

Respuesta ovárica y niveles hormonales en vacas Holando en diferentes estados reproductivos tratadas con Ovsynch y dos formulaciones de progesterona

Ovarian response and hormone levels in Holstein cows in different reproductive status treated with Ovsynch and two formulations of progesterone

Cavestany D^{a*}, Martínez-Barbitta M^b, Alonzo A³, López R³, Pílón A³, García ME³, Segredo A³, Sosa N³

a- DV, MSc, PhD. Departamento de Reproducción, Facultad de Veterinaria, Lasplacas 1620, Universidad de la República, 11600 Montevideo, Uruguay;

b- DCV, Programa de Posgrados, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República

3- DCV, Ejercicio Liberal

* Autor para correspondencia: daniel.cavestany@gmail.com

Veterinaria (Montevideo) Volumen 52
Nº 201 (2016) 4-12

Recibido: 6/5/2014
Aceptado: 13/8/2015

Resumen

Para evaluar los efectos de una progesterona (P4) inyectable en suspensión oleosa en tratamientos de sincronización de la ovulación se realizaron tres experimentos en vacas Holando multíparas en distinto estado reproductivo: 1) 24 vacas con más de 140 días posparto (DPP), en anestro, en tres grupos: Ovsynch + CIDR, Ovsynch + 200 mg y Ovsynch + 400 mg de MAD-4; 2) 8 vacas en anestro con menos de 100 DPP en dos grupos: Ovsynch + CIDR y Ovsynch + 200 mg de MAD-4; y 3) 15 vacas repetidoras ciclando con más de 200 DPP en dos grupos: Ovsynch + 200 y Ovsynch + 400 mg de MAD-4. En todos los experimentos se realizaron sangrados frecuentes y ultrasonografías ováricas. En el experimento 1 el grupo CIDR mantuvo niveles de P4 constantes en $1,5 \pm 0,7$ ng/mL; los grupos MAD 200 y MAD 400 alcanzaron niveles de P4 superiores a 10 ng/mL ($P < 0,05$) a las 8 h, descendiendo a las 48 h a valores basales. El diámetro del folículo dominante (DF) al día 9 fue 5 mm superior en el grupo CIDR que en los grupos MAD ($P < 0,05$). En los experimentos 2 y 3 los niveles de P4 fueron similares a los del experimento 1, así como la diferencia del diámetro del DF al día 9. Se concluyó que los niveles de P4 circulantes luego de la administración de P4 inyectable aumentan excesivamente al comienzo del tratamiento, disminuyendo rápidamente a las 48 h, lo que además de ser menos efectivo como fuente de P4 en tratamientos de inducción de ovulación que la administración intravaginal, afectan el diámetro del folículo dominante inducido.

Palabras clave:

Vacas Holando, sincronización, inducción de ovulación, progesterona

Summary

To evaluate the effects of injectable progesterone (P4) in oily suspension, three experiments were carried out in multiparous Holstein cows in different reproductive status: 1) 24 multiparous cows with more than 140 days postpartum (DPP) in anestrus, in three groups: Ovsynch + CIDR, Ovsynch + 200 and Ovsynch + 400 mg of MAD-4. 2) 8 cows in anestrus with less than 100 DPP in two groups: Ovsynch + CIDR and Ovsynch + 200 mg of MAD-4 and 3) 15 repeat-breeder cows cycling with more than 200 DPP in two groups: Ovsynch + 200 and Ovsynch + 400 mg of MAD-4. In all experiments, frequent bleeding and ovarian ultrasonography were carried out. In experiment 1 P4 levels of CIDR Group remained constant at 1.5 ± 0.7 ng/mL. MAD 200 and 400 MAD groups reached P4 levels higher than 10 ng/mL ($P < 0.05$) at 8 h, descending at 48 h to baseline. Diameter of the dominant follicle (DF) at D9 was 5 mm higher in the CIDR that in MAD groups ($P < 0.05$). In experiments 2 and 3 P4 levels were similar to those of experiment 1, as well as the difference in the diameter of the DF at D9. It is concluded that circulating P4 levels after administration of injectable P4 increase excessively at the beginning of the treatment, decreasing rapidly in 48 hours which, in addition to being less effective as a source of P4 in treatments of induction of ovulation that intravaginal, affect the diameter of the induced dominant follicle.

Keywords:

Holstein cows, induction, synchronization of ovulation, progesterone

Introducción

Las principales causas de pérdida de eficiencia reproductiva en vacas Holando, además de la mortalidad embrionaria precoz (Santos y col., 2004), son la pobre expresión de comportamiento estral, lo que dificulta su detección (Cavestany y Galina, 2001), y el porcentaje de vacas en anestro (Cavestany y col., 2003a; Wiltbank y col., 2011). Para tratar de superar esto se han desarrollado una gran variedad de programas de sincronización o de inducción de celos y ovulaciones (Macmillan, 2010). Los esquemas que aseguran concentraciones circulantes elevadas de progesterona (P4) sincronizan tanto la emergencia de una nueva onda folicular como la ovulación (Cavestany y col., 2003b; Chebel y col., 2010), por lo que cuando utilizan la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), pueden resultar en una mejor eficiencia reproductiva (Pursley y col., 1995), ya que iniciar un protocolo de sincronización de ovulación en un ambiente de alta progesterona incrementa la fertilidad del tratamiento (Murugavel y col., 2003). La P4 previene la ovulación de los folículos maduros (Sirois y Fortune, 1990) por lo que cuando se incluye en estos protocolos, se puede prevenir la ovulación prematura (Stevenson y col., 1999). La progesterona ha sido usada impregnada en implantes vaginales en los protocolos de sincronización de ovulaciones en vacas lecheras (Xu y Burton, 2000).

Otro factor limitante para una buena eficiencia reproductiva es la presencia de vacas problema o repetidoras (Levine, 1999). Esto puede ser debido a varios factores como ser falla en la expresión de celos, ovulación de ovocitos de baja calidad, formación de un cuerpo lúteo (CL) con deficiente producción de P4, presencia de un ambiente inadecuado para la implantación del embrión y la producción de un embrión de mala calidad (Walsh y col., 2011). Por lo tanto un tratamiento de sincronización de celos adecuado debe contemplar tanto la funcionalidad del CL como el adecuado desarrollo folicular, permitiendo así regular el momento de la ovulación de un folículo de buena calidad (Thatcher y col., 1989).

La utilización de progesterona por vía parenteral puede tener efectos beneficiosos ya que elimina la necesidad de remover y eliminar los dispositivos vaginales, y por tanto el riesgo de contaminación ambiental. Hay escasa información sobre el uso parenteral de progesterona en protocolos de sincronización de celos en vacas Holando (Andringa y col., 2013) pero no hay sobre su efecto en los niveles de progesterona circulante y la dinámica folicular, por lo que el objetivo de estos trabajos fue comparar los niveles hormonales y la respuesta ovárica (dinámica folicular, ovulación o regresión de un folículo dominante en vacas en diferentes estados reproductivos (anestro o ciclando), sincronizadas con el protocolo Ovsynch modificado con la adición de P4 en forma inyectable o impregnada en dispositivos vaginales. Además, en dos grupos de vacas repetidoras, también sincronizadas con un Ovsynch se compararon dos dosis de P4 inyectable (200 o 400 mg).

Materiales y métodos

a) Animales y Tratamientos

Todos los experimentos se realizaron en el Instituto Nacional

de Investigación Agropecuaria (INIA), en la estación experimental La Estanzuela (Colonia, Uruguay), que contaba, al momento de la realización de éstos, con un total de 282 animales en ordeño con una producción promedio de leche de 22,5±2,4 L/día y una alimentación consistente en pastoreo de mezcla de gramíneas y leguminosas complementada con silo de maíz (12 kg/MF/vaca/día) y 2-4 kg de concentrado comercial (19% PC y 1,7 Mcal/kg ENL) administrado en el momento de cada ordeño. Los procedimientos con animales fueron previamente aprobados por la Comisión de Ética en Uso de Animales (CEUA) de la Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Experimento 1

Del rodeo de 282 vacas en ordeño, se seleccionaron 24 vacas Holando con 2,3±0,3 lactancias, 148,3±10,5 días posparto y producción promedio de leche de 14,2±0,5 L/día, 506,1±13,2 kg de peso corporal y 2,6±0,1 puntos de condición corporal, que estaban en anestro de acuerdo a la falta de registros de actividad sexual y confirmada por dos ultrasonografías ováricas realizadas con una semana de intervalo previo al inicio de los tratamientos. Las vacas se distribuyeron al azar en tres grupos (n=8 cada uno). El grupo control (CIDR) recibió un tratamiento Ovsynch [D0: 8,4 µg de Buserelina (GnRH; Laboratorio Río de Janeiro, Santa Fe, Argentina) y se colocó un dispositivo intravaginal con 1,3 g de progesterona (CIDR; Universal Lab, Montevideo, Uruguay); D7: 500 µg de d-cloprostenol (Prostaglandina; Laboratorio Río de Janeiro, Santa Fe, Argentina) y el D9: segunda dosis de GnRH, igual a la primera]. Los dos grupos restantes recibieron un tratamiento similar, pero sustituyendo el dispositivo vaginal por P4 inyectable, administrada por vía subcutánea de una sola vez; se utilizaron dos dosis: 200 mg (Grupo MAD 200) o 400 mg (Grupo MAD 400) (4-pregnano-3.20-diona, MAD-4, Laboratorio Río de Janeiro, Santa Fe, Argentina).

Experimento 2

De un lote de 54 vacas del mismo rodeo se seleccionaron 8 vacas en anestro (ausencia de registros de celos y sin estructuras ováricas a dos ultrasonografías realizadas con una semana de intervalo) con las siguientes características: 2,1±0,6 lactancias, 103,3±15,1 días posparto, producción promedio de leche 14,4±1,1 L/día, 466,1±19,6 kg de peso corporal y 2,4±0,1 de condición corporal; las que fueron adjudicadas a dos grupos de 4 animales cada uno. Un grupo (CIDR AN, n=4) recibió un tratamiento Ovsynch [D0: 8,4 µg de Buserelina (GnRH; Laboratorio Río de Janeiro, Santa Fe, Argentina)] y se colocó un dispositivo intravaginal con 1,3 g de progesterona (CIDR; Universal Lab, Montevideo, Uruguay); D7: 500 µg de d-cloprostenol (Prostaglandina; Laboratorio Río de Janeiro, Santa Fe, Argentina) y D9: segunda dosis de GnRH, igual a la primera. El otro grupo (MAD 200 AN, n=4) recibió un tratamiento similar sustituyendo el dispositivo vaginal por 200 mg de P4 oleosa, inyectable, administrada por vía subcutánea de una sola vez (MAD-4; Laboratorio Río de Janeiro, Santa Fe, Argentina).

Experimento 3

Del rodeo de 282 vacas se preseleccionaron 30 vacas ciclando y vacías a la ultrasonografía con una historia reproductiva de más de tres servicios sin concepción, $3,1 \pm 0,9$ lactancias, $210,3 \pm 15,1$ días posparto producción promedio de leche $12,2 \pm 0,6$ L/día, $525,1 \pm 18,3$ kg de peso corporal y $2,9 \pm 0,1$ de condición corporal. La ciclicidad se comprobó por detección de dos celos anteriores y presencia de CL. Los animales fueron adjudicados a dos grupos de 7 y 8 animales, que se presincronizaron con dos dosis de PG (500 µg de d-cloprostenol; Prostaglandina; Laboratorio Río de Janeiro, Santa Fe, Argentina), la primera 26 días previo al inicio de los tratamientos (D-26) y la segunda 14 días después (D-12). El D-1 se seleccionó 15 vacas con un cuerpo lúteo (CL). El D0, todos los animales recibieron 8,4 µg de Buserelina (GnRH; Laboratorio Río de Janeiro, Santa Fe, Argentina), un grupo recibió 200 mg de progesterona inyectable (MAD 200, n=7), (MAD-4; Laboratorio Río de Janeiro, Santa Fe, Argentina) y el otro 400 mg de la misma P4 (MAD 400, n=8), ambos por vía subcutánea. El D7 se aplicó a todas 500 µg de d-cloprostenol (Prostaglandina; Laboratorio Río de Janeiro, Santa Fe, Argentina) y el D9 otra dosis de GnRH.

b) Determinaciones

Se realizaron sangrados periódicos para cuantificación de P4 y se determinó actividad ovárica por ecografía de una manera similar para los tres experimentos.

b.1.) Sangrados

Los sangrados yugulares se realizaron 24 h antes del tratamiento, a las 0, 4, 8 y 12 h de comenzado; luego cada 12 h los dos días siguientes y un sangrado diario los 6 días siguientes. Las muestras recolectadas fueron centrifugadas dentro de los 30 minutos de obtenidas a 3000 RPM durante 15 min y el plasma obtenido fue almacenado a -20 °C hasta su análisis.

b.2.) Actividad Ovárica

Los días 1, 7, 9 y 10 se realizó ultrasonografía ovárica (Aloka 500, Aloka Co. Ltd., Tokio, Japón, con traductor lineal rectal de 5 MHz en modo B) para determinar tamaño, y por tanto crecimiento folicular y el momento y tamaño del folículo ovulatorio; para esto se consideraron las dos últimas ecografías y se definió el animal que ovuló como aquel que mantuvo un crecimiento constante del folículo mayor llegando a un tamaño preovulatorio (≥ 12 mm) desapareciendo el D10. Se clasificó como ovulación prematura cuando al D7 se visualizaban folículos mayores a 12 mm y al D9 folículos menores a 5 mm. Se definió como regresión folicular cuando a los días 7 y 9 se visualizaban folículos mayores a 12 mm, que disminuían a menos de 5 mm al D10.

c) Análisis de Laboratorio

Todas las determinaciones hormonales se realizaron en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria; la progesterona se cuantificó por RIA en fase sólida (125 I Progesterona Coat-a-Count, Siemens SA, EEUU). La sensibilidad del RIA fue 0,02 ng/mL y los coeficientes de variación intra-ensayo para controles bajos (0,8 ng/mL), me-

dios (8,0 ng/mL) y altos (15,0 ng/mL) fueron 7,6%, 10,3% y 5,9%, respectivamente. La variación inter-ensayo fue 9,3%, 11,8% y 6,3% para los mismos controles (Meikle y col, 2004).

d) Análisis estadístico

Para los tres experimentos se empleó el mismo método estadístico. Para el análisis de las variables continuas con más de una medición en el tiempo (dinámica folicular, perfiles de progesterona) se utilizó un modelo mixto: PROC MIXED del SAS (Littell y col., 1998), que incluyó como efectos fijos: tratamiento, día e interacciones. El modelo consideró como efecto aleatorio a la vaca dentro de tratamiento. La estructura de covarianza utilizada fue AR (1) y las medidas repetidas se realizaron sobre la unidad vaca dentro de tratamiento por día. Se determinó el nivel de significancia en 5%

Resultados

Experimento 1

Al inicio del tratamiento (h 0) los valores de P4 en sangre fueron inferiores a 0,9 ng/mL en todos los animales. En las vacas del grupo CIDR la P4 comenzó a elevarse a partir de las 8 h, manteniéndose estable durante las siguientes 48 h. En los grupos MAD, el perfil hormonal fue diferente entre los 3 grupos ($P < 0,05$; Figura 1).

En ambos tratamientos, los valores descendieron a las 48 h a $0,8 \pm 1,3$ ng/mL y $1,9 \pm 1,3$ ng/mL respectivamente ($P < 0,05$). A partir de entonces los valores de P4 en los grupos MAD siguieron descendiendo mientras que en el CIDR comenzaron a aumentar alcanzando su valor máximo el D4. Entre los D3 y D7, los valores de P4 de los tres grupos se mantuvieron similares.

La Figura 2 muestra los resultados de la ultrasonografía ovárica realizada en las vacas al inicio del Experimento (D0) y a los D7 y D9. Al comienzo del tratamiento el diámetro del folículo dominante (DF) fue similar entre los tres grupos ($P > 0,1$). Al D7, las vacas del grupo CIDR tuvieron un mayor diámetro del DF que las de los grupos MAD 200 y MAD 400.

Dentro de los dos grupos MAD, las vacas del MAD 400 registraron un menor tamaño folicular que las del MAD 200. La diferencia del diámetro del DF al D9 fue mayor en el grupo CIDR que en los grupos MAD 200 y MAD 400.

Experimento 2

Todos los animales presentaron en la muestra previa al tratamiento niveles de P4 menores a 0,9 ng/mL. A las 4 h el grupo MAD 200 AN presentó valores mayores que el grupo CIDR AN ($P < 0,01$; Figura 3); a las 8 h los valores del grupo MAD descendieron mientras que los del CIDR aumentaron

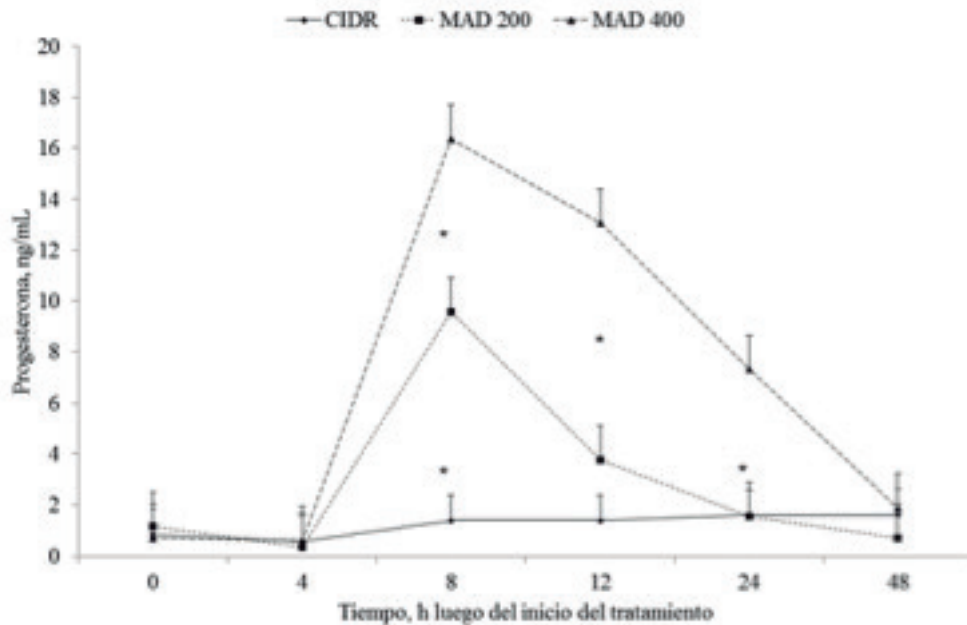


Figura 1 Niveles de progesterona en plasma en vacas Holando en anestro tratadas con Ovsynch más: CIDR (CIDR), o 200 mg (200 MAD) o 400 mg (MAD 400) de progesterona inyectable (MAD-4) (ng/mL; media±e.e.m) (* = P<0,05)

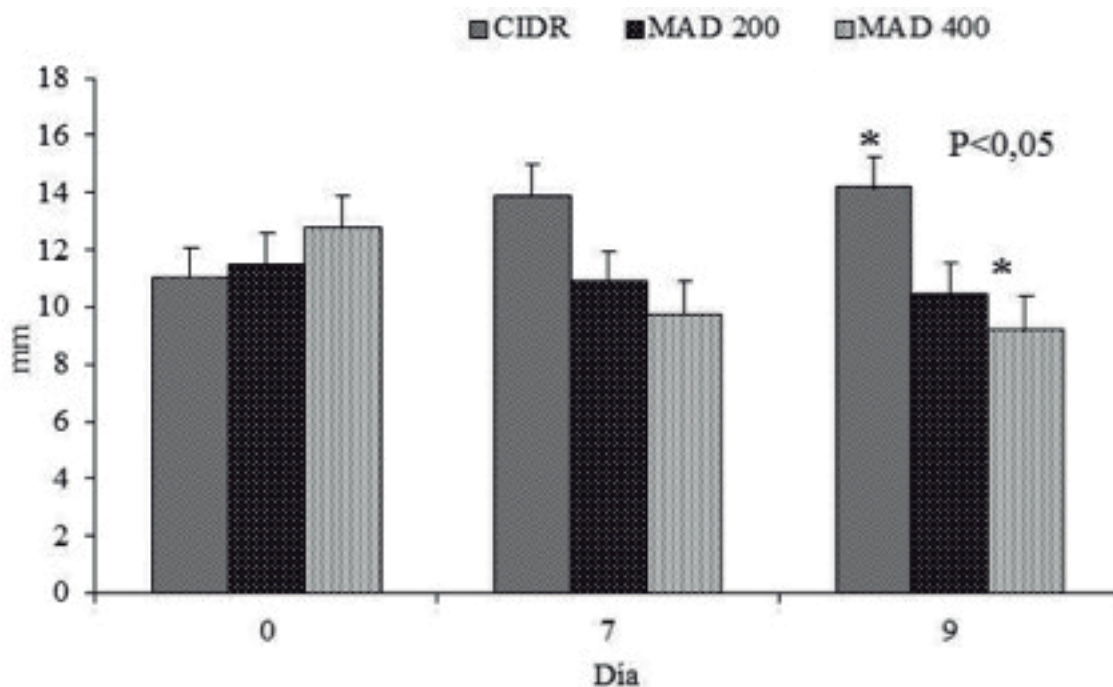


Figura 2 Diámetro folicular determinado por ultrasonografía en los días 0, 7 y 9 del Experimento en vacas Holando en anestro tratadas con Ovsynch más: CIDR (CIDR), o 200 mg (200 MAD) o 400 mg (MAD 400) de progesterona inyectable (MAD-4) (ng/mL; media±e.e.m) (* = P<0,05)

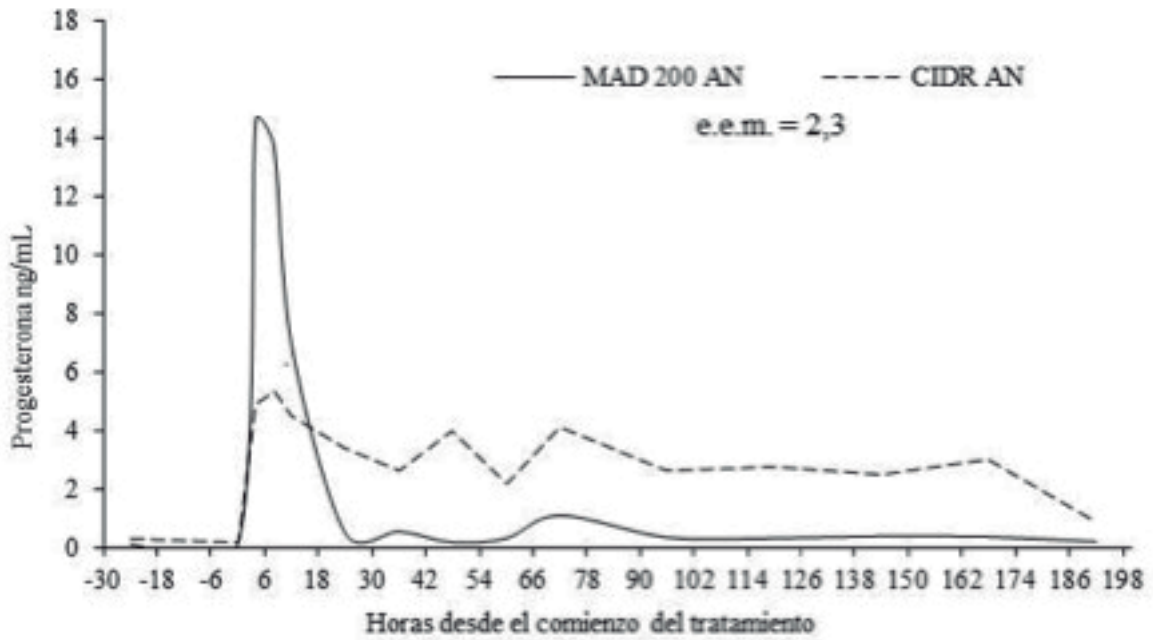


Figura 3 Niveles de progesterona en plasma (ng/mL) en vacas Holando en anestro tratadas con Ovsynch más: CIDR (CIDR AN) o 200 mg de progesterona inyectable (MAD-4) (MAD 200 AN). A hora 6 del Experimento se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,01$) y de la hora 6 hasta el final del período de muestreo ($P < 0,05$)

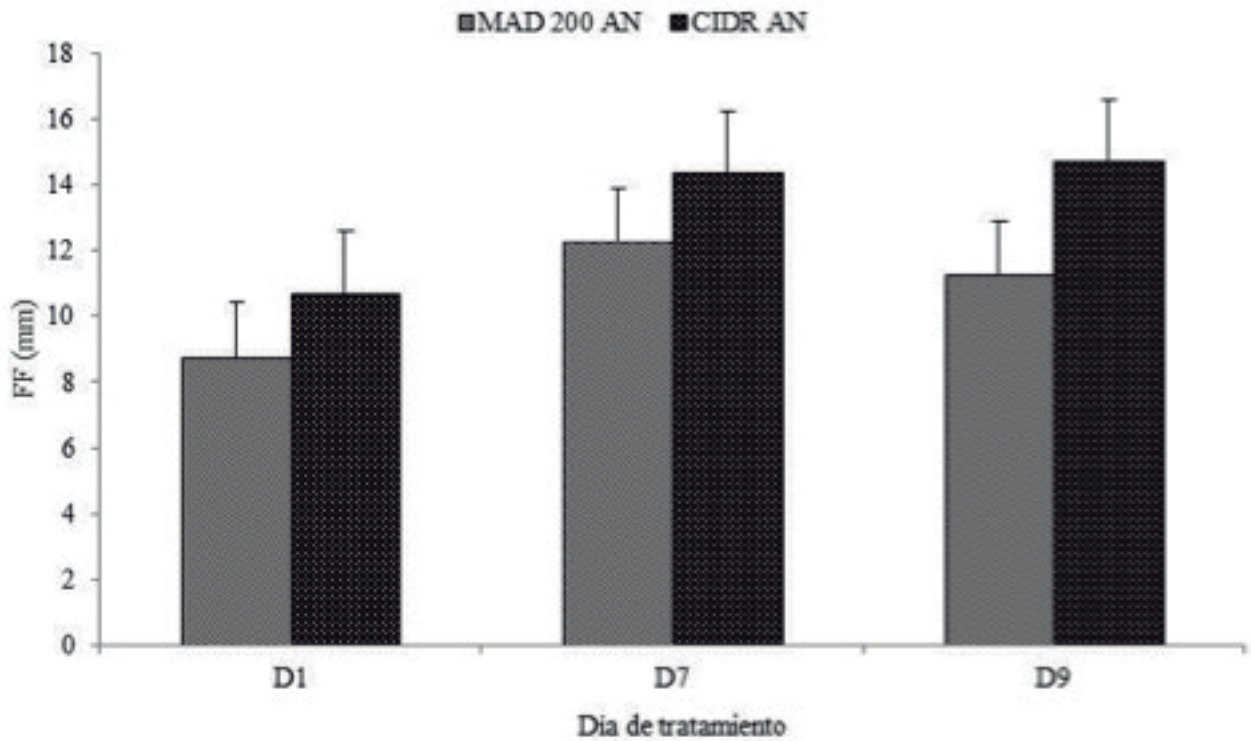


Figura 4 Diámetro del folículo mayor determinado por ultrasonografía a los días 0, 7 y 9 en vacas Holando en anestro tratadas con Ovsynch más: CIDR (CIDR AN) o 200 mg de progesterona inyectable (MAD-4) (MAD 200 AN) ($P > 0,05$).

($P < 0,01$); a las 12 h los valores de MAD y CIDR fueron similares ($P > 0,5$). A partir de entonces, a diferencia del CIDR ($P < 0,05$), los valores del grupo MAD descendieron a valores basales (menores a 1 ng/mL).

Al D1, D7 y D9 el tamaño del DF fue similar entre los grupos ($P > 0,1$; Figura 4).

En el grupo MAD 200 AN una vaca ovuló luego de la segunda GnRH (1/4), una entre la PG y la GnRH (ovulación prematura) (1/4) y 2/4 regresaron el folículo sin ovular. En el grupo CIDR AN, 2 ovularon luego de la segunda GnRH (2/4), 1 (1/4) entre la PG y la GnRH y 1 (1/4) prematuramente.

Experimento 3

Todas las vacas ciclando (repetidoras) iniciaron el tratamiento con niveles promedio de P4 de $3,3 \pm 1,3$ ng/mL. A las 4 h hubo un aumento significativo, mayor en las MAD 400 que en las MAD 200 ($P < 0,05$; Figura 5).

Mientras que a las 8 h los niveles del grupo MAD 200 disminuyeron, en el grupo MAD 400 continuaron aumentando ($P < 0,01$). A las 12 h, el nivel promedio de MAD 400 fue mayor que el de MAD 200 ($P < 0,01$). A partir de este momento los niveles disminuyeron y se mantuvieron constantes hasta la administración de PG. El tamaño del FD no difirió entre los

tratamientos (Figura 6).

En el grupo MAD 200, 5 vacas ovularon luego de la segunda GnRH, 1 entre la PG y la GnRH (ovulación prematura) y 2 regresaron el folículo sin ovular. En el grupo MAD 400 4 ovularon luego de la segunda GnRH, 1 entre la PG y la GnRH (ovulación prematura) y 3 regresaron el folículo sin ovular.

Discusión

Para que la P4 por vía inyectable pueda sustituir la aplicación local debe asegurar niveles luteales en sangre durante un período de tiempo que no puede ser menor a los cinco días (Stevenson y col., 1999; Rivera y col., 2005). En el presente grupo de experimentos se utilizaron diversas categorías de animales y diferentes dosis de P4 inyectable; en ninguno de los tratamientos que comenzaron con niveles de P4 inferiores a 1 ng/mL la P4 inyectable logró inducir concentraciones plasmáticas de P4 por encima de 1 ng/mL por más de dos días de modo que no se puede comparar esta formulación con los dispositivos intravaginales en protocolos de sincronización/inducción de celos.

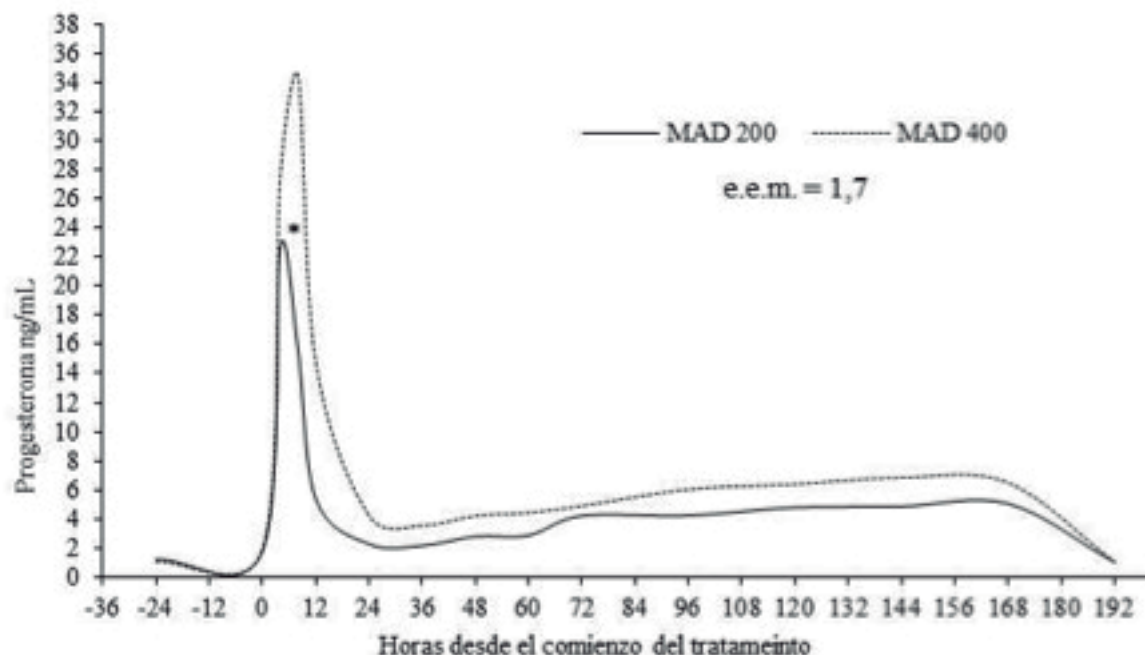


Figura 5 Niveles de progesterona de plasma en vacas Holando ciclando tratadas con Ovsynch más: 200 mg (200 MAD) o 400 mg (MAD 400) de progesterona inyectable (MAD-4) (ng/mL; media \pm e.e.m) (* = $P < 0,05$)

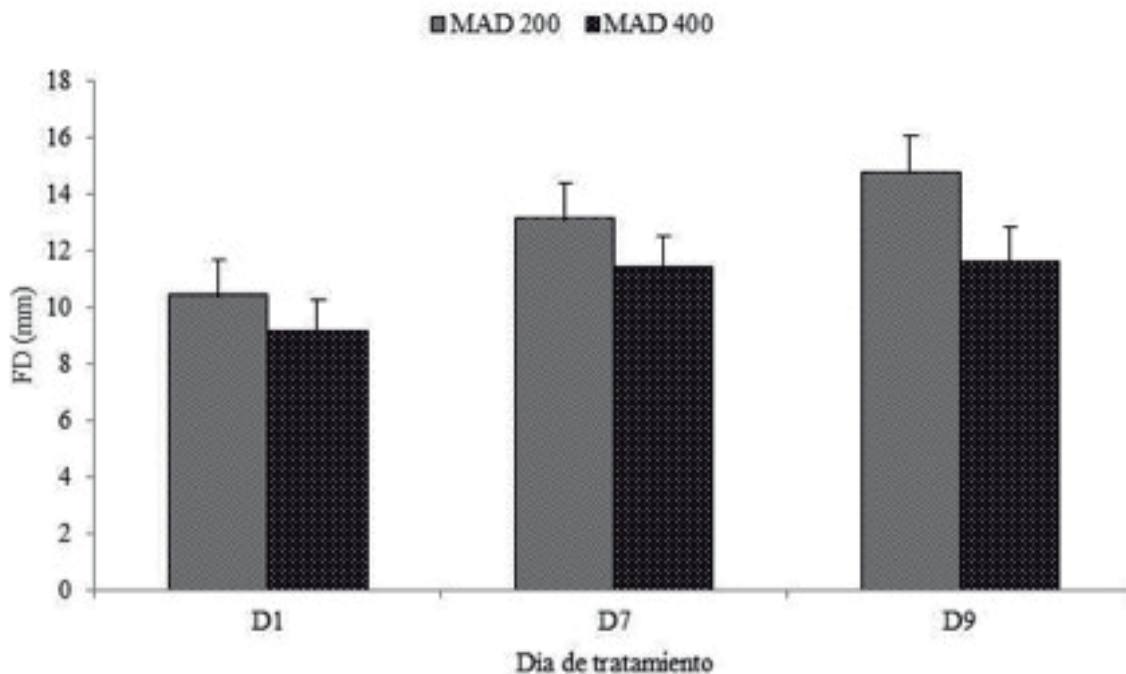


Figura 6 Diámetro del foliculo dominante (FD) determinado por ultrasonografia a los días 0, 7 y 9 en vacas Holando ciclando, tratadas con Ovsynch más: 200 mg (200 MAD) o 400 mg (MAD 400) de progesterona inyectable (MAD-4) (ng/mL; media \pm e.e.m) (P=0,06)

En el experimento 1, los niveles plasmáticos de P4 superaron el umbral de 1 ng/mL solamente durante 24 (MAD 200) o 48 h (MAD 400), tiempo mucho menor que el logrado por dispositivos vaginales y necesario para una adecuada respuesta en término de fertilidad (McDougall y col., 2004; Chebel y col., 2010). Por otra parte, los niveles máximos alcanzados luego de la administración de P4 inyectable (tanto con 200 como con 400 mg) fueron dos y tres veces más altos que los niveles luteales de un ciclo estral normal; los efectos que pueda causar esta elevada concentración plasmática de P4 no pueden inferirse de este experimento, pero sería interesante evaluar si pudieran afectar las relaciones hormonales de un ciclo estral. Los niveles de progesterona en vacas tratadas con Ovsynch + CIDR fueron inferiores a los 2 ng/mL, inferiores también a los reportados por Nation y col. (2000), quienes luego de la colocación de un CIDR por 5 días en vacas primíparas a la tercer semana posparto, encontraron niveles de P4 de 2,8 ng/mL a los 45 minutos de la aplicación del dispositivo, manteniéndose constantes por las 5 h siguientes y presentando la mayor concentración plasmática de la hormona a las 24 h con 4,0 ng/mL. Estos niveles descendieron al cuarto día (2,6 ng/mL), permaneciendo igual al quinto día en el que se retiró el CIDR. Trabajos similares en vacas en anestro también mostraron la mayor concentración de P4 en plasma a las 48 h con niveles de 2,5 ng/mL (Macmillan y col., 2001).

La respuesta ovárica fue diferente en las vacas tratadas con CIDR, donde a los días 7 y 9 se encontraron folículos mayores que en las tratadas con MAD-4, siendo al día previo a la ovulación estadísticamente diferentes. Esto podría estar relacionado a lo mencionado en el párrafo anterior que altos niveles de P4 podrían alterar el sistema endocrino, o bien por el escaso tiempo en que los niveles de P4 permanecen

elevados luego de este tratamiento (Stevenson y col., 1999). Como no existen estudios previos para comparar los resultados, se podría pensar que valores muy altos de P4 afectarían el diámetro folicular de la siguiente onda (Adams y col., 1992). Con el CIDR se logró el desarrollo de un foliculo mayor, resultado similar al obtenido por Herlihy y col. (2012), pero menor al reportado por Stevenson y col. (2007). Normalmente, al remover la fuente de P4 el diámetro folicular aumenta (Cavestany y col., 2003b), aunque esto no fue lo que pasó en el presente experimento donde el diámetro creció menos de 1 mm entre el día 7 y el 9. Para mejorar la respuesta a los tratamientos hormonales es condición necesaria recordar los factores que provocan un período posparto prolongado (Rhodes y col., 2003).

En el experimento 2 con animales en anestro, antes de comenzar el tratamiento éstos presentaron valores de P4 en plasma por debajo de los niveles luteales (1ng/mL), al igual que lo observado por McDougall y col. (2004) y concordantes con los resultados del experimento 1. Luego de realizados los tratamientos, el MAD-4 provocó un pico de P4 superior a los 14 ng/mL a las 6 h, más del doble del CIDR, que duró 24 h, mientras que el CIDR mantuvo valores superiores a los 2 ng/mL hasta su retiro. Valores similares se observaron en el trabajo realizado por Nation y col. (2000) en el cual el pico fue de 4 ng/mL, pero a las 24 h de la colocación del CIDR.

Del mismo modo que en el experimento 1, el crecimiento folicular en vacas tratadas con P4 inyectable fue menor que en las que recibieron un CIDR. Esto podría deberse a las altas concentraciones en plasma alcanzados en las primeras horas por las formulaciones oleosas. Puede pensarse que altos valores de P4 afectarían el crecimiento de la siguiente onda folicular, retrasándola (Callejas y col., 2002; Vasconcelos y

col., 1999). Si bien el porcentaje de vacas que ovulan no fue diferente a reportes previos (Wiltbank y col., 2011), es posible que estos folículos pequeños sean incompatibles con una fertilidad aceptable (Diskin y col., 2003).

En el experimento 3 con vacas ciclando, éstas vacas tenían una historia de más de tres servicios, por lo que pueden considerarse como repetidoras (Yusuf y col., 2010). A pesar que todas al comienzo del tratamiento se hallaban en el día 10 del ciclo y con un CL funcional, los valores de P4 fueron menores a 2 ng/mL, muy inferiores a los 5 ng/mL reportado por otros autores en la misma etapa del ciclo (Wolfenson y col., 2004) lo que podría estar asociado a la baja eficiencia reproductiva de estas vacas. Luego de los tratamientos con 200 y 400 mg de MAD-4, la concentración de P4 se elevó muy por encima de los niveles basales luteales, logrando valores superiores a 11 y 19 ng/mL respectivamente, con un perfil similar a los encontrados en los experimentos anteriores, aunque con niveles superiores debido a la presencia de un CL funcional. Esto difiere de lo reportado en trabajos realizados con CIDR en animales ciclando, en los cuales alcanzaron máximos superiores a 2,5 ng/mL (Sakase y col., 2005) y 4 ng/mL (Kawate y col., 2004). Luego de la hora 12 post tratamiento, y hasta el final del Experimento, los niveles de P4 disminuyeron considerablemente, pero manteniéndose por encima de 1 ng/mL, no existiendo diferencias entre dosis administrada.

El diámetro folicular a los días 7 y 9 fue inferior a 14 mm, similar a lo encontrado luego del tratamiento con MAD-4 en vacas en anestro. Del mismo modo dosis mayores de P4 inyectable parecen resultar en menor diámetro folicular lo que posiblemente derive en menor fertilidad (Atkins y col., 2010). Según Vasconcelos y col. (2001) folículos pequeños (menores a 12 mm) resultarán, luego de la ovulación, en CL de menor tamaño que producirán menores concentraciones de P4, llevando a la reducción de la fertilidad. Asimismo, Pérez Marín y col. (2003) trabajando con vacas repetidoras reportaron que el diámetro medio de los folículos preovulatorios sería de 17,8±3,6 mm, no alcanzado en nuestros experimentos.

Conclusiones

La P4 inyectable provocó aumentos excesivos de los niveles circulantes de esta hormona (tres o cuatro veces los normales), lo que podría afectar los eventos endocrinos siguientes; por otra parte, estos niveles decaen luego de las 48 h, es decir su modo de acción difiere notablemente de lo que ocurre en un ciclo estral normal, lo que cuestiona su efecto en estos tratamientos. Aunque el número de animales fue escaso para realizar afirmaciones contundentes, los altos niveles resultantes provocados por la progesterona inyectable parecerían afectar la dinámica folicular y el tamaño del siguiente folículo dominante.

Referencias

1. Adams GP, Matteri RL, Ginther OJ. (1992). The effect of progesterone on growth of ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating FSH in heifers. *J Reprod Fert*; 95:627-640.
2. Andringa MFA, van Eerdenburg FJCM, Fernández E, García S, Cavestany D. (2013). Comparison between two sources of progesterone and two formulations of oestradiol in a HeatSynch protocol in postpartum cycling dairy cows in pasture. *J Vet Sci* 2013; 14:161-166.
3. Atkins JA, Smith MF, Wells KJ, Geary TW. (2010). Factors affecting preovulatory follicle diameter and ovulation rate following gonadotropin-releasing hormone in postpartum beef cows. Part II: anestrous cows. *J Anim Sci*; 88:2311-2320.
4. Callejas SS, Alberio RH, Cabodevila J, Dulout F, Aller JF, Catalano R. (2002). Evaluación de la administración de diferentes dosis de progesterona para controlar la onda de crecimiento folicular en vacas cíclicas. *Rev Arg Prod Anim*; 22:285-286.
5. Cavestany D, Galina CS. (2001). Factors affecting the reproductive efficiency of artificial insemination programmes in a seasonal breeding pasture based dairy system with the aid of milk progesterone. *Reprod Dom Anim* 2001; 36:85-90.
6. Cavestany D, Cibils J, Freire A, Sastre A, Stevenson JS. (2003a). Evaluation of two different oestrus-synchronisation methods with timed artificial insemination and resynchronisation of returns to oestrus in lactating Holstein cows. *Anim Reprod Sci* 2003; 77:141-155.
7. Cavestany D, Meikle A, Kindahl H, Van Lier E, Moreira F, Thatcher WW, Forsberg M. (2003b). Use of medroxyprogesterone acetate (MAP) in lactating Holstein cows within an Ovsynch protocol: follicular growth and hormonal patterns. *Theriogenology*; 59:1787-1798
8. Chebel RC, Al-Hassan MJ, Fricke PM, Santos JE, Lima JR, Martel CA, Stevenson JS, Garcia R, Ax RL. (2010). Supplementation of progesterone via controlled internal drug release inserts during ovulation synchronization protocols in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*; 93:922-931.
9. Diskin MG, Mackey DR, Roche JF, Sreenan JM. (2003). Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci*; 78:345-370.
10. Edmonson AJ, Lean LJ, Weaver LD, Farver T, Webster G. (1989). A body condition scoring chart for Holstein dairy cow. *J. Dairy Sci*; 72:68-78.
11. Herlihy MM, Crowe MA, Diskin MG, Butler ST. (2012). Effects of synchronization treatments on ovarian follicular dynamics, corpus luteum growth, and circulating steroid hormone concentrations in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*; 95:743-54
12. Kawate N, Itami T, Choushi T, Saitoh T, Wada T, Mat-suoka K, Uenaka K, Tanaka N, Yamanaka A, Sakase M, Tamada H, Inaba T, Sawada, T. (2004). Improved conception in timed-artificial insemination using a progesterone-releasing intravaginal device and ovsynch protocol in postpartum suckled Japanese Black beef cows.

- Theriogenology; 61:399-406.
13. Levine AR. (1999). The repeat breeder cow. *Bov Prac* 33:97-105
 14. Macmillan KL. (2010). Recent advances in the synchronization of estrus and ovulation in dairy cows. *J Reprod Dev*; 56(Suppl):S42-S47.
 15. McDougall S, Compton CWR, Annis FM. (2004). Effect of exogenous progesterone and oestradiol on plasma progesterone concentrations and follicles wave dynamics in anovulatory anoestrus post-partum dairy cattle. *Anim Reprod Sci*; 84:303-314.
 16. Meikle A, Kulsar M, Chilliard Y, Febel H, Delavaud C, Cavestany D, Chilibruste P. (2004). Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction* 127:727-737.
 17. Murugavel K, Yániz LJ, Santolaria P, López-Béjar M, López-Gatius F. (2003). Luteal activity at the onset of a timed insemination protocol affects reproductive outcome in early postpartum dairy cows. *Theriogenology*; 60:583-593.
 18. Nation DP, Burke CR, Parton G, Stevenson R, Macmillan KL. (2000). Hormonal and ovarian responses to a 5-day progesterone treatment in anoestrous dairy cows in the third week post-partum. *Anim Reprod Sci*; 63:13-25.
 19. Pérez Marín, CC, Rodríguez Artilés, I, España España, F, Dorado Martín, J, Hidalgo Prieto, M, Corral Peña, S, Sanz Parejo, J. (2004). Dinámica folicular ovárica en vacas repetidoras: estudio ecográfico y perfil de progesterona. *Arch Zoot*; 53:35-46.
 20. Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PG₂ α and GnRH. *Theriogenology*; 44:915-923.
 21. Rhodes FM, McDougall S, Burke CR, Verkerk GA, Macmillan KL. (2003). Invited review: treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. *J Dairy Sci*; 86:1876-1894.
 22. Rivera H, Lopez H, Fricke PM. (2005). Use of intravaginal progesterone-releasing inserts in a synchronization protocol before timed AI and for synchronizing return to estrus in Holstein heifers. *J Dairy Sci*; 88:957-968.
 23. Sakase M, Seo Y, Fukushima M, Noda M, Takeda K, Ueno S, Inaba T, Tamada H, Sawada T, Kawate N. (2005). Effect of CIDR-based protocols for timed-AI on the conception rate and ovarian functions of Japanese Black beef cows in the early postpartum period. *Theriogenology*; 64:1197-1211.
 24. Santos JE, Thatcher WW, Chebel RC, Cerri RL, Galvão KN. (2004). The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim Reprod Sci*; 82-83:513-535.
 25. Sirois J, Fortune JE. (1990). Lengthening the bovine estrus cycle with low concentration of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology*; 127:916-925.
 26. Stevenson JS, Kobayashi Y, Thopson KE. (1999). Reproductive performance of dairy cows in various programmed breeding systems including ovsynch combinations of gonadotropin releasing hormone prostaglandin F₂ alpha. *J Dairy Sci*; 82:506-515.
 27. Thatcher WW, Macmillan KL, Hansen PJ, Drost M. (1989). Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology*; 31:149-164.
 28. Vasconcelos JL, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank MC. (2001). Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*; 56:307-314.
 29. Vasconcelos JL, Silcox RW, Rosa GJM, Pursley JR, Wiltbank MC. (1999). Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology*; 52:1067-1078.
 30. Walsh SW, Williams EJ, Evans ACO. (2011). A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim Reprod Sci*; 123:127-138.
 31. Wiltbank MC, Sartori R, Herlihy MM, Vasconcelos JL, Nascimento AB, Souza AH, Ayres H, Cunha AP, Keskin A, Guenther JN, Gumen A. (2011). Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. *Theriogenology*; 76:1568-1582.
 32. Wolfenson D, Thatcher WW, Savio JD, Badinga L, Lucy MC. (1994). The effect of GnRH analogue on the dynamics of follicular development and synchronization of estrus in lactating dairy cows. *Theriogenology*; 42:633-644.
 33. Xu ZZ, Burton LJ. (2000). Estrus synchronization of lactating dairy cows with GnRH, progesterone, and prostaglandin F₂ α . *J Dairy Sci*; 83:471-476.
 34. Yusuf M, Nakao T, Ranasinghe RB, Gautam G, Long ST, Yoshida C, Koike K, Hayashi A. (2010). Reproductive performance of repeat breeders in dairy herds. *Theriogenology*; 73:1220-1229.