



INSTITUTO DE REPRODUCCION ANIMAL CORDOBA



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

---

# **EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE CELOS Y LA ADICIÓN DE GnRH SOBRE LA TASA PREÑEZ EN VACAS HOLANDO ARGENTINO EN LACTANCIA SINCRONIZADAS CON ESTRADIOL Y DISPOSITIVOS CON PROGESTERONA**

**Juan Carlos Tschopp**

Tesis

Para obtener el Grado Académico de  
Magister en Reproducción Animal

Universidad Nacional de Córdoba  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Escuela para Graduados

Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC)

**CÓRDOBA, 2016**

**EFFECTO DE LA EXPRESIÓN DE CELOS Y LA ADICIÓN DE GnRH SOBRE LA  
TASA PREÑEZ EN VACAS HOLANDO ARGENTINO EN LACTANCIA  
SINCRONIZADAS CON ESTRADIOL Y DISPOSITIVOS CON PROGESTERONA**

**Juan Carlos Tschopp**

**Comisión Asesora de Tesis**

**Director:** Med.Vet. (M.V.Sc., Ph.D.) Gabriel A. Bó .....

**Co-Director:** Med .Vet. (M.Sc.) Pablo M. Chesta .....

**Tribunal Examinador de Tesis**

**Med. Vet. (Dr.) Santiago Perez Wallace** .....

**Dr. Med. Vet. (M.Sc., Ph.D.) Alejo Menchaca** .....

**Med. Vet. (Dr.) Andrés Tríbulo** .....

**Presentación formal académica**

2016

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi director de tesis Gabriel A. Bó, quien desde un principio confió en mí, me apoyó, enseñó y compartió sus conocimientos desinteresadamente. Por ser un excelente profesor y un gran amigo, por ser todo un ejemplo de sabiduría, honestidad y humildad. Por enseñarme que aunque los resultados que se obtengan no sean los esperados no deja de ser un buen motivo para aprender y crecer.

Al tribunal examinador de tesis Dr. Santiago Perez Wallace, Dr. Alejo Menchaca y Dr. Andrés Tríbulo por sus correcciones y sugerencias aportadas.

A todos los integrantes del Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC) tanto profesores, auxiliares y personal no docente, por abrirme las puertas a la institución, por la gran ayuda para mi formación personal, intelectual y profesional.

A mi Co-Director Pablo Chesta y a Lucas Cutaia por el aporte y las correcciones realizadas a mi tesis.

A la familia Carrera y Fissore por confiar en mí y permitirme utilizar sus animales e instalaciones para el desarrollo de los experimentos y al personal de su empresa.

A Alfredo Pignotti, gerente de Genpro S.A., por aportarme desinteresadamente material para el desarrollo de esta maestría.

A Syntex S.A. por la colaboración con los dispositivos intravaginales que utilicé para la realización de los diferentes experimentos.

A mi padre Juan Carlos por ser un ejemplar luchador y enseñarme a levantarme cada vez que debí hacerlo y a mi madre Pilar Inés por ser mi guía espiritual y mostrarme el verdadero valor de las cosas.

A mis hijos Eugenia, María Victoria, Emilia y Agustín por el tiempo que les robé y a mi esposa Vanina G. Müller por ser mi compañera incondicional y apoyarme en todo lo que cree que me hace feliz.

## RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto de la adición de GnRH al inicio y al final de un tratamiento con dispositivos con progesterona ( $P_4$ ) y estradiol ( $E_2$ ) y la expresión de celos sobre la tasa de preñez (TP) de vacas lecheras en lactancia inseminadas a tiempo fijo (IATF). Para la sincronización de celos se utilizó un tratamiento de 8 días con dispositivo intravaginal con  $P_4$  y EB en el día de la inserción y ECP como inductor de la ovulación. En el Experimento 1 se evaluó si la adición de GnRH al inicio del protocolo mejoraba la TP y si la división del horario de inseminación (IA), inseminando a las 48 h solo a las que presentaban celo y la adición de GnRH a las que no mostraron celo y la IA 12 h después (60 h) mejoraba la TP en comparación con la IATF de todas las vacas a las 48 h. Se demostró que la adición de GnRH en el Día 0 no mejoró la TP (44% vs 40%) como sí lo hizo la división del horario de IA con adición de GnRH (53 vs 31;  $P < 0,01$ ). El objetivo del Experimento 2 fue estudiar la dinámica folicular y evaluar si la TP varía utilizando diferentes horarios de IA (48 h vs 60 h) de acuerdo a la expresión de celos en vacas tratadas con dispositivos con  $P_4$  y ECP como inductor de la ovulación. Se demostró que la división del horario de IA y la adición de GnRH disminuye la dispersión del intervalo entre la IA y la ovulación. Se encontró una interacción ( $P < 0,05$ ) entre el horario de IA y la expresión de celos. Las tasas de preñez fueron mayores en las vacas en celo a las 48 h que fueron IA en ese momento (47,8%) y las que no estaban en celo a las 48 h y que fueron IA a las 60 h (53,4%) que las que no estaban en celo a las 48 h y que fueron IA en ese momento (19,4%) y las que estaban en celo a las 48 h y que fueron IA a las 60 h (29,7%). En el Experimento 3 se evaluó la TP en función de la adición o no de GnRH a las vacas que no presentaban celo a las 48 h. La tasa de preñez fue mayor ( $P < 0,05$ ) en las vacas que no estaban en celo a las 48 h y que recibieron GnRH en ese momento e IA a las 60 h, que en las vacas que no mostraron celos y no recibieron GnRH (56,0% vs 39,8%). En el Experimento 4 se analizaron los factores que pueden afectar la TP en vacas tratadas con el protocolo desarrollado en este experimento. Se encontró que el stress calórico del mes de enero, una condición corporal  $< 2,75$  y la presencia de solo folículos pequeños ( $< 10$  mm y sin CL) afectan negativamente la TP. En conclusión, los resultados de esta serie de experimentos confirman la hipótesis de que la inclusión de una dosis

de GnRH y la modificación del horario de IA aumentan la TP en vacas lecheras tratadas con dispositivos con P<sub>4</sub> y estradiol que no hayan manifestado celo al momento de la IATF.

Palabras Claves: Vacas en lactancia, IATF, ECP, GnRH, horario de inseminación.

## ABSTRACT

The aim of this thesis was to evaluate the effect of the addition of GnRH at the beginning and end of a treatment with progesterone-releasing devices (P<sub>4</sub>) and estradiol (E<sub>2</sub>) and the expression of estrus on pregnancy rates (PR) of lactating dairy cows inseminated at fixed time (FTAI). The estrus synchronization treatment consisted on the insertion of a P<sub>4</sub> device for 8 days and the administration of estradiol benzoate (EB) on the day of insertion and estradiol cypionate (ECP) at the time of device removal to induce ovulation. Experiment 1 was designed to determine whether the addition of GnRH at the start of the protocol improved the PR and if the division of the time of artificial insemination (AI) improved PR. The addition of GnRH on Day 0 did not improve PR (44% vs 40%) but the AI of cows showing estrus at 48 h and the administration of GnRH at 48 h and AI at 60 h of those not showing estrus resulted in higher PR than those cows that were FTAI at 48 h, regardless of estrus expression (53% vs 31%; P <0.01). Experiment 2 was designed to study follicular dynamics and assess whether the PR varies using different times of AI (48 h vs 60 h), according to the expression of estrus. The division of AI and adding GnRH at 48 h decreased the dispersion in the interval between AI and ovulation. There was an interaction (P<0.05) between the time of AI and expression of estrus. Pregnancy rates were higher in cows in estrus at 48 h that were AI at that time (47.8%) and those that were not in heat at 48 h and were AI at 60 h (53.4%) than those who were not in estrus at 48 h and were FTAI at that time (19.4%) and those that were in estrus at 48 h and were FTAI at 60 h (29.7%). In Experiment 3 PR was evaluated based on the addition or not of GnRH to cows not showing estrus at 48 h. Pregnancy rate was higher (P<0.05) in cows that were not in estrus at 48 h, that received GnRH at that time and were AI at 60 h than in cows not showing estrus and 48 h that were also AI at 60 h but without GnRH (56.0% vs 39.8%). Experiment 4 evaluated factors that may affect PR in cows treated with the protocol developed in this experiment. It was found that the heat stress of January, a body condition score <2.75 and the presence of only small follicles (<10 mm and without CL) adversely affect PR. In conclusion, the results of this series of experiments confirm the hypothesis that the inclusion of a dose of

GnRH and the modification of the time of AI increase PR in lactating dairy cows treated with P<sub>4</sub> devices and estradiol that not express estrus at the time of FTAI.

Keywords: lactating dairy cows, FTAI, ECP, GnRH, time of insemination.

# TABLA DE CONTENIDOS

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| <b>CAPITULO 1</b>  |               |
| INTRODUCCIÓN.....  | 1             |
| Evolución de la lechería en la República Argentina y su relación con la<br>reproducción..... | 1             |
| Sincronización de celos con PGF <sub>2α</sub> .....  | 2             |
| Sincronización de las ovulaciones con GnRH y PGF <sub>2α</sub> .....                         | 2             |
| Protocolos desincronización a tiempo fijo.....   | 3             |
| Sincronización de celos con Estrógenos y Progesterona.....                                   | 5             |
| Gonadotrofina Coriónica Equina.....  | 7             |
| Benzoato y Cipionato de Estradiol.....   | 8             |
| HIPOTESIS.....   | 12            |
| OBJETIVO GENERAL.....  | 12            |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 12            |
| <br><b>CAPITULO 2</b>  |               |
| MATERIALES Y MÉTODOS.....  | 13            |
| Animales e instalaciones.....  | 13            |
| Materiales utilizados.....   | 13            |
| Semen utilizado.....   | 14            |
| EXPERIMENTO 1.....   | 15            |
| EXPERIMENTO 2.....   | 17            |
| Experimento 2 <sup>a</sup> .....   | 19            |
| Experimento 2 <sup>b</sup> .....   | 20            |



|   |    |
|---|----|
| EXPERIMENTO 3.....                          | 20 |
| EXPERIMENTO 4.....                          | 22 |
| Ultrasonografía.....                        | 23 |
| Determinación de la condición corporal..... | 24 |
| Análisis estadístico.....                   | 24 |
| <br>  |    |
| <b>CAPITULO 3</b>                           |    |
| RESULTADOS.....                             | 26 |
| EXPERIMENTO 1.....                          | 26 |
| EXPERIMENTO 2.....                          | 27 |
| Experimento 2 <sup>a</sup> .....            | 27 |
| Experimento 2 <sup>b</sup> .....            | 33 |
| EXPERIMENTO 3.....                          | 37 |
| EXPERIMENTO 4.....                          | 39 |
| <br>  |    |
| <b>CAPITULO 4</b>                           |    |
| DISCUSIÓN.....                              | 45 |
| <br>  |    |
| <b>CAPITULO 5</b>                           |    |
| CONCLUSIONES.....                           | 56 |
| <br>  |    |
| <b>CAPITULO 6</b>                           |    |
| BIBLIOGRAFÍA.....                           | 58 |

## LISTA DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 2.1.</b> Características productivas y reproductivas (promedio + desvío estándar) de las vacas utilizadas en el experimento 1.....   | 15 |
| <b>Tabla 2.2.</b> Características productivas y reproductivas (promedio + desvío estándar) de las vacas utilizadas en el experimento 2 <sup>a</sup> .....   | 19 |
| <b>Tabla 2.3.</b> Características productivas y reproductivas (promedio + desvío estándar) de las vacas utilizadas en el experimento 2 <sup>b</sup> .....   | 20 |
| <b>Tabla 2.4.</b> Características productivas y reproductivas (promedio + desvío estándar) de las vacas utilizadas en el experimento 3.....   | 21 |
| <b>Tabla 2.5.</b> Características productivas y reproductivas (promedio + desvío estándar) de las vacas utilizadas en el experimento 4.....   | 22 |
| <b>Tabla 3.1.</b> Tasa de preñez según tratamiento en vacas Holando Argentino en lactancia IATF con ECP como inductor de la ovulación y la adición de GnRH.....   | 26 |
| <b>Tabla 3.2.</b> Expresión de celo y respuesta ovárica en vacas Holando Argentino en lactancia IATF según tratamiento. <b>IATF 48:</b> IATF todas a las 48 h; <b>IATF 60:</b> IATF todas a las 60 h; <b>GnRH IATF 60:</b> No despintadas GnRH a las 48 h y todas IATF a las 60 h; <b>GnRH IATF 48 y 60:</b> Despintadas IATF 48 h, no despintadas GnRH a las 48 h e IATF 60 h..... | 27 |
| <b>Tabla 3.3.</b> Momento de ovulación y tamaño de FPO en vacas Holando Argentino según presencia (despintadas) o ausencia (pintadas) de celo a las 48 h de retirado el dispositivo.....  | 28 |
| <b>Tabla 3.4.</b> Dinámica de expresión de celos y hora promedio de celos en vacas Holando Argentino en lactancia IATF con ECP como inductor de la ovulación con o sin adición GnRH.....  | 29 |
| <b>Tabla 3.5.</b> Dinámica de expresión y hora de celos en vacas IATF con ECP como inductor de la ovulación con o sin adición de GnRH.....  | 30 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 3.6.</b> Intervalo en horas entre el momento de inseminación y la hora promedio de ovulación en vacas Holando Argentina IATF. ....   | 31 |
| <b>Tabla 3.7.</b> Tasa de preñez según tratamiento y pérdidas embrionarias/fetales a los 60 días de la inseminación. ....   | 34 |
| <b>Tabla 3.8.</b> Tasa de preñez según presencia o ausencia de celo a las 48 h en relación a la hora de inseminación. ....  | 35 |
| <b>Tabla 3.9.</b> Tasa de preñez luego de la aplicación de GnRH en protocolos IATF con ECP como inductor de la ovulación según presencia o ausencia de celo a las 60 h. ....  | 35 |
| <b>Tabla 3.10.</b> Evaluación de la tasa de preñez en vacas IATF que perdieron o no el dispositivo durante el tratamiento de sincronización. ....   | 36 |
| <b>Tabla 3.11.</b> Tasa de preñez en vacas Holando Argentino en lactancia IATF con ECP como inductor de la ovulación con división en el horario de inseminación y adición o no de GnRH a las que no presenten celo a las 48 h. .... | 37 |
| <b>Tabla 3.12.</b> Tasa de preñez según tratamiento en vacas que no presentaron celo a las 48 h de retirado el dispositivo y su relación con la presencia de celos a las 60 h. ....   | 38 |
| <b>Tabla 3.13.</b> Tasa de preñez con respecto a la estructura ovárica al inicio del tratamiento en vacas Holando Argentino IATF con ECP y adición de GnRH como inductor de ovulación. ....   | 39 |
| <b>Tabla 3.14.</b> Evaluación de la tasa de preñez en vacas Holando Argentino en lactancia IATF con división del horario de inseminación, ECP y adición de GnRH como inductor de ovulación en diferentes épocas del año. ....       | 41 |
| <b>Tabla 3.15.</b> Evaluación de la tasa de preñez en vacas Holando Argentino en lactancia IATF en diferentes épocas del año, según mostraron o no celo después de la GnRH. ....  | 42 |
| <b>Tabla 3.16.</b> Evaluación de la tasa de preñez en vacas IATF que perdieron o no el dispositivo durante el tratamiento de sincronización. ....   | 43 |

**Tabla 3.17.** Tasa de preñez según litros de producción en vacas Holando Argentino IATF con división del horario de inseminación, ECP y adición de GnRH como inductor de ovulación.....43

**Tabla 3.18.** Tasa de preñez según días de producción en vacas Holando Argentino IATF con división del horario de inseminación, ECP y adición de GnRH como inductor de ovulación.....44

**Tabla 3.19.** Tasa de preñez en vacas H. A. primíparas o multíparas IATF con división del horario de inseminación, ECP y adición de GnRH como inductor de ovulación.....44

**Tabla 3.20.** Tasa de preñez según número de servicios en vacas Holando Argentino IATF con división del horario de I.A., ECP y adición de GnRH como inductor de ovulación.....44

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1.** Esquema de tratamientos por grupos del experimento 1: Grupo EB – 48h (n = 50), Grupo EB + GnRH- 48h (n = 50), Grupo EB – 48h y 60h (n = 50) y Grupo EB + GnRH – 48h y 60h (n = 50).....16
- Figura 2.2.** Esquema de tratamientos del experimento 2: Grupo IATF 48, Grupo IATF 60, Grupo GnRH IATF 60 y Grupo GnRH IATF 48 y 60.....18
- Figura 2.3.** Esquema de tratamientos experimento 3: *Grupo sin GnRH:* IATF con división de horario de inseminación sin adición de GnRH. *Grupo con GnRH:* IATF con división de horario de inseminación y adición de GnRH a las que no presentaron celo a las 48 h. ....21
- Figura 2.4.** Esquema de tratamiento experimento 3: Protocolo de IATF con división del horario de inseminación según expresión de celos y adición de GnRH a las no despintadas a las 48 h de retirado el dispositivo con ECP como inductor de la ovulación.....23
- Figura 3.1.** Dinámica de distribución de celos en vacas IATF con ECP como inductor de ovulación. Grupo 1 y 2 (sin GnRH) y grupos 3 y 4 (con GnRH).....29
- Figura 3.2.** Dinámica de distribución de ovulación en protocolos de IATF con ECP como inductor de ovulación. Grupo 1 y 2 (sin GnRH) y grupos 3 y 4 (con GnRH).....30
- Figura 3.3.** Dinámica de dispersión de la ovulación con respecto a la inseminación en vacas Holando Argentino IATF según tratamientos. *Grupo 1:* IATF 48 h; *Grupo 2:* IATF 60 h; *Grupo 3:* No despintadas GnRH IATF todas a las 60 h; *Grupo 4:* Despintadas IATF 48 h, no despintadas GnRH IATF 60 h.....32
- Figura 3.4.** Probabilidad de preñez en función al intervalo desde la inseminación a la ovulación.....33
- Figura 3.5.** Tasa de preñez según escore de condición corporal en vacas Holando Argentino IATF con ECP y adición de GnRH como inductor de ovulación.....40

## LISTA DE ABREVIATURAS

|           |  |
|-----------|--|
| BCS.....  | Escore de condición corporal               |
| EB.....   | Benzoato de Estradiol                      |
| CC.....   | Condición Corporal                         |
| Ch.....   | Folículo chico < 10 mm                     |
| CL.....   | Cuerpo Lúteo                               |
| CV.....   | Coefficiente de variación                  |
| DEL.....  | Días en leche                              |
| DIB.....  | Dispositivo intravaginal bovino            |
| DM.....   | Dispositivos laminares detectores de monta |
| DS.....   | Desvío Standard                            |
| E2.....   | Estradiol 17 $\beta$                       |
| eCG.....  | Gonadotrofina coriónica equina             |
| ECP.....  | Cipionato de estradiol                     |
| FSH.....  | Hormona folículo estimulante               |
| FOL.....  | Folículo > 10 mm                           |
| FPO.....  | Folículo pre ovulatorio                    |
| g.....    | Gramos                                     |
| GnRH..... | Hormona liberadora de gonadotrofinas       |
| h.....    | Horas                                      |

|                         |                                |
|-------------------------|--------------------------------|
| IA.....                 | Inseminación                   |
| IATF.....               | Inseminación a tiempo fijo     |
| Q.....                  | Quiste                         |
| IM.....                 | Intramuscular                  |
| LH.....                 | Hormona luteinizante           |
| µg.....                 | Microgramos                    |
| mg.....                 | Miligramos                     |
| ml.....                 | Mililitros                     |
| n.....                  | Número de muestra              |
| N°.....                 | Número                         |
| P <sub>4</sub> .....    | Progesterona                   |
| PGF <sub>2α</sub> ..... | Prostaglandina F <sub>2α</sub> |
| TDC.....                | Tasa detección de celos        |
| TP.....                 | Tasa de preñez                 |
| UI.....                 | Unidades internacionales       |

## INTRODUCCIÓN

### **Evolución de la lechería en la República Argentina y su relación con la reproducción**

La productividad de una explotación lechera está directamente relacionada al manejo reproductivo y por lo tanto para que esta actividad sea rentable debemos hacer un enfoque muy exhaustivo sobre la reproducción de dichos animales.

En la República Argentina la tendencia va hacia la disminución en la cantidad de tambos y al aumento en el número de animales por establecimiento según lo informa Sanchez et al. (2012). La razón de ello es poder lograr mayores productividades por área y la única alternativa es intensificar la producción lechera de los establecimientos, trayendo aparejado consigo una disminución en la eficiencia reproductiva (Cattaneo y Callejas, 2001).

Aunque los sistemas de manejo de los rodeos lecheros comerciales difieren en distintas partes del mundo, el objetivo reproductivo principal es preñar a las vacas lecheras lo más rápido posible después del parto (Lucy, 2004). Una de las preguntas es si existe un antagonismo entre alta producción y fertilidad. Varios autores sostienen que la vaca lactante en sistemas estabulados con producciones superiores a los 10.000 Kg (Butler, 2003; Lucy, 2001; Thatcher et al., 2006) y en sistemas pastoriles superiores a los 7.500 Kg (Diskin et al., 2006; Diskin y Morris 2008, Piccardi et al., 2013) son vacas que poseen algún grado de subfertilidad. Sin embargo, otros autores sugieren que esta relación no existe, sino que este fenómeno no es más que una relación temporal que no implica una relación causa efecto (Le Blanc, 2010; Walsh et al., 2011). No obstante, el aumento de la producción en vacas de leche que ocurrió en las últimas décadas ha sido asociado a una menor eficiencia reproductiva de las vacas de alta producción (Washburn et al., 2002; Lopez et al., 2004). Uno de los motivos de esta problemática reproductiva es la dificultad para la detección de celos debido a las bajas expresiones de los mismos (Washburn et al., 2002; Wiltbank et al., 2006). Se atribuye la baja expresión de celos a menores concentraciones circulantes de



estrógeno debido a un mayor metabolismo hepático de hormonas esteroideas como resultado del mayor consumo de materia seca y mayor irrigación sanguínea a nivel hepatocelular (Sangsrivong et al., 2002; Wiltbank et al., 2000). A su vez, los métodos tradicionales de detección de celos son ineficientes cuando son aplicados a grandes rodeos lecheros debido a la alta relación vacas/operarios, resultando en una disminución de la precisión y eficiencia en la detección de los celos (Nebel et al., 1987).

Por lo tanto, es importante diseñar un sistema eficaz para inseminar vacas en un período corto de tiempo, para preñarlas lo más rápido posible después del parto. Para intentar solucionar el problema de baja tasa de servicios, fueron desarrollados muchos protocolos hormonales.

### **Sincronización de celos con Prostaglandina F<sub>2α</sub>**

Dentro de los distintos métodos hormonales de sincronización están los que sincronizan la aparición de celos con el uso de Prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), utilizada comúnmente para acortar la duración de la fase luteal y sincronizar los celos (Bó y Callejas, 2008). Hay que distinguir entre la sincronización del estro y la sincronización de la ovulación. La sincronización de los celos se lleva a cabo mediante la administración de PGF<sub>2α</sub> en hembras cíclicas (vacas o vaquillonas) pero sigue siendo un método ligado fuertemente a la detección de celos, influenciado por la eficiencia y la exactitud con la que se detectan los mismos; donde la eficiencia se define como la capacidad de ver una vaca en celo y la exactitud como la capacidad de establecer el mejor momento para la inseminación (Gnemmi y Maraboli, 2014). El intervalo entre la administración de la PGF<sub>2α</sub> y el celo no depende del tipo de PGF<sub>2α</sub> (natural o sintética), ni del tipo de cuerpo lúteo (con cavidad o compacto), ni del diámetro del cuerpo lúteo (CL), sino exclusivamente de la presencia de un folículo dominante funcional y del diámetro del mismo (Gnemmi y Maraboli, 2007). La PGF<sub>2α</sub> es luteolítica, por lo tanto se necesita un CL como blanco. La cascada de eventos hormonales que siguen a la caída de la progesterona, hacen que en ausencia de un folículo dominante activo, de al menos 8,5 mm de diámetro el animal tenga luteólisis pero no muestre celo y ovulación (Gnemmi y Maraboli, 2012). La medida de 8,5 mm de diámetro (en *Bos taurus* lecheros) es considerado como el tamaño mínimo que un folículo dominante debe

tener, para que en presencia de un CL, se pueda emplear una  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Esta medida es capaz de garantizar un número suficiente de receptores de LH, capaces de responder a la LH adenohipofisaria, liberada gracias a la secreción de GnRH hipotalámica y secundariamente a la caída de progesterona (Ginther, 2000). Una de las limitaciones más importantes que tiene el uso de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  es que solo es efectiva en hembras cíclicas con un CL funcional, no actuando en presencia de CL inmaduros de menos de 5 días del ciclo estral (Gnemmi y Maraboli, 2014; Tsai y Wiltbank, 1998).

## **PROTOSCOLOS DE INSEMINACIÓN A TIEMPO FIJO**

Una de las alternativas más útiles para incrementar la cantidad de vacas inseminadas en un período corto de tiempo es la utilización de protocolos que sincronizan la ovulación y permiten la inseminación sistemática sin la necesidad de detectar celo, generalmente denominados protocolos de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF). Además, el desarrollo de protocolos para las vacas en anestro posparto permitirá la inseminación de una población de animales significativamente mayor eliminando también la infertilidad producida por los ciclos cortos (Bó et al., 2009). Dentro de los protocolos de IATF más usados en el mundo existen los protocolos que utilizan GnRH y los que utilizan estradiol para controlar el desarrollo folicular y la ovulación.

### **Sincronización de las ovulaciones con GnRH y $\text{PGF}_{2\alpha}$**

Pursley et al. (1995) desarrollaron un protocolo hormonal basado en la sincronización de la ovulación llamado Ovsynch que permite la IATF después del uso de una combinación de tratamientos con GnRH y  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Los protocolos con GnRH inducen la ovulación del folículo dominante al principio del tratamiento con la iniciación de una nueva onda folicular y la presencia de un CL accesorio durante el desarrollo del folículo preovulatorio de la nueva onda folicular (Pursley et al., 1995; Wiltbank y Pursley, 2014). Sin embargo, sólo 50 a 65% de las vacas ovulan en respuesta a la aplicación de una dosis de GnRH administrada en una fase aleatoria del ciclo estral (Vasconcelos et al., 1999; Giordano et al., 2012b), y las vacas que no ovulan a la primera GnRH tienen generalmente reducción de la fertilidad (Thatcher et al., 2002).

Estos protocolos han sido utilizados en gran medida durante los últimos años para la IATF de bovinos lecheros en los Estados Unidos (Wiltbank et al., 2013). Los protocolos de tratamiento más usados hoy en Estados Unidos consisten de una inyección de GnRH seguida de PGF<sub>2α</sub> 7 días más tarde y una segunda inyección de GnRH 56 h después del tratamiento con PGF<sub>2α</sub> (Brusveen et al., 2008). En los protocolos Co-Synch, las vacas son IATF al momento de la segunda GnRH (Geary et al., 2001), mientras que en los protocolos Ovsynch, las vacas son IATF 16 h después de la segunda GnRH (Pursley et al., 1995). Varios reportes demostraron que los protocolos Ovsynch producen tasas de preñez similares a las que se obtienen en las vacas que fueron sincronizadas con PGF<sub>2α</sub> e inseminadas 12 h después de detectado el celo (Burke et al., 1996; De la Sota et al., 1998; Pursley et al., 1995; 1997; Stevenson et al., 1999; Thatcher et al., 2000; 2006). Por lo tanto, esta técnica se utiliza en gran medida para inseminar vacas de leche. Caravielo et al. (2006) y Moreira et al. (2001) sugirieron que los bovinos responderán de manera más consistente a los protocolos con GnRH si éstos se inician entre los días 5 y 12 del ciclo. Para esto desarrollaron un protocolo de pre sincronización con PGF<sub>2α</sub> antes de la primera inyección de GnRH. Se ha demostrado que la pre sincronización con una o con dos dosis de PGF<sub>2α</sub> (con una diferencia de 14 días) mejora las tasas de preñez en aproximadamente un 10 a 15% (Bisinotto et al., 2004). Es importante señalar que, si bien, la pre sincronización con prostaglandina es efectiva, sólo funcionará en vacas que estén ciclando.

La utilización del protocolo Ovsynch no tuvo éxito para sincronizar las vacas en anestro posparto. Este protocolo induce aparentemente la ovulación en un alto porcentaje de vacas de leche en anestro, pero algunas de estas vacas tienen una fase luteal posterior más reducida (Gumen et al., 2003) y mayores pérdidas embrionarias (Bisinotto et al., 2004). Se ha combinado la utilización de un dispositivo de liberación de progesterona (P<sub>4</sub>) con el protocolo Ovsynch en vacas de leche no cíclicas (Pursley et al., 2001) con diferencias entre 6 y 8 puntos porcentuales a favor del uso de progesterona. En las vacas de leche en lactancia en un sistema pastoril cuando se le agregó al Ovsynch la inserción de un dispositivo de liberación de P<sub>4</sub> entre los Días 0 y 7, las tasas de preñez se incrementaron significativamente del 30% al 40% (Veneranda et al., 2008). Además, Garverick (1997) informó que la incidencia de quistes foliculares en vacas lecheras en lactancia varía entre el 6% y 19% y uno de los tratamientos más efectivos es la exposición a la P<sub>4</sub> mediante un dispositivo

intravaginal durante 6 a 8 días y 50 a 100 µg de gonadorelina acetato (GnRH) a la inserción del dispositivo y como inductor de la ovulación a las 56 h de retirado el dispositivo (Gümen et al., 2000; Bierschwal et al., 1975).

Se ha propuesto recientemente un protocolo Co-Synch junto con un dispositivo intravaginal con P<sub>4</sub> por 5 días con IATF a las 72 h de la remoción del dispositivo (Cruppe y Day, 2011). En este tratamiento en vacas se recomienda la aplicación de dos dosis de PGF<sub>2α</sub>, una al momento del retiro del dispositivo y otra 12 h más tarde, debido a que estamos en presencia de un CL joven, no ocurriendo lo mismo en vaquillonas donde una sola dosis sería suficiente (Rabaglino et al., 2009).

### **Sincronización de celos con estrógenos y progesterona**

Los tratamientos de IATF que más se usan en Argentina y el resto de Sudamérica son en base a sales de estradiol y dispositivos con P<sub>4</sub> (Bó et al., 2009; 2013). Esta combinación ha aumentado la tasa de preñez debido a que todas las vacas son inseminadas, con aceptables tasas de preñez en vacas en anestro posparto y eliminando la infertilidad producida por los ciclos cortos (Bo et al., 2013). El tratamiento más utilizado para IATF en Sudamérica consiste en administrar 2 mg de benzoato de estradiol (EB) por vía intramuscular (i.m.) junto con la inserción del dispositivo, en lo que nosotros denominamos el Día 0 del tratamiento para sincronizar la emergencia de la onda folicular. En el Día 7 u 8 se extrae el dispositivo y se aplica PGF<sub>2α</sub> i.m. para asegurar la luteólisis, junto con la administración de 400 UI de gonadotrofina coriónica equina (eCG) y 24 h después se administra 1 mg de EB i.m. para sincronizar la ovulación. Se realiza IATF entre las 52 y 56 h de la remoción del dispositivo (Bó et al., 2002b; 2009).

La función fundamental de la aplicación de estrógenos junto con la inserción del dispositivo con P<sub>4</sub> en el inicio del tratamiento es inhibir la FSH provocando la atresia de los folículos pequeños y la inhibición de la LH que altera la actividad estrogénica del folículo dominante y produce su consecuente atresia (Bó et al., 1994; 1995; 2000; Burke et al., 2003). La atresia folicular es seguida de un aumento de FSH iniciando una nueva onda folicular, impidiendo de esta manera la formación de folículos persistentes que interfieren

negativamente en la fertilidad (Bó et al., 2002a; 2002b). En contraste, en situaciones de baja P<sub>4</sub> y en ausencia de un tratamiento que produzca la atresia folicular, el folículo preovulatorio y el ovocito están expuestos durante un período prolongado a una alta frecuencia de pulsos de LH, llevando a la ovulación de un ovocito sobre-estimulado o prematuramente activado con disminución de la fertilidad pos-inseminación (Wiltbank et al., 2006). Cuando se utiliza benzoato de estradiol, la atresia es seguida por el comienzo de una nueva onda folicular a los 4 días, asegurando de esta manera la presencia de un folículo nuevo y un ovocito viable en el momento de retirar el dispositivo, 7 u 8 días después (Bó et al., 2009). Se ha sugerido que la combinación de estradiol y P<sub>4</sub> tiene un efecto aditivo sobre la supresión de la secreción de LH, así, cuando se administran ambos esteroides en forma conjunta se logra un mayor control sobre la secreción de gonadotrofinas y subsecuentemente una manipulación más precisa de la dinámica folicular (Bó et al., 1994). La segunda administración de EB es fundamental para sincronizar la ovulación en promedio a las 66 h de retirado el dispositivo (Cutaia et al., 2001) y obtener buenos índices de preñez a la IATF. La mayoría de los estudios que han usado estradiol como estímulo ovulatorio emplearon EB administrado a las 24 h de retirado el dispositivo (Macmillan y Burke, 1996; Bó et al., 2003).

En vacas Holando Argentino que ciclan normalmente, a los 2,8 días de la emergencia de la nueva onda folicular comienza la desviación folicular, donde un folículo de aproximadamente 8,5 mm de diámetro adquiere receptores de LH en la capa de la granulosa para continuar creciendo, mientras que los restantes folículos que emergieron dentro de la misma onda tienden a la atresia (Ginther, 2000). Esto es debido a que existe una transición de la dependencia de FSH a LH, y solo el folículo dominante es capaz de crecer en un ambiente con baja FSH (Ginther, 2000). El folículo dominante alcanza un tamaño marcadamente superior a los demás siendo el responsable de la secreción de estradiol y adquiriendo capacidad de continuar su desarrollo en un medio hormonal adverso para el resto de los folículos. El folículo dominante finalmente regresa u ovula dependiendo de las condiciones endócrinas durante su dominancia (Diskin et al., 2002). En presencia de P<sub>4</sub> se atresiará, mientras que si está presente al inicio de la luteólisis se convertirá en folículo ovulatorio. Al final de la fase luteal existe un incremento de la frecuencia de pulsos de LH y estradiol que serían los responsables del crecimiento final del folículo dominante, el pico preovulatorio de LH y la ovulación (Nett et al., 2002).

## **Gonadotropina coriónica equina**

Numerosos estudios sugieren que la LH es utilizada como un estimulante gonadotrófico por parte del folículo dominante, por lo cual se utiliza la administración de eCG en protocolos de IATF para mejorar el desarrollo final del folículo pre-ovulatorio (FPO). La eCG es una hormona glicoproteica de alto peso molecular secretada por las copas endometriales de yeguas gestantes formadas como resultado de la adherencia del concepto al endometrio materno alrededor del día 40 de preñez, persistiendo hasta el día 85 de preñez (Allen, 2001). Esta hormona expresa acción biológica de FSH y LH en relación 1,4:1 (Stewart et al., 1976). En la yegua la eCG tiene primariamente un efecto luteotrófico y a medida que las copas endometriales crecen y aumenta la concentración de eCG, induce la ovulación de folículos de mayor tamaño generando CL accesorios y aumentando el nivel de P<sub>4</sub>. Además de su efecto luteotrófico, la eCG posee efecto FSH cuando es usada en otras especies, utilizándose para inducir superovulación en bovinos, ovinos y conejos (Hafez et al., 2000). La administración de eCG ha resultado en incrementos en las tasas de preñez en las vacas lecheras con score de condición corporal más bajo y en anestro (Souza et al., 2006; Bryan et al., 2013), obteniendo mayores niveles de progesterona en el ciclo estral subsiguiente a la sincronización e IATF (Souza et al., 2009). En el experimento realizado en Nueva Zelanda por Bryan et al. (2008) en vacas lecheras en lactancia de parición estacional que se encontraban en anestro anovulatorio, se observó que las vacas tratadas con 400 UI de eCG al momento del retiro del dispositivo en un sistema estándar de P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub>, incrementa significativamente la posibilidad de preñez durante las primeras 48 h y 7 días, especialmente en vacas con más de 5 años. En vacas lecheras en buena condición corporal, el efecto del uso de la eCG sobre la tasa de preñez es más controversial, con efectos positivos (Veneranda et al., 2008) en vacas de mediana producción o sin efectos significativos en vacas de alta producción (Ferreira et al., 2013). Perez Wallace, (2013) reportó que el tratamiento con eCG al momento del retiro de un dispositivo con P<sub>4</sub> en vacas en lactancia que fueron IATF aumentó el tamaño del CL, el porcentaje de preñez, y redujo las pérdidas embrionarias. Resultados similares fueron reportados por García-Ipsilerto et al. (2012) en vacas de leche de alta producción cuando fueron tratadas con eCG al retiro del dispositivo y que fueron inseminadas a celo detectado. Mientras tanto, un trabajo realizado por Ferreira et al. (2013) en vacas Holstein de alta producción IATF en buena condición corporal y sin incidencia de

anestros, la adición de 400 a 600 UI de eCG no modificaron el tamaño del folículo dominante, la tasa de crecimiento folicular, la tasa de ovulación y el tiempo de ovulación, el volumen del CL, la concentración sérica de P<sub>4</sub>, y la preñez por inseminación.

## **Benzoato y cipionato de estradiol**

Existen algunas evidencias de efectos benéficos de mayores concentraciones de estradiol antes de la ovulación en la fertilidad (Ryan et al., 1993). Por ejemplo, una variación del protocolo Ovsynch, conocido como Heatsynch, fue utilizar cipionato de estradiol (ECP) como inductor de la ovulación (Pancarci et al., 2002). Este aumento de las concentraciones sanguíneas de estradiol en el proestro mejoró la fertilidad en vacas de leche (Cerri et al., 2004). También Souza et al. (2007) agregó 1 mg de estradiol 17 $\beta$  a las 48 h de la PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  en un protocolo Ovsynch, mejorando las tasas de preñez sobre todo en las vacas con baja condición corporal.

Se ha demostrado que los estrógenos (E<sub>2</sub>) administrados en la fase de elevados niveles de P<sub>4</sub> inducen la regresión folicular y la emergencia de una nueva onda folicular sincrónica, mientras que la administración en la fase de bajos niveles de P<sub>4</sub> inducen liberación de LH y la ovulación (Mapletoft et al., 2003). Los niveles de estrógenos en el proestro en vacas de alta producción son más bajos que en animales no lactantes (Sartori et al., 2002a) y animales de baja producción (Lopez et al., 2004), probablemente debido a la alta tasa de metabolismo hepático de los esteroides (Sangsritavong et al., 2002). Estas menores concentraciones de estradiol pueden estar causando disminución en la eficiencia de transporte espermático por el tracto uterino (Hawk, 1975), menor tasa de fertilización de los ovocitos y menor calidad embrionaria (Sartori et al., 2002b).

El estradiol es una hormona esteroide que forma parte de un grupo de lípidos que contiene un anillo químico llamado ciclopentanoperhidrofenantreno, el cual es sintetizado principalmente en los folículos dominantes de los ovarios por un grupo de enzimas que convierte el colesterol en pregnenolona, luego en andrógenos y finalmente en estradiol. Los estrógenos están distribuidos en todo el cuerpo, son transportados en su mayoría por proteínas plasmáticas, se almacenan en el tejido adiposo y se metabolizan en el hígado siendo

eliminados en la bilis y orina como conjugados de glucurónidos o sulfatos. Existen tres tipos de estrógenos que ocurren normalmente en la naturaleza: estrona, estradiol-17 $\beta$  y estriol. Estos estrógenos tienen estructura química y actividad biológica distinta. El estradiol-17 $\beta$  es el más potente de los tres y su actividad biológica está determinada por su estructura molecular (Daxenberger et al., 2001). La vida media del estradiol en la corriente sanguínea depende de su estructura molecular, siendo más influenciada por la polaridad de su molécula. Los esteres de estradiol más comúnmente usados en bovinos son el benzoato de estradiol (EB) y el cipionato de estradiol (ECP). Es importante destacar que la molécula de estradiol-17 $\beta$  es la única biológicamente activa, y que los esteres de estradiol solamente producirán efectos biológicos luego de la liberación de la molécula de estradiol-17 $\beta$  por medio de la enzima estearasa a nivel sanguíneo (Mapletoft et al., 2003).

El ECP es una sal de estradiol con mayor vida media que el EB, que posee una absorción retardada desde su administración intramuscular con una actividad biológica mucho más sostenida que el estradiol-17 $\beta$  y se adapta a un esquema de aplicación de estradiol como inductor de la ovulación en el momento de retirar el dispositivo con P<sub>4</sub>, evitando de esta manera tener que volver a pasar los animales por la manga a las 24 h de retirado el dispositivo. La administración i.m. de EB produce un pico de estradiol plasmático de gran magnitud y corta duración, mientras que el ECP produce un pico de menor magnitud, mayor amplitud y más prolongado en el tiempo (Vynckier et al., 1990).

Colazo et al. (2003; 2004) realizaron 2 experimentos en Canadá para evaluar el efecto del ECP en la dinámica folicular, ovulación e índices de preñez. Encontraron que el ECP aplicado en el momento de la remoción de CIDR-B (Zoetis) fue efectivo para sincronizar la ovulación y obtener tasas de preñez comparables a la aplicación de EB o ECP a las 24 h, sólo cuando se utiliza al momento de la inserción del CIDR-B un tratamiento que sea de máxima efectividad en la sincronización de la onda folicular, como 5 mg de estradiol 17 $\beta$  y 100 mg de progesterona (P<sub>4</sub>). Cuando se utilizaron otros agentes que inducen un comienzo de onda más variable, como la GnRH o 1 mg de ECP y 50 mg de P<sub>4</sub>, la tasa de preñez fue mayor (P<0,01) en las vaquillonas que recibieron ECP 24 h después de quitar el CIDR (65%) que al momento de quitar el CIDR (52%) o GnRH al momento de la IA (51%). Otros autores informaron un menor porcentaje de preñez con la utilización de ECP como inductor de la



ovulación comparado con el tratamiento tradicional, encontrando una mayor dispersión en las ovulaciones (Callejas et al., 2011a y 2011b). Debido a la poca información detallada sobre la utilización de ECP en protocolos de IATF en vacas Holando Argentino es que resulta de interés profundizar el estudio sobre dinámica folicular, expresión de celos y ovulación, y su relación con la tasa de preñez cuando se lo utiliza como inductor de ovulación.

Souza et al. (2009) describe que el ECP (1 mg i.m.) aplicado al retiro del dispositivo incrementa el porcentaje de vacas en celo dentro de las 48 h, las cuales ovulan antes y son menos sincronizadas comparadas con vacas sin celo prematuro. Existe una mayor variabilidad al momento del pico de LH en vacas tratadas con ECP en relación con las tratadas con GnRH (Souza et al., 2009). Esta dispersión en la ovulación explicaría, en parte, por qué la concepción es similar en hembras de carne inseminadas a las 48 h o 54 h de retirados los dispositivos (Menchaca et al., 2013). Teóricamente, las vacas que presentarían un celo prematuro tendrían una buena fertilidad cuando se las insemina a las 48 h, mientras que cuando se las insemina a las 54 h se estaría logrando una buena concepción en aquellas hembras que sufren un atraso en la ovulación. Además de la eventual mejora en la fertilidad, el uso de ECP como inductor de la ovulación, es una alternativa para reducir el número de veces que los animales pasan por la manga.

Otra manera de disminuir el número de encierres fue utilizar GnRH en el momento de realizar la IATF como inductor de la ovulación, con resultados similares al tratamiento tradicional en vacas de carne (Bó et al., 2000). En presencia de un folículo dominante de más de 9 mm la administración de GnRH induce la ovulación entre las 24 a 32 h (Pursley et al., 1998). La administración de GnRH produce un pico de liberación de LH aproximadamente 2 h después de su administración i.m., en una magnitud que depende de los niveles de P<sub>4</sub> en el momento de su aplicación (Kastelic y Mapletoft, 1998). La ovulación del folículo dominante está asociada con la disminución de la concentración plasmática de estradiol y por lo tanto se ha reportado una menor expresión de celos en los tratamientos que utilizan GnRH en lugar de estradiol como inductor de la ovulación (Martinez et al., 2002).

Existen evidencias que indican una asociación entre la presencia de celo previo y la fertilidad del servicio de un protocolo de IATF en vaquillonas (Lopez del Cerro et al., 2011), vacas de carne con cría al pie (Sa Filho et al., 2010) y vacas de leche (Galvão et al., 2004; Tschopp y Bó, 2015). Una manera eficaz de diferenciar aquellas hembras que no presentan celo en el momento de la IATF es mediante el empleo de dispositivos laminares detectores de monta (DM) o pintura aplicados en la base de la cola al momento del retiro de los dispositivos intravaginales (Cuatrín et al., 2011; Stahringer et al., 2011).

Según lo expuesto anteriormente, es necesario determinar la tasa de concepción en vacas Holando Argentino inseminadas a las 48 y 60 h posteriores al retiro del dispositivo, cuando se utiliza ECP como inductor de la ovulación, identificando el tamaño folicular al momento del retiro del dispositivo con P<sub>4</sub> y la presencia de celo previo a la IATF. De esta manera se podrían delinear futuras estrategias de IATF, que permitan incrementar la fertilidad del protocolo y de esta manera llevarla a la utilización masiva en los rodeos lecheros. Adicionalmente, es de interés, evaluar el efecto de la administración de GnRH en dichos tratamientos con respecto a la sincronía de las ovulaciones y analizar cómo impacta en las tasas de preñez.

La IATF ha sido una herramienta muy importante para mejorar las fallas de detección de celos (Pursley et al., 1997b; Giordano et al., 2010). El uso de esta tecnología en los tambos Americanos creció de un 5% a un 55% en los últimos 10 años (Wiltbank et al., 2013). En la Argentina no se utiliza en forma masiva todavía y termina siendo utilizada en la mayoría de los casos como un instrumento para tratar solo los casos problemas (Bó et al., 2009). Por lo tanto es importante buscar alternativas para mejorar los resultados obtenidos con la IATF y poder de esta manera corregir los errores humanos de detección de celos (Lucy, 2009).

## **HIPOTESIS**

La inclusión de una dosis de GnRH y la modificación del horario de inseminación aumentan la tasa de preñez en vacas lecheras tratadas con estradiol y dispositivos con progesterona que no hayan manifestado celo al momento de la Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF).

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la adición de GnRH al inicio y al final de un tratamiento con estradiol y dispositivos con progesterona, y la expresión de celos sobre la tasa de preñez de vacas lecheras en lactancia inseminadas a tiempo fijo.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Evaluar si la adición de GnRH al tratamiento con benzoato de estradiol aplicado al momento de la inserción de un dispositivo con progesterona mejora la tasa de preñez en vacas lecheras en lactancia inseminadas a tiempo fijo (Experimento 1).
- Evaluar si la tasa de preñez en vacas lecheras en producción varía utilizando diferentes horarios de inseminación (48 h vs 60 h) de acuerdo a la expresión de celos en vacas tratadas con dispositivos con P<sub>4</sub> y ECP como inductor de la ovulación (Experimentos 1 y 2).
- Evaluar si la administración de GnRH a las vacas sin síntomas de celo a las 48 h de retirado el dispositivo y que son inseminadas a las 60 h aumenta la tasa de preñez en vacas lecheras en lactancia tratadas con ECP como inductor de la ovulación (Experimento 3).
- Analizar los principales factores que interfieren sobre la tasa de preñez a la IATF en vacas Holando Argentino en producción a lo largo de la lactancia en distintas épocas del año (Experimento 4).

### MATERIALES Y METODOS

#### ANIMALES E INSTALACIONES

Para la realización de esta tesis se utilizaron vacas lactantes Holando Argentino provenientes de un establecimiento lechero comercial de aproximadamente 400 vacas en ordeño de la localidad de Marull, ubicado en el Departamento San Justo al sudeste de la Provincia de Córdoba (República Argentina), alimentadas con dietas totales mezcladas (TMR) y suministradas en calle de comida. Todas las categorías de animales se encuentran encerradas en piquetes con piso de tierra con dietas a base de silo de maíz, heno de alfalfa, expeler de soja, semilla de algodón o expeler de girasol, maíz molido y sales minerales, balanceadas para atender o exceder los requerimientos nutricionales mínimos de cada categoría (NRC, 2001).

Los diferentes estudios se realizaron desde septiembre 2013 hasta junio del año 2015. Excepto en los experimentos 3 y 4, en el resto de los experimentos las vacas recibieron su primer servicio posparto. Para la asignación de los tratamientos en cada experimento las vacas fueron primero bloqueadas teniendo en cuenta las estructuras ováricas (presencia de CL, quiste folicular, folículo grande > 10 mm o folículo chico < 10 mm), condición corporal, producción al control lechero anterior al inicio de la sincronización, número de lactancia y días de parida; y luego distribuidas al azar en cada grupo de tratamiento.

#### MATERIALES UTILIZADOS

En todos los experimentos se utilizaron dispositivos intravaginales de silicona inerte impregnados con 1g de progesterona de liberación controlada (DIB<sup>®</sup> 1 g de P4; Syntex SA), análogo sintético de estradiol (Benzoato de Estradiol 1mg/ml, Gonadiol<sup>®</sup>; Syntex SA), análogo sintético de Prostaglandina F<sub>2α</sub> (Cloprostenol 250 µg/ml, Ciclase<sup>®</sup> DL; Syntex SA), análogo sintético de estradiol de acción prolongada (Cipionato de Estradiol 0,5 mg/ml, Cipiosyn<sup>®</sup>; Syntex SA), Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG 200 UI/ml, Novormon

5000<sup>®</sup>; Syntex SA) y análogo sintético de la Hormona Hipotalámica Liberadora de Gonadotrofinas (GnRH; Gonadorelina Acetato 50 µg/ml, Gonasyn GDR<sup>®</sup>; Syntex SA). Todos los tratamientos hormonales fueron realizados por vía intramuscular profunda excepto los dispositivos intravaginales.

Para la determinación de presencia o ausencia de celo en los animales se contó con la ayuda de parches detectores de montas en la base de la cola (Fasco Ap, Argentina) y pinturas (Celotest, Biotay SA, Argentina), considerándose como animal en celo a todo aquel que a las 48 o 60 h de retirado el dispositivo presentaba más del 40 % de pérdida de color, tomando como referencia el experimento realizado en vacas Braford por Stharinger et al. (2011). El objetivo de este trabajo fue evaluar la ocurrencia de celo determinada mediante la desaparición del pintado en la base de la cola en un protocolo de IATF y su relación con la tasa de preñez, donde registró el porcentaje de desaparición de la pintura clasificándolo en 3 grupos: Celo manifiesto (pérdida entre 70-100%), Celo medio (pérdida entre 40-60%) y Celo bajo (pérdida entre 0-30%), demostrando que la mayor tasa de preñez se obtuvo en las vacas con celo manifiesto y medio, probablemente debido al mayor tamaño del folículo dominante al retiro de los dispositivos.

## **SEMEN UTILIZADO**

Para los Experimento 1 y 2 se utilizó semen de la misma partida y del mismo toro y para el Experimento 3 y 4 se utilizó semen de distintos toros y partidas respetando la utilización de un solo toro por réplica. En todos los casos se utilizó semen que resultó apto al examen de calidad seminal determinado por una motilidad individual mínima de 40%, menos del 30% de anormalidades totales con menos del 15 a 20 % de defectos de cabeza y del 25% de defectos de cola y acrosoma, concentración mínima de 8 millones de espermatozoides viables y que al menos el 30% supera el test de termo resistencia entre 35 y 37 °C durante 2 h. Excepto en el Experimento 3 y 4 todas las vacas utilizadas recibieron su primer servicio posparto utilizándose semen de la empresa Accelerated Genetics (GENPRO SA) y fueron inseminadas por el mismo técnico.

## EXPERIMENTO 1

Para este experimento se utilizaron 200 vacas Holando Argentino en lactancia, cuyas características se detallan en la Tabla 2.1.

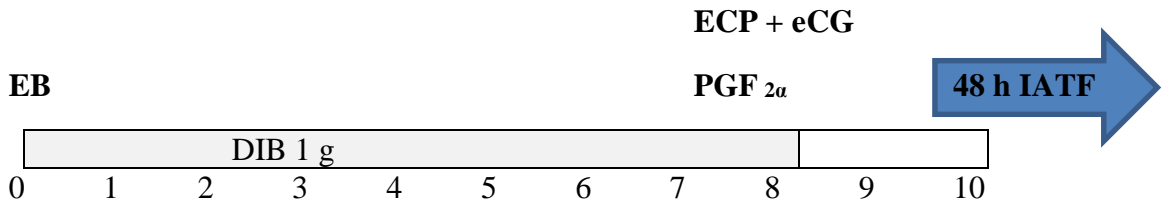
Tabla 2.1. Características productivas y reproductivas (promedio  $\pm$  desvío estándar) de las vacas utilizadas en el Experimento 1.

|                                  |                 |
|----------------------------------|-----------------|
| Días desde la parición           | 72,3 $\pm$ 29,1 |
| Número de partos                 | 2,5 $\pm$ 1,3   |
| Producción (litros de leche/día) | 33,2 $\pm$ 7,1  |
| CC (condición corporal)          | 2,8 $\pm$ 0,4   |
| N° Servicio                      | 1,0             |

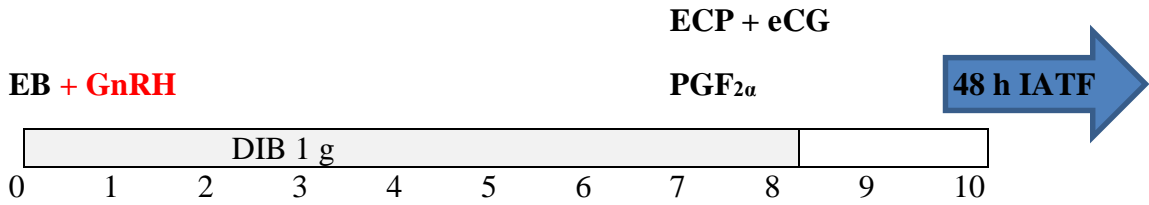
Los animales fueron divididos en un diseño factorial 2x2 para recibir una dosis de GnRH al momento de la colocación del DIB (Día 0; n=100) o permanecer como controles no tratados (n=100), y para dividir el horario de inseminación inseminando a las 48 h las vacas que presentaban celo a las 48 h y aplicar una dosis de GnRH (Día 10) a las 48 h de retirado el dispositivo y atrasar a las 60 h la IA en animales que no manifiestan celo (n=100) o permanecer como controles no tratados y ser inseminadas todas las vacas a las 48 h independientemente de la manifestación de celo (n=100). El protocolo de sincronización de los celos utilizado fue en el Día 0: colocación del DIB y aplicación i.m. de 2 mg de EB. En el Día 8 se retiraron los DIB y se aplicó i.m 1 mg de ECP, 400 UI de eCG y 500  $\mu$ g de PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . El diseño experimental se muestra en la Figura 2.1

Para la determinación de presencia o ausencia de celo en los animales se colocaron en el Día 8 parches detectores de montas en la base de la cola (Fasco Ap, Argentina), considerándose como animal en celo a todo aquel que a las 48 h o 60 h de retirado el dispositivo presentaba más del 40 % de pérdida de color.

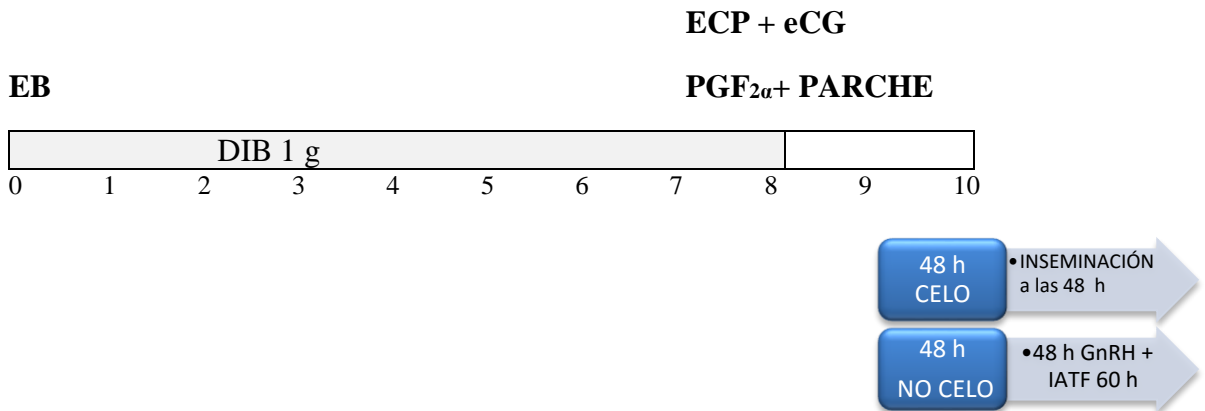
**Grupo EB – 48h**



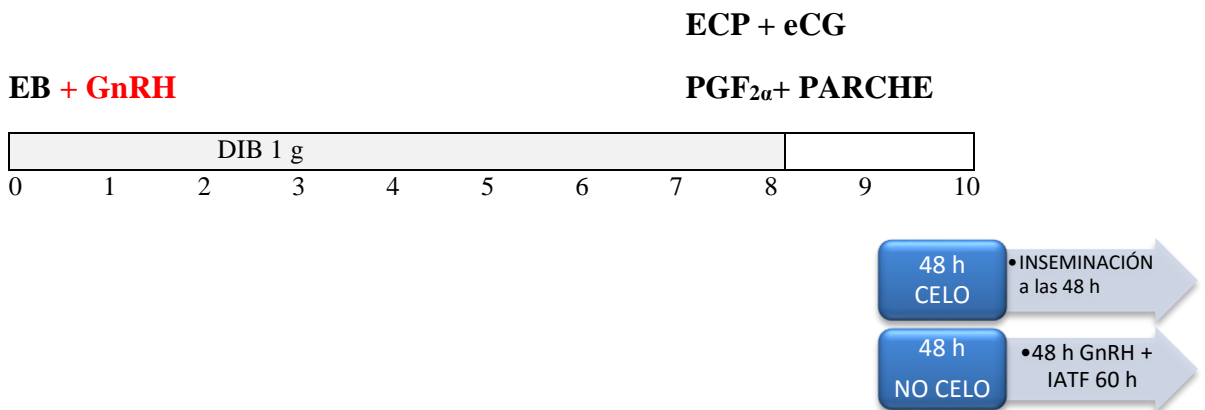
**Grupo EB + GnRH- 48h**



**Grupo EB – 48h y 60h**



**Grupo EB + GnRH – 48h y 60h**



**Figura 2.1.** Esquema de tratamientos por grupos del experimento 1: **Grupo EB – 48h** (n = 50) recibieron en el Día 0, 2 mg de EB junto con la aplicación de un DIB 1 g de P<sub>4</sub>. En el Día 8 se removieron los dispositivos y se administró 500 µg de cloprostenol (PGF<sub>2α</sub>), 400 UI de Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG) y 1 mg de Cipionato de Estradiol. En el Día 10 se les realizó inseminación a tiempo fijo a las 48 h de retirado los dispositivos. **Grupo EB + GnRH- 48h** (n = 50) recibieron en el Día 0, 2 mg de EB más 100 µg de GnRH junto con la aplicación de un DIB. En el Día 8 se removieron los dispositivos y se administró PGF<sub>2α</sub>, 400 UI de eCG y 1 mg de ECP. En el Día 10 se les realizó inseminación a tiempo fijo a las 48 h de retirado los dispositivos. **Grupo EB – 48h y 60h:** el tratamiento hormonal es similar al del grupo 1 con la diferencia de que las vacas que mostraron celo a las 48 h de retirado el dispositivo se las inseminó a las 48h y las que no mostraron celo se les aplicó GnRH a las 48 h y se las inseminó a las 60 h. **Grupo EB + GnRH – 48h y 60h:** el tratamiento hormonal fue similar al del grupo 2 con la diferencia de que las vacas que mostraron celo a las 48 h de retirado el dispositivo se las inseminó y las que no mostraron celo se les aplicó GnRH y se las inseminó a las 60 h.

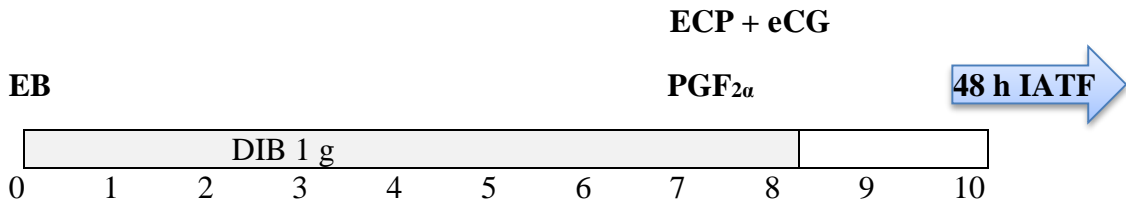
## **EXPERIMENTO 2**

El experimento 2 se dividió en dos partes como se describe más adelante. En ambas partes las vacas fueron divididas en 4 grupos utilizando diferentes horarios de inseminación.

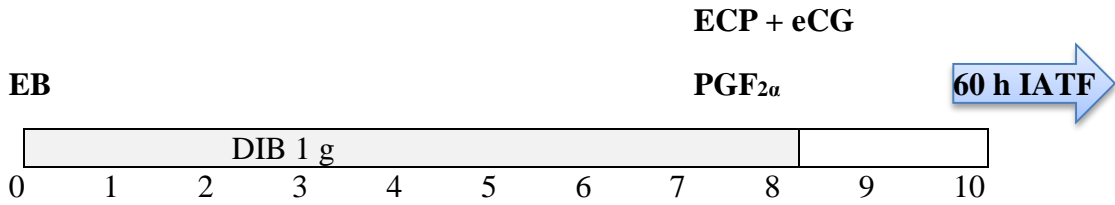
Con la finalidad de llevar a cabo este experimento dentro de un mismo establecimiento, con animales similares, con la misma alimentación y manejo, y que sean todas vacas que recibieron su primer servicio con semen de un mismo toro y partida, es que el desarrollo de este experimento llevó aproximadamente 14 meses, realizándose en 10 réplicas. En cada réplica las vacas fueron bloqueadas teniendo en cuenta las estructuras ovárica al inicio del tratamiento, condición corporal, producción al control lechero anterior al inicio de la sincronización, número de lactancia y días de parida; y luego asignadas al azar en cada grupo de tratamiento.



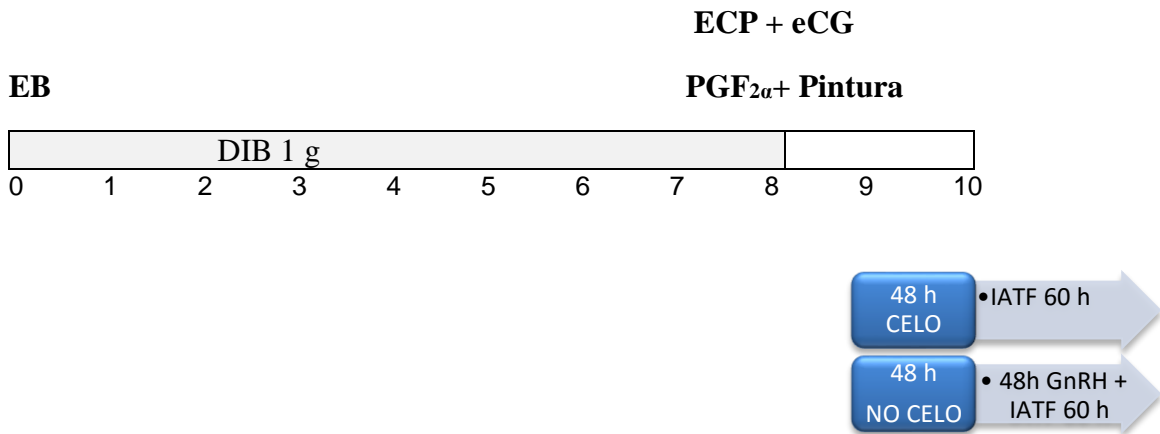
**Grupo IATF 48**



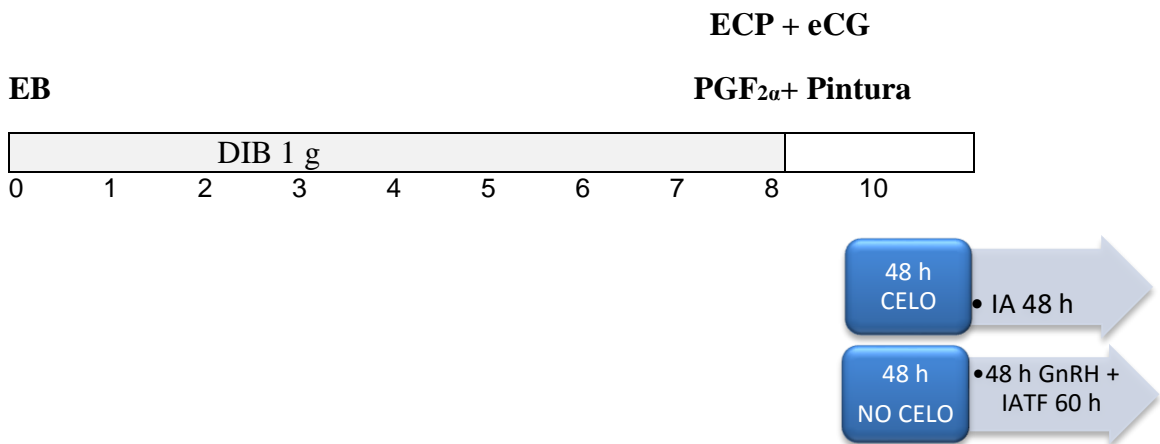
**Grupo IATF 60**



**Grupo GnRH IATF 60**



**Grupo GnRH IATF 48 y 60**



**Figura 2.2.** Esquema de tratamientos Experimento 2: **Grupo IATF 48:** recibieron en el Día 0, 2 mg de EB junto con la aplicación de un DIB. En el Día 8 se removieron los DIB y se administró PGF<sub>2α</sub>, 400 UI de eCG y 1 mg de ECP. En el Día 10 se les realizó la IATF a las 48 h de retirado los dispositivos. **Grupo IATF 60:** ídem al grupo 1 pero se inseminaron todas a las 60 h. **Grupo GnRH IATF 60:** el tratamiento hormonal es similar al del grupo 1 con la diferencia de que las vacas que no mostraron celo a las 48 h de retirado el dispositivo se les aplicó GnRH y se las inseminó a todas a las 60 h. **Grupo GnRH IATF 48 y 60:** el tratamiento hormonal es similar al del grupo 3 con la diferencia de que las vacas que a las 48 h de retirado el dispositivo habían estado en celo se las inseminó en ese momento y las que no mostraron celo a las 48 h se les aplicó GnRH en ese momento y se las inseminó a las 60 h.

### Experimento 2<sup>a</sup>

En este experimento se realizó una parte intensiva con ultrasonografía frecuente para evaluar la dinámica folicular y el intervalo inseminación ovulación, examinándose cada 12 h desde el momento del retiro del DIB hasta la ovulación o 120 h del retiro. Las unidades experimentales constituyeron una muestra de 40 vacas Holando Argentino con los siguientes valores promedio:

Tabla 2.2. Características productivas y reproductivas (promedio  $\pm$  desvío estándar) de las vacas utilizadas en el Experimento 2<sup>a</sup>.

|                                  |                 |
|----------------------------------|-----------------|
| Días desde la parición           | 92,3 $\pm$ 12,1 |
| Número de partos                 | 2,8 $\pm$ 1,4   |
| Producción (litros de leche/día) | 33,3 $\pm$ 4,4  |
| CC (condición corporal)          | 2,7 $\pm$ 0,3   |
| N° Servicio                      | 1,0             |

## Experimento 2<sup>b</sup>

Esta parte fue menos intensiva para evaluar las tasas de preñez a la IATF de los diferentes tratamientos. Las unidades experimentales constituyeron una muestra de 400 vacas Holando Argentino con los siguientes valores promedio:

Tabla 2.3. Características productivas y reproductivas (promedio  $\pm$  desvío estándar) de las vacas utilizadas en el Experimento 2<sup>b</sup>

|                                  |                 |
|----------------------------------|-----------------|
| Días desde la parición           | 77,0 $\pm$ 22,0 |
| Número de partos                 | 2,3 $\pm$ 1,4   |
| Producción (litros de leche/día) | 33,8 $\pm$ 6,3  |
| CC (condición corporal)          | 2,8 $\pm$ 0,2   |
| N° Servicio                      | 1,0             |

## EXPERIMENTO 3

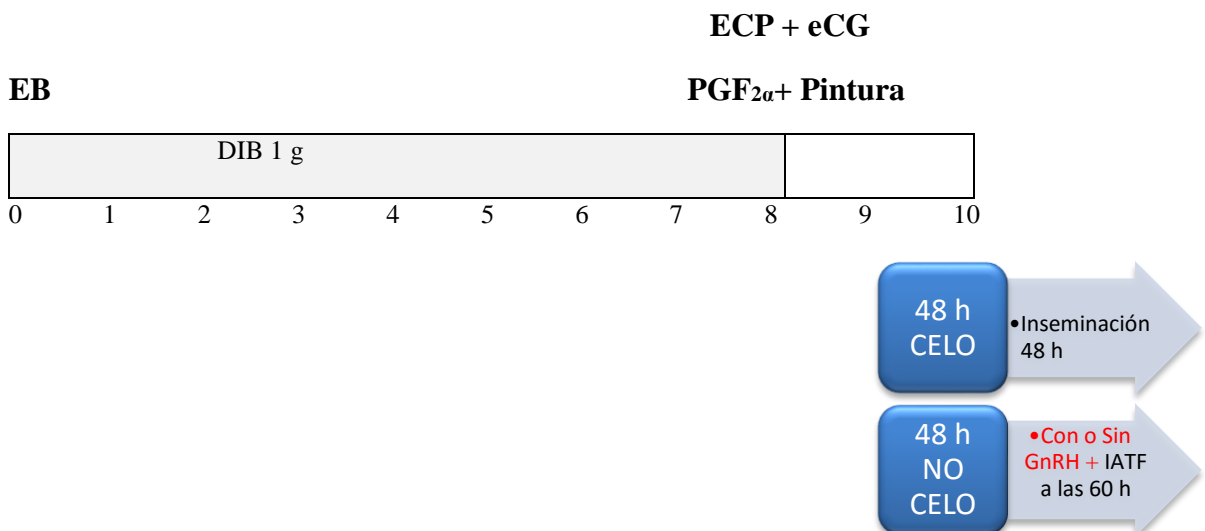
Las unidades experimentales constituyeron una muestra de 856 vacas Holando Argentino en lactancia de un establecimiento comercial de producción lechera de la localidad de Marull.

Para la asignación de los tratamientos se las dividió en dos grupos, teniendo en cuenta para el bloqueo las estructuras ováricas (presencia de CL, quiste, folículo grande  $>$  10 mm o folículo chico  $<$  10 mm), condición corporal, producción al control lechero, número de lactancia y días de parida. Los valores promedio se resumen en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Características productivas y reproductivas (promedio  $\pm$  desvío estándar) de las vacas utilizadas en el Experimento 3.

|                                  |                  |
|----------------------------------|------------------|
| Días desde la parición           | 114,5 $\pm$ 68,4 |
| Número de partos                 | 2,2 $\pm$ 1,2    |
| Producción (litros de leche/día) | 31,6 $\pm$ 7,8   |
| CC (condición corporal)          | 2,9 $\pm$ 0,3    |
| N° Servicio                      | 1,7 $\pm$ 1,1    |

Para la sincronización de los celos se utilizó un tratamiento de 8 días con DIB de 1 g. En el Día 0 se administró 2 mg de EB junto con la aplicación del dispositivo. En el Día 8 se retiraron los dispositivos y se administró PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , 400 UI de eCG, 1 mg de ECP y pintura en la base de la cola. A las 48 h de retirado el dispositivo se inseminó a todas las vacas que presentaron celo (pérdida de más del 40% de la pintura, n=467) y las que no manifestaron celo fueron divididas al azar para recibir una dosis de GnRH a las 48 h (n=194) y o permanecer como controles no tratadas (n=195) y fueron IATF a las 60 h.



**Figura 2.3.** Esquema de tratamientos experimento 3: **Grupo sin GnRH:** IATF con división de horario de inseminación sin adición de GnRH. **Grupo con GnRH:** IATF con división de horario de inseminación y adición de GnRH a las que no presentaron celo a las 48 h.

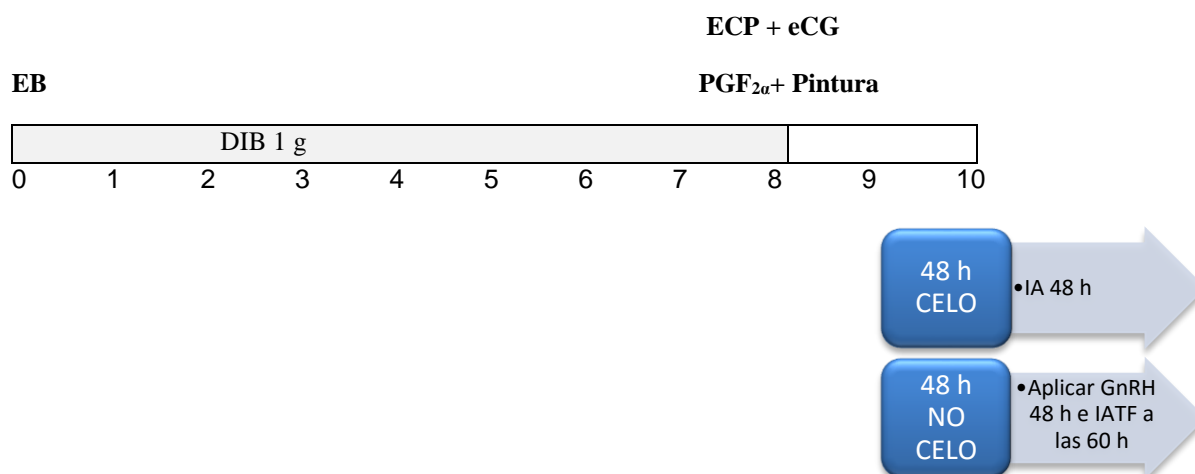
## EXPERIMENTO 4

Este experimento se realizó en 14 réplicas en distintas épocas del año en las instalaciones del establecimiento Don Fabio de la localidad de Marull, Córdoba. Las unidades experimentales constituyeron una muestra de 719 vacas Holando Argentino en lactancia con las siguientes variables promedio:

Tabla 2.5. Características productivas y reproductivas (promedio  $\pm$  desvío estándar) de las vacas utilizadas en el Experimento 4.

|                                  |                  |
|----------------------------------|------------------|
| Días desde la parición           | 157,2 $\pm$ 82,1 |
| Número de partos                 | 2,2 $\pm$ 1,3    |
| Producción (litros de leche/día) | 29,7 $\pm$ 5,2   |
| CC (condición corporal)          | 2,9 $\pm$ 0,3    |
| N° Servicio                      | 2,8 $\pm$ 1,9    |

El total de las vacas se sincronizó con el siguiente protocolo de IATF utilizando semen de varios toros y partidas. En su mayoría eran vacas que provenían de un protocolo de IATF previo y se encontraban vacías al diagnóstico de gestación.



**Figura 2.4.** Esquema del tratamiento del Experimento 4: las vacas recibieron en el Día 0, 2 mg de EB junto con la aplicación de un DIB de 1 g. En el Día 8 se removieron los dispositivos y se administró PFG<sub>2α</sub>, 400 UI de eCG, 1 mg de ECP y pintura en la base de la cola. En el Día 10 se les realizó IATF a las 48 h de retirado los dispositivos a las vacas que habían presentado celo (Despintadas) y las que no (Pintadas), se les aplicó GnRH a las 48 h y se las inseminó a las 60 h.

## ULTRASONOGRAFÍA

Para la visualización de las estructuras ováricas, el diagnóstico de gestación y la reconfirmación de la preñez se realizó ecografía transrectal con un ecógrafo Honda HS-101 V (Honda Electronics, Japón) equipado con un transductor de 5 MHz en modo B. Las vacas fueron inmovilizadas en un cepo para trabajar con mayor comodidad.

Las vacas de los Experimentos 1, 2, 3 y 4 fueron examinadas por ultrasonografía al día del inicio del tratamiento (Día 0) para determinar la presencia de las estructuras del ovario (CL= presencia del cuerpo lúteo, Fol= folículos grandes > 10 mm, Ch= folículos chicos < 10 mm y Q= quistes foliculares; uno o más folículos >25 mm sin un CL) y a los 30 y 60 días de la inseminación para realizar el diagnóstico y confirmación de preñez.

Las vacas del Experimento 2a también fueron examinadas cada 12 h desde el momento de la remoción del dispositivo con progesterona hasta la ovulación o 120 h del

retiro del dispositivo. Se realizó un monitoreo y registro diario de todas las estructuras (folículos de más de 3 mm de diámetro, CL, quistes) construyéndose un mapeo individual de acuerdo a su ubicación relativa en el ovario para realizar un análisis de la dinámica folicular, evaluando los cambios y determinando el crecimiento del folículo dominante ovulatorio y el momento de la ovulación. La técnica de seguimiento utilizada fue la descrita por Knopf et al. (1989). La ovulación fue definida como el momento donde se determinó la desaparición del folículo dominante preovulatorio (FPO).

## **DETERMINACION DE LA CONDICION CORPORAL**

Para la determinación de la condición corporal (CC) se utilizó la escala de 1 a 5, donde 1 corresponde a vacas emaciadas y 5 vacas obesas, con divisiones de 0,25 puntos. (Edmonson et al., 1989).

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para el procesamiento estadístico de los datos de estos experimentos se utilizó el Software Estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2015). Se ajustó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el efecto del tratamiento sobre las variables tamaño del folículo dominante en el momento de la remoción del DIB y previo a la ovulación, crecimiento diario del folículo dominante y momento de la ovulación. Luego, se analizaron los residuos del primer ajuste y se observó la presencia de homogeneidad de varianzas entre los diferentes tratamientos para el momento de ovulación. Para testear homogeneidad de varianzas entre tratamientos se utilizó el test de Bartlett. Las comparaciones de media se realizaron con la diferencia media mínima (DMS) de Fisher (alfa = 0,05) bajo el modelo extendido. Para analizar las curvas de la dinámica folicular bajo los distintos tratamientos se ajustó un ANOVA para modelos mixtos. Para analizar el intervalo entre la IA y la ovulación y la tasa de preñez, se realizó un gráfico de dispersión donde la variable independiente fue el intervalo entre la IA y la ovulación y la variable dependiente fue la tasa de preñez. Se analizó mediante modelo lineal generalizado bajo distribución binaria.

Por último, se ajustaron regresiones logísticas múltiples utilizando una aproximación de modelos mixtos para variables binarias (preñada o vacía) y con enlace logit para evaluar qué factores y en qué medida afectaron la preñez. Cuando se encontraron diferencias significativas entre los factores o sus interacciones se utilizó la diferencia media mínima (DMS) de Fisher ( $\alpha=0,05$ ) bajo el modelo logístico extendido. La tendencia se fijó en  $P<0,10$ .



### RESULTADOS

#### EXPERIMENTO 1

Los resultados de tasas de preñez (número de animales preñados/número total de animales inseminados) se encuentran indicados en la Tabla 3.1. Del total de animales, el 62,0% (124/200) presentó celo dentro de las 48 h de retirado el dispositivo, mientras que el 38,0% (76/200) restante no. La aplicación de GnRH en las vacas que no mostraron celo a las 48 h y atrasar su IATF a las 60 h mejoró el porcentaje de preñez ( $P < 0,01$ ). Por otro lado, la colocación de GnRH a la inserción del dispositivo en el Día 0 no mejoró significativamente las tasas de preñez ( $P > 0,5$ ), ni hubo una interacción entre la aplicación de GnRH en el Día 0 y el horario de inseminación ( $P > 0,1$ ). Las variables condición corporal, días de parto, número de parto, producción y número de servicios no fueron estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ), así como tampoco la interacción entre tratamiento inicial con GnRH y división del horario de IA y aplicación de GnRH en las vacas que no manifestaron celo ( $P > 0,1$ ).

Tabla 3.1. Tasa de preñez según tratamiento en vacas Holando Argentino en lactancia inseminadas a tiempo fijo con ECP como inductor de la ovulación y la adición de GnRH.

| <b>Efectos Principales</b>                               | <b>Tasa de Preñez</b>       |
|--|-----------------------------|
| <b>Tratamiento en el Día 0</b>                           |                             |
| 2 mg EB  | 40,0% (40/100) <sup>a</sup> |
| 2 mg EB + GnRH   | 44,0% (44/100) <sup>a</sup> |
| <b>Horario de IATF</b>                                   |                             |
| Todas 48 h   | 31,0% (31/100) <sup>a</sup> |
| Positivas IA 48 h más negativas<br>GnRH 48 h + IATF 60 h | 53,0% (53/100) <sup>b</sup> |

<sup>ab</sup> denotan diferencias significativas entre los horarios de IATF ( $P < 0,01$ )

## EXPERIMENTO 2

### Experimento 2 a

Los resultados sobre expresión de celos, tasa y hora de ovulación y desarrollo folicular según tipo de tratamiento se resumen en la Tabla 3.2. Se puede observar que si bien en el Grupo 4 (GnRH IATF 48 y 60) en el cual se utilizó GnRH como apoyo para inducir la ovulación del folículo preovulatorio disminuyó la expresión de celos ( $P < 0,05$ ), no afectó la hora de celo ( $P > 0,4$ ), tasa de ovulación ( $P > 0,5$ ) y hora de ovulación ( $P > 0,9$ ). Tampoco existió diferencia entre el diámetro del folículo ovulatorio ( $P > 0,2$ ) y la tasa de crecimiento folicular ( $P > 0,3$ ).

Tabla 3.2. Expresión de celo y respuesta ovárica en vacas Holando Argentino en lactancia inseminadas a tiempo fijo según tratamiento.

| Grupo**                  | Tasa de celo (celo/sincronizadas) | Hora de celo | Tasa de ovulación (ovuladas/sincronizadas) | Hora de ovulación * | Diámetro del folículo ovulatorio (mm)* | Tasa de crecimiento folicular (mm/día)* | Tasa Preñez |
|--------------------------|-----------------------------------|--------------|--|---------------------|--|---|-------------|
| <b>IATF 48</b>           | 90,0% <sup>b</sup>                | 61,3 ± 4,2   | 90,0% (9/10)                               | 78,7 ± 16,1         | 15,4 ± 2,5                             | 1,5 ± 0,2                               | 40,0%       |
| <b>IATF 60</b>           | 100,0% <sup>b</sup>               | 56,4 ± 4,4   | 100,0% (10/10)                             | 74,4 ± 18,3         | 16,2 ± 4,2                             | 1,3 ± 0,3                               | 50,0%       |
| <b>GnRH IATF 60</b>      | 70,0% <sup>ab</sup>               | 51,4 ± 2,2   | 90,0% (9/10)                               | 74,7 ± 13,2         | 13,7 ± 1,6                             | 1,4 ± 0,2                               | 50,0%       |
| <b>GnRH IATF 48 y 60</b> | 44,0% <sup>a</sup>                | 57,0 ± 3,0   | 100,0% (9/9)                               | 76,0 ± 10,4         | 15,1 ± 1,9                             | 1,4 ± 0,3                               | 67,0%       |
| <b>P-Valor</b>           | <0,05                             | 0,404        | 0,599                                      | 0,924               | 0,267                                  | 0,382                                   | 0,106       |

<sup>ab</sup> denotan diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

\*Desde el retiro del dispositivo hasta la ovulación.

\*\* **IATF 48:** IATF todas a las 48 h; **IATF 60:** IATF todas a las 60 h; **GnRH IATF 60:** No despintadas GnRH a las 48 h y todas IATF a las 60 h; **GnRH IATF 48 y 60:** Despintadas IATF 48 h, no despintadas GnRH a las 48 h e IATF 60 h.

Si analizamos el tamaño del FPO y momento de ovulación con respecto a la expresión de los celos podemos ver que las vacas que presentaron celo a las 48 h ovularon antes y con un folículo de mayor diámetro que las que no presentaron celo a las 48 h ( $P<0,05$ , Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Momento de ovulación y tamaño de FPO en vacas Holando Argentino según presencia (despintadas) o ausencia (pintadas) de celo a las 48 h de retirado el dispositivo.

| <b>Grupo</b>        | <b>n</b> | <b>Momento de ovulación (h)*</b> | <b>Tamaño del FPO (mm)</b> |
|---------------------|----------|----------------------------------|----------------------------|
| Celo (Despintadas)  | 23       | 61,7 ± 6,4 <sup>a</sup>          | 16,3 ± 4,2 <sup>a</sup>    |
| No Celos (Pintadas) | 14       | 84,5 ± 10,5 <sup>b</sup>         | 14,5 ± 1,2 <sup>b</sup>    |

<sup>ab</sup> denotan diferencias significativas ( $P<0,05$ )

\*Desde el retiro del dispositivo hasta la ovulación.

En la Figura 3.1 y Tabla 3.4 se puede observar la dinámica de presentación de celos según tratamientos cuando se utiliza ECP como inductor de la ovulación. Para ello se unieron los Grupos IATF 48 y IATF 60 (sin GnRH) y Grupos GnRH IATF 60 con GnRH IATF 48 y 60 (con GnRH). La tasa de expresión celos fue mayor en las vacas que no recibieron GnRH en comparación con las vacas que se les adicionó GnRH ( $P<0,05$ ). En las vacas sin GnRH la expresión de los celos estuvo comprendida en un rango horario que fue de las 36 h a las 84 h, con una dispersión mayor (varianza  $P<0,01$ ) que en las vacas que recibieron GnRH, que mostraron celo entre las 48 y 60 h.

Tabla 3.4. Dinámica de expresión de celos y hora promedio de celos en vacas Holando Argentino en lactancia IATF con ECP como inductor de la ovulación con o sin adición GnRH.

| Tratamiento | % de Celos         | Media (h)       | Varianza           | CV   | Mínimo (h) | Máximo (h) | Mediana (h) |
|-------------|--------------------|-----------------|--------------------|------|------------|------------|-------------|
| Sin GnRH    | 95,0% <sup>a</sup> | 58 <sup>a</sup> | 165,2 <sup>a</sup> | 22,4 | 36         | 84         | 60          |
| Con GnRH    | 61,0% <sup>b</sup> | 54 <sup>a</sup> | 36,1 <sup>b</sup>  | 11,7 | 48         | 60         | 54          |

<sup>ab</sup> denotan diferencias significativas (P<0.05)

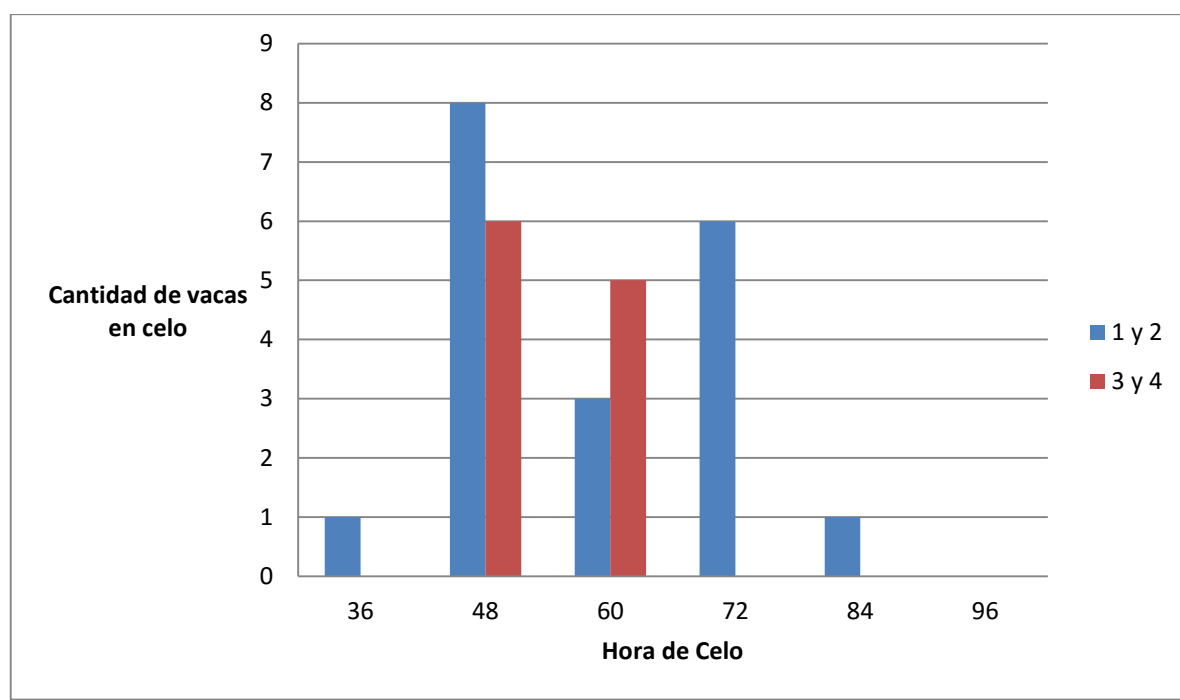


Figura 3.1. Dinámica de distribución de celos en vacas IATF con ECP como inductor de ovulación. Grupo sin GnRH y Grupo con GnRH.

En la Figura 3.2 y Tabla 3.5 se puede observar la dinámica de ovulación para el grupo sin GnRH (grupo IATF 48 + grupo IATF 60) y con GnRH (grupo GnRH IATF 60 y grupo GnRH IATF 48 y 60). La tasa de ovulación fue del 95,0% para ambos grupos. Esto demuestra como la administración de GnRH induce ovulación disminuyendo la expresión

de celos. Tampoco hubo diferencia significativa en la hora media de ovulación. Sin embargo, si observamos la ventana de ovulación se aprecia una tendencia ( $P<0,1$ ) a una menor dispersión del momento de ovulación en las vacas que se les adicionó GnRH en comparación con las que no recibieron GnRH.

Tabla 3.5. Porcentaje y hora promedio de ovulación en vacas IATF con ECP como inductor de la ovulación con o sin adición de GnRH.

| Tratamiento | % de Ovulación     | Media (h)       | Varianza           | CV    | Min (h) | Máx (h) | Mediana (h) |
|-------------|--------------------|-----------------|--------------------|-------|---------|---------|-------------|
| Sin GnRH    | 95,0% <sup>a</sup> | 76 <sup>a</sup> | 276,0 <sup>c</sup> | 22,30 | 48      | 96      | 84          |
| Con GnRH    | 95,0% <sup>a</sup> | 75 <sup>a</sup> | 124,0 <sup>d</sup> | 15,20 | 60      | 96      | 78          |

<sup>a</sup> Los porcentajes y media no difieren ( $P>0,05$ )

<sup>cd</sup> Las varianzas tienden a diferir ( $P<0,1$ )

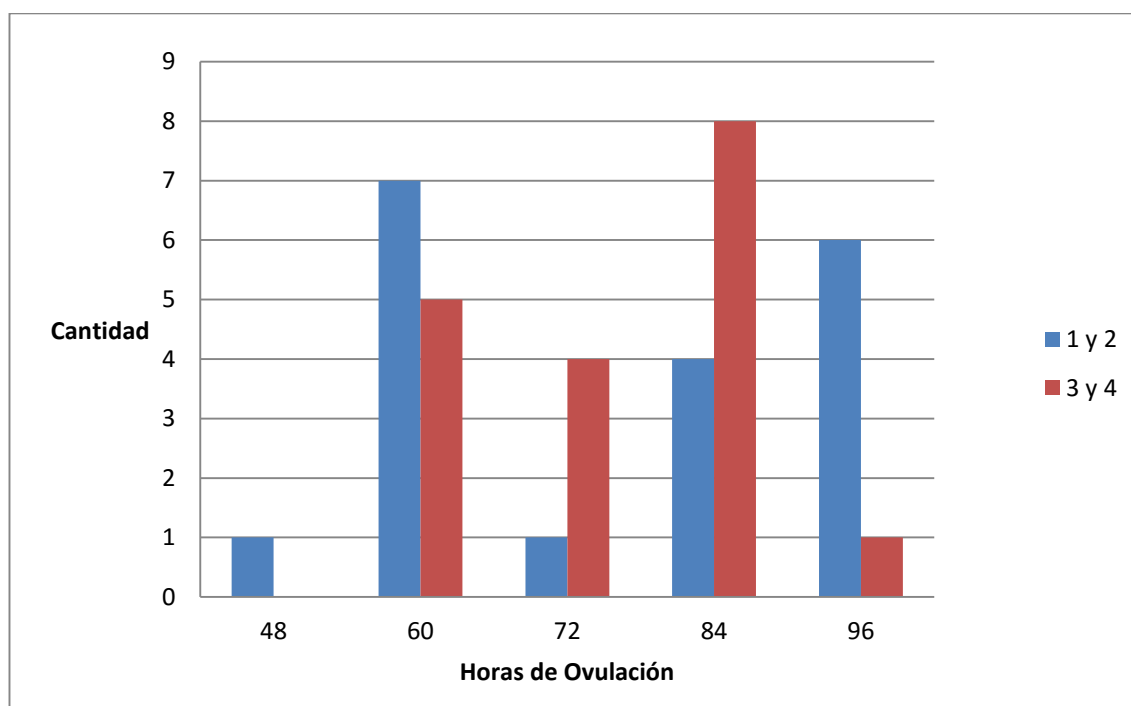


Figura 3.2. Dinámica de distribución de ovulación en protocolos de IATF con ECP como inductor de ovulación. Grupo sin GnRH y grupo con GnRH.

En la Tabla 3.6 se puede ver el intervalo entre las horas de inseminación y la ovulación que fue mayor para el grupo IATF 48 ( $P < 0,05$ ) que para el resto de los grupos. Se puede observar que el coeficiente de variación y la varianza fueron menores en el Grupo GnRH IATF 48 y 60 donde se dividió el horario de inseminación según expresión del estro y se administró GnRH a las vacas que a las 48 h de retirado el dispositivo no habían mostrado signos de estro, que en el resto de los grupos.

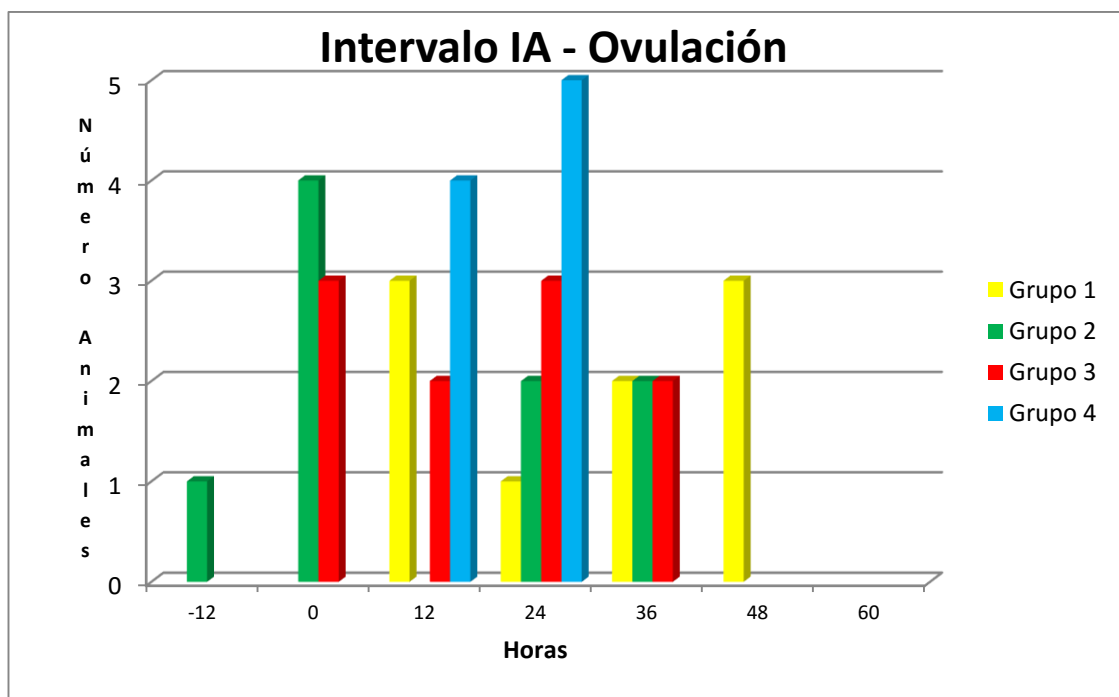
Tabla 3.6. Intervalo en horas entre el momento de inseminación y la hora promedio de ovulación en vacas Holando Argentina IATF según tratamiento.

| Grupo*               | n  | Media                 | Mediana | Varianza           | C.V.   | Min | Max |
|----------------------|----|-----------------------|---------|--------------------|--------|-----|-----|
| IATF 48              | 9  | 30,7±5,3 <sup>a</sup> | 36,0    | 227,6 <sup>b</sup> | 52,0%  | 12  | 48  |
| IATF 60              | 10 | 18,0±6,1 <sup>b</sup> | 16,0    | 333,6 <sup>b</sup> | 129,0% | -12 | 36  |
| GnRH IATF<br>60      | 9  | 18,7±4,4 <sup>b</sup> | 16,0    | 152,9 <sup>b</sup> | 89,0%  | 0   | 36  |
| GnRH IATF<br>48 y 60 | 9  | 18,7±2,1 <sup>b</sup> | 24,0    | 35,6 <sup>a</sup>  | 34,0%  | 12  | 24  |

<sup>ab</sup> denotan diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

\* **IATF 48:** IATF todas a las 48 h; **IATF 60:** IATF todas a las 60 h; **GnRH IATF 60:** No despintadas GnRH a las 48 h y todas IATF a las 60 h; **GnRH IATF 48 y 60:** Despintadas IATF 48 h, no despintadas GnRH a las 48 h e IATF 60 h.

En la Figura 3.3 se puede observar la dispersión de la ovulación con respecto a la inseminación según tratamientos si se toma como hora 0 al momento de la inseminación. Se puede ver como en el grupo 4 (GnRH IATF 48 y 60) las ovulaciones se concentraron entre las 12 y 24 h desde el momento de inseminación a diferencia del resto de los tratamientos donde la dispersión fue mayor.



**Grupo 1:** IATF 48 h; **Grupo 2:** IATF 60 h; **Grupo 3:** No despintadas GnRH a las 48 h y todas IATF a las 60 h; **Grupo 4:** Despintadas IATF 48 h, no despintadas GnRH a las 48 h e IATF 60 h

Figura 3.3. Dinámica de dispersión de la ovulación con respecto a la inseminación en vacas Holando Argentino IATF según tratamientos.

En la Figura 3.4 se observó que el mayor porcentaje de preñez se logró cuando las vacas ovularon entre las 12 y 24 h desde el momento de la inseminación, donde la máxima probabilidad de preñez se dio a las 23,7h. Se evidenció que dicho intervalo es estadísticamente diferente a los restantes. Se ajustó un modelo lineal generalizado cuadrático (regresión logística) para la variable binaria diagnóstico en función del intervalo IA-OV, resultando una dependencia estadísticamente significativa entre diagnóstico e intervalo IA-OV ( $P < 0,01$ ).

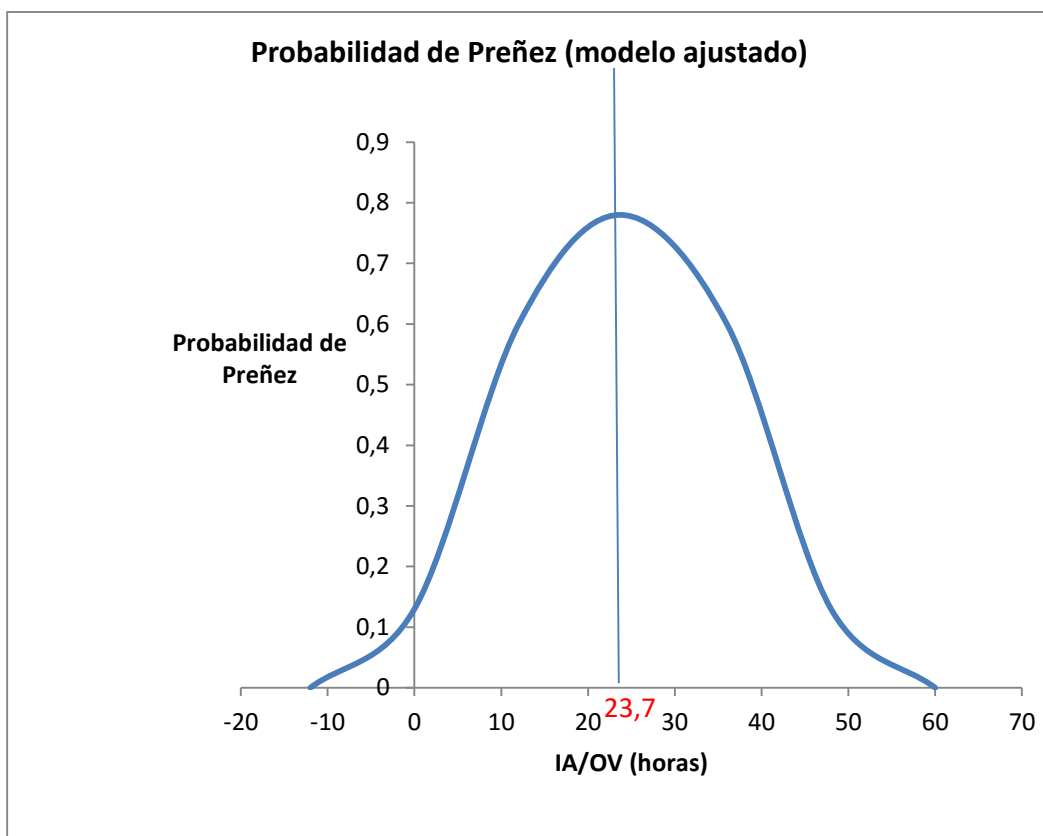


Figura 3.4. Probabilidad de preñez en función del intervalo desde la inseminación a la ovulación ( $P < 0,01$ ).

## Experimento 2b

Si analizamos la Tabla 3.7 podemos ver que no hubo diferencia estadística entre tratamientos en la tasa de preñez ni en las pérdidas gestacionales. Si se toma en cuenta la expresión o no de celos al momento de la inseminación con respecto al porcentaje de pérdidas gestacionales, se observó que no hubo diferencias entre grupos ( $P > 0,5$ ). Del total de 400 vacas iniciadas en el experimento, 5 vacas se han perdido debido a que fueron descartadas por venta o muerte antes del diagnóstico de gestación.



Tabla 3.7. Tasa de preñez según tratamiento y pérdidas embrionarias/fetales a los 60 días de la inseminación

| <b>Tratamiento*</b> | <b>Tasa de Preñez</b>     | <b>Pérdidas de gestación (n=166)</b> |
|---------------------|---------------------------|--------------------------------------|
|                     | <b>US 30 Días (n=395)</b> |                                      |
| IATF 48             | 42,9% (42/98)             | 11,9% (5/42)                         |
| IATF 60             | 39,0% (39/100)            | 7,7% (3/39)                          |
| GnRH + IATF 60      | 40,2% (39/97)             | 10,2% (4/39)                         |
| GnRH + IATF 48 y 60 | 46,0% (46/100)            | 6,5% (3/46)                          |

Los porcentajes no difieren significativamente.

\***IATF 48**: todas inseminadas a las 48 h; **IATF 60**: todas inseminadas a las 60 h; **GnRH + IATF 60**: no despintadas GnRH 48 h + IATF todas a las 60 h; **GnRH + IATF 48 y 60**: despintadas IATF 48 h, no despintadas GnRH 48 h + IATF 60 h.

Si bien los diferentes tratamientos no afectaron la tasa de preñez, cuando se analizaron los datos teniendo en cuenta la expresión de celos y el horario de inseminación (Tabla 3.8) se observó una interacción ( $P < 0,01$ ) entre estos factores. Las vacas que no presentaron celo a las 48 h y fueron inseminadas a las 60 h y las vacas que presentaron celo a las 48 h y fueron inseminadas a las 48 h se preñaron más que las que mostraron celo a las 48 h y fueron inseminadas a las 60 h y las que no mostraron celo y fueron inseminadas a las 48 h ( $P < 0,01$ ). Esto demuestra que la división del horario de inseminación en vacas inseminadas a tiempo fijo utilizando ECP como inductor de la ovulación mejora el porcentaje de preñez.

Tabla 3.8. Tasa de preñez según presencia o ausencia de celo a las 48 h en relación a la hora de inseminación.

| <b>Celo a 48 h</b> | <b>Hora de Inseminación</b> | <b>Tasa de Preñez</b>       |
|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                    |                             | <b>US 30 Días (n=395)</b>   |
| No                 | 60                          | 53,4% (70/131) <sup>a</sup> |
| Si                 | 48                          | 47,8% (56/117) <sup>a</sup> |
| Si                 | 60                          | 29,7% (33/111) <sup>b</sup> |
| No                 | 48                          | 19,4% (7/36) <sup>b</sup>   |

Diferentes superíndices dentro de una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0,01$ ).

En la Tabla 3.9 se puede ver que las vacas que mostraron celo al momento de la inseminación después de la aplicación de GnRH tuvieron una mayor tasa de preñez (59,5%) que las que no lo hicieron (43,3%,  $P < 0,05$ ).

Tabla 3.9. Tasa de preñez luego de la aplicación de GnRH en protocolos de inseminación a tiempo fijo con ECP como inductor de la ovulación según presencia o ausencia de celo a las 60 h.

| <b>Celo a 60 h</b> | <b>Tasa de Preñez</b>      |
|--------------------|----------------------------|
|                    | <b>US 30 Días (n=156)</b>  |
| No                 | 43,3% (29/67) <sup>a</sup> |
| Si                 | 59,5% (53/89) <sup>b</sup> |

Diferentes superíndices dentro de una misma columna representan diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

En la Tabla 3.10 se puede observar que del total de vacas sincronizadas el 3,8 % perdieron el dispositivo pero no afecto la tasa de preñez.

Tabla 3.10. Evaluación de la tasa de preñez en vacas inseminadas a tiempo fijo que perdieron o no el dispositivo durante el tratamiento de sincronización.

| <b>Pérdida de Dispositivo</b> | <b>Tasa de Preñez</b>         |
|-------------------------------|-------------------------------|
| SI                            | 46,7 % <sup>a</sup> (7/15)    |
| NO                            | 41,8 % <sup>a</sup> (159/380) |

Las tasas de preñez no difieren ( $P>0.1$ ).

### EXPERIMENTO 3

En la Tabla 3.11 se puede apreciar una tendencia de que en el tratamiento con adición de GnRH a las vacas que no presentan celo a las 48 h se obtiene una mayor tasa de preñez ( $P= 0.06$ ). Además, cuando se consideraron solo las vacas que no presentaron celo a las 48 h, el grupo que utilizó GnRH tuvo una mayor tasa de preñez que el grupo donde no se utilizó GnRH ( $P<0,01$ ).

Tabla 3.11. Tasa de preñez en vacas Holando Argentino en lactancia inseminadas a tiempo fijo con ECP como inductor de la ovulación, con división en el horario de inseminación y adición o no de GnRH a las que no presenten celo a las 48 h.

| <b>Tratamiento</b> | <b>IA 48 h</b> | <b>Preñez</b>      | <b>IA 60 h</b> | <b>Preñez</b>      | <b>Tasa de Preñez</b> |
|--------------------|----------------|--------------------|----------------|--------------------|-----------------------|
| Sin GnRH           | 55,6%          | 43,5% <sup>a</sup> | 44,4%          | 40,3% <sup>a</sup> | 42,1% <sup>c</sup>    |
|                    | (239/430)      | (104/239)          | (191/430)      | (77/191)           | (181/430)             |
| Con GnRH           | 55,9%          | 41,6% <sup>a</sup> | 44,1%          | 56,9% <sup>b</sup> | 48,4% <sup>d</sup>    |
|                    | (238/426)      | (99/238)           | (188/426)      | (107/188)          | (206/426)             |

<sup>aa</sup> Similares superíndices dentro de una misma columna no representan diferencias significativas ( $P> 0,1$ ).

<sup>ab</sup> Diferentes superíndices dentro de una misma columna representan diferencias significativas ( $P< 0,01$ ).

<sup>cd</sup> Porcentajes con diferentes superíndices dentro de una misma columna tienden a diferir ( $P=0,06$ ).

Cuando se consideraron solo las vacas que no estaban en celo a las 48 h y se las dividió entre las que mostraron celo a las 60 h y recibieron o no GnRH se encontró una interacción significativa ( $P<0,05$ ) entre la expresión de celos a las 60 h y el tratamiento con GnRH. Como se ve en la Tabla 3.12, no hubo diferencia en las tasas de preñez entre los grupos en las vacas que presentaron celo a las 60 h ( $P>0,1$ ), mientras que hubo diferencia significativa entre las que no presentaron celo, con una mayor tasa de preñez en las que utilizaron GnRH como inductor de la ovulación ( $P<0,01$ ). A su vez, la tasa de preñez de las vacas que no mostraron celo y recibieron GnRH fue similar a la de las vacas que mostraron celo a las 60 h.

Tabla 3.12. Tasa de preñez según tratamiento en vacas que no presentaron celo a las 48 h de retirado el dispositivo y su relación con la presencia de celos a las 60 h.

| <b>Tratamiento</b> | <b>Celo 60 h</b> | <b>Tasa de Preñez</b>       |
|--------------------|------------------|-----------------------------|
| <b>Sin GnRH</b>    | Si               | 60,0% (45/79) <sup>a</sup>  |
| <b>Con GnRH</b>    | Si               | 59,7% (43/72) <sup>a</sup>  |
| <b>Sin GnRH</b>    | No               | 28,6% (32/112) <sup>b</sup> |
| <b>Con GnRH</b>    | No               | 55,2% (64/116) <sup>a</sup> |

Diferentes superíndices dentro de una misma columna representan diferencias significativas ( $P < 0,01$ ).

La estructura ovárica al inicio del tratamiento, los días de parto a la inseminación y los litros de producción de leche no demostraron diferencias significativas según tratamientos para la determinación del diagnóstico de gestación ( $P > 0,1$ ).

## EXPERIMENTO 4

Si analizamos la estructura ovárica presente en el inicio del tratamiento se puede ver como los animales que presentaban CL tuvieron mayor tasa de preñez que el resto, pudiéndose observar que la menor tasa de preñez se logró en los que tenían folículo, independientemente del tamaño de los mismos ( $P < 0,05$ ; Tabla 3.13).

Tabla 3.13. Tasa de preñez con respecto a la estructura ovárica al inicio del tratamiento en vacas Holando Argentino IATF con ECP y adición de GnRH como inductor de ovulación.

| <b>Estructura Ovárica</b> | <b>Tasa de Preñez</b>        |
|---------------------------|------------------------------|
| Folículo chico (< 10 mm)  | 36,7% (43/117) <sup>a</sup>  |
| Folículo grande (> 10mm)  | 36,0% (155/431) <sup>a</sup> |
| Cuerpo lúteo              | 53,8% (71/132) <sup>b</sup>  |
| Quiste                    | 46,1% (18/39) <sup>ab</sup>  |

<sup>ab</sup>Diferentes superíndices dentro de una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Para el análisis estadístico de la tasa de preñez en base a la condición corporal, se las dividió en cinco categorías, pudiéndose observar que las que tenían una condición corporal menor o igual a 2,5 fueron las que menos se preñaron ( $P < 0,05$ , Figura 3.5). En base a estos resultados se podría presumir que los animales con ausencia de CL y de menor condición corporal (posibles anestros) serían los que menos se preñaron, como lo demuestra la tendencia a interacción ovario-condición corporal encontrada ( $P = 0,07$ ).

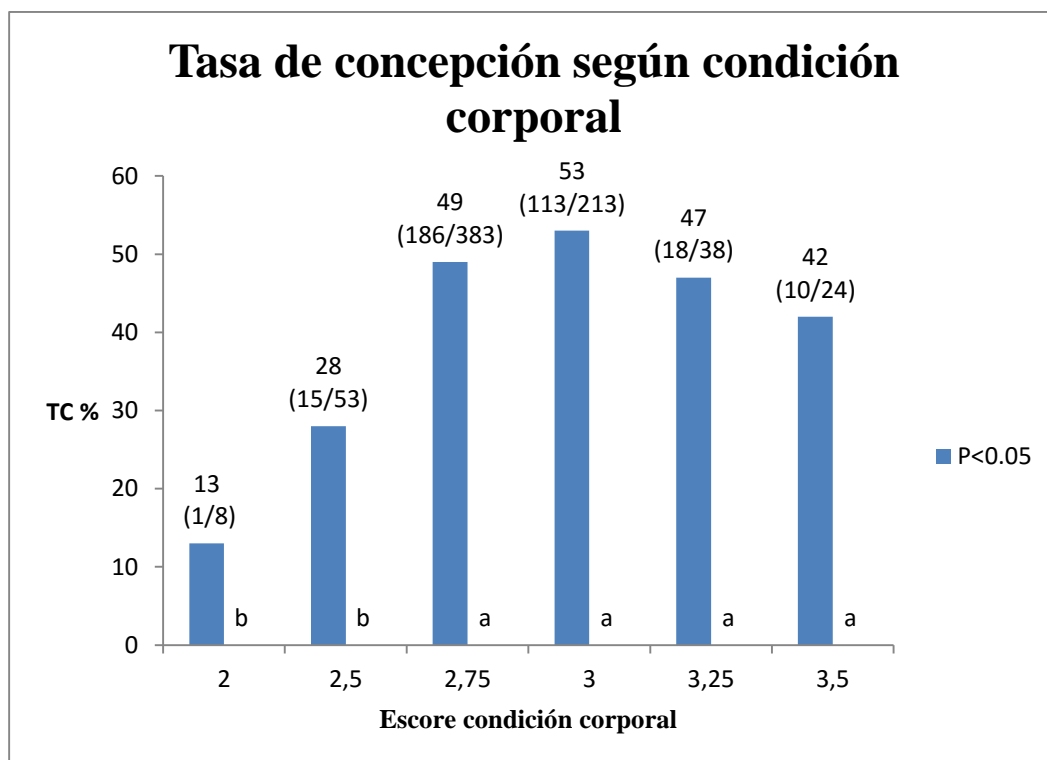


Figura 3.5. Tasa de preñez según escore de condición corporal en vacas Holando Argentino IATF con ECP y adición de GnRH como inductor de ovulación.

En la Tabla 3.14. se puede apreciar que si bien en promedio el 56% de las vacas presentaron celo a las 48 h y el 44% a las 60 h, la presentación de celos fue muy variable según las diferentes réplicas. A su vez la tasa de preñez general fue mayor ( $P < 0,05$ ) en las vacas que se inseminaron a las 60 h en comparación con las que se inseminaron a las 48 h, existiendo también variaciones según réplicas. Se puede observar como el efecto del stress calórico del mes de enero afecta negativamente la tasa de preñez de las vacas en lactancia en comparación con los inseminados en el resto del año ( $P < 0,01$ ).

Tabla 3.14. Evaluación de la tasa de preñez en vacas Holando Argentino en lactancia IATF con división del horario de inseminación, ECP y adición de GnRH como inductor de ovulación en diferentes épocas del año.

| <b>Fecha</b> | <b>n</b>   | <b>IA 48 h</b> | <b>Preñez</b>            | <b>IA 60 h</b> | <b>Preñez</b>            | <b>Preñez General</b> |
|--------------|------------|----------------|--------------------------|----------------|--------------------------|-----------------------|
| 12/12/13     | 87         | 61%            | <b>45%</b>               | 39%            | <b>54%</b>               | <b>51,7% a</b>        |
| 06/01/14     | 71         | 45%            | <b>35%</b>               | 55%            | <b>49%</b>               | <b>42,3% a</b>        |
| 23/01/14     | 55         | 68%            | <b>8%</b>                | 32%            | <b>22%</b>               | <b>12,7% b</b>        |
| 17/02/14     | 62         | 48%            | <b>47%</b>               | 52%            | <b>44%</b>               | <b>45,2% a</b>        |
| 06/03/14     | 42         | 60%            | <b>48%</b>               | 40%            | <b>41%</b>               | <b>45,2% a</b>        |
| 05/06/14     | 33         | 52%            | <b>53%</b>               | 48%            | <b>75%</b>               | <b>63,6% a</b>        |
| 17/07/14     | 39         | 59%            | <b>65%</b>               | 41%            | <b>56%</b>               | <b>61,5% a</b>        |
| 25/08/14     | 40         | 25%            | <b>20%</b>               | 75%            | <b>87%</b>               | <b>70,0% a</b>        |
| 09/10/14     | 35         | 74%            | <b>65%</b>               | 26%            | <b>78%</b>               | <b>68,6% a</b>        |
| 20/11/14     | 31         | 61%            | <b>53%</b>               | 39%            | <b>67%</b>               | <b>58,1% a</b>        |
| 15/12/14     | 24         | 83%            | <b>50%</b>               | 17%            | <b>50%</b>               | <b>50,0% a</b>        |
| 06/01/15     | 47         | 68%            | <b>31%</b>               | 32%            | <b>20%</b>               | <b>27,6% b</b>        |
| 14/02/15     | 92         | 45%            | <b>41%</b>               | 55%            | <b>51%</b>               | <b>46,7% a</b>        |
| 16/03/15     | 61         | 64%            | <b>44%</b>               | 36%            | <b>59%</b>               | <b>49,2% a</b>        |
| <b>Total</b> | <b>719</b> | <b>56,2%</b>   | <b>42,3%<sup>c</sup></b> | <b>43,8%</b>   | <b>54,6%<sup>d</sup></b> | <b>47,6%</b>          |

<sup>ab</sup>Diferentes superíndices dentro de una misma columna representan diferencias significativas (P< 0,01).

<sup>cd</sup>Diferentes superíndices dentro de una misma fila representan diferencias significativas (P< 0,05).

En la Tabla 3.15 es posible ver que si bien existen amplias diferencias entre réplicas en la expresión de celos, a las vacas que en ausencia de signos de estro a las 48 h se les aplicó



una dosis de GnRH, el 40% de las mismas presentó celo a las 60 h, mientras que el 60% restante no. A su vez, es importante destacar una diferencia de preñez en favor de las que presentaron celo comparado con las que no lo hicieron (60,8% vs 49,5%,  $P < 0,05$ ).

Tabla 3.15. Evaluación de la tasa de preñez en vacas Holando Argentino en lactancia IATF en diferentes épocas del año, según mostraron o no celo después de la GnRH.

| Fecha    | n   | Celo<br>60 h   | Preñez                           | No celo<br>60 h | Preñez                           | Vacas sin<br>celo/sincroni-<br>zadas | Tasa de<br>Preñez<br>General |
|----------|-----|----------------|----------------------------------|-----------------|----------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| 12/12/13 | 34  | 32%            | <b>64%</b>                       | 68%             | <b>61%</b>                       | <b>26%</b>                           | <b>51,7%</b>                 |
| 06/01/14 | 39  | 34%            | <b>54%</b>                       | 66%             | <b>46%</b>                       | <b>37%</b>                           | <b>42,3%</b>                 |
| 23/01/14 | 18  | 22%            | <b>25%</b>                       | 78%             | <b>21%</b>                       | <b>26%</b>                           | <b>12,7%</b>                 |
| 17/02/14 | 32  | 63%            | <b>50%</b>                       | 37%             | <b>33%</b>                       | <b>19%</b>                           | <b>45,2%</b>                 |
| 06/03/14 | 17  | 30%            | <b>80%</b>                       | 70%             | <b>25%</b>                       | <b>28%</b>                           | <b>45,2%</b>                 |
| 05/06/14 | 16  | 56%            | <b>78%</b>                       | 44%             | <b>71%</b>                       | <b>21%</b>                           | <b>63,6%</b>                 |
| 17/07/14 | 16  | 44%            | <b>71%</b>                       | 56%             | <b>44%</b>                       | <b>23%</b>                           | <b>61,5%</b>                 |
| 25/08/14 | 30  | 33%            | <b>80%</b>                       | 67%             | <b>90%</b>                       | <b>50%</b>                           | <b>70,0%</b>                 |
| 09/10/14 | 9   | 89%            | <b>75%</b>                       | 11%             | <b>0%</b>                        | <b>3%</b>                            | <b>68,6%</b>                 |
| 20/11/14 | 12  | 42%            | <b>80%</b>                       | 58%             | <b>57%</b>                       | <b>23%</b>                           | <b>58,1%</b>                 |
| 15/12/14 | 4   | 25%            | <b>100%</b>                      | 75%             | <b>33%</b>                       | <b>12%</b>                           | <b>50,0%</b>                 |
| 06/01/15 | 15  | 13%            | <b>50%</b>                       | 87%             | <b>15%</b>                       | <b>28%</b>                           | <b>27,6%</b>                 |
| 14/02/15 | 51  | 43%            | <b>55%</b>                       | 57%             | <b>48%</b>                       | <b>31%</b>                           | <b>46,7%</b>                 |
| 26/03/15 | 22  | 36%            | <b>38%</b>                       | 64%             | <b>71%</b>                       | <b>23%</b>                           | <b>49,2%</b>                 |
| Total    | 315 | 39,7%<br>(125) | <b>60,8%<sup>a</sup></b><br>(76) | 60,3%<br>(190)  | <b>49,5%<sup>b</sup></b><br>(94) | <b>25,0 %</b><br>(180/719)           | <b>47,6%</b><br>(342)        |

<sup>ab</sup>Diferentes superíndices dentro de una misma fila representan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

Del total de vacas sincronizadas el 4,6 % (33/719) perdió el dispositivo antes del Día 8 del tratamiento, afectando la tasa de preñez, siendo menor ( $P < 0,05$ ) en las que lo perdieron con respecto a las que no (Tabla 3.16).

Tabla 3.16. Evaluación de la tasa de preñez en vacas IATF que perdieron o no el dispositivo durante el tratamiento de sincronización.

| <b>Pérdida de Dispositivo</b> | <b>Tasa de Preñez</b>        |
|-------------------------------|------------------------------|
| SI                            | 24,2% (8/33) <sup>a</sup>    |
| NO                            | 48,8% (335/686) <sup>b</sup> |

Diferentes superíndices dentro de una misma columna representan diferencias significativas ( $P < 0,01$ ).

La variable litros de producción fue dividida en diferentes categorías para analizar si las distintas producciones podrían afectar la tasa de preñez (Tabla 3.17). Estadísticamente no existió diferencia significativa ( $P > 0,1$ ).

Tabla 3.17. Tasa de preñez según litros de producción en vacas Holando Argentino IATF con división del horario de inseminación, ECP y adición de GnRH como inductor de ovulación.

| <b>Litros de Leche</b> | <b>Tasa de Preñez</b>        |
|------------------------|------------------------------|
| < 20                   | 59,5% (25/42) <sup>a</sup>   |
| 21 – 30                | 51,1% (192/376) <sup>a</sup> |
| 31 – 40                | 41,9% (116/277) <sup>a</sup> |
| > 40                   | 41,6% (10/24) <sup>a</sup>   |

Las tasas de preñez no difieren ( $P > 0,1$ )

En la Tabla 3.18 se puede observar que las vacas de menos de 100 días de paridas son las que menos se preñaron en comparación con el resto ( $P < 0,05$ ) y si comparamos la tasa de preñez en función del número de partos podemos apreciar que no difirieron estadísticamente ( $P > 0,1$ , Tabla 3.19).

Tabla 3.18. Tasa de preñez según días desde el parto en vacas Holando Argentino IATF con división del horario de inseminación, ECP y adición de GnRH como inductor de ovulación.

| <b>DEL</b> | <b>Tasa de Preñez</b>        |
|------------|------------------------------|
| < 100      | 40,3% (68/169) <sup>a</sup>  |
| 101 – 150  | 50,0% (119/238) <sup>b</sup> |
| 151 – 200  | 43,7% (59/135) <sup>ab</sup> |
| > 200      | 54,2% (96/177) <sup>b</sup>  |

<sup>ab</sup>Diferentes superíndices dentro de una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Tabla 3.19. Tasa de preñez en vacas Holando Argentino primíparas o multíparas IATF con división del horario de inseminación, ECP y adición de GnRH como inductor de ovulación.

| <b>N° Partos</b> | <b>Tasa de Preñez</b>        |
|------------------|------------------------------|
| Primíparas       | 45,2% (117/259) <sup>a</sup> |
| Multíparas       | 48,9% (225/460) <sup>a</sup> |

Las tasas de preñez no difieren ( $P > 0,1$ )

Tampoco existió diferencia significativa ( $P > 0,1$ ) en la tasa de preñez según número de servicios. Ver tabla 3.20.

Tabla 3.20. Tasa de preñez según número de servicios en vacas Holando Argentino IATF con división del horario de IA, ECP y adición de GnRH como inductor de ovulación.

| <b>N° de servicios</b> | <b>Tasa de Preñez</b>        |
|------------------------|------------------------------|
| $\leq 3$               | 47,0% (251/534) <sup>a</sup> |
| 4 – 6                  | 47,8% (65/136) <sup>a</sup>  |
| > 6                    | 57,1% (28/49) <sup>a</sup>   |

Las tasas de preñez no difieren ( $P > 0,1$ )

### DISCUSIÓN

La presente Tesis de Maestría ha permitido incrementar los conocimientos actuales sobre los protocolos hormonales de IATF que utilizan estradiol y dispositivos con P<sub>4</sub>, con ECP y la adición de una dosis de GnRH como inductor de la ovulación, en vacas Holando Argentino en lactancia. Principalmente ha aportado información de la dinámica folicular del protocolo de IATF y la expresión de celos. Si bien la inclusión de GnRH al inicio del protocolo no mejoró el porcentaje de preñez, y tampoco habría mejorado el inicio de la nueva onda folicular, mediante estos experimentos se confirmó la hipótesis de que la inclusión de una dosis de GnRH al final del tratamiento de sincronización y la modificación del horario de inseminación aumentan la tasa de preñez en vacas tratadas con dispositivos con P<sub>4</sub> que no hayan manifestado celo al momento de la IATF cuando se utiliza ECP como inductor de la ovulación. También se aportó información sobre cómo afectan las diferentes variables a la tasa de preñez en vacas Holando Argentino en lactancia sincronizadas hormonalmente e IATF en diferentes épocas del año.

En el Experimento 1, la idea de colocar GnRH en el Día 0 fue mejorar la sincronía de una nueva onda folicular al estimular la liberación de LH y consecuentemente la ovulación de los folículos de mayor tamaño, con la subsiguiente formación de un CL evitando de esta manera la existencia de folículos persistentes de menor fertilidad (Pereira et al., 2015). No obstante, puede verse que este tratamiento no mostró diferencias significativas en las tasas de preñez con los que solo utilizaron EB al inicio del tratamiento, indicando que el posible efecto ovulatorio de la GnRH sobre los folículos >10 mm de diámetro (Wiltbank et al., 2013) no influenció la respuesta al tratamiento. Estos datos son similares a los obtenidos en un experimento realizado en vacas de raza Nelore por Campos et al. (2016). Pereira et al. (2015) también realizaron un experimento para evaluar el efecto de la administración de GnRH en el Día 0 en vacas lecheras de alta producción en Brasil. En este experimento las vacas recibieron EB y GnRH en el Día 0, una PGF2 $\alpha$  en el Día 7 y una segunda PGF2 $\alpha$  y ECP en el Día 9, cuando se removieron los dispositivos con P<sub>4</sub> y fueron

IATF a las 48 h. Si bien el tratamiento con GnRH solo tuvo un aumento marginal en la tasa de preñez, reportan una mejora especialmente durante la temporada fría del año y en vacas con ausencia de CL y baja P<sub>4</sub> en el inicio del protocolo (<3 ng/ml), mientras que en las con CL no se encontraron diferencias. Esto estaría indicando que la ausencia de diferencias significativas en el Experimento 1 de esta tesis, se puede deber principalmente a que la mayoría de las vacas (68%) tenían un CL en el momento del iniciar el tratamiento. La razón por la diferencia en el efecto de adicionar GnRH en las vacas sin CL con las vacas con CL puede ser debido a que la liberación de LH en respuesta a la administración de GnRH es mayor en vacas con bajos niveles de P<sub>4</sub> que las que tienen altos niveles de P<sub>4</sub> (Kastelic y Mapletoft, 1998). Por lo tanto, es lógico pensar que la GnRH va a tener un mayor efecto inductor de la ovulación del folículo dominante en las vacas con baja P<sub>4</sub>. De hecho, en el experimento de Pereira et al. (2015) la administración de GnRH en el Día 0 del tratamiento resultó en un mayor porcentaje de vacas que formaron un nuevo CL y mayores niveles circulantes de P<sub>4</sub> en el Día de la remoción del dispositivo que en el grupo control que no recibió GnRH. Por lo tanto, el experimento de Pereira et al. (2015) como el nuestro muestra solo diferencias marginales en las vacas con CL, cuestionando la justificación de adicionar GnRH en el Día 0 en forma sistemática en vacas lecheras cuando la mayoría de ellas está ciclando al inicio del protocolo. Por lo tanto, debido a su alta eficiencia y simplicidad, el tratamiento que más se sigue utilizando en América Latina para iniciar una nueva onda folicular sincrónica en protocolos de IATF, es la combinación de P<sub>4</sub> más estradiol, ya que suprime eficientemente la secreción de FSH y LH dando inicio a una nueva onda entre los 2 y 5 días, con un promedio de 4 días en un 90% de las vacas de carne (Bó et al., 1994; 1995; 2002) y un 75% de las vacas de leche (Balla et al., 2005) con variaciones según el nivel de producción. Souza et al. (2007b) demostraron que existe una correlación negativa significativa entre la producción de leche y la emergencia de la onda folicular, las vacas con mayores producciones de leche (> 35 kg/día) poseen una emergencia más temprana de la onda folicular (3,5 ± 0,2 días) que las que poseen una producción menor (< 25 kg/día; 4,6 ± 0,3 días).

Del total de animales utilizados en el Experimento 1, el 62% (124/200) presentó celo dentro de las 48 h de retirado el dispositivo, mientras que el 38% (76/200) restante no. Esto es inferior a los 68,5% de celos reportados en vaquillonas Holando Argentino por Cuatrín

et al. (2011). Esta menor tasa de celos a las 48 h puede deberse a que la utilización de ECP como inductor de la ovulación tiene una actividad biológica más sostenida que el EB y resulta en menores niveles circulantes de estradiol, con una mayor variabilidad en el momento de la ovulación (Bó et al., 2009).

Baruselli et al. (2007) reportaron que es posible utilizar ECP como inductor de la ovulación y comenzar con la IATF a las 48 h pos retirada de los dispositivos en vacas y vaquillonas Nelore. López del Cerro et al. (2011) utilizaron GnRH en el momento de la IATF en vacas Braford que no presentan celo a las 48 h de retirado el dispositivo y mejoraron la tasa de preñez del protocolo. Sin embargo otros autores no encontraron los mismos resultados (Sa Filho et al., 2011). Zabala et al. (2013 a, b y c) encontraron que si se difiere la IATF para las 56 h en las hembras que no dan celo y reciben GnRH en el momento de la inseminación, se pueden tener tasas de preñez similares a las de las hembras que dan celo, indicando que una proporción de hembras sufren un atraso en la ovulación. En este experimento los tratamientos en los que se dividió el horario de inseminación con respecto a la expresión de celos tuvieron mayor tasa de preñez (53% vs 31%,  $P < 0,01$ ) que los que fueron IATF a las 48h, coincidiendo con los datos reportados por Souza et al., (2009) quien sostuvo que la división del horario de inseminación mejoraría la tasa de preñez debido a que las vacas que presentan un celo prematuro presentarían una buena fertilidad cuando se las insemina a las 48 horas, mientras que cuando se las insemina a las 56 horas se estaría logrando una buena concepción en aquellas vacas que sufren un atraso en la ovulación. Por esta razón es que se diseñó el Experimento 2 para determinar el momento de la ovulación en relación a la expresión de celos en vacas Holando Argentino en lactancia.

El objetivo del Experimento 2 fue estudiar mejor la dinámica folicular en protocolos de IATF con  $E_2$  y dispositivos con  $P_4$  utilizando ECP como inductor de la ovulación y en base a estos hallazgos evaluar cuál era el mejor horario de inseminación y si la división del horario de inseminación y la adición de una dosis de GnRH a las que no presentaban signos de celo mejoraba la tasa de preñez en comparación con las que utilizaban un único horario de inseminación. Los inductores de ovulación que más se utilizan en protocolos de IATF son hormonas que inducen un pico de LH, tales como los ésteres de estradiol y la GnRH. Con la aplicación de ECP al retiro del dispositivo la concentración plasmática de estradiol comienza

a aumentar a las 12 horas (Vinckier et al., 1990; Souza et al., 2009; Uslenghi, 2016) y en presencia de un folículo dominante grande podría inducir un pico de LH anticipado, debido a la sumatoria del estradiol sintético y el estradiol endógeno producido por el propio folículo, adelantando la ovulación de los folículos de mayor tamaño (Colazo et al., 2003). De esta manera podrían llegar a ovular en forma temprana (antes de las 60 h) viéndose afectada la fertilidad de las vacas que ovulan tempranamente. Por otra parte el pico de LH que produce el ECP es de menor magnitud que el producido cuando se utiliza EB como inductor de la ovulación ( $9,4 \pm 2,2$  vs  $20,5 \pm 1,9$  ng/ml) pero de mayor duración ( $50,5 \pm 3,6$  vs  $19,6 \pm 1,2$  h) que explica la mayor dispersión de celos y las ovulaciones (Sales et al., 2012; Uslenghi et al., 2014). Las vacas tratadas con ECP como inductor de ovulación tienen una ventana de ovulación más amplia que cuando se utiliza EB, de aproximadamente 48 h (entre 42 y 90 h pos retiro del dispositivo) según reportó Ayres et al. (2008); por lo cual los animales que entran en celo a las 48 h y se inseminan más tarde ven dificultada su preñez debido a que al ovular tempranamente tienen un ovocito envejecido al momento de la inseminación, disminuyendo la tasa de fecundación o produciendo muertes embrionarias tempranas (Dalton et al., 2001).

En el experimento 2<sup>a</sup> se pudo observar que si bien los tratamientos en los cuales se utilizó GnRH como apoyo para inducir la ovulación del folículo pre-ovulatorio disminuyó la expresión de celos, no afectó la hora de celo, tasa de ovulación y hora de ovulación. En las vacas sin GnRH la expresión de los celos estuvo comprendida en un rango horario que fue de las 36 a las 84 h, con una dispersión mayor que en las vacas que recibieron GnRH, que mostraron celo entre las 48 y 60 h. Esto demuestra como la administración de GnRH induce ovulación disminuyendo la expresión de celos coincidiendo con lo reportado por Martínez et al. (2002) quien reportó que la ovulación del folículo dominante al administrar GnRH está asociada con la disminución de la concentración plasmática de estradiol y por lo tanto menor expresión de celos. Tampoco en el Experimento 2<sup>a</sup> existió diferencia entre el diámetro del FPO y la tasa de crecimiento folicular. Si analizamos el tamaño del FPO y momento de ovulación con respecto a la expresión de los celos podemos ver que las vacas que presentaron celo a las 48 h ovularon antes y con un folículo de mayor diámetro que las que no presentaron celo a las 48 h, similar a lo reportado por Salfen et al. (1999). Así mismo, hubo una tendencia ( $P < 0,1$ ) a una menor varianza en la hora de ovulación en las vacas que

recibieron GnRH en comparación con las que no. Cuando se analizó el horario de ovulación con respecto a la inseminación se pudo observar una menor dispersión desde el momento de la inseminación a la ovulación en el tratamiento donde se dividió el horario de inseminación y se utilizó GnRH en las vacas que no presentaron celo a las 48 h con respecto al resto de los tratamientos. Con este tratamiento las ovulaciones se concentraron entre las 12 y 24 h desde el momento de inseminación, siendo el mejor intervalo inseminación/ovulación para lograr una adecuada tasa de fertilización según sostienen Dransfield et al. (1998) y Rodríguez Hernández et al. (1995), a diferencia del resto de los tratamientos donde la dispersión fue mayor. Dransfield et al. (1998) demostraron que la probabilidad de que ocurra una concepción disminuía a medida que la inseminación se aproxima mucho al momento de la ovulación y cuando la inseminación se realizaba en animales ya ovulados. En este experimento se pudo determinar que el intervalo inseminación/ovulación donde se logró la mayor tasa de preñez fue entre las 12 y las 24 h, donde la máxima probabilidad de preñez se dio a las 23,7 h. Esto demuestra que la división del horario de inseminación y la adición de GnRH en vacas IATF utilizando ECP como inductor de la ovulación disminuye la dispersión entre la inseminación y la ovulación resultando en un adecuado control y sincronización de las ovulaciones. Las vacas que presentan un celo prematuro presentaron una buena fertilidad cuando se las insemina a las 48 h, mientras que la aplicación de GnRH para evitar retrasos en las ovulaciones y el atraso del horario de inseminación a las que no presentaron celo a las 48 h mejoraron el porcentaje de preñez.

El experimento 2<sup>b</sup> se realizó para evaluar las tasas de preñez a la IATF de los diferentes tratamientos, donde se observó que no hubo diferencia significativa entre tratamientos, contrariamente a lo encontrado en el Experimento 1. En el Experimento 1, el grupo que se inseminó de acuerdo a la expresión de celos tuvo una tasa de preñez significativamente mayor que el grupo en el cual todas las vacas fueron IATF a las 48 h. Si bien se esperaba una mayor tasa de preñez en este tratamiento también en el Experimento 2, en este caso no hubo diferencias significativas. Es difícil poder explicar el motivo de estos resultados diferentes. Una diferencia posible puede ser el semen utilizado en cada uno de los experimentos. Se ha estimado que la máxima viabilidad espermática en el tracto genital femenino es de 24 a 30 h (Hiers et al., 2003) por lo cual lograr una mejor sincronía entre la ovulación y el arribo de los espermatozoides debería mejorar la tasa de fecundación. Sin



embargo, hay grandes variaciones entre toros en cuanto a la persistencia de espermatozoides viables en el tracto reproductivo femenino (Dalton, 2013). Por lo tanto, es posible que el semen utilizado en este estudio haya sido de una calidad superior o de mayor fertilidad individual que el utilizado en el Experimento 1, compensando en parte la deficiencia en la distribución de las ovulaciones, permaneciendo viable en el tracto genital femenino durante un mayor período de tiempo (Dalton, 2013). Desafortunadamente, estas diferencias de persistencia en el oviducto no son posibles de determinar por los test *in vitro* convencionales de evaluación de la calidad seminal (Dalton, 2013). No obstante, a pesar que las diferencias entre grupos no fueron significativas los valores favorecieron numéricamente al grupo en el que se dividió la inseminación de acuerdo a la expresión de celos.

La conclusión más importante del Experimento 2 es que a pesar de no haber diferencias en la tasa de preñez entre grupos, cuando se analizaron los datos teniendo en cuenta la expresión de celos y el horario de inseminación se encontró una interacción significativa entre ellas. Se demostró que las vacas que presentaron celo a las 48 h del retiro del dispositivo se preñaron más cuando se las inseminó a las 48 h y las que no presentaron celo se preñaron más cuando se las inseminó a las 60 h, afirmando que la división en el horario de inseminación en protocolos de IATF que utilizan ECP como inductor de la ovulación sería una medida adecuada para disminuir la a sincronía inseminación/ovulación.

Además de eso, se observó que las vacas que demostraron celo previo a la IA obtuvieron mayor tasa de preñez que las que no lo hicieron, tanto en las que presentaron celo a las 48 h (48% vs 30%) como las que mostraron celo luego de la aplicación de GnRH (60% vs 43%). Según Perry et al. (2014) existe una interacción entre el diámetro del folículo preovulatorio, el ambiente hormonal óptimo (demostrado por la expresión de celos), y el establecimiento y mantenimiento de la preñez. Las vacas que presentan celo antes de la inseminación tienen más chances de ovular y lograr una preñez en comparación con las que no lo hacen (Perry et al., 2007). El diámetro folicular al momento de la IATF y la ocurrencia de estro al final del protocolo de sincronización es uno de los factores que pueden influenciar las respuestas de los protocolos de sincronización (Sa Filho et al., 2010; 2011b) porque está relacionado con la producción de E<sub>2</sub>, el tamaño del CL de la fase luteal subsiguiente y la producción de P<sub>4</sub> (Thatcher et al., 2001; Souza et al., 2009). El crecimiento folicular final y

el diámetro del folículo dominante en el momento de la IATF pueden afectar significativamente la calidad de los ovocitos, la ovulación, el ambiente uterino, y por consiguiente, la preñez. En vacas tratadas con EB al inicio del protocolo, los folículos ovulatorios más grandes en el día de la IATF muestran una mayor expresión de celos, mayor tasa de ovulación y dan lugar a un mayor número de preñeces por IA (Sá Filho et al.; 2010). En base a esto, podríamos concluir que en vacas que presenten celo al momento de la IATF podríamos utilizar semen de mayor valor genético debido a que tienen mayor probabilidad de preñarse.

Si bien en los protocolos de IATF es importante lograr un buen desarrollo de folículo dominante ovulatorio es importante tener en cuenta que existen circunstancias en que las vacas lecheras lactantes pueden desarrollar folículos más grandes que los folículos normales siendo perjudicial para los resultados de preñez, no solo cuando se inseminan después de un ciclo de estro espontáneo sino también en situaciones particulares tras protocolos de sincronización tradicionales de IATF en base a GnRH. Las vacas que no responden a la primera GnRH del protocolo Ovsynch o vacas cuyo folículo ovulatorio se desarrolla bajo concentraciones bajas de  $P_4$  tienen una fertilidad disminuida (Cerri et al., 2009). Cuando el folículo ovulatorio se desarrolla en un entorno de bajos niveles de  $P_4$ , el diámetro del folículo ovulatorio es más grande debido a una mayor exposición a la LH. Sin embargo, se observan concentraciones más altas de  $PGF_{2\alpha}$  y una tendencia hacia una fase lútea más corta durante el ciclo estral subsiguiente (Cerri et al.; 2011a, b). Por otra parte un período de dominancia más largo puede dar lugar a un ovocito envejecido y resultar en fertilidad reducida (Perry et al., 2007).

En base a los resultados obtenidos en el experimento anterior se diseñó el experimento 3 con la finalidad de evaluar si la administración de GnRH a las vacas sin síntomas de celo a las 48 h de retirado el dispositivo y que son inseminadas a las 60 h aumenta la tasa de preñez en vacas lecheras en lactancia tratadas con ECP como inductor de la ovulación.

En este experimento se evaluó la tasa de preñez en función de la adición o no de GnRH a las vacas que no presentaban celo a las 48 h y se difería su inseminación a las 60 h. En este caso se encontró una tendencia de que con la adición de GnRH a las vacas que no presentaron celo a las 48 h mejora la tasa de preñez general a la IATF (48,4% vs 42,1%). Además, el hallazgo más importante de este experimento fue que el grupo que utilizó GnRH en las vacas que no presentaron celo a las 48 h tuvo una mayor tasa de preñez que las del grupo donde no se utilizó GnRH (56,9% vs 40,3%). Trabajos de Ribadu et al. (1999) informaron que el tratamiento de vacas lecheras repetidoras con GnRH al momento de la inseminación resultó en el aumento de los índices de preñez, pudiéndose deber simplemente a la estimulación de un pico de LH en el subconjunto de vacas que presentan celo evidente sin el posterior pico de LH u ovulación. Del mismo modo, la adición de GnRH a las vacas sin síntomas de celo a las 48 h parecería estar adelantando la ovulación en las vacas que todavía no han tenido un pico de LH y por lo tanto tendrían una ovulación muy retrasada. La administración de GnRH produce un pico de liberación de gonadotrofinas hipofisarias dos horas después de su administración i.m., en una magnitud que depende del estado en que se encuentra la onda folicular, desencadenando la ovulación en vacas con un FD > a 9 mm de diámetro (Martinez et al., 1999). Si comparamos las tasas de preñez de las vacas que no presentaron celo a las 48 h y recibieron GnRH, se pudo ver que no hubo diferencia entre grupos en las que presentaron celo a las 60 h de retirado el dispositivo (60,0% vs 59,7%); mientras que si existió diferencia estadística entre las que no presentaron celo a las 60 h, preñándose más las que utilizaron GnRH como inductor de la ovulación (55,2% vs 28,6%). Esto demuestra que la administración de GnRH mejora la tasa de preñez induciendo una ovulación más sincrónica en las vacas que no presentan celo a las 60 h de retirado el dispositivo, probablemente debido a que la administración de GnRH induce la ovulación de las vacas que todavía no habían tenido un pico de LH y por lo tanto tendrían una ovulación muy retrasada y tal vez la ovulación de vacas con folículos más pequeños (Pereira et al., 2013; Vasconcelos et al., 2013).

De todos modos, al igual que en el Experimento 2 es importante destacar que siempre se preñaron más las vacas que presentaron celo, tanto a las 48 h como a las 60 h, coincidiendo con Perry et al. (2007) que observó que en general, las vacas que expresan celo antes de la inseminación tienen más chances de ovular en comparación con las que no lo

hacen. Pereira et al. (2016) reportaron que la expresión de celos al momento de la IATF o TETF se asoció con un aumento de la fertilidad mejorando la tasa de preñez (sin estro 25,5% vs con estro 38,9%) y disminución de la pérdida de preñez (sin estro 20,1% vs con estro 14,4%).

En el Experimento 4 se analizó la tasa de preñez en distintas épocas del año en vacas Holando Argentino en producción inseminadas con el protocolo desarrollado en esta tesis. Este experimento se llevó a cabo con la finalidad de ver como interfieren las diferentes variables en el resultado de la tasa de preñez con el protocolo en estudio.

A diferencia de los datos publicados por Piccardi et al. (2013) quien evaluó que las vacas de menor producción lechera tienen más posibilidad de preñarse que las de mayor producción, esta variable no afectó la tasa de preñez en este experimento. Si analizamos el número de partos con respecto a la tasa de preñez no se encontró diferencia estadísticamente significativa, a diferencia de los datos publicados por Souza et al., (2009) quien reportó mayor tasa de preñez en vacas primíparas con respecto a las multíparas en vacas lecheras de alta producción (primíparas 31,7% vs multíparas 21,3%). Tampoco afectó la tasa de preñez el número de servicios al igual que en el resto de los experimentos. Si se pudo observar una diferencia estadísticamente significativa cuando comparamos la tasa de preñez en función de los días de paridas, preñándose menos las vacas de menos días de parida, pudiéndose concluir que las vacas que se encuentran en pico de producción son las que menores niveles de hormonas esteroides en sangre tienen debido al alto metabolismo hepatocelular motivo de la mayor ingesta de materia seca (Sangsritavong et al., 2002). Sin embargo en este experimento no se encontró interacción entre producción y días de parida.

Con respecto a la condición corporal se pudo observar que las vacas con una condición corporal por debajo de 2,75 ven afectada negativamente su preñez, similar a los datos reportados por otros investigadores en vacas lecheras de alta producción que sugieren una menor tasas de preñez en vacas con una condición corporal menor a 2,75 (Souza et al., 2007b; Moreira et al., 2000; Galvao et al., 2004) y en vacas de carne sincronizadas con una condición corporal menor a 2,5 (en escala de 1-5; Cutaia et al., 2003).

Bisinotto et al. (2013 y 2015) reportaron que la presencia de un CL al inicio del protocolo de IATF es predictivo de mayor fertilidad. Estos investigadores demostraron que se necesita un mínimo de 2,0 ng/ml de P<sub>4</sub> en sangre durante el desarrollo del folículo ovulatorio para optimizar la fertilidad en las vacas lecheras de alta producción. Debido a que con un solo dispositivo intravaginal el aporte de P<sub>4</sub> en sangre es de alrededor de 0,8 a 1,0 ng/ml en vacas sin CL, mostraron que con el uso de dos dispositivos intravaginales se restableció la fertilidad en las vacas sin CL al inicio del tratamiento, logrando niveles de P<sub>4</sub> en sangre por encima de 2,0 ng/ml similares a los de las vacas en diestro, y obteniendo tasas de preñez similares a las que se logran en vacas que se encontraban en diestro al momento de iniciar el protocolo de IATF. Coincidiendo con los datos reportados por estos autores, si analizamos el momento del ciclo estral en el que se inició el tratamiento se puede ver como los animales que presentaban CL se preñaron mejor que el resto, pudiéndose observar que la menor tasa de preñez se logró en los que tenían folículo, independientemente del tamaño de los mismos. En un experimento realizado por Campos et al. (2016) en vacas Nelore obtuvieron la menor tasa de preñez en vacas que al momento de iniciar el protocolo de IATF presentaban folículos < 10 mm en comparación con la que tenían un folículo > 10 mm o CL (TP: 16,44%, 46,15% y 48,35%). En base a estos resultados se podría presumir que los animales con ausencia de CL y de menor condición corporal (posibles anestros) serían los que menos se preñaron, como lo demostró la tendencia interacción ovario-condición corporal.

Si bien en promedio el 56% de las vacas presentaron celo a las 48 h y el 44% a las 60 h, datos similares a los reportados por Baruselli et al. (2007) y Souza et al. (2009), la presentación de celos fue muy variable según las diferentes réplicas, quizás influenciadas por diferentes factores externos como el clima, temperatura, humedad ambiente y época del año. A su vez es importante destacar que al igual que los resultados del Experimento 2<sup>b</sup> se preñaron más las vacas que se inseminaron a las 60 h en comparación con las que se inseminaron a las 48 h, existiendo también variaciones según réplicas.

Se puede observar como el efecto del stress calórico del mes de enero afecta negativamente la tasa de preñez de las vacas en lactancia en comparación con los inseminados en el resto del año. Se cree que la causa es multifactorial y que la hipertermia

afecta la función celular de varios tejidos del tracto reproductivo femenino (Wolfenson et al., 2000; Hansen et al., 2001). En este contexto, se demostró que las vacas expuestas al stress térmico tenían períodos más largos sin ciclos estrales ( $P_4 < 1\text{ng/ml}$ ), así como ciclos estrales más cortos, comprometiendo la dinámica folicular ovárica y la divergencia folicular. Diferentes experimentos realizados en vacas en condiciones de stress térmico reportaron pulsos de LH de menor amplitud y frecuencia posiblemente relacionados al bloqueo de pulsos de GnRH y LH debido a un mayor nivel de corticosteroides en sangre (Gilad et al., 1993) y por ende un crecimiento folicular menor, con menor producción de esteroides por parte del folículo dominante, reducida ovulación y disminución de la fertilidad (Wilson et al., 1998). También se reportó que en el verano existe un aumento de co-dominancia folicular (aumento del número de folículos de más de 9 mm (Sartori et al., 2004), disminución de la expresión del estro, disminución en la fertilización, de la competencia para desenvolver a blastocisto y mayor mortalidad embrionaria temprana (Ferreira et al., 2011; Torres Junior et al., 2008).

Similar a lo ocurrido en el experimento 2<sup>b</sup>, a las vacas que en ausencia de signos de estro a las 48 h se les aplicó una dosis de GnRH, el 40% de las mismas presentó celo a las 60 h, mientras que el 60% restante no. A su vez es importante destacar una diferencia de preñez en favor de las que presentaron celo comparado con las que no lo hicieron (61% vs 49%), coincidiendo con lo reportado por otros autores (Perry et al, 2007; Sá Filho et al.; 2010).

Es importante destacar el alto porcentaje de vacas que no presentan celo hasta las 60 h de retirado el dispositivo en un tratamiento de IATF cuando se utiliza ECP como inductor de la ovulación, quizás porque entren en celo y ovulen más tarde, porque no lleguen a ovular u ovulen sin manifestar estro. Con la utilización de EB como inductor de la ovulación esto no es así, presentando celo el 80 al 90% de las vacas (Bó et al., 2009), probablemente debido a una mayor cantidad de celos farmacológicos de menor fertilidad. Frente a esta situación, la aplicación de una dosis de GnRH sigue siendo una buena medida debido a que colabora con el pico de LH induciendo la ovulación y logrando preñeces aceptables en estas vacas.

### CONCLUSIONES

Los resultados de esta Tesis de Maestría confirman la hipótesis de que la inclusión de una dosis de GnRH y la modificación del horario de inseminación aumentan la tasa de preñez en vacas lecheras tratadas con estradiol y dispositivos con progesterona que no hayan manifestado celo al momento de la IATF, cuando se utiliza ECP como inductor de la ovulación.

Además, los resultados de los diferentes experimentos de esta tesis permitieron llegar a las siguientes conclusiones específicas:

- La adición de GnRH al inicio del tratamiento con benzoato de estradiol aplicado al momento de la inserción de un dispositivo con progesterona en protocolos de IATF no mejoraron la tasa de preñez en vacas lecheras cíclicas en lactancia.
- Los tratamientos de IATF que utilizaron GnRH como apoyo para inducir la ovulación del folículo preovulatorio disminuyeron la expresión de celos, sin afectar las características del folículo dominante ovulatorio ni la tasa y momento de la ovulación.
- En los protocolos de IATF que utilizaron ECP y GnRH como inductor de la ovulación, las vacas que presentaron celo a las 48 h ovularon antes y con un folículo de mayor diámetro que las que no presentaron celo a las 48 h.
- La inseminación con respecto a la expresión de celos y la división del horario de inseminación en protocolos de IATF que utilizaron ECP como inductor de la ovulación disminuyó la dispersión entre la inseminación y la ovulación.

- La expresión de celo previo a la inseminación mejoró la tasa de preñez en vacas en lactación IATF con ECP como inductor de ovulación, tanto a las 48 h de retiro del dispositivo como las que mostraron celo luego de la aplicación de la GnRH (entre las 48 y 60 h) y son IATF a las 60 h.
- La administración de GnRH a las vacas sin síntomas de celo a las 48 h de retirado el dispositivo y su inseminación a las 60 h mejoraron la tasa de preñez en vacas lecheras en lactancia IATF con ECP como inductor de la ovulación.
- Las vacas que iniciaron el protocolo de IATF con ausencia de un CL y con presencia de solo folículos menores a 10 mm de diámetro y condición corporal  $< 2,75$  tuvieron una menor tasa de preñez.
- Los protocolos de IATF realizados en los periodos de mayor estrés calórico afectaron negativamente la tasa de preñez.



### BIBLIOGRAFIA

- Allen, W. R. 2001. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Reprod and Fert* 121, 513-527.
- Balla E., Filippi D., Maraña Peña D., Pincinato D., Perez L.C., Cutaia L., Veneranda G., Martínez M.F., Bó G. 2006. Efectos de diferentes protocolos de sincronización de la ovulación con dispositivos intravaginales con progesterona sobre el desarrollo folicular y las tasas de preñez en vacas lecheras en lactancia. Jornadas de actualización en biotecnologías de la reproducción en bovinos. IRAC 2006, Huerta Grande. Córdoba. 30 de junio y 1 de julio del 2006. CD.
- Baruselli P.S., Marques M.O., Nasser L.F., Reis E.L., Bó G.A. 2003. Effect of eCG on pregnancy rates of lactating zebu beef cows treated with CIDR-B devices for timed artificial insemination. *Theriogenology*, 59, 214.
- Bierschwal C.J., Garverick H.A., Martin C.E., Youngquist R.S., Cantley T.C., Brown M.D. 1975.. Clinical response of dairy cows with ovarian cysts to GnRH. *J Anim Sci.*, 41, 1660-1665.
- Bisinotto, R.S., Ribeiro, E.S., Santos, J.E.P. 2004. Synchronization of ovulation for management of reproduction in dairy cows. *Animal* 8 (Suppl. 1), 151-159.
- Bisinotto R. S., E. S. Ribeiro, F. S. Lima, N. Martinez, L. F. Greco, L. F. Barbosa, P. P. Bueno, L. F. Scagion, W. W. Thatcher, and J. E. P. Santos. 2013. Targeted progesterone supplementation improves fertility in lactating dairy cows without a corpus luteum at the initiation of the timed artificial insemination protocol. *J. Dairy Sci.*, 96, 2214-2225.
- Bisinotto R.S., L.O. Castro, M.B. Pansani, C.D. Narciso, N. Martinez, L.D.P. Sinedino, T.L.C. Pinto, N.S. Van de Burgwal, H.M. Bosman, R.S. Surjus, W.W. Thatcher, and J.E.P. Santos. 2015. Progesterone supplementation to lactating dairy cows without corpus luteum at the initiation of the Ovsynch protocol. *J. Dairy Sci.*, 98, 2515-2528.
- Bó G.A., Adams G.P., Pierson R.A., Caccia M., Tríbulo H., Mapletoft R.J. 1994. Follicular wave dynamics after estradiol-17 $\beta$  treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology*, 41, 1555-1569.

- Bó G.A., Adams G.P., Pierson R.A., Mapletoft R.J. 1995. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*, 43, 31-40.
- Bó G.A., Medina M., Tegli J.C., Costamagna A. and Brogliatti G.M. 2000. Fixed-timed artificial insemination in CIDR-B treated cows induced to ovulated with estradiol benzoate or GnRH. Proc. 14<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction (ICAR), 14-14, págs. 2-45. Stockholm, Sweden.
- Bó G.A., Barusselli P.S., Moreno D., Cutaia L., Caccia M., Tríbulo R., Tríbulo H., Mapletoft R.J. 2002a. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 57, 53-72. 3.
- Bó G.A., Cutaia L., Tribulo R. 2002b. Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos para carne: algunas experiencias realizadas en Argentina. Segunda Parte. *Taurus*, 15, 17-32.
- Bó G.A., Cutaia L., Chesta P., Balla E., Picinato D., Peres L., Maraña D., Avilés M., Menchaca A, Veneranda G., Baruselli P.S. 2005. Implementación de programas de inseminación artificial en rodeos de cría de Argentina. VI Simposio Internacional de Reproducción Animal, (págs. 97-128). Córdoba- Argentina.
- Bó G.A., Callejas S.S. 2008. Sincronización de celos y ovulaciones en el ganado bovino. En P. G, *Biotechnología de la reproducción* (págs. 189-199). Mar del Plata: Reprobiootec.
- Bó G.A., Cutaia L.E., Souza A.H., Baruselli P.S. 2009. Actualización sobre protocolos de IATF en Bovinos de leche utilizando dispositivos con progesterona. *Taurus*, 41, 20-34.
- Bó G.A., Baruselli P.S., Mapletoft R.J. 2013. Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci*, 10, 137-142.
- Brusveen D.J., Cunha A.P., Silva C.D., Cunha P.M., Sterry R.A., Silva E.P.B., Guenther, J.N., Wiltbank, M.C. 2008. Altering the time of the second gonadotropin-releasing hormone injection and artificial insemination (AI) during ovsynch affects pregnancies per AI in lactating dairy cow. *J. Dairy Sci.*, 91, 1044-1052.
- Bryan M.A., Emslie R., Heuer C. 2008. Comparative efficacy of an 8-day Cue-Mate/estradiol benzoate program with or without inclusion of equine chorionic gonadotropin in anestrous dairy cows. *Reprod. Fertil. Dev.*, 20, 85.
- Bryan M.A., Bó G., Mapletoft R.J., Emslies F.R. 2013. The use of equine chorionic gonadotropin in the treatment of anoestrous dairy cows in gonadotropin-releasing hormone/progesterone protocols of 6 or 7 days. *J. Dairy Sci.*, 96, 122-131.

- Burke C.R., Mussard M.L., Gasser C.L., Grum D.E., Day M.L. 2003. Estradiol benzoate delays new follicular wave emergence in a dose-dependent manner after ablation of the dominant ovarian follicle in cattle. *Theriogenology*, 60, 647-658.
- Burke J.M., de la Sota R.L., Risco C.A., Staples C.R., Schmitt E.J.-P, Thatcher W.W. 1996. Evaluation of timed insemination using a gonadotropin-releasing hormone agonist in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 8, 1385-1394.
- Butler, W. 2003. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livest Prod*, 83, 211-218.
- Campos C.C, Oivera M., Ferreira Mohallem R., dos Santos R.M.. 2016. Gonadorelin at the outset and/or end of an ovulation synchronization progestrone estradiol benzoate-based protocol in Nelore Females. *Semina: Ciencias Agrarias, Londrina*, 37, 173-182.
- Callejas S., De dominicis O., Madero S., Cantallops F., Uslenghi G., Cabodevila J. (2011a). Uso del cipionato de estradiol para implementar un programa de IATF. *Rev. Arg. Prod. Anim*, 31 (Supl 1), 408.
- Callejas S., Uslenghi G., Larghi J., Cledou G., Cabodevila J. 2011b. Uso del cipionato de estradiol para sincronizar ovulaciones en vaquillonas Holando. *Arg. Prod. Anim*, 31 (Supl 1), 409.
- Cattaneo R., Callejas S. 2001. Detección de celos en el Bovino. Factores que afectan y métodos que ayudan. *Rev. Med. Vet.*, 82, 17-22.
- Cerri R. L., Santos J.E., Juchem S.O., Galvao K.N., Chebel R.C. 2004. Timed artificial insemination with estradiol cypionate or insemination at estrus in high-producing dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 87, 3704-3715.
- Cerri R. L., Rutigliano H. M., Chebel R. C., Santos J. E. P. 2009. Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows. *Reproduction*, 137, 813-823.
- Cerri R. L., Chebel R. C., Rivera F., Narciso C. D., Olivera R. A., Thatcher W.W., Santos J. E. P. 2011a. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: I. Ovarian and embryonic responses. *J. Dairy Sci.*, 94, 3342-3351.
- Cerri R. L., Chebel R. C., Rivera F., Narciso C. D., Olivera R. A., Amstalden M., Baez-Sandoval G. M., Thatcher W. W., Santos J. E. P. 2011b. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and uterine responses. *J. Dairy Sci.*, 3352-3365.

- Colazo M.G., Kastelic J.P., Mapletoft R.J. 2003. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. *Theriogenology*, 60, 855-865.
- Colazo M.G., Kastelic J.P., Martinez M.F., Whittaker P.R., Wilde R. 2004. Fertility following fixed-time AI in CIDR treated beef heifers given GnRH or estradiol Cypionate and fed diets supplemented with flax seed or sunflower seed. *Theriogenology*, 61, 1115-1124.
- Cruppe L.H. y Day M.L. 2011. Maximización de las tasas de preñez con inseminación artificial a tiempo fijo con el programa Co-Synch de 5 días. . 9° Simposio Intenacional de Reproducción Animal, (págs. 193-222). Córdoba, Argentina.
- Cuatrín A., Scándolo D.G., Scándolo D., Maciel M. 2011. Detección de celo por actividad en vaquillonas Holstein sincronizadas con un protocolo de inseminación a tiempo fijo. Resúmenes I Simposio Latinoamericano de Reproducción Animal/Comunicaciones Cortas/Bovinos, (pág. en CD). Viña del Mar, Chile.
- Cutaia L., Moreno D., Villata L., Bó G.A. 2001. Synchrony of ovulation in beef cows treated with progestin vaginal devices and estradiol benzoate administered at device removal or 24 h hours later. *Theriogenology*, 55, 244.
- Cutaia L., Veneranda G., Tríbulo R., Barusselli P.S y Bó G.A. 2003. Programa de inseminación a tiempo fijo en rodeos de cría: Factores que lo afectan y resultados productivos. V Simposio Internacional de Reproducción Animal., (págs. 119-132). Córdoba, Argentina.
- Dalton J.C., Nadir J.H., Bame M., Noftsinger, R.L. Nebel, and R.G., Saacke. 2001. Effect of time of insemination on number of accessory sperm, fertilization rate, and embryo quality in nonlactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 84:2413-2418.
- Dalton, J. 2013. Características del semen de relevancia para la inseminación artificial a tiempo fijo. Resúmenes X Simposio Internacional de Reproducción Animal, (págs. 183-198). Córdoba, Argentina.
- Daxenberger A., Ibarreta D., Meyer H. H. D. 2001. Possible health impact of animal oestrogens in food. *Human Reproduction Update*, 7, 340-355.
- De la Sota R.L., Risco C., Moreira F., Thatcher W.W. 1998. Efficacy of a timed insemination program in lactating dairy cows during summer heat stress. *Theriogenology*, 49, 761-770.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C. W. (s.f.). InfoStat versión 2015. Obtenido de Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.: <http://www.infostat.com.ar>.

- Diskin M.G., Ausstin E.J., Roche J.F. 2002. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Dom. Anim. Endocrinol*, 23, 211-228.
- Diskin M.G., Morris D.G. 2008. Embryonic and fetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod Dom Anim.*, 43 (supl 2), 260-267.
- Diskin MG., Murphy JJ., Sreenan JM. . 2006. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Animal Rep. Sci.*, 96, 297-311.
- Dransfield, M.B.G., R.L. Nebel, R.E. Pearson, and L.D. Warnick. 1998. Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. *J. Dairy Sci.* 81:1874-1882.
- Edmonson A.J., Lean I.J., Weaver L.D., Farver T., Webster G. 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 72, 68-78.
- Ferreira R. M., Ayres H., Chiaratti M. R., Ferraz M. L., Araújo A. B., Rodriguez C. A., Watanabe Y. F., Vireque A. A., Joaquim D. C., Smith L.C., Meirelles F.V., Barusselli P.S. 2011. The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. *J. Dairy Sci.*, 94, 2383-2392.
- Ferreira R.M., Ayres H., Sales J.N.S., Souza A.H., Rodriguez C.A., Barusselli P.S. . 2013. Effect of different doses equine chorionic gonadotrophin on follicular and luteal dynamics and P/AI of high-producing Holstein cows. *Anim Reprod Sci.*, 140, Issues 1-2, 26-33.
- Galvao K.N., Santos J.E., Juchem S.O., Cerri R.L., Coscioni A.C., Villasenor M. 2004. Effect of addition of a progesterone intravaginal insert to a timed insemination protocol using estradiol cypionate on ovulation rate, pregnancy rate, and late embryonic loss in lactating dairy cows. *J. Animal Sci.*, 82, 3508-3517.
- García-Ipsilerto I., Lopez Helguera I., Martino A., Lopez Gatius I. 2012. Reproductive performance of anoestrous high-producing dairy cows improved by adding Equine chorionic gonadotrophin to a progesterone- based oestrus synchronizing protocol. *Reprod Dom Anim*, 47, 752-758.
- Garverick, H. 1997. Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 80, 995-1004.
- Gilad E., Meidan R., Berman A., Graver Y., Wolfenson D. 1993. Effect of heat stress on tonic and GnRH-induced gonadotrophin secretion in relation to concentration of oestradiol in plasma of cyclic cows. *J. Reprod. Fertil.*, 99, 315-321.
- Ginther, O. J. 2000. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim. Reprod. Sci.*, 60, 61-79.

- Giordano J.O., Fricke M.C., M.C. Wiltbank and V.E. Cabrera. 2010. An economic decision-making support system for selection of reproductive management programs on dairy farms. *J. Dairy Sci.*, 94, 6216-6232.
- Giordano J. O., M. C. Wiltbank, J. N. Guenther, R. Pawlisch, S. Bas, A. P. Cunha, and P. M. Fricke. 2012. Increased Fertility in lactating dairy cows resynchronized with Double-Ovsynch compared with Ovsynch initiated 32 d after timed artificial insemination. *J. Dairy Sci.*, 95, 639-653.
- Gnemmi G., Maraboli C. 2007. Ultrasonografía e gestione riproduttiva. Parte I: Programmi di sincronizzazione. *Summa*, 8, 38-44.
- Gnemmi G., Maraboli C. 2012. L'anestronella bovina: diagnosi e terapia. *Rivista de Medicina Veterinaria*, 46, 21-26.
- Gnemmi G., Maraboli C. 2014. La ultrasonografía en los programas de sincronización. Resúmenes Séptimas Jornadas Taurus, (págs. 56-69). Buenos Aires, Argentina.
- Gumen A.J., Guenther M., Wiltbank M.C. 2003. Follicular size and response to Ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovular lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 86, 3184-3194.
- Gumen A., Sartori R., Costa F., Wiltbank M.C. 2000. Development of follicular cysts in cattle is due to an estradiol-induced GnRH/LH surge without subsequent progesterone exposure. *J. Dairy Sci.*, 83 (Suppl 1), 211 abstr.
- Hafez E.S.E., Jainudeen M.R., Rosnina Y. 2000. Hormonas, factores de crecimiento y reproducción. 7ma Edición. En Hafez, ESE y Hafez B Reproducción e inseminación artificial en animales. (págs. 33-56). Mexico: Ed McGraw- Hill Interamericana.
- Hansen P. J., Drost M., Rivera R. M., Paula-Lopez F. F., Al-Katanani Y. M., Krininger III C. E., Chase Jr C. C. 2001. Adverse impact of heat stress on embryo production: Causes and strategies for mitigation. *Teriogenology*, 55, 91-103.
- Hawk, H. W. 1975. Hormonal control of changes in the direction of uterine contractions in the estrous ewe. *Biol. Reprod.*, 12, 423-430.
- Hiers E., Barthle C., Dahms V., Portillo G., Bridges G., Rae D., Thacher W., Yelich J. 2003. Synchronization of Bos Indicus x Bos Taurus cows for timed artificial insemination using gonadotropin-releasing hormone plus prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  in combination with megestrol acetate. *J. Anim. Sci.*, 81, 830-835. InfoStat. (2007). InfoStat/Profesional, versión 2007. Grupo InfoStat/FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Ed. Brujas, Córdoba, Argentina.

- Knopf L., Kastelic J.P., Schallenbeger E., Ginther O.J. 1989. Ovarian follicular dynamics in heifers: Test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Dom. Anim. Endocr.*, 6, 111-120.
- Le Blanc, S. 2010. Does higher production imply worse reproduction? *WCDS. Advances in dairy technology.*, 22, 253-263.
- Lopez del Cerro P., Scándolo D.G., Vanzetti L., Cuatrín A., Scándolo D., Maciel M. 2011. Efecto de la aplicación de Lecirelina en la fertilidad de vaquillonas Braford que no manifiestan celo previo a la IATF. Resúmenes IX Simposio Internacional de Reproducción Animal, (pág. 326 abstract). Córdoba, Argentina.
- Lopez H., Satter L.D., Wiltbank M.C. 2004. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 81, 209-223.
- Lucy, M. C. 2001. Reproduction Losses in high production dairy cattle: where will it end? *J. Dairy Sci.*, 84, 1277-1293.
- Lucy M.C., 2004. The use of treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture based management systems. *Anim Reprod Sci.*, 82-83, 495-512.
- Lucy, M.C., 2009. Celos: biología básica y mejoramiento de la detección de celo. *Taurus*, 43, 15-27.
- Macmillan K.L. y Burke C.R. 1996. Effects of estrus cycle control on reproductive efficiency. *Anim. Reprod. Sci.*, 42, 307-320.
- Mapletoft, R.J., Colazo M.G., Martínez M.F., Kastelic J.P. 2003. Ésteres de estrógenos para la sincronización de la emergencia de la onda folicular y la ovulación en animales tratados con dispositivos con progesterona. V Simposio Internacional de Reproducción Animal, (págs. 55-67). Córdoba, Argentina.
- Martínez M.F., Adams G.P., Bergfelt D.R., Mapletoft R.J. 1999. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, 57, 23-33.
- Martínez M.F., Kastelic J.P., Adams G.P., Mapletoft R.J. 2002. The use of a progesterone-releasing device (CIDR-B) or melengestrol acetate with GnRH, LH or estradiol benzoate for fixed time AI in beef heifers. *J. Animal Sci.*, 80, 1746-1751.
- Moreira F., Risco C., Pires M.F., Ambrose J.D., Drost M., Delorenzo M., Thatcher W.W. 2000. Effect of body condition on reproductive efficiency of lactating dairy cows receiving a timed insemination. *Theriogenology*, 53, 1305-1319.

- Moreira F., Orlandi C., Risco C.A., Mattos R., Lopes F., Thatcher W. 2001. Effects of presynchronization and bovine somatotropine on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J. Animal Sci.*, 84, 1646-1659.
- Nebel R.L., Jobst S.M., Dransfield M.B., Bailey T.L. 1987. Use of radio frequency data communication system, HeatWatch®, to describe behavioral estrus in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 80, 179-197.
- Nett T.M., Turzillo A.M., Baratta M., Rispoli L.A. 2002. Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 23, 33-42.
- NRC. Nutrient requirements of dairy cattle. 7<sup>th</sup> Revised edition, National Academic of Sciences. Washington, DC, Estados Unidos, 2001.
- Pancarci S.M., Jordan E.R., Risco C.A., Schouten M.J., Lopez F.L., Moreira F., Thatcher W.W. . 2002. Use of estradiol cypionate in a presynchronized timed artificial insemination program for lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 85, 1222-1231.
- Pereira, M. H., A. D. Rodrigues, T. Martins, W. V. Oliveira, P. S. Silveira, M. C. Wiltbank, and J. L. Vasconcelos. 2013. Timed artificial insemination programs during the summer in lactating dairy cows: Comparison of the 5-d Cosynch protocol with an estrogen/ progesterone-based protocol. *J. Dairy Sci.*, 96, 6904–6914.
- Pereira M. H. C., M. C. Wiltbank, L. F. S. P. Barbosa, W. M. Costa Jr., M. A. P. Carvalho, and J. L. M. Vasconcelos. 2015. Effect of adding a gonadotropin-releasing-hormone treatment at the beginning and a second prostaglandin F2 treatment at the end of an estradiol-based protocol for timed artificial insemination in lactating dairy cows during cool or hot seasons of the year. *J. Dairy Sci.*, 98, 947-959.
- Pereira M. H. C., M. C. Wiltbank, J. L. M. Vasconcelos. 2016. Expression of estrus improves fertility and decreases pregnancy losses in lactating dairy cows that receive artificial insemination or embryo transfer. *J. Dairy Sci.*, 99, 2237-2247.
- Perez Wallace, S. M. 2013. Tratamientos hormonales para reducir pérdidas de gestación en vacas lecheras. En T. Doctoral. La Plata, Argentina: Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencias Veterinarias. 76 pp.
- Perry G. A., Smith M. F., Roberts A.J., Macneil M.D., Geary T.W. 2007. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J. animal Sci.*, 85, 684-689.
- Perry, G. A., O. L. Swanson, E. L. Larimore, B. L. Perry, G. D. Djira. 2014. Relationship of follicle size and concentrations of estradiol among cows exhibiting or not exhibiting estrus during a fixed-time AI protocol. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 48, 15-20.



- Piccardi M., Capitaine Funes A., Balzarini M., Bó G.A. 2012. Some Factors affecting the number of days open in Argentinean dairy herds. *Theriogenology*, 30, 1-6.
- Piccardi M., Capitaine Funes A., Balzarini M., Bó G.A. 2013. Some factors affecting the number of days open in Argentinean dairy herds. *Theriogenology* 79:760-765.
- Pursley J. R., Mee M. O., Wiltbank M. C. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF $2\alpha$  and GnRH. *Theriogenology*, 44, 915-923.
- Pursley J.R., Wiltbank M.C., Stevenson J.S., Ottobre J.S., Garverick H.A., Anderson L.L. 1997a. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J. Dairy Sci.*, 80, 295-300.
- Pursley J.R., Kosorok M.R., Wiltbank M.C. 1997b. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J. Dairy Sci.*, 80, 301-306.
- Pursley J.R., Silcox R.W., Wiltbank M.C. 1998. Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 81, 2139-2144.
- Pursley J.R., Fricke P.M., Garverick H.A., Kesler D.J., Ottobre J.S., Stevenson J.S., Wiltbank M.C. 2001. NC-113 Regional Research Project. Improved Fertility in noncycling lactating dairy cows treated with exogenous progesterone during Ovsynch. Midwest Branch ADSA 2001 Meeting, Des Moines, IA; 63.
- Rabaglino MB., Risco CA., Santos JEP, Thatcher WW. 2009. Estrategias de manejo para optimizar la eficiencia reproductiva en vaquillonas lecheras de remplazo. 8° Simposio Internacional de Reproducción Animal., (págs. 228-242). Córdoba. Argentina.
- Ribadu A.Y., Nakada K., Tanaka Y., Moriyoshi M., Zhang W.C., Nakao T. 1999. Lack of LH response to exogenous estradiol in heifers with ACTH-induced ovarian follicular cysts. *J Vet Med Sci*, 61, 979-981.
- Rodríguez Hernández, T., Espinoza, J. and Verde, O. 1995. Efecto del momento de inseminación artificial, masaje clitorico, temperatura rectal y otros factores sobre la preñez en bovinos. *Zootécnia. Tropical*. 13:129.
- Ryan D. P., Prichard J.F., Kopel E., Godke R.A. 1993. Comparing early embryo mortality in dairy cows during hot and cool season of the year. *Theriogenology*, 39, 719-737.
- Sá Filho M.F., A.M. Crespilho, J.E.P. Santos, G.A. Perry, P.S. Baruselli. 2010. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 120, 23-30.

- Sá Filho M.F., J.E.P. Santos, R.M. Ferreira, J.N.S. Sales, P.S. Baruselli. 2011b. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. *Theriogenology*, 76, 455-463.
- Sales J.N.S., Carvalho J.B.P., Crepaldi G.A., Cipriano R.S., Jacomini J.O., Maio J.R.G., Souza J.C., Nogueira G.P., Baruselli P.S. 2012. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* ( 78), 510-516.
- Salfen B.E., Cresswell J.R., Xu Z.Z., Bao B., Garverick H.A. 1999. Effects of the presence of a dominant follicle and exogenous oestradiol on the duration of the luteal phase of the bovine oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil*, 115, 15-21.
- Sanchez C., Suero M., Castignani H., Terán J.C., Marino M. 2012. La lechería Argentina: Estado actual y su evolución (2008 a 2011). . Obtenido de Asociación Argentina de economía Agraria. RIAN 2012 – Red de Información Agropecuaria Nacional.: <http://rian.inta.gov.ar/>
- Sangsritavong S., Combs D.K., Sartori R., Armentano L.E., Wiltbank M.C. 2002. High feed intake increases liver blood and metabolism of progesterone and estradiol-17 $\beta$  in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 85, 2831-2842.
- Sartori R., Rosa G.J.M.; Wiltbank M.C. 2002a. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating cows and dry cows in Winter. *J. Dairy Sci.*, 85, 2813-2822.
- Sartori R., Sartor-Bergfelt R., Mertens S.A., Guenther J. N., Parrish J.J., Wiltbank, M.C. 2002b. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J. Dairy Sci.*, 85, 2803-2812.
- Sartori R., Haughian J.M., Shaver R.D., Rosa G.J.M., Wiltbank M.C. 2004. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J. Dairy Sci.*, 87, 905-920.
- Souza A.H., Wosniacki A.M., Torres-Junior J.R.S., Martins C.M., Ayres H., Baruselli P.S. 2006. Fatores que afetam o volume do corpo lúteo durante o ciclo estral de vacas Holandesas de alta produção. *Acta Scientiae Veterinariae* (Proc. Annual Meeting of the Brazilian Society of Embryo Technology; SBTE), 34, 368.
- Souza A.H., V. S. 2007a. Efeito do eCG e do cipionato de estradiol em protocolos para inseminação artificial em tempo fixo em vacas holandesas de alta produção. *Acta Scientiae Veterinariae* (Proc. Annual Meeting of the Brazilian Society of Embryo Technology (SBTE), Submitted.

- Souza, A.H., Gumen, A., Silva, E.P.B., Cunha, A.P., Guenther, J.N., Peto, C.M., Caraviello, D.Z., Wiltbank, M.C. 2007b. Supplementation with Estradiol-17 $\beta$  before the last Gonadotropin-Releasing Hormone injection of the Ovsynch protocol in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 90, 4623-4634.
- Souza A.H., Viechnieski S., Lima F.A., Silva F.F., Araujo R., Bó G.A., Wiltbank M.C., Baruselli P.S. 2009. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology*, 72, 10-21.
- Stahinger R.C., Vispo P.E., Prieto P.N., Fogliatti G. 2011. Evaluación del pintado en a base de la cola en protocolos de IATF en vacas Bradford pluríparas. IX Simposio Internacional de Reproducción Animal , (pág. 335). Córdoba, Argentina.
- Stevenson J.S., Kobayashi Y., Thompson K.E. 1999. Reproductive performance of dairy cows in various programmed breeding systems including Ovsynch and combinations of gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin F2 $\alpha$ . *J. Dairy Sci.*, 82, 506-515.
- Stewart F., Allen W.R., Moor R.M. . 1976. Pregnant mare serum gonadotrophin: ratio of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone activities measured by radioreceptor assay. *J. of Endocrinology*, 71, 371-382.
- Thatcher W.W., Moreira F., Santos J.E.P., Mattos R.C., Lopez F.L., Pancarci S.M., Risco C.A. 2001. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology*, 55, 75-90.
- Thatcher W. W., F. Moreira, S. M. Pancarci, J. A. Bartolomé, and J. E Santos. 2002. Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. *Domest. Animal Endocrinol*, 23, 243-254.
- 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.
- Torres-Júnior J .R., Pires W.F., Ferreira J.H.M., Viana L.S.A., Camargo A.A., Ramos I.M., Folhadella J., Polisseni C., Clemente M.F., Sá Filho F., Paula-Lopez, and P. S. Barusselli. 2008. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 69, 155-166.
- Tsai S.J., Wiltbank M.C. 1998. Prostaglandin F2 $\alpha$  regulates distinct physiological changes in early and mid-cycle bovine corpora lutea. *Biol. Reprod.* 58: 346-352.
- Tschopp J.C. y Bó G.A. 2015. Momento de inseminación y expresión de celos en vacas lecheras sincronizadas con dispositivos con progesterona y estradiol. XI Simposio Internacional de Reproducción Animal, (págs. 209-233). Córdoba, Argentina.

- Uslenghi G., Gonzales Chavez S., Cabodevila J., Callejas S. 2014. Effect of estradiol cypionate and amount of progesterone in the intravaginal device on synchronization of estrus, ovulation and om pregnancy rate in beef cows treated with FTAI based protocols. *Anim. Reprod. Sci.*145, 1-7.
- Uslenghi G. 2016. Factores que afectan la eficiencia reproductiva en bovinos para carne inseminados a tiempo fijo: sal de estradiol, sincronización de la ovulación y calidad seminal. Tandil, Buenos Aires, Argentina: Facultad de Ciencias Veterinarias, U.N.C.P.B.A.105 pp.
- Vasconcelos J. L. M., R. W. Silcox, G. J. M. Rosa, J. R. Pursley, and M. C. Wiltbanck. 1999. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 52, 1067-1078.
- Vasconcelos, J. L. M., M. H. C. Pereira, M. Meneghetti, C. C. Dias, O. G. SaFilho, R. F. G. Peres, A. D. P. Rodrigues, and M. C. Wiltbanck. 2013. Relationships between growth of the preovulatory follicle and gestation success in lactating dairy cows. *Anim. Reprod.*, 10, 206-214.
- Veneranda G, Filippi L, Racca D, Cutaia L, Bó GA. 2008. Pregnancy rates in dairy cows treated with intravaginal progesterone devices and GnRH or estradiol benzoate and eCG. *Reprod. Fertil. Dev.*, 20, 91 (abstract).
- Vynckier L., Debackere M., De Kruif, Coryn M. 1990. Plasma estradiol-17 $\beta$  concentration in the cow during induced estrus and after injection of estradiol-17 $\beta$  benzoate and estradiol-17 $\beta$  cypionate – a preliminary study. *J. Vet. Pharmacol Theriogenology*, 13, 36-42.
- Walsh S.W., Williams E.J., Evans A.C.O. 2011. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 123, 127-138.
- Washburn S.P., Silvia W.J., Brown C.H., McDaniel B.T., McAllister A.J. 2002. Trends in reproductive performance in southeastern Holstein and Jersey DHI herds. *J. Dairy Sci.*, 85, 244-251.
- Wilson S. J., C. J. Kirby, A. T. Koenigsfeld, D. H. Keisler, and M. C. Lucy. 1998. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 2. Heifers. *J. Dairy Sci.*, 81, 2132-2138.
- Wiltbank M.C., Fricke P.M., Sangsritavong S., Sartori R., Ginther O.J. 2000. Mechanisms that prevent and produced dooble ovulations in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 83, 1-10.
- Wiltbank M.C., Lopez H., Sartori R.,Sangsritavong S., Gümen A. 2006. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*, 65, 17-29.

- Wiltbank M.C., Souza A., Carvalho P., Bender R., Nascimento A. 2013. Como mejorar la fertilidad a la IATF mediante la manipulación de las concentraciones de progesterona circulante en el ganado lechero. Resúmenes X Simposio Internacional de Reproducción Animal, (págs. 77-90). Córdoba, Argentina.
- Wiltbank M.C., and J.R. Pursley. 2014. The cow as an induced ovulator: Timed IA after synchronization of ovulation. *Theriogenology*, 81, 170-185.
- Wolfenson D., Roth Z., Meidan R. 2000. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: Basic and applied aspects. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 535-547.
- Zabala N., Repiso G., Miranda J., Cutaia L. 2013a. Efecto de la aplicación de GnRH 12 h antes de la IATF en vaquillonas de 24 meses que no manifiestan celo sobre los porcentajes de preñez. Resúmenes X Simposio Internacional de Reproducción Animal, (pág. 329 (abstract)). Córdoba, Argentina.
- Zabala N., Repiso G., Miranda J., Cutaia L. 2013b. Efecto de la aplicación de GnRH 12 h antes de la IATF en vacas Bradford con cría al pie que no manifiestan celo sobre los porcentajes de preñez. Resúmenes X Simposio Internacional de Reproducción Animal, (pág. 330 (abstract)). Córdoba, Argentina.
- Zabala N., Repiso G., Miranda J., Cutaia L. 2013c. Efecto de la aplicación de GnRH 12 h antes de la IATF en vacas Bradford sin cría al pie que no manifiestan celo sobre los porcentajes de preñez. Resúmenes X Simposio Internacional de Reproducción Animal, (pág. 331 (abstract)). Córdoba, Argentina.