete días, desde el 2 al 9 posterior a la IA, obteniendo una tasa de concepción de un 70% en el grupo tratado y un 42% en el control. Por otra parte, la inserción de un dispositivo liberador de progesterona (CIDR), durante los días 6, 7 u 8 post IA, se asoció con un aumento en los porcentajes de preñez, desde un 66% en animales control a un 79% en los tratados (López-Gatius *et al.*, 2004). En la misma línea, Robinson *et al.* (1989), utilizaron CIDR en vacas los días 5 a 12 tras la IA, logrando tasas de concepción de un 60% en los animales tratados *versus* valores cercanas al 30% en las vacas controles.

Adicionalmente, en vacas que presentaron baja concentración de progesterona en el día 5 posterior a la ovulación, la suplementación con progesterona desde ese momento fue capaz de aumentar las tasas de supervivencia embrionaria (Starbuck *et al.*, 2001). En este mismo estudio se reportó un aumento en la sobrevivencia embrionaria cuando las concentraciones de progesterona al día 5 eran mayores a  $3 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , pero menores a  $9 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Esto nuevamente apoya la teoría que indica que tanto concentraciones de progesterona deficitarias como excesivas alrededor de este periodo pueden ser perjudiciales.

- Efecto de la suplementación de progesterona en la fase luteal tardía:

Los resultados de diversos estudios permitirían concluir que no existen mejoras significativas en la fertilidad, tras la administración de progesterona en períodos que van entre el día 10 y el 20. Colectivamente, estos datos indican la importancia del momento en el que se instaura el tratamiento con progesterona para afectar

las tasas de concepción, y muestran que la suplementación temprana pareciera ser más efectiva con este fin. (Starbuck *et al.*, 2001).

- Efecto de la suplementación de progesterona según el nivel de concentración sistémica de progesterona:

Al administrar progesterona el día 5 posterior a la inseminación en vacas con bajas concentraciones sistémicas (1 a 2 ng\*ml<sup>-1</sup>) se observan aumentos significativos en la tasa de concepción, a veces incluso doblando los porcentajes de los animales no tratados. Sin embargo, la progesterona parece tener un efecto mínimo o incluso no tener efecto al ser administrada en vacas con concentraciones menores a 1 ng\*ml<sup>-1</sup> el día 5. Se ha sugerido que ovulaciones tardías podrían comprometer la sobrevivencia embrionaria previa al día 5 en estos casos. También se dispone de antecedentes que sugieren que no habría un efecto de la progesterona administrada el día 5, en vacas con concentraciones sistémicas de la hormona entre 2 y 3 ng\*ml<sup>-1</sup>. Este hecho podría indicar la existencia de un rango de concentraciones dentro del que los animales se beneficiarían con la administración de progesterona, y sobre el cual no se observarían efectos. Esta teoría se ve respaldada por evidencias de depresión en las tasas de concepción, cuando la concentración de progesterona excede los 9 ng\*mL<sup>-1</sup> el día 5 del ciclo. Se ha sugerido que este valor representa un límite superior para la progesterona, que de ser sobrepasado, ya sea de manera espontánea o por suplementación de progesterona, sería detrimental para la sobrevivencia embrionaria y podría causar muerte embrionaria por un excesivo estímulo al crecimiento, llevando a asincronías entre el embrión y su medio ambiente (Morris y Diskin, 2007). Así, para que la suplementación de progesterona sea exitosa en un sentido terapéutico, debe estar estratégicamente dirigida a animales con concentraciones de progesterona dentro de un rango en que sea factible obtener respuesta a la suplementación (Morris y Diskin, 2007).

- Sustancias estimuladoras de la función luteal

La LH u hormona luteinizante es, como su nombre lo dice, una hormona luteotrófica en el bovino. Por ésto se han utilizado estrategias que involucran la administración de LH bovina, preparaciones que contengan LH, gonadotrofina coriónica humana (hCG) o factor liberador de gonadotropinas (GnRH), para estimular la función luteal. La ovulación de folículos dominantes o la formación de cuerpos lúteos accesorios aumentarían los niveles de progesterona y reducirían la concentración de estradiol (Bartolomé *et al.*, 2005; Stevenson *et al.*, 2007).

El momento más temprano en el cual el folículo dominante posee el tamaño suficiente para responder a GnRH o hCG es alrededor del día 5 del ciclo (Diskin *et al.*, 2002). El cuerpo lúteo accesorio generado como resultado del tratamiento el día 5 aumenta la concentración plasmática desde el día 8, llegando a un nivel máximo los días 16-17 (Kerbler *et al.*, 1997). Existen otros estudios que no demuestran un efecto positivo consistente de la administración de GnRH durante la segunda onda folicular (Perry y Perry, 2009).

La hCG tiene la capacidad de unirse a los receptores para LH y ejercer una acción similar a esta hormona, aumentando los niveles de progesterona al estimular al cuerpo lúteo ya existente o estimulando la formación de cuerpos lúteos accesorios (Hirako *et al.*, 1995). Las vacas preñadas con cuerpos lúteos accesorios tienen mayor probabilidad de presentar altas concentraciones de progesterona plasmática que las vacas con un cuerpo lúteo único. Esto evidencia los efectos positivos de un cuerpo lúteo accesorio sobre la mantención de la gestación y refuerza la propuesta de que en vacas de alta producción láctea, las concentraciones de progesterona son inferiores a las óptimas durante el inicio de la gestación (Bech-Sàbat *et al.*, 2008). Ante ésto, las estrategias que induzcan la formación de un cuerpo lúteo accesorio, pueden colaborar incrementando las concentraciones de progesterona en vacas de alta producción láctea (Stevenson *et al.*, 2007; Bech-Sàbat *et al.*, 2008).

La inducción de cuerpos lúteos accesorios entre los días 4 y 9 posteriores al estro o post IA, se ha asociado a un mejoramiento en la tasa de concepción medida desde el día 25 de gestación hasta el 43. Este aumento en la tasa de concepción se explica por una mejor sobrevivencia embrionaria, como resultado de la progesterona adicional que resultó del CL accesorio (Santos *et al.*, 2001; Stevenson *et al.*, 2007).

Además de lo señalado anteriormente, se dispone de antecedentes que revelan que las vacas lecheras con un cuerpo lúteo accesorio espontáneo, tuvieron 1/8 de la probabilidad de sufrir pérdida fetal, en comparación a las vacas con sólo un cuerpo lúteo). Este efecto del cuerpo lúteo accesorio no estaría relacionado con la ocurrencia de preñeces dobles, ya que las vacas preñadas con mellizos tienen el triple de posibilidades de presentar pérdida de esa gestación, en relación a animales con una gestación simple (Stevenson *et al.*, 2008).

En algunos estudios se ha demostrado que la administración de GnRH o hCG tras la inseminación y en momentos coincidentes con la presencia de folículo(s) dominante(s) de la primera o segunda onda folicular, puede estimular la función luteal, inducir la formación de un cuerpo lúteo accesorio, aumentar el nivel de progesterona y reducir la síntesis de estradiol, lo que traería un efecto positivo sobre la sobrevivencia embrionaria (Bartolomé *et al.*, 2005; Stevenson *et al.*, 2007). Por ejemplo, la tasa de preñez de un grupo de vacas que recibieron hCG el día 6 postinseminación fue mayor (67,5%) que la del grupo control (45,0%) y que la de un grupo que recibió hCG el día 1 postinseminación (42,5%) (Thatcher *et al.*, 2006). En otro estudio, el tratamiento con un análogo de GnRH el día 7 posterior al estro en vacas de carne, produjo un incremento en el tamaño y número de células grandes del cuerpo lúteo, indujo la formación de cuerpo lúteo accesorio y aumentó los niveles de progesterona en vacas que no se encontraban ciclando. Un tratamiento con hCG el día 5 en vaquillas y vacas de lechería, y el día 6 en vacas de carne, indujo la formación de cuerpo(s) lúteo(s) accesorio(s) y aumentó los niveles de progesterona. La capacidad de inducción de cuerpos lúteos accesorios fue similar para ambas hormonas; sin embargo, el aumento en la

concentración de progesterona fue mayor en vaquillas de lechería tratadas con hCG el día 5 del ciclo estral, en comparación con el grupo tratado con el producto análogo a la GnRH (Bartolomé *et al.*, 2005). Stevenson *et al.* (2007) concluyeron que los tratamientos tanto con GnRh como con hCG, son efectivos en inducir la ovulación y aumentar el número de cuerpos lúteos, pero solamente en los animales tratados con hCG se observa un aumento en las concentraciones de progesterona.

El día 5 del ciclo estral, las células de la granulosa del folículo dominante contienen receptores para LH, de tal modo que la estimulación con hCG podría inducir la ovulación y la formación de cuerpos lúteos accesorios. Así, la administración de hCG 5 días después de la inseminación tiene el potencial de aumentar la secreción de progesterona durante el inicio de la gestación y de alterar la dinámica folicular de modo de generar tres ondas foliculares en el período cercano a la mantención del cuerpo lúteo (Díaz *et al.*, 1998). Al administrar 3.300 UI de hCG en vacas lactantes 5 días posterior a la IA, se observó un aumento en el número de cuerpos lúteos y se elevaron significativamente las concentraciones plasmáticas de progesterona (Santos *et al.*, 2001). La administración de hCG el día 7 postinseminación indujo la formación de cuerpos lúteos accesorios, aumentó la concentración de progesterona plasmática (Stevenson *et al.*, 2007) y redujo la mortalidad embrionaria, en comparación con los valores obtenidos en vacas tratadas el día 0, el día 14 y en vacas no tratadas (Bartolomé *et al.*, 2005). Las tasas de concepción los días 28, 42 y 90 aumentaron tras el tratamiento con hCG; sin embargo, la mortalidad embrionaria tardía y las pérdidas fetales se mantuvieron inalteradas. Así, el efecto positivo de la administración de hCG sobre las tasas de concepción es por medio de una reducción de las pérdidas embrionarias tempranas (Thatcher *et al.*, 2006). Esto es probablemente producto del estímulo sobre el cuerpo lúteo y el consiguiente aumento en la liberación de progesterona.

Las vacas con dos o más cuerpos lúteos presentan en general mayores concentraciones de progesterona que las solo con un cuerpo lúteo. A su vez, las

vacas con un cuerpo lúteo solo tuvieron 3,67 veces más probabilidad de tener pérdida embrionaria durante la temporada de altas temperaturas (Bech-Sàbat *et al.*, 2008). Por lo tanto, la presencia de un cuerpo lúteo adicional disminuye fuertemente el riesgo de pérdida embrionaria durante esta época del año.

Dentro de las sustancias estimuladoras del cuerpo lúteo también se encuentra la gonadotropina coriónica equina, pero sobre este rol en bovinos se encuentra relativamente poca información.

- Gonadotropina coriónica equina (eCG)

La eCG es una hormona glicoproteica heterodimérica sintetizada por las copas endometriales de la placenta de la yegua preñada. La subunidad beta de esta hormona posee una secuencia aminoacídica idéntica a la de la subunidad beta de la hormona luteinizante del equino. La eCG se une a los receptores de LH de otras especies, al igual que hCG y LH. Debido a esto, la eCG posee una importante actividad luteotrófica, ya que potencia las gonadotropinas endógenas en el estímulo del desarrollo folicular. La eCG es la gonadotropina de mayor vida media en el organismo bovino. Esta característica, en conjunto con su actividad luteotrófica, es muy conveniente para mantener la función luteal por más tiempo (Hirako *et al.*, 1995).

Además de sus efectos luteotróficos, la eCG posee importantes efectos foliculotróficos, característica por la que ha sido más comúnmente utilizada en ganado bovino (Hirako *et al.*, 1995). La evidencia obtenida con eCG como sustancia luteinizante es hasta ahora fundamentalmente experimental, ya que a nivel de campo se utiliza ampliamente por sus propiedades foliculoestimulantes. Sin embargo, hay algunas experiencias de la utilización de eCG con un fin luteotrófico, con resultados inconsistentes de acuerdo al tiempo de aplicación transcurrida la inseminación artificial.

Al administrarse una dosis baja de eCG (500 UI) o hCG (3.000 UI) en el día 7 postinseminación en vaquillas de raza Negro Japonés o Holstein, se observaron

tasas de concepción de 61,5, 46,2 y 35,7% para eCG, hCG y control no tratado, respectivamente. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, debido al pequeño tamaño de los grupos experimentales (n=13). Las concentraciones plasmáticas de progesterona los días 14 y 21 fueron significativamente superiores en los grupos tratados con eCG y hCG respecto al grupo control, y el día 14 se observaron pequeños folículos y cuerpos lúteos accesorios en los grupos tratados con eCG y hCG, con un diámetro luteal notoriamente mayor (Nagano *et al.*, 1999).

Hay entonces estudios (Hirako *et al.*, 1995, Santos *et al.*, 2001, Stevenson *et al.*, 2008) en los que la eCG y la hCG son usadas para mejorar las tasas de concepción, aplicando la hormona algunos días previos a la IA, con el fin de generar un mayor número de folículos ovulatorios y en consecuencia un mayor número de cuerpos lúteos, lo que también favorecería la sobrevida embrionaria.

Debido a su función tanto luteotrófica como folículoestimulante, es importante el momento en el ciclo estral y la dosis en la que esta hormona se administra. Hirako *et al.* (1995) utilizaron tres grupos de vaquillas, donde a uno se le administró 500 UI de eCG el día de la ovulación (e inseminación), el día 7 posterior a la ovulación (e inseminación) a otro, y solución salina en ambos momentos a un grupo control. Como resultado se obtuvieron valores significativamente mayores de progesterona plasmática en el grupo tratado al día 7 posterior a la ovulación. Estos niveles además fueron más persistentes en el tiempo. Además de un mayor crecimiento del cuerpo lúteo se observó una mayor vida media del mismo en el grupo al que se le administró eCG al día 7. Todo ésto se atribuye a la estimulación sobre el cuerpo lúteo ya existente (el día 7) ejercida por la eCG. Además, los resultados obtenidos por Hirako *et al.* (1995) sugieren que eCG se encuentra activa por un tiempo más largo que hCG, en lo que respecta a la estimulación directa del cuerpo lúteo. Esto último sería una ventaja comparativa del uso de eCG frente a la hCG.

## **Utilidad Práctica y Económica del Uso de una Sustancia Luteinizante durante el Período Embrionario Temprano**

El uso de progesterona o estimuladores de la función luteal posterior a la IA, se encuentran dentro de las variadas tecnologías y manejos hormonales que contribuyen a mejorar, o al menos a mantener, la eficiencia reproductiva; contribuyendo de esta manera a aumentar la productividad y rentabilidad de la empresa lechera.

Como se mencionó, el éxito económico de cada lechería depende en gran medida de la eficiencia reproductiva de sus vacas lecheras. En numerosos estudios se ha documentado que cada día abierto adicional al número óptimo de días abiertos post parto (o el período de espera voluntario) representa un alto costo. El costo de una gestación depende de diversos factores, entre los que cabe destacar la etapa de la lactancia (mayor costo en lactancias más avanzadas o en vacas con más días en leche), el número de lactancias de un individuo, la producción lechera (menor costo para vacas de mayores niveles de producción) y decisiones de reemplazo, entre otros. Algunos factores, como el precio de la leche, no influirían significativamente sobre el costo de una gestación (De Vries, 2006).

Todos los factores mencionados, y muchos más, están relacionados con el éxito reproductivo y contribuyen a disminuir el número de días desde el parto a la nueva preñez. Su efecto se manifiesta en uno de los periodos reproductivos más críticos, que es ambiente hormonal en el período preimplantación y en el período embrionario temprano. Ante esto se plantean los mecanismos mencionados anteriormente, para lograr amainar este ambiente de bajas concentraciones hormonales circulantes. La aplicación de hormonas que promueven el alza de progesterona durante el diestro, representaría una alternativa práctica muy útil para disminuir la pérdida reproductiva en vacas lecheras de altos niveles productivos, y así disminuir los días abiertos a lo largo de la vida del individuo, potenciando el éxito económico de la empresa.

De acuerdo a lo recopilado en esta revisión, se estima que la eCG podría ser una alternativa efectiva en relación a las utilizadas actualmente en la generación de un ambiente de altas concentraciones de progesterona, porque;

- Con respecto a la administración de progesterona a través de implantes, el aumento en las concentraciones sanguíneas de progesterona que estos generan es significativo durante aproximadamente 7 días y posteriormente declinan rápidamente. Con las sustancias estimuladoras de la función luteal se aumenta la producción de progesterona por el cuerpo lúteo, o en algunos casos se forma uno o más cuerpos lúteos accesorios, estructuras que estarán presentes por toda la gestación.
- En comparación con LH, hCG y GnRH, la eCG posee una mayor vida media en el organismo bovino. La vida media de la LH es de aproximadamente diez minutos, la hCG posee una vida media de 24 a 36 horas y la GnRH permanece activa por 2 a 4 minutos (Edqvist y Stabenfeld, 2003). La eCG, en cambio, dura cerca de 6 a 7 días activa en el organismo bovino, por lo que el efecto luteotrófico podría permanecer por más tiempo (Edqvist y Stabenfeldt, 2003).

Con estos antecedentes y ante la opción de una nueva y mejor alternativa para enfrentar el factor limitante que representa el ambiente hormonal en la etapa de preñez temprana en la vaca lechera de alta producción, como es el bajo nivel circulante de progesterona, que determina a su vez una baja tasa de concepción por un aumento en las pérdidas embrionarias, se propone este estudio que pretende evaluar el efecto de la eCG como hormona luteotrófica.

## **HIPÓTESIS**

La administración de eCG al inicio del diestro mejora la actividad luteal en vacas lecheras de alta producción.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los efectos de la administración de eCG siete días después del celo sobre la actividad luteal en vacas lecheras de alta producción.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar el efecto de la administración de eCG sobre la concentración de progesterona sérica en el diestro.

Determinar el efecto de la administración de eCG sobre la apariencia ultrasonográfica del tejido luteal.

Determinar el efecto de algunos factores no genéticos, sobre la respuesta al tratamiento.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Lugar del estudio**

El estudio se llevó a cabo en una lechería ubicada en la comuna de María Pinto, Región Metropolitana de Santiago, con aproximadamente 950 vacas en ordeña. Los animales se mantienen en un sistema de producción intensivo y en confinamiento permanente. Se realizan tres ordeñas diarias y la producción promedio de leche es de alrededor de 10.500 litros por lactancia.

### **Manejo alimentario y reproductivo**

El manejo alimentario comprende distintas raciones según etapa productiva y número de la lactancia, utilizándose una dieta para vacas en preparto, y otras para vacas en post parto reciente y en producción. La alimentación consta de insumos voluminosos, como heno y *soiling* de alfalfa, ensilaje de maíz, suplementados con concentrados y aditivos. La formulación de las raciones se realiza de acuerdo con los estándares del NRC, 2001. Los insumos se mezclan en un carro mezclador y son entregados tres a cuatro veces al día.

Respecto al manejo reproductivo, los partos ocurren en maternidades individuales o un corral para ese fin, observados por el personal encargado y con asistencia inmediata si fuese necesario. Los terneros son separados de las madres inmediatamente después del parto. Se realiza un control ginecológico a las vacas aproximadamente 28 días después del parto. Éste incluye un examen de útero y ovarios mediante palpación transrectal.

Los servicios se realizan exclusivamente por inseminación artificial (IA). Las inseminaciones se inician luego de un periodo de espera voluntario de 60 días. Los celos son detectados por observación periódica visual, la cual se realiza 2 veces en el día. Además, se complementa con ayudas a la detección, como pinturas o parches en la base de la cola, los que son activados con la monta de

otras hembras presentes en el corral. Las vacas en celo son inseminadas aproximadamente 8 a 12 horas posterior a la detección del estro, según regla AM/PM. Aquellas vacas que no repiten celo son examinadas a través de ultrasonografía transrectal, desde los 30 días después de la última inseminación, con el objetivo de diagnosticar la gestación. Las vacas preñadas son examinadas nuevamente a los 60 días después de la IA, con el fin de confirmar la continuación de la gestación.

### **Diseño experimental**

Para el estudio se seleccionaron 50 vacas inseminadas según presentación de celo, de segunda y tercera o más lactancias. El tamaño muestral fue determinado considerando los valores normales de progesterona en diestro y una diferencia esperada de  $1 \pm 0,3 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  de progesterona entre el grupo tratado y el control, con un 95% de confianza y un 80% de poder de la prueba estadística, se requirió un tamaño muestral mínimo de 23 vacas por grupo (Winepiscope 2.0, 2003).

Las vacas seleccionadas se distribuyeron aleatoriamente para recibir dos tratamientos 7 días después de la inseminación:

T1: 500 UI de eCG (2,5 mL Folligon®, Schering Plough-Intervet ); 2,5mL vía IM

T2: 2,5 mL de solución salina, vía IM

En ese momento, a todas las vacas se les realizó un examen de los ovarios por ultrasonografía transrectal utilizando un equipo portátil Tringa Linear (Pie Medical, Maastricht, Holanda), con un transductor de 5 MhZ. Se determinó el número de cuerpos lúteos, su diámetro y el volumen luteal total. El diámetro luteal se calculó promediando el diámetro mayor de la altura y el ancho del cuerpo lúteo. El volumen luteal se calculó asumiendo que el cuerpo lúteo es una estructura esférica, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen} = 4/3 \times R^3 \times \pi,$$

Donde: R = radio;  $\pi = 3,14159$

$$\text{Radio} = (W/2 + H/2)/2$$

Donde: W = ancho máximo; H = altura máxima

Además, el día del tratamiento se obtuvo una muestra de sangre desde la vena coccígea, para posteriormente determinar la concentración de progesterona sérica.

El examen ultrasonográfico y el muestreo de sangre se repitieron a los 14 días después de la IA. El suero recolectado se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior determinación, que se realizó por análisis enzimático (ELISA) realizado por un equipo automatizado eProCheck (Minitüb Abfüll-u. Labortechnik GmbH, Alemania) (Figura 1), empleándose un volumen de  $25\ \mu\text{L}$  para cada determinación (Figura 2).

**Figura 1.** Equipo eProCheck utilizado para la determinación de progesterona en muestras de suero.



**Figura 2.** Material utilizado en la determinación de progesterona: micropipeta (abajo, derecha), tubos con las muestras de suero. A la izquierda se aprecian las soluciones controles.



### **Recolección de datos y análisis de la información**

Se recolectó información sobre identificación de la vaca, fecha de parto, número de la lactancia, días en lactancia al momento de la IA, producción de leche acumulada a los 60 días y la producción láctea el día de la IA.

La información recolectada sobre concentraciones de progesterona y aspecto ultrasonográfico del cuerpo lúteo para obtener el volumen luteal total, se analizó a través de estadística descriptiva y modelos lineales, donde se comparó el valor observado a los 14 días covariando por los niveles del día 7 posterior a la IA. Para esto se llevó a cabo un análisis de varianza para medidas repetidas a través de un

modelo mixto, considerando a la vaca como un efecto al azar anidado en el tratamiento. El tipo de tratamiento se consideró como variable principal, corrigiendo por lactancia y producción de leche. Para este análisis se utilizó el procedimiento Mix del programa estadístico SAS 9.3 (2003). El modelo mixto para medidas repetidas se definió como:

$$y_{ijklmno} = \mu + T_i + d_j + Lac_k + vaca (T_i)_l + Placum_m + DEL_n + (T*d)_{ik} + (T* Lac)_i + e_{ijklmn}$$

Donde:

$y_{ijklmno}$  = Concentraciones de progesterona plasmática, volumen del cuerpo lúteo

$T_i$  = efecto fijo de tratamiento

$d_k$  = efecto fijo de día de la muestra de progesterona (7, 14)

$Lac_l$  = efecto fijo de número de lactancia (2<sup>a</sup> ; 3<sup>a</sup> )

$vaca (T_i)_j$  = efecto al azar de vaca anidada en tratamiento (1, 2)

$PLIA_m$  = efecto al azar de producción de leche el día de la IA

$Placum_m$  = efecto al azar de la producción de leche acumulada a los 60 días

$DEL_n$  = efecto al azar de los días en leche a la inseminación

$(T*d)_{ik}$  = interacción día por tratamiento

$(T* Lac)_i$  = interacción tratamiento por número de lactancia

$e_{ijklmn}$  = error

Para analizar la variable número de cuerpos lúteos, se evaluó el número de ovulaciones dobles presentes el día 7 y el día 14, y se compararon ambos números. Los valores se analizaron mediante la prueba de t de Student. Para analizar la respuesta del volumen luteal al tratamiento, se tomó como valor de referencia la diferencia de volumen presentada entre el día 14 y el 7. Este valor, como un promedio del grupo tratado y otro para el grupo control, se evaluó mediante la prueba de t de Student. Para explicar el número de cuerpos lúteos encontrados al día 14 (siete días posterior al tratamiento), se llevó a cabo una regresión de Poisson, la cual es una metodología estadística para variables de cuenta. Para tal análisis se utilizó el procedimiento GENMOD del programa SAS 9.3 (2003).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. NÚMERO DE CUERPOS LÚTEOS

Al inicio del estudio (día 7) los animales del grupo control presentaron 3 casos de ovulación doble, mientras que en el grupo tratado se observó una vaca con dos cuerpos lúteos (Tabla 1). Hacia el día 14 en las vacas no tratadas se mantuvo el mismo número de vacas con cuerpos lúteos dobles, mientras que en las tratadas se aumentó a tres vacas con dos cuerpos lúteos.

**Tabla 1: Proporción de individuos con dos cuerpos lúteos al día 7 y 14 después del celo en vacas controles (n=25) y en vacas tratadas con eCG al día 7 (n=25).**

Grupo	Proporción de vacas con dos cuerpos lúteos	
	Día 7	Día 14
CONTROL	3/25	3/25
TRATADO	1/25	3/25

No se observó una diferencia significativa ( $p=0,30$ ) en el cambio del número de vacas con dos cuerpos lúteos entre el día 7 y el 14 entre controles y tratadas.

Al agrupar la información considerando el número de la lactancia, no se observaron diferencias significativas en el número de cuerpos lúteos en vacas de segunda o de tercera o más lactancias. Así, como muestra la Tabla 2, en vacas de segunda lactancia pertenecientes al grupo control, en un total de 15 individuos, 2 animales tenían doble cuerpo lúteo el día 7, número que disminuyó a 1 para el día 14 ( $p=0,54$ ). Por el contrario, en vacas de segunda lactancia que fueron tratadas, de un total de una vaca con cuerpo lúteo doble al día 7, se encontraron 3 dobles cuerpos lúteos al día 14 ( $p=0,18$ ). Dentro de los individuos de tercer o mayor número de lactancia, en el grupo control (10 vacas), se encontró un cuerpo lúteo doble el día 7 y dos el día 14 ( $p=0,53$ ). Finalmente, las vacas de sobre 3ª lactancia tratadas, presentaron en ambos ausencia de cuerpos lúteos dobles ( $p=1$ ).

**Tabla 2: Número y proporción de individuos con dos cuerpos lúteos al día 7 y 14 después del celo en vacas controles (n=25) y en vacas tratadas (n=25) con eCG al día 7, según número de lactancia.**

Grupo	Número (proporción) de vacas con dos cuerpos lúteos		
	Día 7	Día 14	p
CONTROL 2 Lac	2/15 (13%)	1/15 (6,7%)	0,54
TRATADO 2 Lac	1/12 (8,3%)	3/12 (25%)	0,18
CONTROL ≥3 Lac	1/10 (10%)	2/10 (20%)	0,8
TRATADO ≥3 Lac	0/13 (0%)	0/13 (0%)	1

No se observó un efecto significativo de la producción de leche el día de la inseminación sobre el número de cuerpos lúteos al día 14 ( $P= 0,92$ ), como tampoco se observó un efecto significativo de los días en producción de leche a la inseminación sobre el número de cuerpos lúteos al día 14 ( $P= 0,74$ ).

Se esperaba encontrar un número de cuerpos lúteos significativamente mayor el día 14 en las vacas tratadas con eCG. Si bien, en ellas aumentó de 1 a 3 las vacas con dos cuerpos lúteos, probablemente este número no es suficiente como para marcar una diferencia significativa y solo marca una tendencia. Para ambos grupos el número de ovulaciones dobles al día 14 es el mismo (3 de 25).

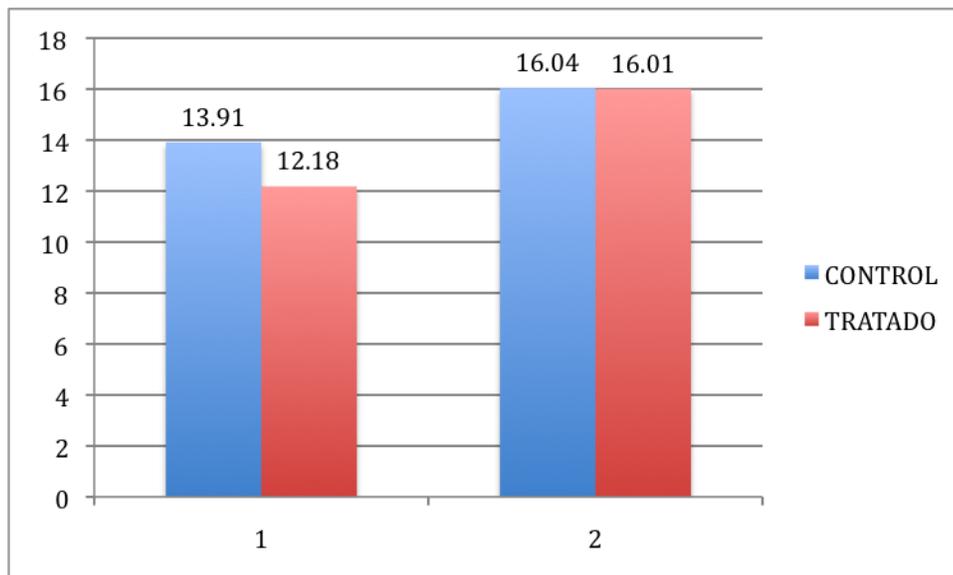
Estos resultados se pueden explicar en dos etapas. Primero, en vacas más jóvenes, o en vaquillas como en el caso del estudio de Nagano *et al.* (1999), el efecto luteinizante logrado es más importante ya que en ellas el flujo sanguíneo digestivo y el consiguiente “clearing” hepático de esteroides es mucho menor. Por otro lado, en vacas de altos niveles productivos se podría esperar encontrar un mayor número de cuerpos lúteos dobles, ya que en ellas, nuevamente producto de los elevados niveles de metabolismo hepático, el proceso de retroalimentación negativo del estrógeno es menor, lo que permite el crecimiento hasta estado

preovulatorio y posterior ovulación de un mayor número de folículos (López *et al.*, 2005).

## 2. DIFERENCIA DE VOLUMEN LUTEAL

El volumen luteal inicial (día 7) fue de 13,91 cm<sup>3</sup> con una desviación estándar de 3,77 cm<sup>3</sup> en el grupo control. En el grupo tratado el volumen inicial fue de 12,18 cm<sup>3</sup> con una desviación estándar de 3,97cm<sup>3</sup>. Hacia el día 14, los valores encontrados para el grupo control fueron de 16,04 ± 3,8 cm<sup>3</sup>, y de 16,01 ± 4,06 cm<sup>3</sup> (Figura 3) en el tratado. El promedio de todos los individuos (n=50) al día 7 fue de 13,55 ± 3,93cm<sup>3</sup>, mientras que el día 14 el promedio total fue de 16,03 ± 3,9 cm<sup>3</sup>.

**Figura 3: Volumen luteal (cm<sup>3</sup>) al día 7 y al día 14 después de la inseminación en vacas controles (n=25) y en vacas tratadas con eCG el día 7 después del celo (n=25).**

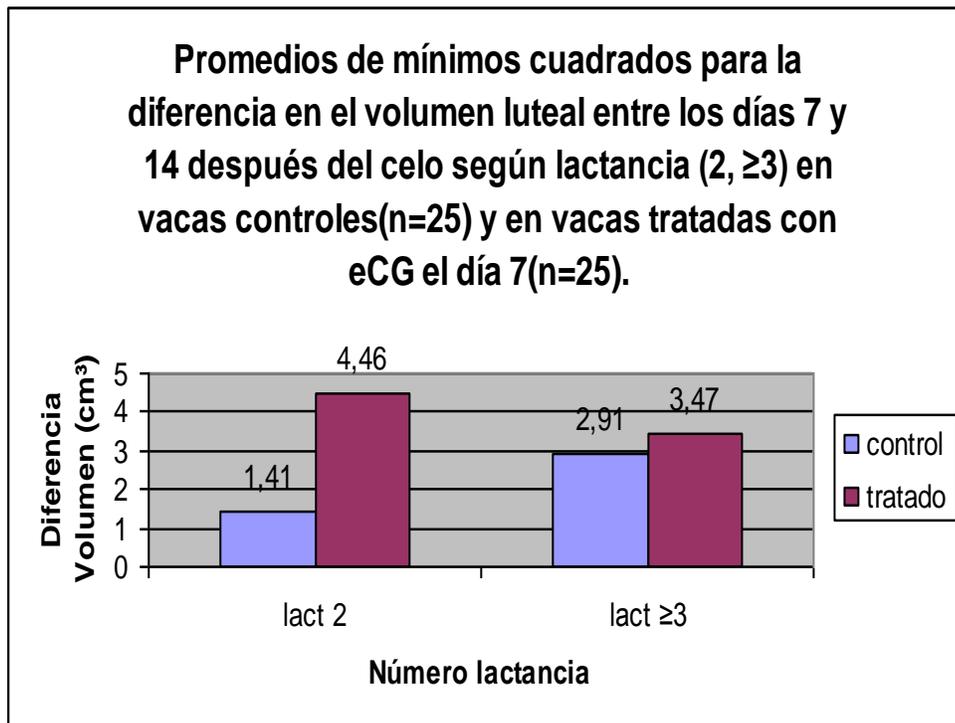


Para evaluar el efecto del tratamiento sobre el volumen luteal, la variable a comparar fue la “diferencia en el volumen” entre los días 7 y 14. La diferencia

promedio fue de 2,13 cm<sup>3</sup> en el grupo control (n=25) frente a 3,83 cm<sup>3</sup> en el tratado (n=25). Estas diferencias no son estadísticamente significativas (p=0,11). Sin embargo, se podría hablar de una “tendencia” a una mayor diferencia de volumen luteal entre el día 7 y el 14 en el grupo de individuos que recibió el tratamiento con eCG.

Esta tendencia a un aumento en el volumen luteal se hace significativa al considerar el número de la lactancia. Se observó un aumento significativo en el volumen luteal al día 14 (7 días posterior al tratamiento con eCG) en vacas tratadas de segunda lactancia (p=0,05). En ellas, la diferencia luteal entre los días 7 y 14 para individuos controles fue de 1,41 cm<sup>3</sup>, frente a una diferencia de 4,46 cm<sup>3</sup> entre los días 7 y 14 en individuos tratados (Figura 4).

**Figura 4.**



No se observó efecto significativo de la producción de leche el día de la inseminación (p=0,31) sobre la diferencia de volumen luteal entre los días 7 y 14;

tampoco se observó un efecto significativo de la producción de leche acumulada al día 60 postparto ( $p=0,61$ ), ni de los días en leche al inicio del tratamiento ( $p=0,51$ ), como tampoco del número de lactancias ( $p=0,82$ ) sobre la diferencia de volumen luteal entre los días 7 y 14.

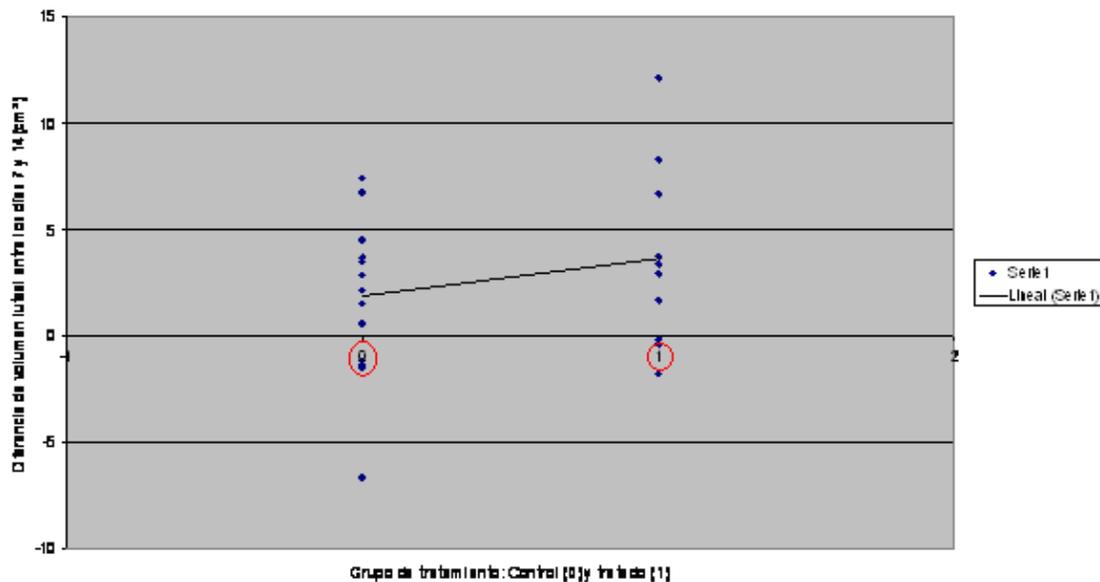
En general, el grupo tratado no presentó un aumento en el volumen luteal significativamente mayor. Esto se puede explicar al conocer el fenómeno que ha generado la selección por altos niveles de producción, que resulta en un aumento en los niveles sanguíneos de somatotropina y prolactina, ambas hormonas estimuladoras de la lactancia, y menores niveles de insulina, hormona antagonista de la lactancia y que jugaría un rol principal en el desarrollo folicular (Nebel y McGilliard, 1993). Estos son elementos que harían al sistema reproductivo menos sensible a las estrategias que se puedan intentar para potenciarlo. A este elemento se le debe sumar la magnitud y duración en el tiempo del balance energético negativo, que alteraría la secreción hipotalámica de GnRH y su efecto sobre la liberación de gonadotropinas y con esto, la secreción ovárica de progesterona (Nebel y McGilliard, 1993). Este elemento jugaba un rol importante en los individuos que entraron al estudio, debido a sus altos niveles productivos. Con todo, la eCG genera un leve aumento, no significativo, en el total de los animales, aumento que se hace significativo en vacas de segunda lactancia. Probablemente el menor nivel de stress productivo en estos animales, comparado con vacas de mayor edad y producción, permite que sean más sensibles a esta hormona y respondan al estímulo luteotrófico.

Estos resultados son parcialmente opuestos a los obtenidos por Hirako *et al.* (1995) y por Nagano *et al.* (1999), donde tras la administración de eCG y hCG el día 7 obtuvieron un significativo mayor diámetro luteal en hembras tratadas. En el estudio de Hirako *et al.* (1995) además se observaron cuerpos lúteos más persistentes en el tiempo. Sin embargo, ambos estudios se llevaron a cabo en vaquillas de raza Negro Japonés, que es una raza de doble propósito y de tamaño pequeño. En esos animales cabe esperar situaciones orgánicas más favorables

para el desarrollo reproductivo, debido a sus menores niveles de metabolismo hepático por ser razas con una menor capacidad de producción láctea, sumado a su estado de no lactancia. En estos animales el ambiente de balance energético negativo característico de las vacas de alta producción no jugaba un rol, lo que hace a esos animales más favorables para tener responder satisfactoriamente frente a los manejos reproductivos.

Sin embargo el tratamiento logró generar un leve aumento en el volumen luteal en vacas de segunda lactancia, esto medido a través de una mayor diferencia en el volumen luteal entre los días 7 y 14 (figura 5).

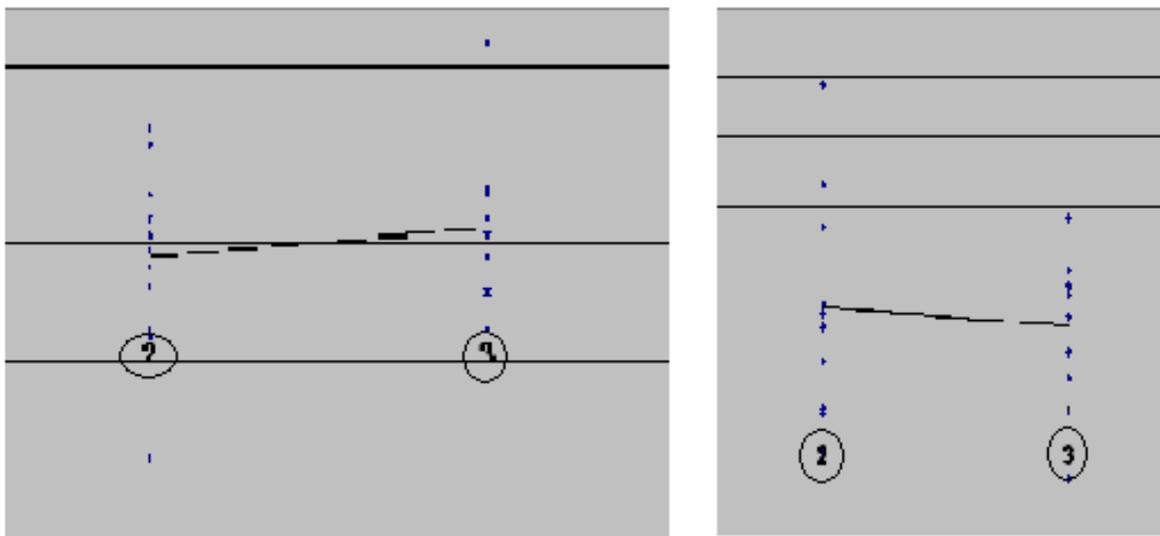
**Figura 5. Diferencia en el volumen luteal entre día 7 y 14 después de la inseminación en vacas controles (0) y tratadas (1) de segunda lactancia.**



Este aumento no es seguido por un aumento significativo en el nivel de progesterona en este mismo grupo. Estos resultados son concordantes con los obtenidos por Nagano *et al.* (1999), donde la aplicación de eCG el día 7 del ciclo logró generar diámetros luteales marcadamente mayores al día 14. En este caso

se trabajó con vacas secas y por esta razón circula por su hígado menos volumen sanguíneo/hora. Este elemento está altamente relacionado con el consumo de materia seca, que a su vez es menor en vacas más jóvenes. Producto de todo lo anterior es que en ellas el clearance hepático de progesterona es menor, logrando mayores niveles hormonales circulantes, lo que a su vez está asociado con mayores volúmenes luteales.

**Figura 6. Diferencia en el volumen luteal entre los días 7 y 14 en vacas controles (panel izquierdo) y tratadas (panel derecho) en vacas de segunda y de tercera o más lactancias.**



En el grupo control la diferencia de volumen entre los días 7 y 14 se hace mayor en animales de 3 o más lactancias (Figura 6, panel izquierdo, grupo de datos de la derecha), mientras que en el tratado se observa una mayor diferencia de volumen luteal entre los días 7 y 14 en animales de segunda lactancia (Figura 6, panel derecho, grupo de datos de la derecha). Estas diferencias no son significativas.

De esto se podría inferir que los animales de segunda lactancia fueron más propensos a responder al tratamiento con mayores niveles de crecimiento del cuerpo lúteo entre el día 7 y 14. Más aun, podríamos inferir que sin el tratamiento los cuerpos lúteos de vacas de más números de lactancias presentaron algunos individuos con buenos niveles de crecimientos luteales, mientras en otros individuos este crecimiento no se presentó en igual magnitud. Ellas tuvieron cambios de volumen luteal entre los días 7 y 14 mucho más variables que las vacas de segundo parto (esto sobre todo en animales pertenecientes al grupo control), quienes sin tratamiento alguno fueron más constantes en su comportamiento reproductivo, como se podía esperar por su condición de más constancia en perfiles hormonales.

### **3. CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA SÉRICA**

De un total de 50 individuos que entraron al estudio, se obtuvieron dos muestras de sangre por cada animal, una al día 7 y otra al día 14. Esto generó un total de 50 muestras de suero de animales tratados y 50 muestras de animales controles. Algunas de estas muestras presentaron hemólisis, lo que hizo que no se obtuviera el mismo número de resultado de mediciones de progesterona en suero.

Los valores de concentraciones séricas de progesterona al día 7 fueron de  $4,16 \pm 3,92$  ng\*mL<sup>-1</sup> (n=24) para individuos controles y de  $3,26 \pm 0,79$  ng\*mL<sup>-1</sup> (n=23) para tratados (p=0,28). El día 14 los resultados obtenidos fueron de  $6,05 \pm 3,72$  ng\*mL<sup>-1</sup> (n=24) para controles y de  $6,29 \pm 2,42$  ng\*mL<sup>-1</sup> (n=22) para individuos tratados (p=0,79).

Luego, para evaluar el aumento en la concentración de progesterona al día 14 se evaluó la diferencia entre los niveles del día 7 y 14. En el grupo control se observó una diferencia promedio de  $2,54 \pm 2,24$  ng\*mL<sup>-1</sup>. Esta diferencia fue de  $2,71 \pm 1,88$  ng\*mL<sup>-1</sup> en individuos tratados con eCG 7 días después del celo. No se observó incidencia del tratamiento con eCG siete días posterior a la inseminación artificial

sobre la diferencia de concentraciones séricas de progesterona entre los días 7 y 14 ( $p=0,64$ ).

El número de lactancia no generó un efecto significativo sobre las concentraciones séricas de progesterona ( $p=0,97$ ), tampoco lo hizo la producción de leche acumulada al día 60 post parto ( $p=0,15$ ) ni los días en leche al momento de la inseminación artificial ( $p=0,20$ ).

Al analizar la información según número de lactancia (Tabla 3) y evaluar la interacción tratamiento por lactancia, no se observó un efecto significativo de esta interacción ( $p=0,89$ )

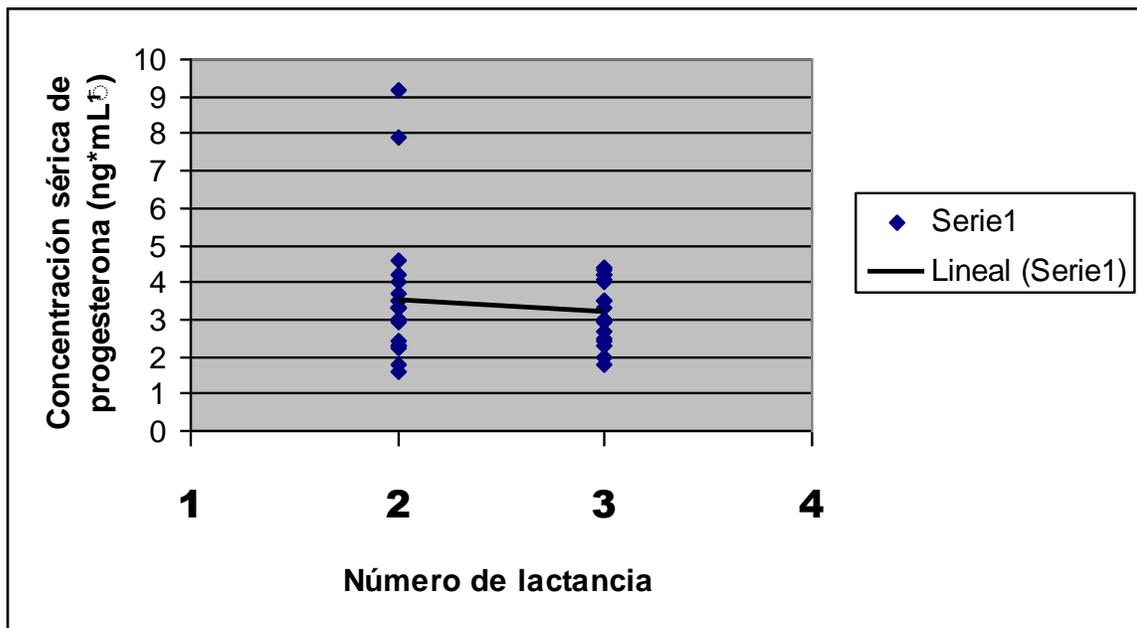
**Tabla 3: Promedios de mínimos cuadrados para la diferencia en las concentraciones séricas de progesterona ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) entre el día 7 y 14 después del celo según número de lactancia en vacas controles y en vacas tratadas con eCG el día 7 después del celo (Error estándar acumulado= 0,08).**

Grupo	Lact 2	Lact $\geq 3$
CONTROL	2,45	2,51
TRATADO	2,85	2,74

En ambos grupos de número de lactancia (2 y  $\geq 3$ ) se observa un leve mayor aumento en las concentraciones de progesterona en los individuos tratados que en los controles. En animales de segunda lactancia, mientras que el grupo control presentó un aumento promedio de  $2,45 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , el aumento en el grupo tratado fue de  $2,85 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; lo que es  $0,4 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  superior. En los individuos de tercera o más lactancias los animales del grupo control presentaron un aumento de  $2,51 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , versus un aumento de  $2,74 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  en los animales tratados correspondientes a esta categoría. En este caso el aumento fue de  $0,23 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  superior en los animales tratados.

Es interesante también ver que los niveles de progesterona el día 7 posterior a la IA, es decir en el momento justo anterior a recibir el tratamiento, tomando en cuenta toda la población, son levemente mayores para vacas de segunda lactancia (Figura 7), mostrando estos niveles una tendencia al descenso a medida que aumenta el número de lactancia de los individuos. Esta diferencia sin embargo no es significativa.

**Figura 7: Concentraciones séricas de progesterona 7 días después de la inseminación (inicio del estudio) según número de la lactancia.**

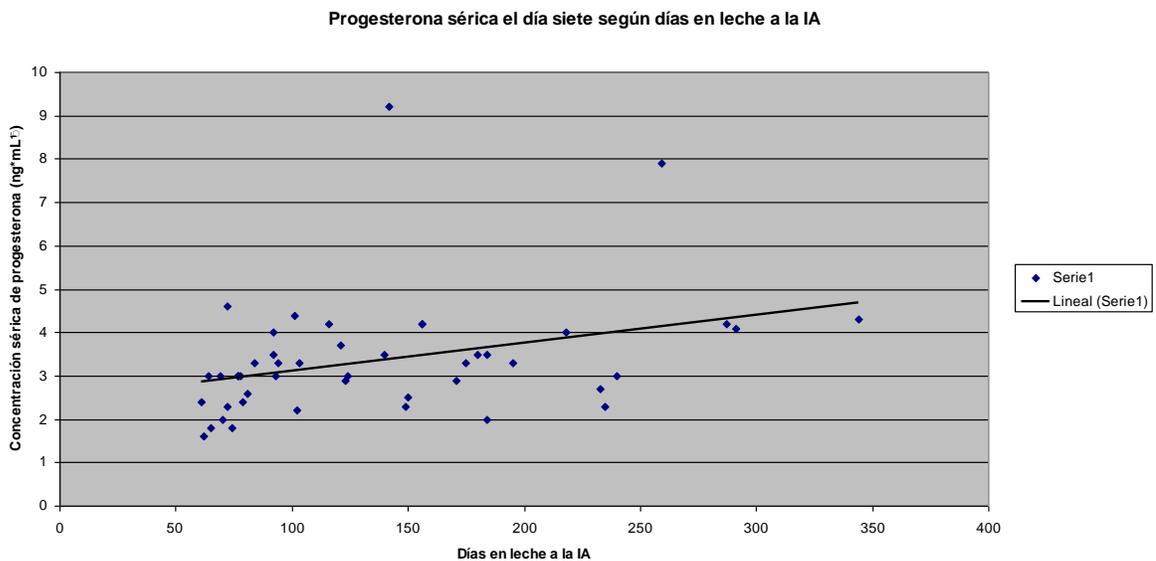


Este resultado en vacas de segunda lactancia versus vacas de tercer o mayor número de lactancias se adapta a lo esperado por las razones discutidas en la revisión bibliográfica. Más aún, como se observa en la figura 7, cuando se analiza la información según su número exacto de lactancia (2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup>), y no solo como vacas de 2<sup>a</sup> y de 3<sup>a</sup> o mayor lactancia, se ve que esta tendencia al descenso en las concentraciones de progesterona se mantiene y aumenta a medida que aumenta el número de lactancias. Vacas mayores, más productivas, poseen una

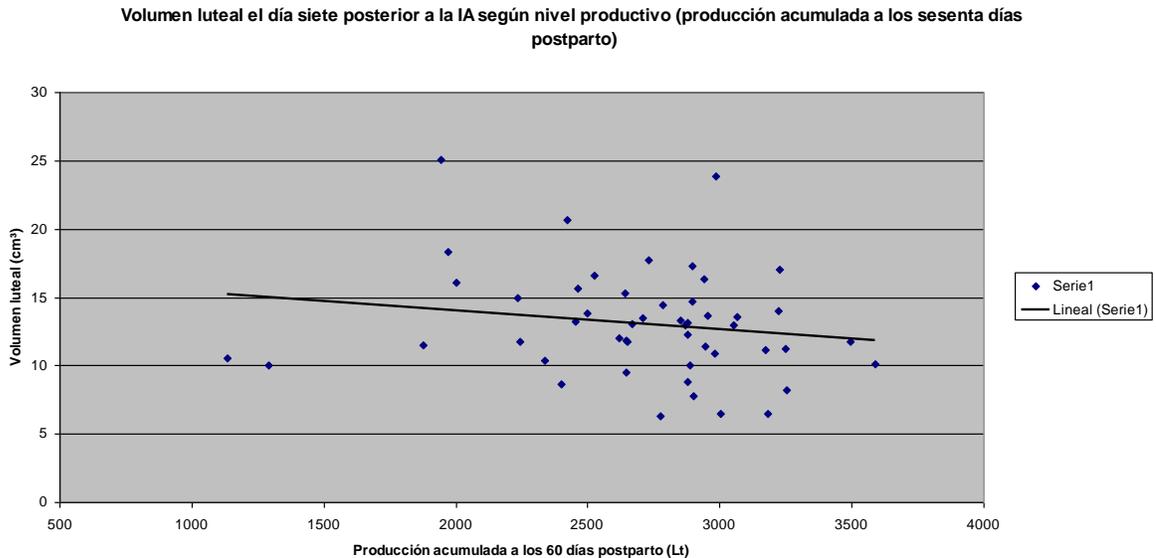
mayor tasa de metabolismo hepático y como resultado se obtienen niveles de fertilidad deprimidos, y es por esto que en ellas el tratamiento sería menos efectivo que en vacas más jóvenes.

También se observa que a medida que aumentan los días de lactancia, aumentan los niveles de progesterona (Figura 8). La línea de tendencia de la figura es aproximadamente opuesta a lo que se esperaría para la producción de leche. Esto concuerda con lo sugerido por Bech-Sàbat *et al.* (2008), quienes plantearon que las concentraciones plasmáticas de progesterona están correlacionadas negativamente con la producción láctea.

**Figura 8. Concentraciones séricas de progesterona 7 días después de la inseminación de acuerdo a los días en lactancia al momento de la IA.**



**Figura 9: Volumen luteal 7 días después de la inseminación artificial según la producción de leche acumulada al día 60 post parto.**



La figura 9 muestra que a medida que aumenta el nivel productivo de los individuos hay una tendencia a disminuir el volumen luteal total.

Los resultados de progesterona son consistentes con los obtenidos por Stevenson *et al.* (2007), donde tras probar el efecto de GnRH sobre algunas variables reproductivas, como el número de cuerpos lúteos y las concentraciones séricas de progesterona, no observaron un efecto significativo. Sin embargo, la administración de hCG fue efectiva en mejorar significativamente estas variables. Dicho estudio se llevó a cabo en una población de vacas que no superaba las dos lactancias, y es este factor el que probablemente favoreció la respuesta al tratamiento con hCG.

En estudios realizados por Hirako *et al.* (1995) y Nagano *et al.* (1999) se reportó una respuesta significativa a la administración de eCG como luteinizante. En ambos casos el estudio se efectuó con un grupo de vaquillas de raza Negro Japonés. Estos animales corresponden a una raza pequeña y de doble propósito, con menores niveles de producción láctea a lo que se suma el hecho de que sean

vaquillas. Todo esto hace que estos animales tengan ventajas frente a los individuos escogidos en el presente estudio, por tener menores niveles de clearing hepático, producto de una menor tasa metabólica. Como se discutió previamente, las vacas de altos niveles productivos, y particularmente las de mayor número de lactancias, son menos capaces de responder de manera positiva a un tratamiento con una sustancia luteinizante, cualquiera sea su naturaleza.

Este resultado también es consistente con los de aquellos estudios donde se asocian negativamente los niveles de progesterona en vacas lactantes en comparación con estos niveles en vacas no lactantes o vaquillas (Thatcher *et al.*, 2006; Diskin y Morris, 2008). En el estudio de Thatcher *et al.* (2006) podría haber además influencia de la administración de somatotrofina bovina (bST) u hormona del crecimiento bovina sobre los parámetros reproductivos, principalmente sobre las concentraciones séricas de progesterona. La administración de bST podría aumentar la tasa metabólica de los individuos, lo que llevaría en consecuencia a menores niveles de progesterona circulante (Thatcher *et al.*, 2006). En este estudio también se observó un efecto positivo tras la administración de 3300UI de hCG el día 5 del ciclo, obteniéndose mayores niveles de progesterona circulante y número de cuerpos lúteos. Estos resultados contrastan con los obtenidos en el presente estudio. Podría haber un efecto del momento de administración del tratamiento, ya que quizás la aplicación al día 7 fue levemente tardía. Sin embargo, esto también sería poco probable considerando que en estudios donde se aplicaba eCG el día 7 del ciclo se observaron mejoras en esos parámetros reproductivos (Hirako *et al.*, 1995; Nagano *et al.*, 1999). Al respecto sería interesante la realización de otros estudios donde se evaluara el momento exacto en el que la administración de una sustancia luteinizante sería más provechosa, considerando elementos como nivel productivo y número ordinal de parto, entre otros.

Adicionalmente, en otros estudios previos se ha obtenido como resultado a la administración de LH un mayor número de cuerpos lúteos, pero sin verse esos

resultados reflejados en mayores niveles de progesterona circulantes. Estos resultados sugerirían que un estímulo luteotrófico de mayor duración (e.g., eCG en lugar de LH o GnRH) sería más efectivo en la inducción de un cuerpo lúteo accesorio o en promover la función luteal (Hirako *et al.*, 1995). En el mismo estudio también se concluye que para ciertos animales la dosis de 500 UI de eCG podría ser insuficiente como estímulo luteinizante. Tomando esa conclusión en cuenta, se puede especular que en el presente estudio, debido a los altos niveles metabólicos de las vacas, se podría encontrar un efecto estimulante del cuerpo lúteo al administrar una dosis mayor de eCG. También sería interesante evaluar si existe un efecto significativo de la eCG al ser administrada en un protocolo diferente, con dosis repetidas después de la inseminación, posiblemente alrededor del momento de la implantación y antes del diagnóstico de gestación.

En resumen, al comparar el presente resultado con los de diversos estudios (Bech – Sàbat *et al.*, 2008; Hirako *et al.*, 1995; Thatcher *et al.*, 2006), hay resultados concordantes en relación a que el mayor volumen luteal está asociado con mayores concentraciones plasmáticas de progesterona, aún cuando no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, hay una tendencia a mayores volúmenes de CL en individuos más jóvenes, quienes además poseen mayores niveles de progesterona circulante (independientes del tratamiento). En consecuencia, si hay más cuerpos lúteos y/o cuerpos lúteos de mayor tamaño, se presentarán mayores niveles de progesterona circulantes. Además, existe la tendencia a asociar el nivel productivo con estos dos parámetros, lo lleva a plantear que la respuesta a cualquier herramienta luteinizante (eCG en este caso) estaría influenciada también por el número de lactancia de la vaca y por sus niveles productivos, ambos factores que a su vez se encuentran relacionados.

Así, a grandes rasgos, en el presente estudio no se observó un aumento significativo en el número de cuerpos lúteos ni en los niveles circulantes de progesterona. Respecto al volumen luteal, sólo se observó un aumento significativo en vacas de segunda lactancia tratadas, mientras que en el resto de

las vacas tratadas solamente se observó una tendencia al aumento. Este aumento se debió principalmente a mayores volúmenes luteales después del tratamiento y no a un mayor número de cuerpos lúteos accesorios. En estos animales el tratamiento fue capaz de inducir un mayor crecimiento de los cuerpos lúteos ya existentes, pero no un mayor número de nuevas ovulaciones con la consecuente formación de cuerpos lúteos accesorios. Probablemente estos animales tuvieron una mayor capacidad de respuesta a la administración de eCG como hormona luteinizante debido a sus menores niveles de metabolismo hepático, obteniendo resultados similares a los de Nagano *et al.* (1999) en vaquillas de carne.

## IMPLICANCIAS

En general, la aplicación de 500 UI de eCG 7 días después de la inseminación en vacas no tuvo un efecto significativo sobre el volumen luteal, el número de cuerpos lúteos presentes ni las concentraciones de progesterona circulante.

Aún cuando se observó una tendencia a un mayor volumen luteal en las vacas tratadas, el que fue significativamente mayor en vacas de segunda lactancia; esto no se vio reflejado en mayores concentraciones de progesterona. Esto sería atribuible principalmente a los altos niveles de metabolismo hepático de las vacas de este estudio, lo que resultaría en un elevado “clearance” hepático de los esteroides ováricos, particularmente el eventual aumento de progesterona debido a la estimulación del cuerpo lúteo por parte de la eCG. Los altos niveles productivos de estos animales implican un alto consumo de alimento para satisfacer las demandas nutricionales con el consiguiente aumento del flujo sanguíneo al hígado. Además y en menor grado, es posible que la dosis de eCG utilizada no fuera suficiente para inducir un estímulo luteotrófico suficiente. Podría ser interesante utilizar la administración de varias dosis en el mismo período de tiempo que lo realizado en este estudio, o quizás de una dosis mayor a la utilizada. Además se podría obtener un efecto beneficioso en vacas que tengan una mayor probabilidad de responder a las sustancias luteinizantes, como vacas de menor tamaño y producción y bajo una menor carga de *stress* productivo.

Estos resultados son concordantes con los mostrados por algunos estudios analizados y citados en la revisión bibliográfica y en la discusión del presente documento. A su vez estos resultados son diferentes a los obtenidos en un menor número de estudios, en los que la administración de eCG, siguiendo un protocolo similar al empleado en el presente estudio (administración del tratamiento en la misma dosis y el mismo día del ciclo) indujo un efecto positivo en las variables en estudio. Esta diferencia puede atribuirse principalmente al mayor nivel productivo de los individuos utilizados en el presente estudio, lo que es reforzado por la

tendencia a una mejor respuesta en vacas de segunda lactancia, con menores niveles productivos que las de tercera o más lactancias.

Sería recomendable la ejecución de estudios adicionales en que se considere el nivel productivo de los animales, administrando una dosis más alta de la hormona. Además, sería interesante estudiar la relación de los niveles hormonales y la respuesta a un tratamiento con eCG tomando en cuenta el tiempo transcurrido entre la última ingesta alimenticia y la administración de un tratamiento con eCG. Esto, debido a que tasas elevadas de ingesta alimenticia llevan a una mayor tasa de clearance metabólico de progesterona. Sangsritavong *et al.* (2002) reportaron que en vacas lecheras en pastoreo, con una fuente de progesterona exógena, las concentraciones de progesterona fueron menores en aquellas alimentadas *ad libitum* que en vacas con una alimentación restringida. En este estudio se analizaron las tasas de metabolismo hepático y los niveles séricos de progesterona posterior a la ingesta alimenticia, observándose que entre una y cuatro horas después de la entrega e ingesta de alimento hay un aumento significativo del flujo sanguíneo al hígado. Además, en este mismo periodo las concentraciones séricas de progesterona disminuyeron significativamente. Este efecto fue más evidente en la medida que las vacas recibían más alimento. La mayor diferencia fue cuando se compararon vacas lactantes con vacas no lactantes. En el presente estudio, ya la toma de muestras para progesterona fue hecha entre 1 y 2 horas posteriores a la entrega del alimento, lo cual pudo haber influido en los resultados obtenidos.

Considerando estos elementos, se podría intentar la administración del tratamiento más lejos del horario de alimentación, en momentos en los que el flujo sanguíneo digestivo es menor. Alternativamente, podría tratarse a las vacas de mayor nivel productivo con una dosis más alta de eCG. Además podría ser interesante evaluar cuál es el momento más adecuado en el diestro para la administración de una hormona luteinizante (e.g., día 5, 7 ó 12) tomando en consideración además el nivel productivo y la condición de vaca o vaquilla

## CONCLUSIONES

- La administración de 500 UI de eCG a vacas 7 días después de la inseminación no fue capaz de inducir un aumento en el número de cuerpos lúteos.
- No se observaron diferencias significativas en el volumen luteal entre vacas tratadas y controles 7 días después del tratamiento.
- Al separar por número de la lactancia, se observó un aumento significativo del volumen luteal en vacas tratadas de segunda lactancia, pero no en vacas de un mayor número de lactancias.
- El tratamiento no logró inducir un aumento significativo en las concentraciones de progesterona sérica entre el día 7 y 14 en relación al observado en vacas controles.
- No se observó un efecto significativo del número de lactancia, los niveles productivos, ni los días en lactancia sobre los niveles séricos de progesterona.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bartolome, J.A., Melendez, P., Kelbert, D., Swift, K.; McHale, J., Hernandez, J., Silvestre, F., Risco, C.A., Arteché, A.C.M., Thatcher, W.W., Archbald, L.F. 2005. Strategic use of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) to increase pregnancy rate and reduce pregnancy loss in lactating dairy cows subjected to synchronization of ovulation and timed insemination. *Theriogenology* 63: 1026-1037.
- Bech-Sabàt, G., Lopez-Gatiús, F., Yániz, J.L., García-Ispuerto, I., Santolaria, P., Serrano, B., Sulon, J., De Sousa, N.M., Beckers, I.F. 2008. Factors affecting plasma progesterone in the early fetal period in high producing dairy cows. *Theriogenology* 69: 426-432.
- Beltman, M. E., Lonergan, P., Diskin, M. G., Roche, J. F., Crowe, M. A. 2009. Effect of progesterone supplementation in the first week post conception on embryo survival in beef heifers. *Theriogenology* 71: 1173-1179.
- Committee on Bovine Reproductive Nomenclature. 1972. Recommendations for standardising bovine reproductive terms. *Cornell Vet.* 62: 216-237.
- De Vries, A. 2006. Economic value of pregnancy in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 83: 3875-3885.
- Diaz, T., Schmitt, E., De La Sotta, R.L., Thatcher, M-J., Thatcher, W.W. 1998. Human chorionic gonadotrophin-induced alterations in ovarian follicular dynamics during the estrous cycle of heifers. *Journal of Animal Science* 76: 1929-1936.
- Diskin, M.G., Morris, D.G. 2008. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reproduction in Domestic Animals* 43: 260-267.
- Diskin, M. G., Austin, E. J., Roche, J. F. 2002. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 23: 211-228.

- Diskin, M. G., Murphy, J. J., Sreenan, J. M. 2006. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Animal Reproduction Science* 96: 297-311.
- Edqvist, L.-E.; Stabenfeldt, G.H. 2003. The hormones of reproduction. **In:**King, G.J. (Ed.). *Reproduction in Domesticated Animals*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. pp 55-73
- Hirako, M., Kamamoe, H., Domeki, I. 1995. Luteotropic effect of pregnant mare serum gonadotropin in cattle. *Journal of Veterinary Medicine Science* 57: 317-321.
- Hou, Q., Gorski, J. 1993. Estrogen receptor and progesterone receptor genes are expressed differentially in mouse embryos during preimplantation development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 9460-9464.
- Johnson, K.R., Ross, R.H., Fourt, D.L. 1958. Effect of progesterone administration on reproductive efficiency. *Journal of Animal Science* 17: 386-390.
- Kerbler, T. L., Buhr, M. M., Jordan, L. T., Leslie, K. E., Walton, J. S. 1997. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology* 47: 703-714.
- Larue, L., Ohsugi, M., Hirchenhain, J., Kemler, R. 1994. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 8263-8267.
- Larson, G., Butler, W.R., Currie, W.B. 1997. Reduced fertility associated with low progesterone post breeding and increased milk urea nitrogen in lactating cows. *Journal of Dairy Science* 80: 1288-1295.
- López, H., Caraviello, D. Z., Satter, L. D., Fricke, P. M., Wiltbank, M. C. 2005. Relationship between level of milk production and multiple ovulations in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88: 2783-2793.

- López-Gatius, F., Santolaria, P., Yániz, J. L., Hunter, R. H. F. 2004. Progesterone supplementation during the early fetal period reduces pregnancy loss in high-yielding dairy cattle. *Theriogenology* 62: 1529-1535.
- Mann, G.E., Lamming, G.E. 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 121: 175-180.
- McNeill, R.E., Diskin, M.G., Sreenan, J.M., Morris, D.G. 2006. Associations between milk progesterone concentration on different days and with embryo survival during the early luteal phase in dairy cows. *Theriogenology* 65: 1435-1441.
- Morris, D., Diskin, M. 2007. Effect of progesterone on embryo survival. *Animal*. 2: 1112- 1119.
- Morris, D.G., Humpherson, P.G., Leese, H.J., Sreenan, J.M. 2002. Amino acid turnover by elongating cattle blastocysts recovered on day 14-16 after insemination. *Reproduction* 124: 667-673.
- Nagano, M., Kamimura, S., Ushinohama, K., Hamana, K. 1999. Luteotropic effect of equine chorionic gonadotrophin (eCG) and human chorionic gonadotrophin (hCG) in cows. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association* 52: 635-638.
- Nebel, R. L., McGilliard, M.L. 1993. Interactions of high milk yield and reproductive performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 76: 3257-3268.
- Perry, G.A., Perry, B.L. 2009. GnRH treatment at artificial insemination in beef cattle fails to increase plasma progesterone concentrations or pregnancy rates. *Theriogenology* 71: 775-779.
- Rhinehart, J.D., Starbuck-Clemer, M.J., Flores, L.A., Milvae, R.A., Yao, J., Poole, D.H., Inskip, E.K. 2009. Low peripheral progesterone and late embryonic/early fetal loss in suckled beef and lactating dairy cows. *Theriogenology* 71: 480-490.

- Robinson, N.A., Leslie, K.E., Walton, J.S. 1989. Effect of treatment with progesterone on pregnancy rate and plasma concentration in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 72: 202-207.
- Sangsritavong, S., Combs, D.K., Sartori, R., Armentano, L.E., Wiltbank, M.C. 2002. High feedintake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17  $\beta$  in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 85:2831-2842.
- Santos, J.E.P., Thatcher, W.W., Pool, L., Overton, M.W. 2001. Effect of human chorionic gonadotropin in luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. *Journal of Animal Science* 79: 2881-2894.
- Santos, J.E.P., Thatcher, W.W., Chebel, R.C., Cerri, R.L.A., Galvao, K.N. 2004. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estous synchronization programs. *Animal Reproduction Science* 82-83: 513-535.
- Shelton, K., Gayerie de Abreu, M.F., Hunter, M.G., Parkinson, T.J., Lamming, G.E. 1990. Luteal inadequacy during the early luteal phase of subfertile cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 90: 1-10.
- Spencer, T.E., Bazer, F.W. 2002. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Frontiers Bioscience* 7: 1879-1898.
- Spencer, T.E., Burghardt, R.C., Johnson, B.A., Bazer, F.W. 2004. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Animal Reproduction Science* 82-83: 537-550.
- Sreenan, J.M., Diskin, M.G., Morris, D.G. 2001. Embryo survival rate in dairy cattle: a major limitation to the achievement of high fertility. In: *Proceedings of the fertility in the high-producing dairy cow. British Society of Animal Science Occasional Publication*. 93-104.
- Starbuck, G.R., Darwash, A.O., Mann, G.E., Lamming, G.E. 2001. The detection and treatment of post-insemination progesterone insufficiency in dairy cows. *Fertility in the high-producing dairy cow. British Society of Animal Science Occasional Publication* 26: 447-450.

- Stevenson, J.S., Portaluppi, M.A., Tenhouse, D.E., Lloyd, A., Eborn, D.R., Kacuba, S., DeJarnette, J.M. 2007. Interventions after artificial insemination: Conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to gonadotrophin-releasing hormone, human chorionic gonadotrophin, and progesterone. *Journal of Dairy Science* 90: 331-340.
- Stevenson, J.S., Tiffany, S.M., Inskeep, E.K. 2008. Maintenance of pregnancy in dairy cattle after treatment with human chorionic gonadotropin or gonadotropin-releasing hormone. *Journal of Dairy Science* 91: 3092-3101.
- Stronge, A.J.H, Sreenan, J.M., Diskin, M.G., Mee, J.F., Kenny, D.A., Morris, D.G. 2005. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology* 64: 1212-1224.
- Thatcher, W.W., Bilby, T.R., Bartolome, J.A., Silvestre, F., Staples, C.R., Santos, J.E.P. 2006. Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology* 65: 30-44.
- Winepiscopes 2.0, 2001.