



Universidad Nacional
de Córdoba



Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Instituto de Reproducción Animal Córdoba

**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE GnRH SOBRE LA TASA DE
PREÑEZ DE VACAS DE CARNE SINCRONIZADAS CON
DISPOSITIVOS CON P₄ Y ECP**

Rodrigo Cuervo

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, 2017

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE GnRH SOBRE LA TASA DE PREÑEZ DE VACAS DE CARNE SINCRONIZADAS CON DISPOSITIVOS CON P₄ Y ECP

Rodrigo Cuervo

Comisión Asesora de Tesis

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

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

.

Tribunal Examinador de Tesis

Biol. (Dra.) Mariana Caccia

Med. Vet. (Dr.) Luciano Cattaneo

Med Vet. (M.Sc.) Juan Carlos Tschopp

Presentación formal académica

2017

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis Dr. Gabriel A. Bó por la confianza y por todo el apoyo profesional durante la realización de esta maestría. Por ser un excelente profesor y amigo que no solo compartió sus conocimientos en este trabajo sino que también lo hace día a día con la posibilidad que me dio de dictar clases con él, una gran motivación para aprender y crecer.

A mi co-director Pablo Chesta por el aporte realizado a mi trabajo de tesis y por la continua formación no solo como profesional sino también como amigo.

Al tribunal examinador de tesis Biol. (Dra.) Mariana Caccia, Med. Vet. (Dr.) Luciano Cattaneo y Med Vet. (M.Sc.) Juan Carlos Tschopp por sus correcciones y sugerencias aportadas.

A Humberto Tribulo, Ricardo Tribulo y Gabriel Bó por brindarme la posibilidad de formar parte del equipo de trabajo del Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC) donde comencé mi formación y mis trabajos y donde siempre soy bienvenido con diferentes proyectos nuevos.

A Lucas Cutaia por guiarme en mis primeros pasos de ésta maestría.

A los invaluable amigos que el IRAC me dio la oportunidad de conocer y que aportaron a mi formación y a la realización de esta tesis: José María Oviedo, Jahir Vicente Garzón, Paula Rodriguez Villamil, Felipe Ongaratto, Andrés Tribulo, Exequiel Barzola y Martin Ramos.

Agradezco a mi familia por apoyarme en todo momento e incentivar me para continuar con mi formación profesional.

A Sofía Tarraubella por acompañarme, apoyarme y ayudarme en la etapa final de esta tesis de maestría.

RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto de la aplicación de una dosis de GnRH en el momento de la Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF) sobre el momento de la ovulación y la tasa de preñez (TP) de vacas con cría al pie y vaquillonas sincronizadas con protocolos con estradiol, dispositivos con progesterona (P_4), benzoato de estradiol (EB) y cipionato de estradiol (ECP) como inductor de la ovulación. Para la sincronización de celos se utilizó un tratamiento de 7 días con dispositivo de P_4 y EB en el día de la inserción y prostaglandina, eCG y ECP el día del retiro. En el Experimento 1 se evaluó la adición sistemática de GnRH a las 48 h del retiro del dispositivo con P_4 , mismo momento en el que se realizó la IATF, mejora la TP. Se demostró que la TP no fue diferente entre las vacas que recibieron o no GnRH en el momento de la IATF ($P=0,9$). El objetivo del Experimento 2 fue evaluar el efecto de la expresión de celos y el horario de IATF en vacas que no mostraron celo y recibieron GnRH a las 48 h de retirado el dispositivo. En este experimento 250/298 (83,9%) de las vacas estaban despintadas (mostraron celo) a las 48 h de la remoción del dispositivo. Si bien las diferencias no fueron significativas ($P=0,2$), las vacas que se despintaron a las 48 h tuvieron una tendencia, a una mayor tasa de preñez que las vacas que no estaban despintadas en ese momento, independientemente del horario de inseminación. A su vez, las diferencias numéricas, no significativas, también favorecieron a las vacas que no mostraron celo a las 48 h de retirado el dispositivo que fueron inseminadas a las 56 h en comparación con las vacas que fueron inseminadas a las 48 h de retirado el dispositivo. El objetivo del Experimento 3 fue evaluar la tasa de ovulación en relación a la expresión de celos y al tratamiento con GnRH. Las vacas que mostraron celo a las 48 h ovularon antes ($P<0,05$) que las que no mostraron celo y las que no mostraron celo y recibieron GnRH ovularon antes ($P<0,05$) que las que no recibieron GnRH. El objetivo del Experimento 4 fue evaluar el efecto de la adición de GnRH y el horario de inseminación en las TP. En este experimento 372/488 (76,2%) de las vacas estaban despintadas (mostraron celo) a las 48 h de la remoción del dispositivo. La tasa de preñez de las vacas que mostraron celo fue mayor ($P<0,05$) que en las vacas que no mostraron celo, se inseminaron a las 56 h y no recibieron GnRH. Las vacas que no mostraron celo, se inseminaron a las 56 h y recibieron GnRH tuvieron una tasa de preñez intermedia que no fue diferente a los otros dos grupos. En conclusión, en protocolos con dispositivos

con P₄, EB y ECP como inductor de la ovulación, la adición de GnRH adelanta el horario de ovulación en las vacas y vaquillonas de carne que no muestran celo a las 48 h de la remoción del dispositivo, pero solo aumenta parcialmente la tasa de preñez.

Palabras claves: Vacas carne, IATF, ECP, GnRH, horario de inseminación.

ABSTRACT

The aim of this thesis was to evaluate the effect of the addition of GnRH at the time of fixed timed artificial insemination (FTIA) on the interval to ovulation and pregnancy rates (PR) of suckled beef cows and heifers treated with progesterone-releasing devices (P₄), estradiol benzoate (EB) and estradiol cypionate (ECP) to induce ovulation. The estrus synchronization protocol consisted of a 7-day treatment with the insertion of a P₄ device and the administration of EB on the day of insertion and prostaglandin, eCG and ECP at the time of device removal. In Experiment 1, GnRH was added systematically 48 h after P₄ device removal, at the same time that the FTAI was performed. PR did not differ between cows that received GnRH at the time of AI and cows that did not (P=0.9). In Experiment 2 estrus expression and time of AI was evaluated in cows that didn't show estrus and received GnRH 48 h after P₄ device removal. Overall, 250/298 (83.9%) of the cows showed estrus 48 h after P₄ device removal. Although not significant differences were found (P=0,2), cows that showed estrus 48 h after P₄ device removal had a numerical increased in pregnancy rate compare to cows that did not show estrus, independent of the time of the AI. Also there was numerical tendency of a higher PR in cows that did not show estrus but were inseminated 56 h after device removal than in cows that did not show estrus and were inseminated 48 h after P₄ device removal. In experiment 3 ovulation rate was evaluated in relation with estrus expression and GnRH treatment. Cows that showed estrus at 48 h of P₄ device removal ovulated earlier (P<0.05) than cows that did not show estrus. Cows that did not show estrus and received GnRH ovulated earlier (P<0.05) than cows that did not receive GnRH. In Experiment 4, the effect of GnRH addition and the time of AI was evaluated. Overall, 372/488 (76.2%) of the cows showed estrus 48 h after P₄ device removal. PR of cows that showed estrus was higher (P<0.05) than in cows that did not show estrus and were AI at 56 h, but didn't received GnRH. Cows that did not show estrus and were inseminated at 56 h and received GnRH had an intermediate PR than did not differ from the other groups. In conclusion, in protocols with P₄ devices, EB and ECP to induce ovulation, the administration of GnRH to those animals not showing estrus at 48 h after device removal, hastened the time of ovulation but only partially increased PR in beef cows and heifers fixed timed inseminated.

Key Words: Beef cows, FTAI, ECP, GnRH, Time of Insemination

TABLA DE CONTENIDO

Página	
Capítulo 1	
INTRODUCCIÓN	1
Protocolos de inseminación a tiempo fijo.....	2
Factores relacionados con los resultados en un programa de IATF.....	3
Gonadotropina Coriónica Equina.....	5
Tratamientos de IATF utilizando Benzoato de Estradiol o Cipionato de Estradiol como inductores de la ovulación.....	7
GnRH para la sincronización de la ovulación.....	10
HIPOTESIS	14
OBJETIVO GENERAL.....	14
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	14
Capítulo 2.	
MATERIALES Y METODOS.....	16
Animales e instalaciones.....	16
Materiales utilizados.....	17
Experimento 1.....	17
Experimento 2.....	19
Experimento 3.....	21
Experimento 4.....	23
Ultrasonografía.....	25

Análisis estadístico.....	25
Capítulo 3.	
RESULTADOS.....	26
Experimento 1.....	26
Experimento 2.....	29
Experimento 3.....	31
Experimento 4.....	32
Capítulo 4	
DISCUSIÓN.....	34
Capítulo 5	
CONCLUSIÓN.....	41
Capítulo 6.	
BIBLIOGRAFÍA.....	42

LISTA DE TABLAS

Tabla 3.1. Porcentaje de preñez por establecimiento.....	26
Tabla 3.2. Porcentaje de preñez por Raza.....	28
Tabla 3.3. Porcentaje de preñez por categoría.....	28
Tabla 3.4. Porcentaje de preñez por CC.....	29
Tabla 3.5. Porcentaje de preñez	29
Tabla 3.6. Efecto de la expresión de celos y el horario de IATF sobre la tasa de preñez.....	30
Tabla 3.7. Tasa de ovulación en vacas Hereford sincronizadas con dispositivos con progesterona y cipionato de estradiol en relación a la expresión de celos a las 48 h de la remoción del dispositivo (despintadas) y al tratamiento con GnRH en las que no mostraron celo a las 48 h (pintadas)	31
Tabla 3.8. Momento de la ovulación y diámetro del folículo dominante ovulatorio (medias \pm EE y rango) en vacas Hereford sincronizadas con dispositivos con progesterona y cipionato de estradiol.....	32
Tabla 3.9. Efecto de la expresión de celo (diagnosticada por la pérdida de pintura) a las 48 h de retirado el dispositivo con progesterona y el tratamiento con GnRH en las que no mostraron celo a las 48 h sobre la tasa de preñez.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Esquema de tratamientos del experimento 1: GRUPO GnRH., GRUPO CONTROL.....	18
Figura 2.2. Esquema de tratamientos del experimento 2: GRUPO CELO, NO CELO+GnRH – IATF(48 h), GRUPO NO CELO + GnRH – IATF (56 h)	20
Figura 2.3. Esquema de tratamientos del experimento 3: GRUPO CELO, GRUPO NO CELO + GnRH, GRUPO NO CELO + NO GnRH.....	22
Figura 2.4. Esquema de tratamientos del experimento 4: GRUPO CELO, GRUPO NO CELO + NO GnRH, GRUPO NO CELO + NO GnRH – IATF (56 h).....	24
Figura 3.1. Porcentaje de preñez por establecimiento.....	27
Figura 3.2. Tasa de preñez de vacas que recibieron o no GnRH en el momento de la IATF.....	27
Figura 3.3. Efecto de la expresión de celos y el horario de IATF sobre la tasa de preñez.....	30
Figura 3.4. Efecto de la presentación del celo (diagnosticada por la pérdida de pintura) a las 48 h de retirado el dispositivo con progesterona y el tratamiento con GnRH en las que no mostraron celo a las 48 h sobre la tasa de preñez.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

CC.....	Condición corporal
CL.....	Cuerpo Luteo
DIB.....	Dispositivo intravaginal
E ₂	Estradiol 17β
EB.....	Benzoato de estradiol
eCG.....	Gonadotrofina coriónica equina
ECP.....	Cipionato de estradiol
FD.....	Folículo dominante
FSH.....	Hormona Folículo estimulante
g.....	Gramos
h.....	Horas
IA.....	Inseminación
IATF.....	Inseminación a tiempo fijo
i.m.....	Intramuscular
INF-t.....	Interferón tau
LH.....	Hormona luteinizante
mg.....	Miligramos
MHz.....	Mega Hertz
mL.....	Mililitros
μg.....	Miligramos
P ₄	Progesterona

PGF.....Prostaglandina
TE.....Transferencia de embriones
UI.....Unidades internacionales
US.....Ultrasonografía

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

El ciclo estral en bovinos fue estudiado durante muchos años. El entendimiento de los mecanismos del ciclo estral y la dinámica folicular permitieron la posibilidad de manipular el ciclo estral para obtener mejores resultados en la aplicación de las diferentes biotecnologías reproductivas disponibles en la actualidad (Adams et al. 2008; Machaty et al 2012). La inseminación artificial (IA), la transferencia de embriones (TE) in vivo e in vitro han sido muy beneficiadas por estos avances y alcanzaron gran popularidad al poder establecer protocolos con resultados aceptables y repetibles (Bó y Mapletoft, 2014c; Baruselli et al., 2011b)

La IA ganó popularidad y comenzó a ser utilizada en forma masiva desde la implementación de la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF; Bó et al., 2001 Baruselli et al., 2011a), la cual no requiere la detección de celo, simplificando el trabajo y evitando las fallas en la detección de celo. Estos protocolos son fáciles para aplicar a gran escala y de esta manera mejorar la eficiencia de un rodeo y a la vez aportar progreso genético mejorando la rentabilidad (Bó et al., 2001).

En la actualidad existe una amplia gama de tratamientos de IATF disponibles para utilizarse tanto en ganado de carne como leche. (Bó et al., 2013). Los protocolos se agrupan de acuerdo a las hormonas utilizadas. Los protocolos denominados “OvSynch” (Pursley et al., 1995) y “Co-Synch” (Geary et al., 2001) utilizan análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PGF) para la sincronización de la ovulación. Los protocolos Co-Synch también han sido utilizados junto a la inserción de un dispositivo con progesterona resultando en mejores porcentajes de preñez en vaquillonas y vacas de carne con cría al pie (Lamb et al., 2001; Martinez et al., 2002).

Por otro lado, existen protocolos que emplean diferentes sales de estradiol (Estradiol 17β o Benzoato de Estradiol, EB) junto con dispositivos con progesterona para controlar las ondas foliculares y sincronizar la emergencia de una nueva onda folicular y la ovulación. (Bó et al, 1994; Caccia y Bó 1998; Moreno et al., 2001; Bó et al., 2002b). Posteriormente, estos protocolos se vieron simplificados ante la posibilidad de utilizar Cipionato de Estradiol (ECP) como inductor de la ovulación (Colazo et al., 2003). En general, tanto en protocolos con GnRH como con estradiol y progesterona, las tasas de preñez promedian un 50% en rodeos de vacas de carne (Bó et al., 2003; 2013; Cutaia et al., 2003)

Programas de inseminación artificial a tiempo fijo

Una de las alternativas más utilizadas en los rodeos de carne es la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF). Si bien existen varios protocolos, los que sincronizan la onda folicular y la ovulación permiten la inseminación de un grupo grande de animales e independizarse de la necesidad de detectar celo (Bó et al., 2001). Además, el desarrollo de estos protocolos permite la inseminación de una población de animales significativamente mayor y mejorar los resultados de los protocolos de IATF estimulando la ovulación de vacas en anestro y reduciendo la infertilidad de estas vacas por ciclos cortos después de la primera ovulación (Bó et al., 2009)

Los protocolos de IATF que utilizan estrógeno y progesterona son los más usados en rodeos de vacas para carne en la Argentina. (Bó et al 2009; 2013) El más utilizado consiste en administrar 2 mg de EB por vía intramuscular (i.m.) junto con la inserción de un dispositivo con progesterona (P_4) en lo que denominamos el Día 0. La función fundamental de la aplicación de estrógenos junto con la inserción del dispositivo con P_4 en el inicio de tratamiento es inhibir la hormona folículo estimulante (FSH) provocando la atresia de los folículos pequeños y la inhibición de 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 (Bo et al., 2002a, 2002b). En el Día 7 u 8 se extrae el dispositivo con P₄ y se aplica PGF para asegurar la luteólisis y se administran 400 UI de gonadotrofina coriónica equina (eCG). Cuando se utiliza EB, 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 en el Día 7 u 8 (Moreno et al., 2001). A las 24 h después del retiro del dispositivo con P₄ se administra 1 mg de EB i.m. para sincronizar la ovulación que se producirá a las 66 h de retirado el dispositivo (Cutaia et al., 2001). La IATF se realiza entre las 54 y 56 h de la remoción del dispositivo (Bo et al., 2002b; 2009)

Factores relacionados con los resultados en un programa de IATF

La aplicación de protocolos de IATF conlleva una cantidad de ventajas. La IA es la técnica más apropiada para acelerar el avance genético y el retorno económico en una explotación de cría. Al aplicar la IA se obtiene un aumento de la producción en kilos de carne por vientre inseminado, y nos permite el mejoramiento genético de un rodeo (Bó et al., 2001) Otro beneficio importante es la posibilidad de organizar las tareas de trabajo ya que se concentran gran cantidad de los partos. Sin embargo, el éxito de un programa de IATF varía ya que la técnica se ve afectada por varios factores.

La categoría de los animales a tratar en un protocolo de IATF es un factor a tener en cuenta. En análisis realizados de las bases del Instituto de Reproducción Animal Córdoba muestra que sobre 58.068 IATF, realizadas en 438 lotes diferentes, la tasa de preñez promedio fue de 49,5% (28.723/58.068), no observándose diferencia entre las vaquillonas y las vacas (49,8 % vs 49,2 %; P>0,8). No obstante, si bien no se encontró diferencias estadísticas en la distribución de las tasas de preñez entre las categorías (P>0,12) pudo observarse que la mayor cantidad de resultados en vaquillonas están por

debajo del 50 % siendo lo contrario para las vacas. En líneas generales las tasas de preñez son más fáciles de predecir en un lote de vacas con cría al pie, que en un lote de vaquillonas. Factores como adaptación, ciclicidad y desarrollo del tracto reproductivo, son claves en la selección de vaquillonas para inseminar (Bo et al 2002b; 2002c).

La condición corporal (CC) es otro factor importante a la hora de elegir un protocolo y predecir los resultados de una IATF. Si tomamos la escala de clasificación de CC de 1 a 5, el rango de preñez fue de 28,7 % (vacas con cría al pie con una CC 2) a 75 % (vaquillonas con una CC= 3) (Cutaia et al., 2003) Estos resultados y otros trabajos sugieren que los animales deben tener una condición mínima de 2,5 o idealmente 3 para obtener buenos resultados de preñez (Tríbulo et al., 2006; Bó et al 2002a)

Con respecto a la nutrición se debe estar atento para hacer un manejo que permita mantener la CC tan alta como sea posible antes del parto. Una baja CC en el parto tiene mayor efecto negativo que pérdidas de CC después del parto o después de la concepción. Si las vacas paren en una condición excelente o moderada (CC 3,5- 4), a menudo pueden preñarse lo suficientemente temprano como para soportar los cambios nutricionales de la lactancia (Tríbulo et al., 2006). De esta forma, el rodeo debe ser manejado para recuperar CC durante el periodo seco y antes del parto. Alternativamente, se puede ejercer un efecto positivo sobre la performance reproductiva si la vaca pare en una CC menor que el óptimo dándole de comer para que gane peso y condición después del parto. Sin embargo esto no es un manejo muy económico ya que una gran cantidad de nutrientes serán usados en la producción de leche, en detrimento de la reproducción. Por lo tanto es mejor hacer parir las vacas en buena CC y luego usar una estrategia de suplementación con proteínas para aumentar la incorporación y digestión de forrajes de baja y media calidad para mantener la CC. El uso de suplementos con alto contenido de grasas para estimular el desarrollo folicular también puede mejorar marcadamente la performance reproductiva del posparto, particularmente en vacas en condición moderada o flaca (Randel 1990)

La calidad del semen a utilizar también es un factor que influye en la tasa de fertilización y por ende la tasa de preñez (Saake et al., 1994). La buena calidad de los espermatozoides necesarios para una adecuada fertilización contempla motilidad progresiva, capacidad de motilidad hiperactiva e integridad de membranas (Dalton et al., 2013). Se recomienda realizar un análisis de calidad seminal previamente a la IATF. En el mismo se debe encontrar un mínimo de 25% de células motiles, con vigor 3 (0: sin movimiento y 5: movimiento rápido) inmediatamente después del descongelado y un 15% de células motiles a un vigor 2 luego de dos horas de incubación a 37°C. La morfología debe tener un mínimo de 70% de espermatozoides normales y con no más de un 15% a 20% de defectos de cabeza y del 25% de defectos de cola y acrosoma (Barth et al., 1995)

El estrés y el manejo de los animales es otro punto que no suele tenerse en consideración. Sin embargo hay diversos trabajos que reportan que se observaron menores tasas de preñez en animales poco dóciles o de peor temperamento (Cooke et al 2011)

Todos estos factores deberían tenerse en cuenta al momento de decidir aplicar un protocolo de IATF en un rodeo ya que la sumatoria de todos ellos afecta en cierta medida los resultados de un programa de IATF. Es importante tener en cuenta que no hay un solo factor que determine el éxito o no de un programa de IATF sino la sumatoria de ellos.

Gonadotropina Coriónica Equina

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 gestación, persistiendo hasta el día 120 (Allen 2001). Esta hormona expresa una acción biológica de FSH y LH en relación 1,4:1 (Steward et al., 1976) En la yegua, la eCG tiene primariamente un efecto luteotrófico y a medida que las copas endometriales crecen y aumentan la concentración de eCG,

induce la ovulación de los folículos de mayor tamaño generando CL accesorios y aumentando el nivel de P_4 . Además de su efecto luteotrófico, la eCG posee efecto foliculoestimulante cuando es usada en otras especies, utilizándose para inducir superovulación en bovinos, ovinos y conejos (Hafez et al., 2000; Bo y Mapletoft, 2014)

Numerosos estudios sugieren que la LH es utilizada como un estimulante gonadotrófico por parte del folículo dominante, por lo cual se ha utilizado la eCG en protocolos de IATF para mejorar el desarrollo del folículo preovulatorio (Cutaia et al., 2003). Tratamientos con eCG han mostrado un incremento en el porcentaje de preñez en vacas con cría con alta incidencia en anestro (Cutaia et al., 2003). Sin embargo, cuando se ha usado junto con P_4 y EB en protocolos de IATF en vacas en buena condición corporal, los porcentajes de preñez no se incrementaron con respecto a los grupos que no recibieron eCG. Esto se debería a que estas vacas no necesitarían del estímulo extra que ofrece la eCG para el crecimiento folicular por encontrarse en buena condición corporal (Bó et al., 2002b; Cutaia et al., 2003) y por lo tanto la adición de eCG solo tendría resultados positivos en vacas en anestro posparto. Cuando se utilizan vacas con pobre o moderada condición corporal, la aplicación de eCG aumentó los porcentajes de preñez, sobre todo en vacas sin estructuras anatómicas palpables o solo con folículos (sin un CL) al inicio del tratamiento (Cutaia et al., 2003). En otro estudio (Baruselli et al., 2004) se demostró que el tratamiento con eCG incrementa las concentraciones plasmáticas de progesterona y el porcentaje de preñez a IATF en vacas con cría en anestro posparto. Por lo tanto, el tratamiento con eCG puede ser una herramienta importante para aumentar la tasa de concepción a la IATF, disminuir el periodo intervalo-concepción y mejorar la eficiencia reproductiva (Baruselli et al., 2003)

La administración de eCG también resultó en mayores tasas de preñez en las vacas lecheras con score de condición corporal más bajo y en anestro (Souza et al., 2006; Bryan et al., 2008; 2013) obteniendo mayores niveles de P_4 en el ciclo estral subsiguiente a la sincronización e IATF (Souza et al 2009). En un experimento realizado en Nueva Zelanda con 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 P₄ y E₂, incrementaron significativamente la posibilidad de preñez durante las primeras 48 h y 7 días de la IATF, especialmente en vacas con más de 5 años (Bryan et al., 2013). En vacas lecheras en buena condición corporal el efecto del uso de 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). Otro trabajo reportó que el tratamiento con eCG al momento del retiro del dispositivo con P₄ en vacas en lactancia que fueron IATF aumentó el tamaño del CL, el porcentaje de preñez, y redujo las pérdidas embrionarias (Perez Wallace 2013). Resultados similares fueron reportados en vacas de leche de alta producción cuando fueron tratadas con eCG al retiro del dispositivo y que fueron inseminadas a celo detectado (Garcia-Ipsilerto et al., 2012).

Tratamientos de IATF utilizando Benzoato de Estradiol o Cipionato de Estradiol como inductores de la ovulación

Una de las posibilidades para sincronizar la ovulación en los programas de IATF es la utilización de EB en el momento de la remoción de los dispositivos de P₄. Algunos autores lo han utilizado en el momento de la remoción del dispositivo sin encontrar diferencias en la tasa de preñez alcanzada cuando se comparó con la aplicación de EB 24 h posteriores al retiro de los dispositivos de P₄ (Cesaroni et al., 2000) mientras que otros trabajos han encontrado diferencias a favor de una mayor tasa de preñez cuando se realiza una aplicación posterior (Cutaia et al., 2001; Sorroarain et al., 2005).

En trabajos realizados en vacas Angus cíclicas se demostró una mayor sincronía de las ovulaciones cuando se administró 1 mg de EB a las 24 h (rango de ovulaciones: 66 a 84 h) en lugar de administrarlo al retiro del dispositivo (rango de ovulaciones: 48 a 96 h) (Cutaia et al., 2001). En vacas *Bos indicus* se han reportado resultados similares en las cuales la aplicación de EB junto con la remoción de los dispositivos con P₄ disminuye la

tasa de preñez, por lo que adelantar la colocación de EB al momento del retiro del dispositivo no es aconsejable en programas de IATF (Bó et al., 2007).

Entre las alternativas para simplificar los tratamientos o hacer de la IATF una tecnología para trabajar a mayor escala, una posibilidad es inseminar más vacas por día. Hasta el momento era posible separando el rodeo en dos lotes para retirar los dispositivos en diferentes horas y luego inseminar cada lote por separado en la mañana o en la tarde (Menchaca et al., 2013). En rodeos grandes este manejo adicional tiene ciertas dificultades operativas y en general es preferible mantener el protocolo de inseminación tradicional durante la tarde. Sin embargo con el uso del ECP se ha ampliado la posibilidad de realizar la IATF durante todo el día sin necesidad de armar dos lotes al momento del retiro del dispositivo (Menchaca et al., 2013).

El ECP es una sal del estradiol que tiene una mayor vida media que el EB (Colazo et al., 2003) y tiene una baja solubilidad en agua y con baja liberación desde el momento de su aplicación. Pero lo más importante es que tarda más tiempo en hidrolizarse en sangre lo que hace que se prolonguen las concentraciones plasmáticas de estradiol-17 β durante 98-170 h después de la administración de dosis altas (5-10 mg; Burton et al. 1990). Comparado con la administración intramuscular de EB el ECP produce un pico de estradiol-17 β plasmático de menor magnitud con una mayor amplitud, la cual es más prolongada en el tiempo (Vynckier et al., 1990; Souza et al., 2006). Debido a este patrón fisiológico el ECP ha sido utilizado como inductor de ovulación aplicado en el momento de la remoción de los dispositivos con P₄ evitando de esta manera tener que volver a pasar los animales por la manga a las 24 h de retirado el dispositivo.

Se realizaron experimentos con el fin de evaluar el efecto del ECP sobre las tasas de preñez. Se encontró que el ECP aplicado en el momento de la remoción del dispositivo actuó de manera efectiva para sincronizar la ovulación y obtener tasas de concepción comparables a la aplicación de EB, sólo cuando se utilizaron 5 mg de estradiol 17 β y 100 mg de P₄ en el momento de la inserción del CIDR-B para sincronizar el desarrollo folicular (Colazo et al., 2003). 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 P₄, la tasa de preñez fue mayor en

las vaquillonas que recibieron ECP 24 h después de quitar el CIDR-B (65%) que al momento de quitar el CIDR (52%) o GnRH al momento de la IA (51%) (Colazo et al., 2004). Asimismo, en trabajos realizados por Cutaia et al., (2005), las tasas de preñez fueron mayores cuando se utilizaron 2 mg de EB en el momento de la inserción del dispositivo comparado con 1 mg de ECP al inicio del tratamiento de IATF.

Otros trabajos demostraron que la administración de ECP en el momento del retiro de los dispositivos con P₄ resultaron en similares tasas de preñez que la administración de EB a las 24 h en vacas y vaquillonas tratadas con dispositivos con P₄ y 2 mg de EB en el momento de la inserción del dispositivo para sincronizar el desarrollo folicular (Bó et al., 2005). A su vez, Baruselli et al., (2007) propusieron utilizar una dosis de 0,5 mg en vaquillonas y 1 mg de ECP en vacas con cría al pie que son IATF a las 48 o 54 h desde la remoción de los dispositivos de P₄ en vacas *Bos indicus*.

Se realizaron trabajos en vacas y vaquillonas *Bos taurus* para evaluar la tasa de preñez luego de realizar la IATF en la mañana (48 h) o en la tarde (54 h), es decir durante todo el día, lo que permite sincronizar unas 500 vacas para cada día de inseminación. (Menchaca et al., 2013). En un primer trabajo se utilizaron 1394 vaquillonas Angus de 14 meses en dos réplicas. Se comparó la IATF realizada a las 48 h vs a las 54 h, con la diferencia que en la réplica 1 la dosis de PGF fue administrada al retirar el dispositivo y en la réplica 2 se dividió en dos medias dosis administradas al colocar y retirar el dispositivo. Cuando la PGF se administró al retirar el dispositivo la tasa de preñez fue superior con la IATF a las 54 h en aquellas vaquillonas que tenían un cuerpo luteo (CL) al inicio del tratamiento (48 h=23,2% vs 54 h=38,7%, P=0,05), mientras que en las que no tenían CL no hubo diferencias significativas (48 h=44,5% vs 54 h= 39,2 %, P=0,28). Sin embargo, en la réplica 2 cuando se agregó PGF al colocar el dispositivo, la tasa de preñez fue superior a las 48 h tanto en las que tenían un CL (48 h=51,0% vs 54 h=40,6%, P=0,05) como en las sin CL (48 h=44,5% vs 54 h=39,2%. P=0,01) (Menchaca et al., 2013). Estos resultados concuerdan con los de trabajos previos realizados en vaquillonas cruce cebú donde luego de varios experimentos se concluyó que cuando las vaquillonas son expuestas a niveles demasiado altos de progesterona la tasa de preñez puede verse disminuida (Cutaia et al 2001).

En otro experimento se evaluó el momento de la IATF en 1953 vaquillonas *Bos taurus* de 2 años. Se comparó la tasa de preñez entre las vaquillonas inseminadas a las 48 h y a las 54 h. La PGF se administró al inicio y al final del tratamiento. Se utilizaron dispositivos de 1 gramo y 0,5 gramos. No hubo diferencia entre ambos momentos de inseminación, siendo posible inseminar las vaquillonas tanto a las 48 h como a las 54 h sin afectar la tasa de preñez (dispositivo 1 g 48 h=61,6% vs 54 h= 60,3%, y dispositivos 0,5 g 48 h= 57,8% vs 54 h= 57,5%,). En todos los casos la preñez fue superior al 50% lo que representa un buen resultado en vaquillonas con un alto porcentaje de anestro (Menchaca et al., 2013)

Se evaluó también la tasa de preñez con la inseminación AM y PM en vacas con cría así como en vacas secas sin ternero. Se utilizaron 2737 vacas *Bos taurus* paridas con 60 a 90 días posparto y 942 vacas secas sin ternero. En las vacas con cría se realizó destete precoz al colocar el dispositivo. Las vacas fueron asignadas a dos grupos experimentales para recibir IATF a las 48 h y 54 h luego de retirado el dispositivo. En las vacas con 60 a 90 días posparto la tasa de preñez no se vio afectada por el momento de inseminación (vacas con cría: 48 h=53,5% vs 54 h=55,1 y vacas secas 48 h=57,9 % vs 54 h= 62,3%) independientemente del dispositivo utilizado o la presencia del CL al iniciar el tratamiento. Se concluyó que es posible realizar la IATF tanto a las 48 h como a las 54 h sin afectar la tasa de preñez (Menchaca et al., 2013)

GnRH para la sincronización de la ovulación

La GnRH es un decapeptido producido por las neuronas del hipotálamo y es secretada a los capilares del sistema portal hipotalámico hipofisario. En la pituitaria, la GnRH se une a receptores específicos y mediante reacciones en cascada estimula la FSH y LH provocando la ovulación del folículo dominante y la formación de un CL (Thatcher et al., 1989).

Vacas de tambo tratadas con GnRH al momento de la detección de celo tuvieron un pico de LH de mayor amplitud que las que tuvieron un pico espontáneo. 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), aunque Sartori et al (2004) solo consiguieron la ovulación del folículo dominante cuando este era mayor a los 10 mm de diámetro en vacas lecheras. 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_4 en el momento de su aplicación (Kastelic y Mapletoft, 1998). En un metanálisis que involucra a 40 experimentos (n=19019) en 27 publicaciones, Morgan y Lean (1993) demostraron que el uso de GnRH al momento de la IA puede incrementar significativamente la probabilidad de preñez en 12,5% ($P < 0.05$). Sin embargo, en trabajos previos, el tratamiento con GnRH al momento de la IA luego de la detección de celos aumento (Schels et al. 1978) o no tuvo efecto en la concepción a primer servicio (Lee y Maurice, 1983). Según una revisión de Thatcher et al. (1989) la adición sistemática de GnRH solo mejora la tasa de preñez en situaciones donde la detección de celos no es la ideal.

La GnRH también se ha utilizado para sincronizar la ovulación en programas de IATF. En algunos trabajos se ha utilizado en el momento de la inseminación como inductor de la ovulación, con resultados similares al tratamiento tradicional en vacas de carne (Bó et al., 2000). De esta manera se evitaba un encierro ya que las vacas podían quedar encerradas y recibían la GnRH por la mañana, a las 48 h de retirado el dispositivo y se inseminaban esa tarde permitiendo una tasa de preñez mayor al EB administrado a las 24 h de la remoción del dispositivo en vaquillonas de 15 meses (Menchaca et al., 2013) o similar al EB en vacas con cría al pie y en vaquillonas cuando la GnRH se administró directamente en el momento de la IATF (Bó et al., 2014; Martínez et al., 2002). La ovulación del folículo dominante después de la administración de GnRH al final de un protocolo de IATF 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 (Martínez et al., 2002)

López del Cerro et al. (2011) utilizaron GnRH en el momento de la IATF en vacas Braford tratadas con un protocolo con EB y dispositivos con progesterona y ECP como inductor de la ovulación que no presentaban celo a las 48 h de retirado el dispositivo y mejoraron la tasa de preñez del protocolo. Sin embargo otros autores no encontraron lo mismo (Sa Filho et al., 2011). Zabala et al. (2013 a, b y c) sugirieron que si se difiere la IATF para las 56 h de la remoción del dispositivo en las hembras que no dan celo y reciben GnRH a las 48 h, se puede tener tasas de preñez similares a las hembras que dan celo, indicando que una proporción de hembras sufrían un atraso en la ovulación. Tschopp (2016), trabajando con vacas lecheras en lactancia, reportó que hubo una tendencia ($P < 0,1$) a una menor varianza en la hora de ovulación en las vacas que recibieron GnRH en comparación a las que no. Cuando 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, cuando se inseminaron las vacas en celo a las 48 h en ese momento y cuando las que no estaban en celo recibieron GnRH y fueron inseminadas a las 60 h. Esto demostró que la división del horario y la adición de GnRH en vacas que no muestran celo e 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.

También 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. El hallazgo más importante de este experimento fue que las vacas que mostraron celo a las 48 h y fueron inseminadas en ese momento tuvieron una mayor tasa de preñez que las que mostraron a las 48 h pero fueron inseminadas a las 60 h. A su vez las vacas que no mostraron celo a las 48 h tuvieron una mayor tasa de preñez cuando se inseminaron a las 60 h que cuando se inseminaron a las 48 h. Además, dentro de las vacas que no entraron en celo a las 48 h, el grupo que utilizó GnRH en ese momento tuvo una mayor tasa de preñez que las del grupo donde no se utilizó GnRH (56,9% vs 40,3%) (Tschopp, 2016). 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 tendrán una ovulación muy retrasada. (Tschopp, 2016).

La P_4 es importante para la supervivencia de embrión/feto (Lonergan et al 2016). Las vacas que poseen concentraciones elevadas de progesterona al comienzo del ciclo tienen embriones más desarrollados (Lonergan et al 2016). Estos embriones tienen más capacidad de producir interferón tau (INF-t) que es responsable de inhibir la liberación de PGF, 16 días luego del servicio. Vacas que han tenido retrasos en incrementar los niveles de progesterona tuvieron menos capacidad de producir INF-t y no fueron capaces de inhibir la liberación de PGF en el Día 16 después de la IA (Mann et al., 2001)

Una forma de aumentar los niveles de P_4 es incrementar el crecimiento del CL (Binelli et al., 2001). El crecimiento del CL se ha relacionado con la duración y la amplitud del pico preovulatorio de LH (Ambrose et al., 1998). Una dosis de GnRH al momento de la IA puede potencialmente aumentar el tamaño del CL y en consecuencia los niveles circulantes de P_4 (Fields, 2008). Sin embargo, se encontraron resultados variables respecto a la concentración de P_4 circulante en el ciclo siguiente a la IA cuando se administró GnRH. En algunos se incrementó (Mee et al., 1993) y en otros decreció (Lucy et al., 1986).

HIPOTESIS

La aplicación de una dosis de GnRH y la modificación del horario de inseminación artificial a vacas y vaquillonas de carne tratadas con estradiol y dispositivos con progesterona aumenta la tasa de preñez a la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF).

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la aplicación de una dosis de GnRH en el momento de la IATF sobre el momento de la ovulación y la tasa de preñez de vacas con cría al pie y vaquillonas sincronizadas con protocolos con estradiol, dispositivos con progesterona y cipionato de estradiol como inductor de la ovulación.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar si la adición de GnRH en el momento de la IATF realizada a las 48 h de la remoción del dispositivo aumenta la tasa de preñez en vacas y vaquillonas sincronizadas con protocolos con benzoato de estradiol, progesterona y con cipionato de estradiol como inductor de la ovulación (Experimento 1).
- Evaluar si la adición de GnRH a las 48 h de la remoción del dispositivo y la modificación del horario de inseminación (48 vs 56 h) aumenta la tasa de preñez en vacas con cría al pie que no mostraron celo sincronizadas con protocolos con

benzoato de estradiol, progesterona y cipionato de estradiol como inductor de la ovulación (Experimento 2)

- Evaluar si la adicción de GnRH en vacas que no muestran celo a las 48 h de retirado el dispositivo con progesterona altera el momento de la ovulación (Experimento 3).
- Evaluar si la adición de GnRH a vacas que no muestran celo a las 48 h de retirado el dispositivo aumenta la tasa de preñez en vacas con cría al pie sincronizadas con protocolos con estradiol, progesterona y con cipionato de estradiol como inductor de la ovulación (Experimento 4).

CAPITULO 2

MATERIALES Y METODOS

Animales e instalaciones

Para la realización de esta tesis se utilizaron vacas y vaquillonas de raza *Bos taurus* y cruzas (Aberdeen Angus, Hereford, Brangus, Braford) provenientes de tres establecimientos diferentes de Cabaña y cría comercial. El primer establecimiento “El Mauleón” ubicado en la provincia de Buenos Aires dedicado principalmente a la cría de animales Aberdeen Angus. Los animales se encontraban sobre pasturas naturales e implantadas y diferidas y la época de servicio se extendió de Octubre a Enero. El segundo establecimiento corresponde a la “Cabaña Minístaló”, ubicada en la localidad de Rio Ceballos, Córdoba. El establecimiento se dedica a la siembra de maíz y soja y la cría de animales Braford y Brangus de pedigrí para la venta tanto de hembras como machos. Los animales se encontraban sobre pasturas naturales e implantadas suplementados estratégicamente con silo de maíz durante el invierno y la época de servicio fué de Noviembre a Febrero. Estos experimentos se llevaron a cabo en la temporada de IATF 2014-2015. El tercer establecimiento fue “Estancia La Tapita” que se dedica a la cría de animales Hereford para la venta de terneros. El establecimiento se encuentra situado en la zona rural de Las Albahacas, Rio Cuarto, Córdoba. Los animales se encontraban sobre pasturas naturales y diferidas. La época de servicio se extendió desde Diciembre a Febrero. Los experimentos se llevaron a cabo durante las temporadas 2015-2016 y 2016-2017.

Las vacas utilizadas debían tener una condición corporal mínima de 2 (escala del 1 (flaca) al 5 (obesa)) y tener un CL o por lo menos un folículo > 8 mm de diámetro detectados por ultrasonografía al momento de iniciar los tratamientos. Los animales fueron

manejados en instalaciones adecuadas (corrales, mangas y cepos) que poseían los tres establecimientos siguiendo normas de bienestar animal para disminuir el efecto del estrés sobre las tasas de preñez.

Materiales Utilizados

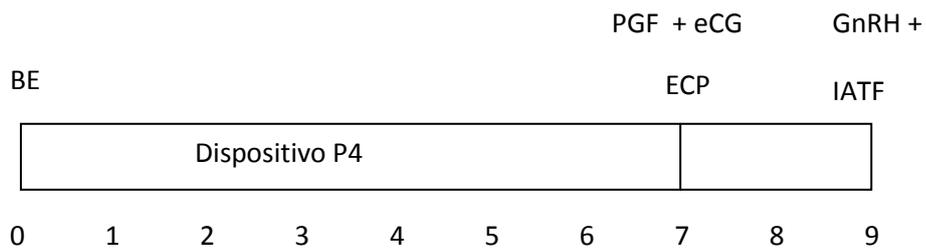
Para los diferentes experimentos se utilizaron dispositivos intravaginales 0,5 g de P₄ (DIB®, Zoetis, Argentina); EB (1mg/mL, Gonadiol®, Zoetis, Argentina); Cloprostenol (PGF 250 µg/mL, Ciclase®, Zoetis, Argentina); ECP (0,5mg/mL, Cipiosyn®, Zoetis, Argentina); Gonadotrofina Coriónica Equina (200 UI/mL, Novormon 5000®, Zoetis, Argentina); Gonadorelina Acetato (GnRH, 50 µg/mL, Gonasyn gdr®, Zoetis, Argentina) y pintura para la base de la cola (Celotest®, Biotay, Argentina). Todos los tratamientos se administraron vía intramuscular (i.m.) profunda excepto los dispositivos intravaginales y la pintura.

EXPERIMENTO 1

Para este experimento se utilizaron 818 vacas. Estas fueron: 207 vaquillonas y vacas con cría al pie y más de 60 días posparto Hereford de estancia La Tapita, 274 vacas con cría al pie y más de 60 días posparto Aberdeen Angus de estancia El Mauleón, 79 vaquillonas y vacas con cría al pie y más de 60 días posparto y vacas secas (categoría de vacas sometidas a protocolos de superoovulación) Braford y 258 vaquillonas y vacas con cría al pie y más de 60 días posparto Brangus de cabaña Ministaló. Todas las vacas tuvieron el mismo tratamiento hasta el momento de la IATF. Las vacas recibieron 2 mg de EB al momento de la colocación del DIB; 7 días después se retiraron los dispositivos y se administró 500 µg de cloprostenol sódico, 400 UI de eCG y 1 mg de ECP. A las 48 h de retirado el DIB las vacas fueron IATF y se colocó aleatoriamente a la mitad del rodeo 100

μg de Gonadorelina Acetato mientras que la otra mitad permaneció como tratamiento control.

GRUPO GnRH



GRUPO CONTROL

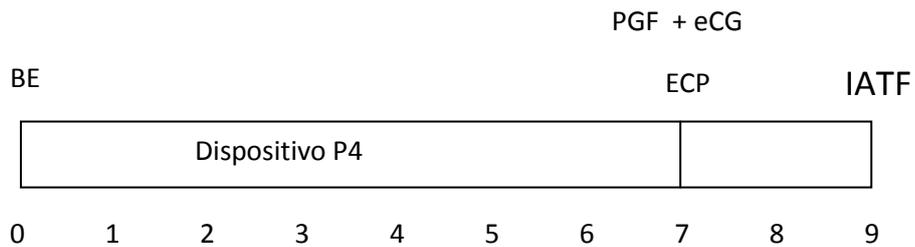
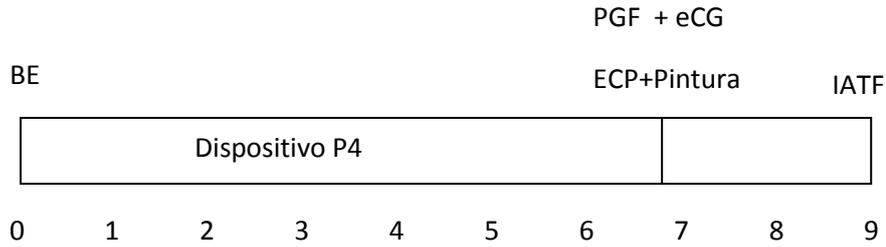


Figura 2.1. Esquema de tratamientos del experimento 1: GRUPO GnRH: recibieron 2 mg de EB al momento de la colocación de un dispositivo intravaginal con 0,5 g de progesterona (Día 0); 7 días después se retiraron los dispositivos con progesterona, se administró 500 μg de cloprostenol (PGF), 400 UI de eCG, 1 mg de Cipionato de estradiol (ECP) y 100 μg de Gonadorelina Acetato (GnRH). El Día 9 se realizó la IATF a las 48 h de retirado el dispositivo. GRUPO CONTROL: recibieron 2 mg de EB al momento de la colocación de un dispositivo intravaginal con 0,5 g de progesterona (Día 0); 7 días después se retiraron los dispositivos con progesterona, se administró 500 μg de cloprostenol (PGF), 400 UI de eCG, 1 mg de ECP. El Día 9 se realizó la inseminación a tiempo fijo (IATF) a las 48 h de retirado el dispositivo..

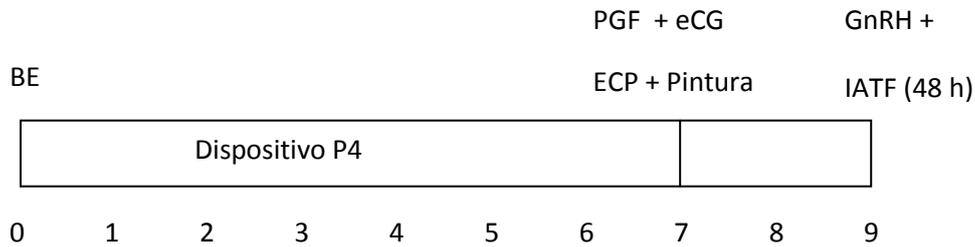
EXPERIMENTO 2

Para este experimento se utilizaron 298 vacas Hereford cíclicas con cría al pie y más de 60 días posparto de estancia La Tapita con una condición corporal mayor a 2 (Escala 1 a 5). Todas las vacas recibieron el mismo tratamiento hasta el momento de la IATF. Las vacas recibieron 2 mg de EB al momento de la colocación del DIB; 7 días después se retiraron los DIB, se administró PGF, 400 UI de eCG, 1 mg de ECP y pintura en la base de la cola para determinar la presencia de celo. A las 48 h de retirado el dispositivo, las vacas se dividieron en las que mostraron celo y las que no mediante la lectura de la pintura de la base de la cola (>50% en celo y <50% no celo). Las vacas que presentaron celo fueron inseminadas a las 48 h mientras que las que no presentaron celo, es decir que no se despintaron, recibieron 100 µg de GnRH. Las vacas inyectadas con GnRH se dividieron a su vez al azar en dos grupos. Un grupo se inseminó a las 48 h de retirado el dispositivo mientras que el otro se inseminó a las 56 h de retirado el dispositivo.

GRUPO CELO



GRUPO NO CELO + GnRH – IATF (48 h)



GRUPO NO CELO + GnRH – IATF (56 h)

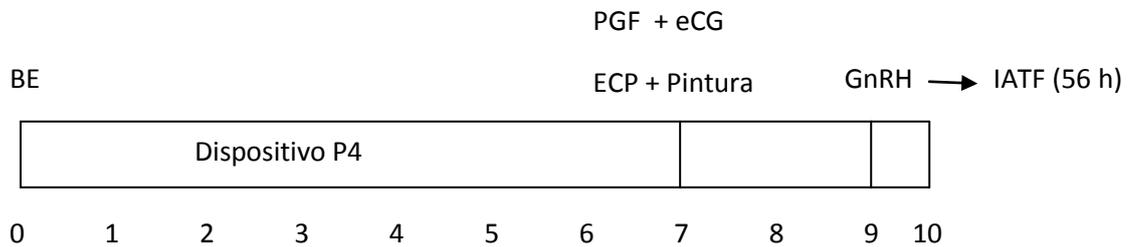
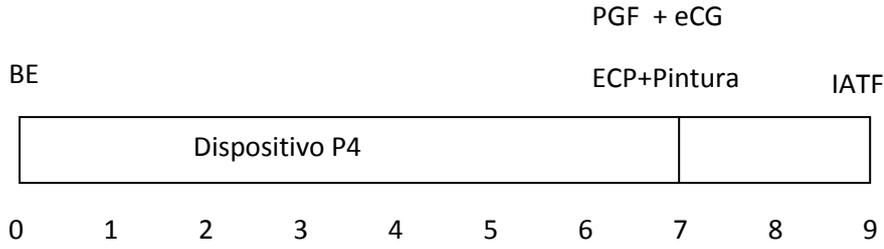


Figura 2.2 Esquema de tratamientos del experimento 2: GRUPO CELO. recibieron 2 mg de EB al momento de la colocación de un dispositivo intravaginal con 0,5 g de progesterona (Día 0); 7 días después se retiraron los Dispositivos con progesterona, se administró 500 µg de cloprostenol (PGF), 400 UI de eCG, 1 mg de ECP y se pintó la base de la cola con pintura. El día 9 se realizó la lectura de la pintura y las que presentaban más del 50 % de pérdida de la pintura se IATF a las 48 h de retirado el dispositivo. GRUPO NO CELO+GnRH – IATF (48 h). recibieron 2 mg de EB al momento de la colocación de un dispositivo intravaginal con 0,5 g de progesterona (Día 0); 7 días después se retiraron los Dispositivos con progesterona, se administró 500 µg de cloprostenol (PGF), 400 UI de eCG, 1 mg de ECP y se pintó la base de la cola con pintura. El día 9 se realizó la lectura de la pintura y las que presentaban menos del 50% de pérdida de la pintura se les colocó 100 µg de Gonadorelina acetato (GnRH) y se IATF a las 48 h de retirado el dispositivo. GRUPO NO CELO + GnRH – IATF (56 h) recibieron 2 mg de EB al momento de la colocación de un dispositivo intravaginal con 0,5 g de progesterona (Día 0); 7 días después se retiraron los Dispositivos con progesterona, se administró 500 µg de cloprostenol (PGF), 400 UI de eCG) 1 mg de ECP y se pintó la base de la cola con pintura. El día 9 se realizó la lectura de la pintura y las que presentaban menos del 50% de pérdida de la pintura se les colocó 100 µg de Gonadorelina acetato (GnRH) y se inseminaron a tiempo fijo (IATF) a las 56 h de retirado el dispositivo.

EXPERIMENTO 3

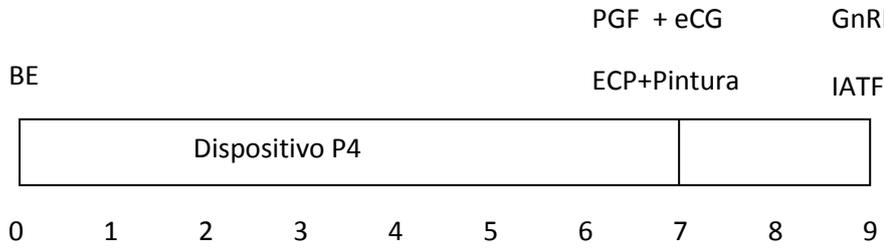
Este experimento se llevó a cabo en estancia La Tapita. Se utilizaron 20 Vacas Hereford cíclicas (con un CL) y con una condición corporal mayor a 2 (Escala 1 a 5). Las vacas recibieron, como en los experimentos anteriores, 2 mg de EB al momento de la colocación de un DIB con 0,5 g de progesterona; 7 días después se retiraron los DIB, se administró PGF, 400 UI de eCG, 1 mg de ECP y pintura en la base de la cola para determinar celo. Las vacas que manifestaron celo a las 48 h de retirados los DIB fueron examinadas por ultrasonografía cada 12 h hasta el momento de la ovulación. Aquellas que no manifestaron celo fueron distribuidas al azar para recibir 100 µg de GnRH o permanecer como controles no tratados, y fueron examinadas por ultrasonografía cada 12 h hasta el momento de la ovulación. Todas las vacas fueron inseminadas a las 48 h de retirado el dispositivo.

GRUPO CELO



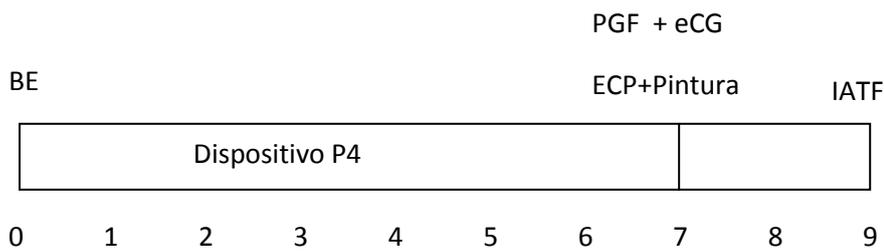
US	US	US	US	US
48h	60h	72h	84h	96h

GRUPO NO CELO+ GnRH



US	US	US	US	US
48h	60h	72h	84h	96h

GRUPO NO CELO – NO GnRH



US	US	US	US	US
48h	60h	72h	84h	96h

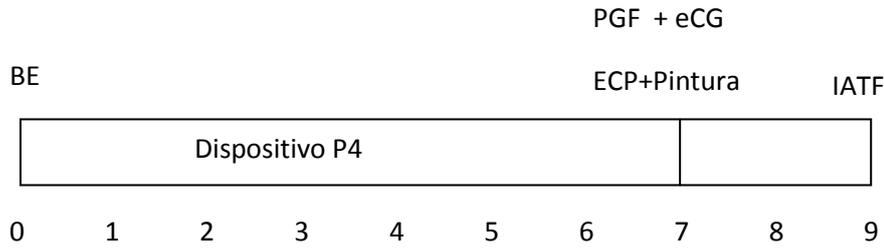
Figura 2.3. Esquema de tratamientos del experimento 3: GRUPO CELO. recibieron 2 mg de EB al momento de la colocación de un dispositivo intravaginal con 0,5 g de progesterona (Día 0); 7 días después se retiraron los dispositivos con progesterona, se administró 500 µg de cloprostenol (PGF), 400 UI de eCG, 1 mg de ECP y se pintó la base de la cola

con pintura. El Día 9 se realizó la lectura de la pintura y las que presentaban más del 50% de pérdida de la pintura se inseminaron a las 48 h de retirado el dispositivo. GRUPO NO CELO+GnRH. recibieron el mismo tratamiento que las vacas del grupo anterior, salvo que el Día 9 a las que presentaban menos del 50% de pérdida de la pintura se les colocó 100 µg de GnRH y se inseminaron a las 48 h de retirado el dispositivo. GRUPO NO CELO + NO GnRH recibieron el mismo tratamiento que el grupo anterior excepto que no recibieron GnRH a las 48 h. Se realizó ultrasonografía ovárica cada 12 h hasta la ovulación o hasta las 96 h de la remoción del dispositivo (48, 60, 72, 84, 96).

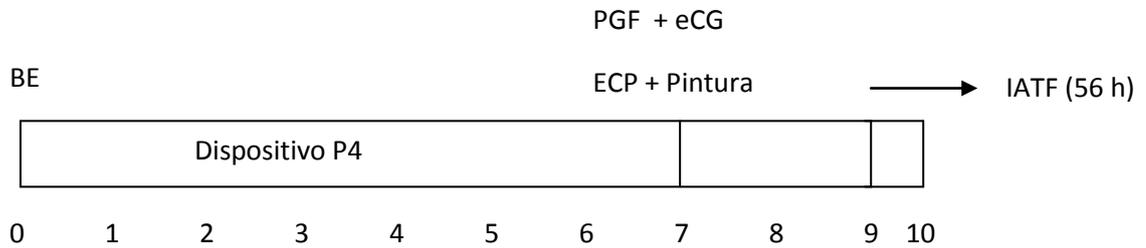
EXPERIMENTO 4

Para este experimento se utilizaron 488 vacas con cría al pie y más de 60 días posparto Hereford con CL o por lo menos un folículo >8 mm de diámetro con cría al pie de Estancia “La Tapita” con una condición corporal mayor a 2 (Escala 1 a 5). Todas las vacas recibieron el mismo tratamiento hasta el momento de la IATF. Las vacas recibieron 2 mg de EB al momento de la colocación de un DIB con 0,5 g de P4; 7 días después se retiraron los DIB, se administró PGF, 400 UI de eCG, 1 mg de ECP y pintura en la base de la cola para determinar la presencia de celo. A las 48 h de retirado el dispositivo, las vacas se dividieron en las que mostraron celo y las que no mediante la lectura de la pintura de la base de la cola. Las vacas que presentaron celo fueron inseminadas a las 48 h mientras que las que no presentaron celo, es decir no se despintaron, la mitad recibió 100 µg de GnRH y la otra mitad permaneció como grupo control. Las vacas que no mostraron celo a las 48 h fueron inseminadas a las 56 h de retirado el dispositivo con P₄.

GRUPO CELO



GRUPO NO CELO +NO GnRH – IATF (56 h)



GRUPO NO CELO + GnRH – IATF (56 h)

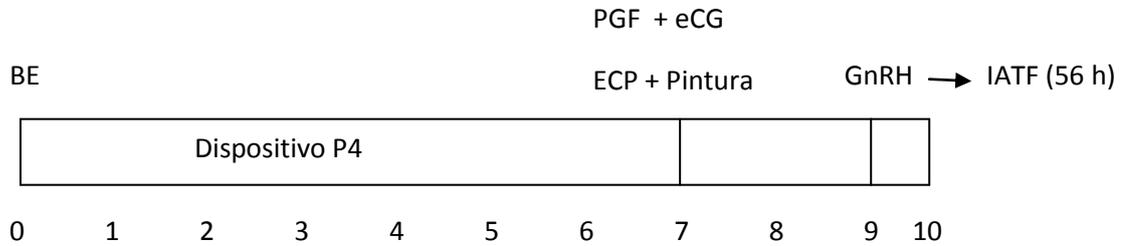


Figura 2.4 GRUPO CELO. recibieron 2 mg de EB al momento de la colocación de un dispositivo intravaginal con 0,5 g de progesterona (Día 0); 7 días después se retiraron los dispositivos con progesterona, se administró 500 µg de cloprostenol (PGF), 400 UI de eCG, 1 mg de ECP y se pintó la base de la cola con pintura. El Día 9 se realizó la lectura de la pintura y las que presentaban más del 50% de pérdida de la pintura se inseminaron a las 48 h de retirado el dispositivo. GRUPO NO CELO+ GnRH: recibieron el mismo tratamiento que las vacas del grupo anterior, salvo que el Día 9 en que se comprobó que presentaban menos del 50% de pérdida de la pintura se les colocó 100 µg de GnRH y se inseminaron a las 56 h de retirado el dispositivo. GRUPO NO CELO + NO GnRH recibieron el mismo tratamiento que el grupo anterior excepto que no recibieron GnRH a las 48 h.

Ultrasonografía

Para la visualización de las estructuras ováricas y uterinas se utilizó un equipo WELL-3100V (Well D, China) con un traductor lineal de 5 MHz y en modo B. Las vacas fueron inmovilizadas en mangas y cepos en donde se les efectuó la ultrasonografía transrectal para registrar todas las estructuras ováricas y diagnóstico de preñez.

Las vacas de todos los experimentos fueron examinadas por ultrasonografía al día del inicio del tratamiento (Día 0) para determinar las estructuras del ovario. En el experimento 3, las vacas fueron examinadas cada 12 h desde las 24 h de la remoción del DIB hasta la ovulación. La ovulación fue definida como el momento en que el FD dejó de observarse. Las estructuras fueron medidas con el software del equipo en el diámetro mayor del folículo dominante (FD).

En los experimentos 1, 2 y 4 los diagnósticos de gestación por ultrasonografía se realizaron a los 30 días luego de la IATF.

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 varianzas (ANOVA) para evaluar el efecto de los tratamientos sobre las variables tamaño del folículo dominante a 48 h de retirado el dispositivo con P₄ y previo a 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 la ovulación. 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 (establecimiento, raza, categoría, CC) 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 (alfa=0,05) bajo modelo logístico extendido. La tendencia se fijó en P<0,10.

CAPITULO 3

RESULTADOS

EXPERIMENTO 1

El porcentaje de preñez no se vio afectado por los diferentes establecimientos ($P=0,26$). Si bien hubo diferencias porcentuales no se encontraron diferencias significativas como se muestra en la Tabla 3.1. La raza tampoco fue un factor que aportara diferencias significativas en el experimento ($P=0,17$; Tabla 3.2.), Además, la tasa de preñez no fue diferente entre las vacas que recibieron o no GnRH en el momento de la IATF ($P=0,9$) (Figura 3.2).

Tabla 3.1. Porcentaje de preñez por establecimiento.

Grupo	GnRH	Control	Total
El Mauleón	92/173	96/164	188/337 (55,8%)
Ministalo	83/139	71/135	154/274 (56,2%)
La Tapita	68/106	62/101	130/207 (62,8%)
Total	243/418	229/400	472/818 (57,7%)

Los porcentajes no difieren significativamente ($P=0,26$)

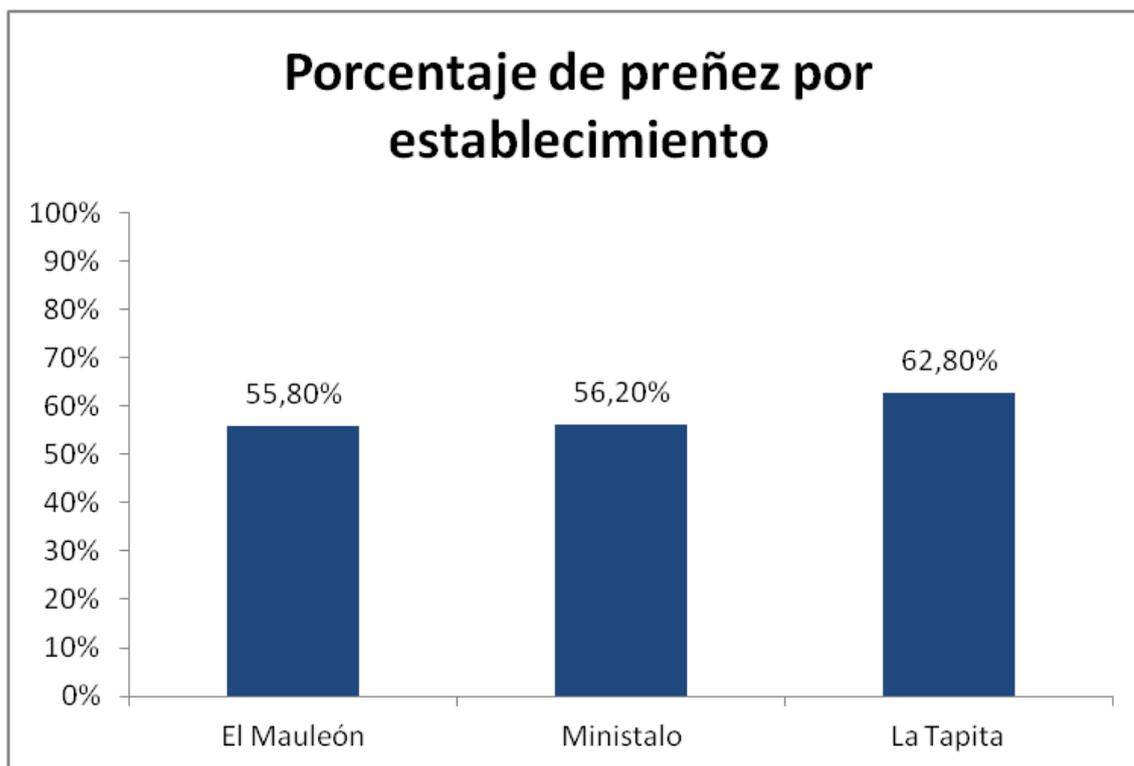


Figura 3.1. Porcentaje de preñez por establecimiento

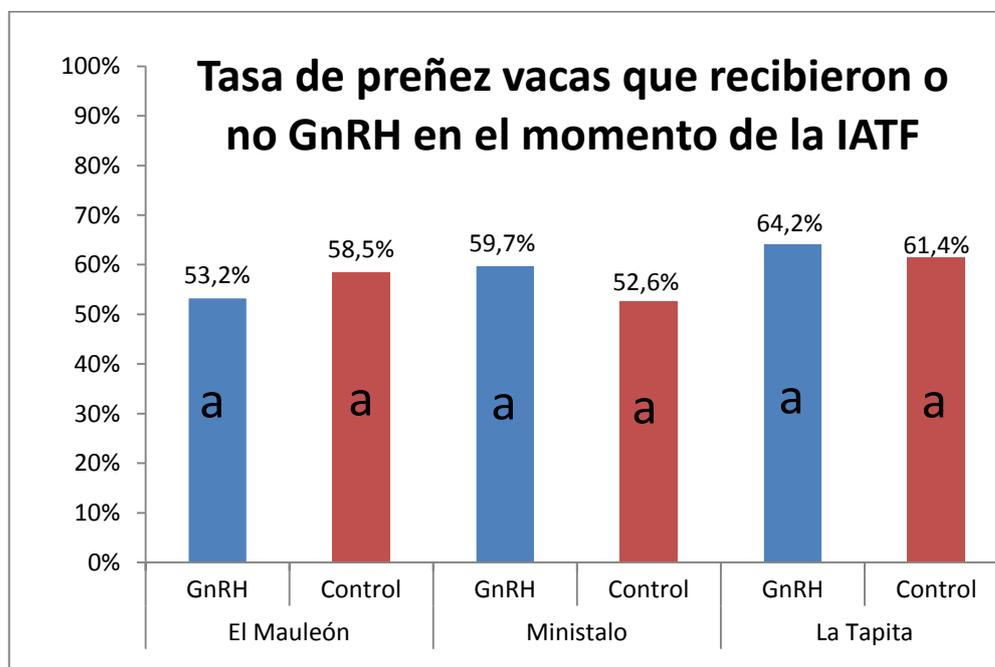


Figura 3.2. Tasa de preñez de vacas que recibieron o no GnRH en el momento de la IATF (P=0,9).

Tabla 3.2. Porcentaje de preñez por Raza

Raza	Preñadas	Porcentaje
Hereford	130/207	62,8%
Aberdeen Angus	154/274	56,2%
Braford	50/79	63,2%
Brangus	138/258	53,5%

Los porcentajes no difieren significativamente (P=0,17)

Se encontraron diferencias significativas entre las categorías. Las vacas secas se preñaron menos (P<0,05) que el resto de las categorías (tabla 3.3.).

Tabla 3.3. Porcentaje de preñez por categoría.

Categoría	Preñadas	Porcentaje
Vaca con cría	435/744	58,5% ^a
Vaquillona	31/50	62,0% ^a
Vaca Seca	6/24	25,0% ^b

^{ab} Porcentajes con superíndice distintos difieren significativamente (P<0,05)

Tabla 3.4. Porcentaje de preñez por CC

CC	Preñadas	Porcentaje
2	141/218	64,7% ^a
2,5	283/490	57,8% ^a
3	38/71	53,5% ^a
3,5	7/17	41,2% ^{ab}
4	3/11	27,3% ^b

Los porcentajes tienden a diferir (P=0,06)

EXPERIMENTO 2

La tasa de preñez en este experimento fue de 60,4 % (180/298; Tabla 3.5.).

Tabla 3.5. Porcentaje de preñez.

n	Preñadas	Porcentaje
298	180	60,4%

En este experimento 83,9% (250/298) de las vacas estaban despintadas (mostraron celo) a las 48 h de la remoción del dispositivo. Si bien las diferencias no fueron significativas (P=0,2), las vacas que se despintaron a las 48 h tuvieron una tendencia a una mayor tasa de preñez que las vacas que no estaban despintadas en ese momento, independientemente del horario de inseminación (Tabla 3.6.). A su vez, las diferencias numéricas, no significativas, también favorecieron a las vacas que no mostraron celo a las 48 h de retirado el dispositivo que fueron inseminadas a las 56 h en comparación con las vacas que fueron inseminadas a las 48 h de retirado el dispositivo.

Tabla 3.6. Efecto de la expresión de celos y el horario de IATF sobre la tasa de preñez.

Tratamiento	n	Preñadas	Porcentaje
En Celo (despintadas) e IATF a las 48 h	250	156	62,4%
No Celo (pintadas) e IATF a las 48 h	22	10	45,4%
No Celo (pintadas) e IATF a las 56 h	26	14	53,8%

Los porcentajes no difieren significativamente (P=0,2)

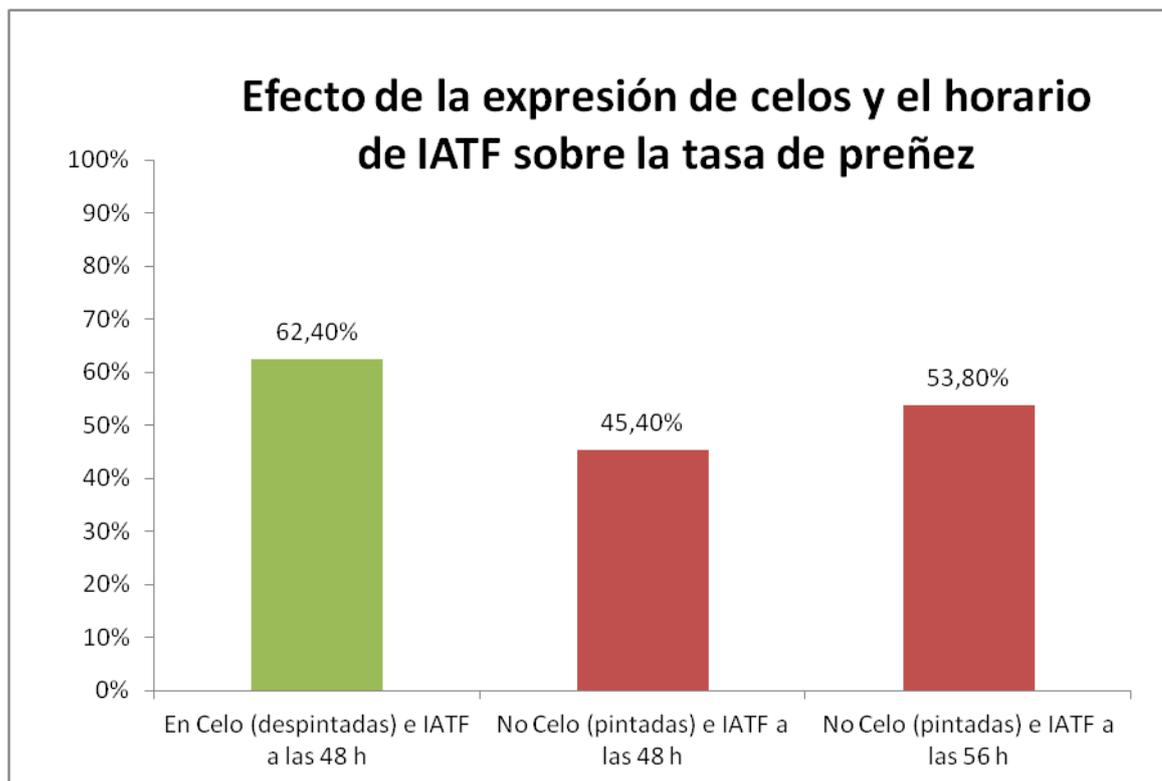


Figura 3.3. Efecto de la expresión de celos y el horario de IATF sobre la tasa de preñez.

EXPERIMENTO 3

Se examinaron por ultrasonografía 20 vacas Hereford. Del total de vacas tratadas, 6 vacas entraron en celo a las 48 h y todas ovularon. De las 14 que no mostraron celo a las 48 h, a la mitad se le administró una dosis de GnRH y la otra mitad permaneció como grupo control. En ambos grupos 6 de las 7 vacas ovularon. (Tabla 3.7.)

Tabla 3.7. Tasa de ovulación en vacas Hereford sincronizadas con dispositivos con progesterona y cipionato de estradiol en relación a la expresión de celos a las 48 h de la remoción del dispositivo (despintadas) y al tratamiento con GnRH en las que no mostraron celo a las 48 h (pintadas)

Grupo	n	Ovuladas	Porcentaje
En celo (despintadas) a las 48 h	6	6/6	100%
No celo (pintadas) a las 48 h+GnRH	7	6/7	85,7%
No celo (pintadas) a las 48 h y no GnRH	7	6/7	85,7%

Los porcentajes no difieren ($P < 0,8$).

A pesar de que el diámetro del folículo dominante no difirió significativamente ($P < 0,05$) entre los grupos, las vacas que mostraron celo a las 48 h ovularon antes ($P < 0,05$) que las que no mostraron celo y las que no mostraron celo y recibieron GnRH ovularon antes ($P < 0,05$) que las que no recibieron GnRH (Tabla 3.8) Finalmente, a pesar que las vacas que mostraron celo se preñaron numéricamente más que las que no mostraron celo, las diferencias no fueron significativas, tal vez debido al número pequeño de animales en este experimento para detectar diferencias en tasas de preñez.

Tabla 3.8. Momento de la ovulación y diámetro del folículo dominante ovulatorio (medias \pm EE y rango) en vacas Hereford sincronizadas con dispositivos con progesterona y cipionato de estradiol.

Grupo	n	Hora de Ovulación (Rango)	Diámetro del Folículo Ovulatorio	Preñadas
En celo (despintadas) a las 48 h	6	68,0 \pm 2.5 ^a (60-72)	15.83 \pm 0.31 (15-17)	4/6 (66,7%)
No celo (pintadas) a las 48 h + GnRH	6	78,0 \pm 2.6 ^b (72-84)	16.33 \pm 0.33 (15-17)	3/6 (50%)
No celo (pintadas) a las 48 h y no GnRH	6	86.0 \pm 2.0 ^c (84-96)	16.17 \pm 0.31 (15-17)	3/6 (50%)

^{abc} Las medias con letras distintas difieren ($P < 0,05$).

EXPERIMENTO 4

La tasa de preñez en este experimento fue de 54,5% (266/488) En este experimento 76,2% (372/488) de las vacas estaban despintadas (mostraron celo) a las 48 h de la remoción del dispositivo. La tasa de preñez de las vacas que mostraron celo fue mayor ($P < 0,05$) que en las vacas que no mostraron celo y no recibieron GnRH mientras que las vacas que no mostraron celo y recibieron GnRH tuvieron una tasa de preñez intermedia que no fue diferente a los otros dos grupos (Tabla 3.9.)

Tabla 3.9. Efecto de la expresión de celo (diagnosticada por la pérdida de pintura) a las 48 h de retirado el dispositivo con progesterona y el tratamiento con GnRH en las que no mostraron celo a las 48 h sobre la tasa de preñez.

Tratamiento	n	Preñadas	Porcentaje
En Celo (despintadas) a las 48 h	372	214	57,5% ^a
No Celo (pintadas) a las 48 h +GnRH	60	28	46,6% ^{ab}
No Celo (pintadas) a las 48h y no GnRH	56	24	42,8% ^b

^{ab} Los porcentajes con letras distintas difieren (P<0,05).

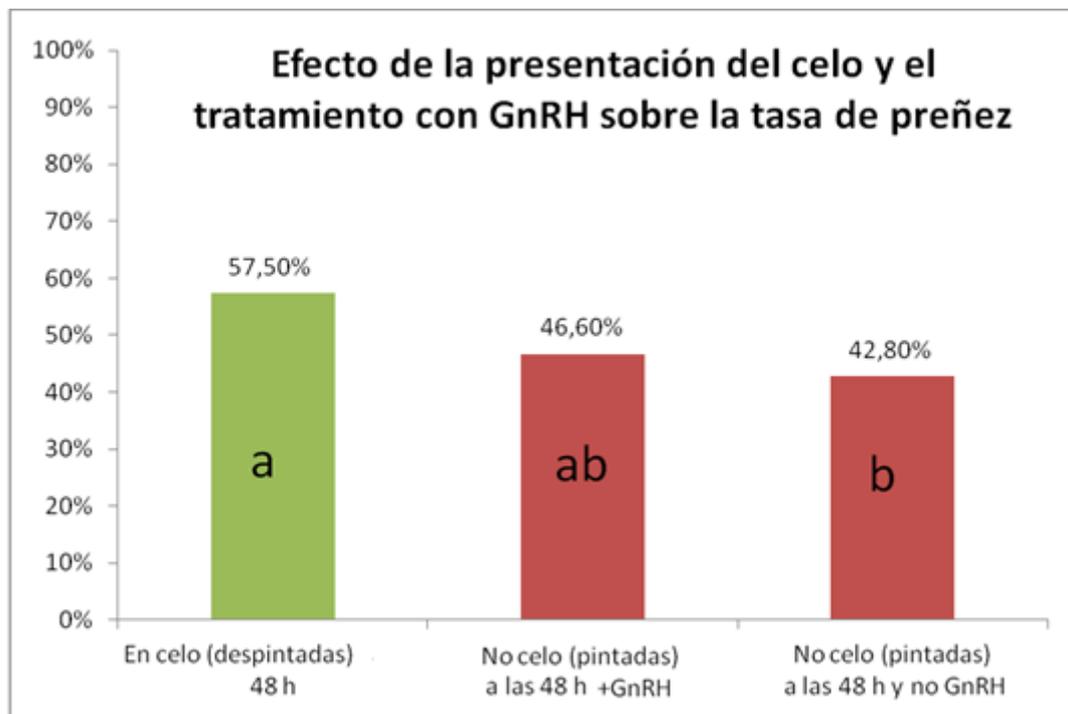


Figura 3.4. Efecto de la presentación del celo (diagnosticada por la pérdida de pintura) a las 48 h de retirado el dispositivo con progesterona y el tratamiento con GnRH en las que no mostraron celo a las 48 h sobre la tasa de preñez

DISCUSION

La presente tesis de maestría ha permitido incrementar los conocimientos con respecto al uso de GnRH en protocolos con estrógenos y progesterona y con ECP como inductor de la ovulación. Esta tesis no soporta la hipótesis planteada, ya que a pesar que la adición de GnRH adelantó el momento de ovulación en las vacas que no mostraron celo a las 48 h de la remoción del dispositivo con P₄, esto no se vio reflejado en un aumento significativo de la tasa de preñez respecto de las vacas que no mostraron celo y no recibieron GnRH.

En el experimento 1, en el cual se adicionó una dosis de GnRH en forma sistemática a la mitad de las vacas a las 48 h del retiro del dispositivo, el objetivo fue mejorar el índice de preñez. Con la aplicación de ECP al retiro del dispositivo la concentraciones plasmáticas de estradiol comienzan a aumentar a las 12 h (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 17 β producido por la metabolización plasmática del ECP y el estradiol 17 β 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 si se inseminan más tarde. Por otro lado, el aumento de estradiol-17 β en sangre que produce el ECP es de menor magnitud que el producido cuando se utiliza EB como inductor de la ovulación ($9,4 \pm 2,2$ pg/mL vs $20,5 \pm 1,9$ pg/mL) pero de mayor duración ($50,5 \pm 3,6$ h vs $19,6 \pm 1,2$ h) lo que explica la mayor dispersión de celos y ovulaciones (Sales et al., 2012; Uslenghi et al., 2014). El ECP como inductor de ovulación tienen una ventana más amplia de acción que cuando se utiliza EB, de aproximadamente 48 h (entre 42 y 90 h luego del retiro del dispositivo) (Sales et al., 2012; Uslenghi et al., 2014). Otros trabajos reportaron que es

posible utilizar ECP como inductor de la ovulación y comenzar con la IATF a las 48 h de retirado el dispositivo en vacas y vaquillonas Nelore (Baruselli et al., 2007) y Hereford y Angus (Menchaca et al., 2013), sin embargo se comprobó que un grupo de vacas retrasa su momento de ovulación. Con esta información surgió la idea de aplicar una dosis de GnRH a las 48 h de retirado el dispositivo a las vacas que son IATF en ese momento para inducir un pico de LH antes en el caso de las vacas que todavía no han tenido un pico de LH y adelantar la ovulación en este subgrupo de vacas con la expectativa de lograr más probabilidad de preñarse. Sin embargo, en este trabajo la GnRH no mejoró significativamente las tasas de preñez, tal vez debido a que el uso de GnRH en las vacas que ya estaban en celo, probablemente no haya alterado el momento de la ovulación de esas vacas. Como la mayoría de las vacas se encontraban con una buena condición corporal, es posible que el porcentaje de vacas que no se sincronizaron haya sido baja. Además, las vacas que no entraron en celo fueron IATF a las 48 h a diferencia de los otros trabajos de esta tesis en que la IATF de las vacas que no mostraron celo fue diferida entre 6 y 8 h después de la administración de GnRH.

En este experimento se trabajó en distintos campos y con diferentes razas: Aberdeen Angus (El Mauleón), Braford y Brangus (Ministalo) y Hereford (La Tapita). Se considera que un 50,0% de concepción en promedio en los programas de IATF es un resultado por demás aceptable teniendo en cuenta que esto se logra en un día de inseminación y sin la necesidad de detectar celo (Bó et al., 2016). En los campos estudiados, los porcentajes de preñez fueron entre 55% y 65%. En cuanto a las razas, los porcentajes de preñez también fueron entre 55% y 65%. La similitud en los resultados logrados en los diferentes establecimientos y razas no interfirió en los resultados obtenidos por el tratamiento aplicado.

En este Experimento, se encontraron diferencias en la tasa de preñez entre vacas secas y el resto de las categorías incluidas en el ensayo. Como se aclaró en la metodología, las vacas secas corresponden a un grupo de vacas de uno de los establecimientos bajo estudio que estuvieron alojadas en el Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC)

para ser superovuladas y luego de algunas colectas retornaron al establecimiento y a rodeo general para ser inseminadas. Por esta razón se cree que se hayan encontrado una menor tasa de preñez en este grupo con respecto a los otros.

Con respecto a la condición corporal, se ha reportado en muchos trabajos que influye sobre la tasa de preñez de los animales al inicio del tratamiento de sincronización (Bó et al., 2005) y es por esto que se eligieron animales con condición corporal mayor a 2 (escala 1 a 5). No se encontraron diferencias entre las condiciones corporales 2, 2.5 y 3, pero hubo una tasa de preñez menor en vacas con condición 4. Estas condiciones corporales correspondían a las mismas vacas del grupo vacas secas que como ya mencionamos, habían sido utilizadas para programas de colección de embriones in vitro e in vivo. Sin embargo estos datos concuerdan con los reportados en la bibliografía que tanto las vacas con muy alta o muy baja condición corporal tienen una menor tasa de preñez a las IATF (Bó et al., 2005).

En el Experimento 2, se evaluó el efecto de la adicción de GnRH y la inseminación en diferentes horarios (48 h vs 56 h) en vacas que no mostraron celo luego de 48 h del retiro del dispositivo con el objetivo de sincronizar las ovulaciones y optimizar el momento de la inseminación en estos animales. Si bien en este experimento, no se encontraron diferencias significativas debido al bajo número de animales involucrados, se observó que las vacas que mostraron celo al momento de la IATF (48 h de retirado el dispositivo) tuvieron una tasa de preñez numérica más alta que las que no lo hicieron. De las vacas que mostraron celo a las 48 h de retirado el dispositivo se preñó el 62,4% mientras que de las vacas que no mostraron celo se preñó el 50%. 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 presentan (Vera Cedeño, 2017). El diámetro folicular al momento de la IATF y la ocurrencia de estro al final del protocolo es uno de los factores que pueden influenciar las respuestas de los protocolos de sincronización (Sa Filho et al., 2011) porque

está relacionado con la producción de estradiol-17 β , el tamaño del CL de la fase luteal subsiguiente y la producción de progesterona (Thatcher et al., 2001; Souza et al., 2009). Estos resultados son similares a los reportados por Tschopp (2016) en vacas lecheras. En este trabajo, las vacas que manifestaron celo, tuvieron una tasa de preñez más alta (58,3%) que las que no lo hicieron (42,1%). Similar a lo anterior, Lima et al. (2015) en un trabajo realizado en vacas de leche reportaron que las hembras que nunca manifestaron signos de celo en un programa de IATF tuvieron una tasa de preñez menor ($P < 0,01$; 24,8%) que las que si demostraron celo (44,8%). Además las hembras que no manifestaron celo tuvieron una mayor pérdida de gestación que las que si manifestaron celo ($P < 0,01$; 42,2 vs 20,4%). Estos resultados también son similares a los reportados por Thomas et al. (2014) en un trabajo realizado en vaquillonas de carne, donde el porcentaje de preñez de los animales en celo a la IA fue más alto (52,0%) que aquellos sin celo en ese momento (34,0%) y a los reportados por Sá Filho et al. (2011) donde se evaluó la importancia de la manifestación del celo en la respuesta ovárica y la tasa de preñez en vacas Nelore. En este estudio las vacas que mostraron celo obtuvieron una tasa de preñez mayor (58,5%) que las vacas que no mostraron celo (32,1%). Por último, en una tesis reciente realizada en el IRAC (Vera Cedeño, 2017) las vacas y vaquillonas de carne que mostraron celo también tuvieron una mayor tasa de preñez que las que no mostraron celo. Los animales que estaban despintados (en celo) a las 48 h (666/868) se preñaron más (56,0%) en comparación con los que no mostraron celo en ese momento (202/868- 48%) ($P = 0,04$). A su vez, estudios recientemente realizados en vacas lecheras (Tschopp y Bó, 2015) han demostrado un atraso en el horario de ovulación (60 a 96 h) de las vacas que no manifiestan celo a las 48 h desde la remoción del dispositivo, lo que indicaría que es conveniente realizar una división en el horario de la IATF cuando se utiliza ECP como inductor de ovulación.

Por este motivo se decidió adicionar una dosis de GnRH a las vacas que no mostraron celo a las 48 h de retirado el dispositivo con el objetivo de adelantar y sincronizar las ovulaciones. La administración de GnRH produce un pico de liberación de LH dos horas después de su administración i.m., en una magnitud que depende del estadio del ciclo estral y los niveles endógenos de P₄, desencadenando la ovulación en vaquillonas de carne con un folículo dominante mayor a 9 mm de diámetro (Martínez et al., 1999). En

trabajos realizados por Sá Filho et al. (2011), donde evaluaron la eficiencia de la utilización de GnRH en el momento de la IATF para aumentar la tasa de preñez de aquellas vacas que no manifestaron celo después de un protocolo de sincronización, los resultados demostraron que no hubo un efecto positivo del uso de la GnRH en las vacas que no mostraron celo. Sin embargo, la GnRH en presencia de un folículo dominante de más de 9 mm induce la ovulación entre las 24 a 32 h (Pursley et al., 1998). Por esta razón, si bien no fue significativa, se observó una tendencia a una mayor tasa de preñez en estas vacas inseminación a 56 h del retiro del dispositivo respecto de las inseminadas a las 48 h, por esto se retrasó el horario de la IATF a las 56 h del retiro en el experimento 4. En trabajos realizados por Zabala et al. (2013a, 2013b y 2013c) la tasa de preñez de las vacas que no mostraron celo y que recibieron GnRH a las 48 h de la remoción del dispositivo pero atrasando la IATF 6 a 8 h después de la GnRH, en lugar de hacerla en ese momento, fueron similares a los de las vacas que mostraron celo a las 48 h y que fueron IATF en ese momento.

El objetivo del Experimento 3 fue estudiar el momento de ovulación de los diferentes grupos para llegar a un mejor entendimiento de lo que sucedía en cada uno de ellos. En este caso se corroboró que la presencia o no de celo y el tratamiento con GnRH modifica el momento de la ovulación en las vacas. En las vacas que mostraron celo la ovulación ocurrió a las $68 \pm 2,5$ h mientras que las vacas del grupo que no mostraron celo pero que recibió GnRH a las 48 h de retirado el dispositivo ovulo a las $78 \pm 2,6$ h de retirado el dispositivo con progesterona. Es decir más tarde que las que mostraron celo pero antes de las que no mostraron celo y no recibieron GnRH que lo ovularon a las 86.0 ± 2.0 h.

De acuerdo a estos resultados se podría hipotetizar que sería correcto inseminar a las vacas que muestran celo a las 48 h de retirado el dispositivo en ese mismo momento y diferir la IATF a las vacas que no muestran celo en ese momento ya que van a ovular más tarde, como se realizó en vacas lecheras (Tschopp y Bó, 2015). Estos trabajos demostraron 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 (Tschopp, 2016). Esto confirma los resultados obtenidos en este experimento. Las vacas que muestran celo ovulan antes y las vacas que no muestran celo retrasan el momento de ovulación. Las vacas que no muestran celo pero reciben GnRH tienen una ovulación intermedia entre los dos grupos.

Con respecto al diámetro del folículo ovulatorio, no se encontró diferencia entre los grupos. El grupo que manifestó celo a las 48 h del retiro del dispositivo tuvo un diámetro del folículo ovulatorio de $15,8 \pm 0,3$ mm, el grupo no celo + GnRH presentó un diámetro de $16,3 \pm 0,3$ mm y el grupo no celo- no GnRH tuvo un promedio de $16,2 \pm 0,3$ mm. Todos los grupos tuvieron un rango del diámetro del folículo ovulatorio de 15 a 17 milímetros. Diferente a lo reportado por Tschopp (2016) quien encontró que las vacas que mostraron celo a las 48 h de retirado el dispositivo ovularon antes y con folículos de mayor diámetro que las que no presentaron celo a las 48 h.

El objetivo del Experimento 4 fue investigar si la adición de GnRH a las 48 h de retirado el dispositivo podía mejorar la tasa de preñez en las vacas que no mostraban celo a las 48 h y se inseminaban a las 56 h y confirmar los datos de los trabajos realizados en nuestro laboratorio en vacas lecheras (Tschopp, 2016) y vacas y vaquillonas de carne (Vera Cedeño, 2017). También Souza et al. (2009) sostuvieron que la división del horario de inseminación mejora 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 h, mientras que cuando se las insemina a las 56 h se estaría logrando una buena concepción en aquellas vacas que sufren un atraso en la ovulación.

En este caso las vacas que mostraron celo a las 48 h tuvieron una mayor preñez que las que no mostraron celo y no recibieron GnRH, pero las que recibieron GnRH tuvieron una tasa de preñez intermedia, que no difirió de los otros dos grupos. A pesar que los resultados no son concluyentes a favor del uso de GnRH, tal vez por el número de

animales utilizados en este experimento, los datos concuerdan con los obtenidos por Vera Cedeño (2017) y Tschopp (2016) que encontraron un tasa significativamente mayor de preñez en las vacas que no muestran celo a las 48 h y que recibieron GnRH, con respecto a las que no recibieron GnRH. Otra posibilidad por la falta de diferencias significativas en las vacas que recibieron o no GnRH puede ser debido a la posible viabilidad espermática en el tracto reproductivo de la hembra. 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 visto en los resultados del Experimento 3, el horario de ovulación de las vacas que no muestran celo y no reciben GnRH ronda las $86 \pm 2,0$ h. Es decir que si retrasamos la hora de inseminación a las 56 h de retirado el dispositivo en las vacas que no muestran celo y la viabilidad espermática puede llegar a las 30 h, estaríamos cubriendo casi la mayoría de las ovulaciones con 86 h desde el retiro del dispositivo. Existen variaciones entre toros en cuanto a la persistencia de espermatozoides viables en el tracto reproductivo femenino, y estas diferencias de persistencias en el oviducto no son posibles de determinar por los test in vitro convencionales de evaluación de la calidad seminal (Dalton, 2013). Por último. si bien las tasas de preñez no fueron diferentes entre las que mostraron celo y las que no mostraron celo y recibieron GnRH en este experimento, si sumamos los resultados de las vacas que estuvieron en celo en los Experimentos 2 y 4 y las comparamos con las tasas de preñez de las vacas que no mostraron celo pero que recibieron GnRH y fueron IATF a las 56 h, las diferencias tienden a ser significativas ($P=0,06$) a favor de las vacas que mostraron celo (370/622; 59,4% vs 42/86; 48,8%). A su vez las diferencias son significativas si consideramos también las vacas que no mostraron celo en el Experimento 2 y que recibieron GnRH pero fueron inseminadas a las 48 h (370/622; 59,4% vs 52/118; 44,1%), confirmando los datos obtenidos en las vacas y vaquillonas carne por Vera Cedeño (2017).

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

- La adición de GnRH en forma sistemática en protocolos que utilizan dispositivos con progesterona y cipionato de estradiol como inductor de la ovulación no aumentó significativamente la tasa de preñez en vacas y vaquillonas de carne inseminadas a tiempo fijo.
- Un 20% de las vacas no mostró celo a las 48 h de retirado el dispositivo en protocolos con dispositivos con progesterona y cipionato de estradiol como inductor de la ovulación.
- La vacas que muestran celo a las 48 h de retirado el dispositivo tienen una mayor tasa de preñez que las que no muestran celo.
- La adición de una dosis de GnRH a las vacas que no muestran celo a las 48 h de retirado el dispositivo con progesterona no modifica el diámetro del folículo preovulatorio pero adelanta el momento de la ovulación en aproximadamente 10 h.
- La adición de GnRH a las vacas que no muestran celo a las 48 h y el atraso del horario solo mejoraron las tasas de preñez numéricamente, sin encontrarse diferencias significativas.

CAPITULO 6

BIBLIOGRAFIA

- Adams G.P., Jaiswal R., Singh J., Malhi P. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 69: 72-80.
- Allen, W.R. 2001. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Reprod and fert* 121, 513-527.
- Ambrose, J. D., M. F. Pires, F. Moreira, T. Diaz, M. Binelli, and W. Thatcher. 1998. Influence of deslorelin (GnRH-agonist) implant on plasma progesterone, first wave dominant follicle and pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology* 50:1157–1170.
- Baruselli P.S., Marquez 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.
- Baruselli P.S. Reis E.L., Marques M.O., Nasser L.F. Bó G.A. 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anoestrus beef cattle in tropical climates. *Animal Reproduction Science* 82-83: 479-486.
- Baruselli P.S., Sales J.N.S., Crepaldi G.A., Marques M.O. Penteado L., Bó G.A. 2007. Aplicación integrada de programas de control de ovulación en manejo reproductivo en vacas de carne criadas en condiciones extensivas. *Resúmenes VII Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba* 55-79.
- Baruselli P.S., Madureira E.H., Marques M.O. 2011. Programas de IA a tiempo fijo em *Bos indicus*. *Resúmenes Cuarto Simposio Internacional de Reproducción Animal, Huerta Grande, Córdoba*; 95-116.
- Barth A.D. 1995. Evaluation of frozen semen by the veterinary practitioner. *Proc. Of bovine short Course. Society for Theriogenology*, 105-110.
- Binelli M, Thatcher WW, Mattos R, Baruselli PS. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology* 2001;56: 1451–63.
- Bó G.A., Adams G.P., Pierson R.A., Tribulo H.E., Caccia M., Mapletoft R.J. 1994. Follicular wave dynamics after estradiol 17 β treatment of heifers with or without a progesterone 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., Costamagna A., Brogliatti G.M., 2000. Fixed-timed artificial insemination in CIDR-B treated cows induced to ovulate with estradiol benzoate or GnRH. *Proc. 14 International Congress on Animal Reproduction (ICAR)*, 14-14, páginas 2-45. Stockholm, Sweden.

- Bó G.A., Cutaia L., Brogliatti G.M., Medina M., Tríbulo R., Tríbulo H. 2001. Programas de inseminación artificial a tiempo fijo en ganado bovino utilizando progestágenos y estradiol. Resúmenes Cuarto Simposio Internacional de Reproducción Animal, Huerta Grande, Córdoba; 117-136.
- Bo G.A., Baruselli P.S., Moreno D., Cutaia L., Caccia M., Tribulo R., Tribulo H., Mapletoft R.J. 2002a. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 57, 53-72.
- 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., Tribulo R., 2002c. Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos para carne: Algunas experiencias realizadas en Argentina. Primera parte. *Taurus*, 14, 10-21.
- Bó G.A., Baruselli P.S., Martínez M.F. 2003. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 78: 307-326.
- Bó, G.; Cutaia, L.; Chesta, P.; Balla, E.; Pincinato, E.; Peres, L.; Maraña, D.; Aviles, M.; Menchaca, A.; Venerada, G.; Baruselli, P. 2005. Implementación de Programas de Inseminación Artificial en Rodeos de Cría de Argentina. Resúmenes VI Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina. Tomo I, pp. 97-128.
- Bó, G.A., Cutaia, L., Peres, L.C., Pincinato, D., Maraña, D., Baruselli, P.S. 2007. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. *Reproduction in Domestic Ruminants VI*, Juengel JL, Murray JF and Smith MF (editors), Nottingham University Press; 223-236.
- 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. *Animal Reproduction* 10:137-142.
- Bó G.A., Mapletoft R.J. 2014. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology* 81:Pages 38-48.
- Bó G.A. de la Mata J.J., Baruselli P.S., Menchaca A. 2016. Alternative programs for synchronizing and re-synchronizing ovulation in beef cattle. 18th International Congress of Animal Reproduction, Tours, France. *Theriogenology* (en prensa) DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.053.
- Bryan M.A., Emslies F.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., Bo G.A., 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. I., Gasser C.L., Grum D.E., D.A. y M.I., 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.
- Burton M.J., Dziuk H.E., Fahning M.L., Zemjanis R. 1990. Effects of oestra-diol cypionate on spontaneous and oxytocin-stimulated postpartum myometrial activity in the cow. *Brit. Vet. J.* 146, 309-315.
- Caccia M. and Bó G.A. 1998. Follicle wave emergence following treatment of CIDR-B implanted beef cows with estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology* 49: 341.
- Cesaroni, G., Butler, H., Mc Dermott, E., Cano, A. 2000. Preñez de vaquillonas inseminadas a tiempo fijo después de un tratamiento con CIDR asociado con GnRH o con benzoato de estradiol aplicado 0 o 24 hs postratamiento. *Taurus*; 6:20-25.
- 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.
- Cooke R.F., Bohnert D.W., Meneghetti M., Losi T. C., Vasconcelos J.L.M. 2011. Effects of temperament on pregnancy rates to fixed timed AI in *Bos indicus* beef cows. *Livest. Sci. LIVSCI-D-11-414R1*.
- Cutaia L., Moreno D., Villata L., Bo G.A. 2001. Synchrony of ovulation in beef cows treated with progesterone vaginal devices and estradiol benzoate administered at device removal or 24 hours later. *Theriogenology*, 55,244.
- Cutaia L., Moreno, D., Villata, M.L., Bó, G.A. 2001. Synchrony of ovulation in beef cows treated with progesterone vaginal devices and estradiol benzoate administered at device removal or 24 hours later. *Theriogenology*; 55:408 abstract.
- Cutaia L., Veneranda G., Tribulo R., Baruselli P.S., Bó G.A. 2003. Programas de inseminación artificial a tiempo fijo: Análisis de factores que afectan los resultados. Resúmenes de V simposio Internacional de Reproducción Animal. Huerta Grande, Córdoba, Argentina. pp 119-132
- Cutaia, L.; Balla, E.; Bó, Gabriel A. 2005. Efecto del momento de la administración de Benzoato o Cipionato de Estradiol para inducir la ovulación en vaquillonas tratadas con DIB e inseminadas a tiempo fijo. VI Simposio Internacional de Reproducción Animal. p. 394

- Dalton J.C. 2013. Características del semen de relevancia para la inseminación artificial a tiempo fijo. Resúmenes X Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba pp183-198.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzales 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>.
- Ferreira R.M., Ayres H., Sales J.N.S., Souza A.H., Rodriguez C.A., Baruselli P.S. 2013. Effects 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.
- Fields SF. Effects of an Injection of GnRH and Initiation of Standing Estrus on Initiation of LH Pulses, LH Release, and Subsequent Concentrations of Progesterone. MS Thesis; Brookings: South Dakota State University; 2008.
- Garcia-Ipsilerto I., Lopez Helguera I., Martino A., Lopez Gatus 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.
- Geary T.W. and Whittier J.C. 2001 Effects of timed insemination following synchronization of ovulation using the Ovsynch or CO-Synch protocol in beef cows. *The Professional Animal Scientist* 14: 217-220.
- 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 (Pags 33-56). Mexico: Ed McGraw- Hill Interamericana.
- 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 prostaglandin F_{2α} in combination with megestrol acetate. *J. Anim. Sci.*, 81, 830-835.
- Kastelic J. P., Mapletoft R. J. 1998. Ovarian follicular responses in dairy cows treated with GnRH and cloprostenol. *Can Vet J* 1998; 39: 107-109.
- Lamb GC, Stevenson JS, Kesler DJ, Garverick HA, Brown DR, Salfen BE. 2001. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F_{2α} for ovulation control in postpartum suckled beef cows. *J Anim Sci* 2001;79:2253-9.
- Lee CN, Maurice E, Ax RL, Pennington JA, Hoffman WF, Brown MD. 1983. Efficacy of gonadotropin-releasing hormone administered at the time of artificial insemination of heifers and postpartum and repeat breeder dairy cows. *Am J Vet Res* 1983;44:2160-3.
- Lima M.E., Brauner C.C., Freitas V.O., Krause A.R.T., Gularte E.X., Burkert Del Pino F.A., Rabassa V., Corrêa M.N. 2015. Reproductive Responses of Lactating Dairy Cows According to Estrus Behavior and CIDR Uses in a Heatsynch Protocol. *Acta Scientiae Veterinariae*. 43: 1256.

- Lonergan P., Forde N., Spencer T. 2016. Role of progesterone in embryo development in cattle. *Reproduction, Fertility and Development* 28: 66-74
- López del Cerro P., Scándolo D.G., Vanzetti L., Cuatrín A., Scándolo D., Maciel M. 2011. Efecto de la aplicación de Licerelina en la fertilidad de vaquillonas Braford que no manifiestan celo previo a la IATF. Resúmenes IX Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina. pp. 326 (abstract).
- Lucy, M. C., and J. S. Stevenson. 1986. Gonadotrophin-releasing hormone at estrus: Luteinizing hormone, estradiol and progesterone during the periestrual and postinsemination periods in dairy cattle. *Biol. Reprod.* 35:300–311.
- Machaty Z. Peippo J., Peter A. 2012. Production and manipulation of bovine embryos: techniques and terminology. *Theriogenology* 78 (5):937-950.
- Mann, G.E., Lamming, G.E., 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 121, 175–180.
- 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
- McDonald LE, Nichols RE, McNutt SH. 1983. Study of corpus luteum ablation and progesterone replacement therapy in cattle. *Am Journal Vet Res* 1952;13:446–51.
- Mee MO, Stevenson JS, Alexander BM, Sasser RG. 1993. Administration of GnRH at estrus influences pregnancy rates, serum concentrations of LH, FSH, estradiol-17 beta, pregnancy-specific protein B, and progesterone, proportion of luteal cell types, and in vitro production of progesterone in dairy cows. *J Anim Sci* 1993;71:185–98.
- Menchaca A, Núñez R, Wijma R, García Pintos C, Fabini F, de Castro T. 2013. How fertility can be improved in fixed-time AI programs in beef cattle. Resúmenes X Simposio Internacional de Reproducción Animal, IRAC, Córdoba, 103-134.
- Moreno D., Cutaia L., Villata L., Otisi F., Bó G.A. 2001 Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol and progesterone. *Theriogenology* 55: 408 (abstract)
- Morgan WF, Lean IJ. 1993. Gonadotrophin-releasing hormone treatment in cattle: a meta-analysis of the effects on conception at the time of insemination. *Aust Vet J* 1993;70:205–209.
- Perez Wallace, S.M. 2013. Tratamientos hormonales para reducir perdidas gde gestacion en vacas lecheras. En Tesis Doctoral. La Plata, Argentina: Universidad Nacional de la plata, Facultad de Ciencias Veterinarias. 76 pp

- Pursley R.J., Mee M.O. and Wiltbank M.C., 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂ α and GnRH. *Theriogenology* 44(7):915-23.
- Pursley J.R., Silcox R.W., Wiltbank M.C. 1998. Effect of time on 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.
- Randel, R. D. 1990. Nutrition and postpartum rebreeding in cattle. *Journal animal Science* 68; 853-862.
- 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*, 62, 979-981.
- Sá Filho M.F., Santos J.E.P., Ferreira R.M., Sales J.N.S., Baruselli P.S. 2011. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone based timed insemination protocols. *Theriogenology* 76, 455–463
- Saake R.G., Nadir S., Nebel R.L. 1994. Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization and embryo quality in ruminants. *Theriogenology* 41; 45-50.
- Sales J.N.S., Carvalho J.B.P., Crepaldi G.A., Cipriano R.S., Jacomini J.O., Maio J.R.G., Sousa J.C., Nogueira G.P., Baruselli P.S. 2012. Effects of two estradiol esters (Benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulation in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* (78), 510-516.
- 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.
- Schels HF, Mostafawi D. 1978. The effect of Gn-RH on the pregnancy rate of artificially inseminated cows. *Vet Rec* 1978;103:31–2.
- Sorroarain, N., Vaca R.J.A., Fernández Francia M.G., Lares S.F., de La Sota R.L., Baldo A. 2005. Eficiencia de la utilización de benzoato de estradiol a las 0 ó 24 horas del retirado el dispositivo intravaginal con progesterona para inducir la ovulación en vacas multíparas para carne. Resúmenes VI Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina, abstract. p 425.
- Souza A.H., Wosniacki A.M., Torres-Junior J.R.S., Martins C.M., Ayres H., Baruselli P.S. 2006. Factores que afetam o volume do corpo luteo 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., Viechnieski S., Lima F.A., Silva F.F., Araujo R., Bo 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.

- Steward 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., Macmillan K.L. Hensen P.J. Drost M. 1989. Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology* 31 149-164.
- Thatcher W.W., Moreira F., Santos J.E.P., Mattos R.C., Lopes F.L., Pancarci S.M., Risco C.A, 2001. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology*, 55, 75-90.
- Thomas J.M., Poock S. E., Ellersieck M. R., Smith M. F., Patterson D. J. 2014. Delayed insemination of non-estrous heifers and cows when using conventional semen in timed artificial insemination. *J. Anim. Sci.* 92:4189-419.
- Tribulo H.E., Bárdon J., Combessies G., Martinez A. 2006. Manejo reproductivo en rodeos de carne IRAC 236 pp.
- Tschopp J.C. 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, Córdoba, Argentina. pag. 209-233.
- Tschopp J. C. 2016. Efecto de La expresión de celos y la adición de GnRH sobre la tasa de preñez en vacas Holando Argentino en lactancia sincronizadas con estradiol y dispositivos con progesterona. M. S.c., Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Córdoba (UNC). Córdoba. 84 pp 37.
- 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 on 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.
- Veneranda G., Filippi L., Racca D., Cutaia L., Bo G.A. 2008. Pregnancy rates in dairy cows treated with intravaginal progesterone devices and GnRH or estradiol benzoate and eCG. *Reprod. Fertil. Dev.*, 20,91 (Abstract)
- Vera Cedeño A.2017. Efecto del cello y el tratamiento con GnRH sobre la tasa de concepción en programas de inseminación artificial y transferencia de embriones bovinos. M. S.c., Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Córdoba (UNC). Córdoba. 98 pp.
- Vynckier L. Debackere M., De Kruif, Coryn M. 1990. Plasma estradiol-17 β concentration in the cow during induced estrus and after injection of estradiol-17 β benzoate and estradiol-17 β cypionate – a preliminary study. *J.Vet. Pharmacol Theriogenology*, 13, 36-42.

- Zabala N., Repiso G., Miranda., Cutaia L. 2013a. Efecto de La aplicación de GnRH 12 h antes de la IATF en vaquillonas de 24 meses que no manifestaron celo sobre los porcentajes de preñez. Resúmenes X Simposio Internacional de reproducción Animal, (Pag. 329 (Abstract)). Córdoba, Argentina.
- Zabala N., Repiso G., Miranda., Cutaia L. 2013b. Efecto de La aplicación de GnRH 12 h antes de la IATF en vacas Braford con cría al pie que no manifestaron celo sobre los porcentajes de preñez. Resúmenes X Simposio Internacional de reproducción Animal, (Pag. 330 (Abstract)). Córdoba, Argentina.
- Zabala N., Repiso G., Miranda., Cutaia L. 2013c. Efecto de La aplicación de GnRH 12 h antes de la IATF en vacas Braford sin cría al pie que no manifestaron celo sobre los porcentajes de preñez. Resúmenes X Simposio Internacional de reproducción Animal, (Pag. 331 (Abstract)). Córdoba, Argentina.